



# Infections liées aux mycobactéries du complexe abscessus diagnostiquées chez les patients mucoviscidosiques suivis au CHU de Rouen entre 2004 et 2012

Aurélie Simeon

## ► To cite this version:

Aurélie Simeon. Infections liées aux mycobactéries du complexe abscessus diagnostiquées chez les patients mucoviscidosiques suivis au CHU de Rouen entre 2004 et 2012. *Pharmaceutical sciences*. 2012. <dumas-00760627>

**HAL Id: dumas-00760627**

**<http://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-00760627>**

Submitted on 4 Dec 2012

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

**U.F.R. DE MEDECINE ET DE PHARMACIE DE ROUEN**

**Année 2012**

**N°**

**MEMOIRE**  
**DU DIPLOME D'ETUDES SPECIALISEES DE BIOLOGIE MEDICALE**

**Aurélie SIMEON**  
Née le 07 juin 1983 à Dieppe

Présentée et soutenue publiquement le 9 octobre 2012

Conformément aux dispositions de l'Arrêté du 4 octobre 1988 tient lieu de :

**THESE**  
**POUR LE DIPLOME D'ETAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE**

---

**INFECTIONS LIEES AUX MYCOBACTERIES DU  
COMPLEXE *ABSCISSUS* DIAGNOSTIQUEES CHEZ LES  
PATIENTS MUCOVISCIDOSIQUES SUIVIS AU CHU DE  
ROUEN ENTRE 2004 ET 2012**

---

**JURY :**

**PRESIDENT :** Madame le Professeur Martine PESTEL-CARON

**MEMBRES :** Monsieur le Professeur Christophe MARGUET  
Monsieur le Docteur Stéphane DOMINIQUE  
Monsieur le Docteur Ludovic LEMEE

ANNEE UNIVERSITAIRE 2011 - 2012  
U.F.R. DE MEDECINE~PHARMACIE DE ROUEN

-----

DOYEN :	Professeur Pierre FREGER
ASSESEURS :	Professeur Michel GUERBET Professeur Benoit VEBER Professeur Pascal JOLY Professeur Bernard PROUST
DOYENS HONORAIRES :	Professeurs J. BORDE - Ph. LAURET - H. FIGUET – C. THUILLEZ
PROFESSEURS HONORAIRES :	MM. M-P AUGUSTIN - J.ANDRIEU-GUTTRANCOURT - M.BENOZIO- J.BORDE - Ph. BRASSEUR - R. COLIN - E. COMOY - J. DALION -. DESHAYES - C. FESSARD – J.P FILLASTRE - P.FRIGOT -J. GARNIER - J. HEMET - B. HILLEMAND - G. HUMBERT - J.M. JOUANY - R. LAUMONIER – Ph. LAURET - M. LE FUR – J.P. LEMERCIER - J.P LEMOINE - Mle MAGARD - MM. B. MAITROT - M. MAISONNET - F. MATRAY - P.MITROFANOFF - Mme A. M. ORECCHIONI - P. PASQUIS - H.FIGUET - M.SAMSON – Mme SAMSON-DOLLFUS – J.C. SCHRUB - R.SOYER - B.TARDIF -.TESTART - J.M. THOMINE – C. THUILLEZ - P.TRON - C.WINCKLER - L.M.WOLF

I - MEDECINE
--------------

**PROFESSEURS**

M. Frédéric ANSELME	HCN	Cardiologie
M. Bruno BACHY	HCN	Chirurgie pédiatrique
M. Fabrice BAUER	HCN	Cardiologie
Mme Soumeya BEKRI	HCN	Biochimie et Biologie Moléculaire
M. Jacques BENICHOU	HCN	Biostatistiques et informatique médicale
M. Eric BERCOFF	HB	Médecine interne (gériatrie)
M. Jean-Paul BESSOU	HCN	Chirurgie thoracique et cardio-vasculaire
Mme Françoise BEURET-BLANQUART	CRMPR	Médecine physique et de réadaptation
M. Guy BONMARCHAND	HCN	Réanimation médicale
M. Olivier BOYER	UFR	Immunologie
M. Jean-François CAILLARD	HCN	Médecine et santé au Travail
M. François CARON	HCN	Maladies infectieuses et tropicales
M. Philippe CHASSAGNE	HB	Médecine interne (Gériatrie)
M. Alain CRIBIER ( <i>Surnombre</i> )	HCN	Cardiologie
M. Antoine CUVELIER	HB	Pneumologie

M. Pierre <b>CZERNICHOW</b>	HCH	Epidémiologie, économie de la santé
M. Jean - Nicolas <b>DACHER</b>	HCN	Radiologie et Imagerie Médicale
M. Stéfan <b>DARMONI</b>	HCN	Informatique Médicale/Techniques de communication
M. Pierre <b>DECHELOTTE</b>	HCN	Nutrition
Mme Danièle <b>DEHESDIN</b>	HCN	Oto-Rhino-Laryngologie
M. Philippe <b>DENIS (Surnombre)</b>	HCN	Physiologie
M. Jean <b>DOUCET</b>	HB	Thérapeutique/Médecine – Interne - Gériatrie.
M. Bernard <b>DUBRAY</b>	CB	Radiothérapie
M. Philippe <b>DUCROTTE</b>	HCN	Hépatogastro-entérologie
M. Frank <b>DUJARDIN</b>	HCN	Chirurgie Orthopédique - Traumatologique
M. Fabrice <b>DUPARC</b>	HCN	Anatomie - Chirurgie Orthopédique et Traumatologique
M. Bertrand <b>DUREUIL</b>	HCN	Anesthésiologie et réanimation chirurgicale
Mlle Hélène <b>ELTCHANINOFF</b>	HCN	Cardiologie
M. Thierry <b>FREBOURG</b>	UFR	Génétique
M. Pierre <b>FREGER</b>	HCN	Anatomie/Neurochirurgie
M. Jean François <b>GEHANNO</b>	HCN	Médecine et Santé au Travail
M. Emmanuel <b>GERARDIN</b>	HCN	Imagerie Médicale
Mme Priscille <b>GERARDIN</b>	HCN	Pédopsychiatrie
M. Michel <b>GODIN</b>	HB	Néphrologie
M. Philippe <b>GRISE</b>	HCN	Urologie
M. Didier <b>HANNEQUIN</b>	HCN	Neurologie
M. Fabrice <b>JARDIN</b>	CB	Hématologie
M. Luc-Marie <b>JOLY</b>	HCN	Médecine d'urgence
M. Pascal <b>JOLY</b>	HCN	Dermato - vénéréologie
M. Jean-Marc <b>KUHN</b>	HB	Endocrinologie et maladies métaboliques
Mme Annie <b>LAQUERRIERE</b>	HCN	Anatomie cytologie pathologiques
M. Vincent <b>LAUDENBACH</b>	HCN	Anesthésie et réanimation chirurgicale
M. Alain <b>LAVOINNE</b>	UFR	Biochimie et biologie moléculaire
M. Joël <b>LECHEVALLIER</b>	HCN	Chirurgie infantile
M. Hervé <b>LEFEBVRE</b>	HB	Endocrinologie et maladies métaboliques
M. Xavier <b>LE LOET</b>	HB	Rhumatologie
M. Eric <b>LEREBOURS</b>	HCN	Nutrition
Mlle Anne-Marie <b>LEROI</b>	HCN	Physiologie
M. Hervé <b>LEVESQUE</b>	HB	Médecine interne
Mme Agnès <b>LIARD-ZMUDA</b>	HCN	Chirurgie Infantile

M. Bertrand <b>MACE</b>	HCN	Histologie, embryologie, cytogénétique
M. Eric <b>MALLET</b> ( <i>Surnombre</i> )	HCN	Pédiatrie
M. Christophe <b>MARGUET</b>	HCN	Pédiatrie
Mlle Isabelle <b>MARIE</b>	HB	Médecine Interne
M. Jean-Paul <b>MARIE</b>	HCN	ORL
M. Loïc <b>MARPEAU</b>	HCN	Gynécologie - obstétrique
M. Stéphane <b>MARRET</b>	HCN	Pédiatrie
M. Pierre <b>MICHEL</b>	HCN	Hépatologie - Gastro - Entérologie
M. Francis <b>MICHOT</b>	HCN	Chirurgie digestive
M. Bruno <b>MIHOUT</b>	HCN	Neurologie
M. Pierre-Yves <b>MILLIEZ</b>	HCN	Chirurgie plastique, reconstructrice et esthétique
M. Jean-François <b>MUIR</b>	HB	Pneumologie
M. Marc <b>MURAINÉ</b>	HCN	Ophthalmologie
M. Philippe <b>MUSETTE</b>	HCN	Dermatologie - Vénérologie
M. Christophe <b>PEILLON</b>	HCN	Chirurgie générale
M. Jean-Marc <b>PERON</b>	HCN	Stomatologie et chirurgie maxillo-faciale
M. Christian <b>PFISTER</b>	HCN	Urologie
M. Jean-Christophe <b>PLANTIER</b>	HCN	Bactériologie - Virologie
M. Didier <b>PLISSONNIER</b>	HCN	Chirurgie vasculaire
M. Bernard <b>PROUST</b>	HCN	Médecine légale
M. François <b>PROUST</b>	HCN	Neurochirurgie
Mme Nathalie <b>RIVES</b>	HCN	Biologie et méd. du dévelop. et de la reprod.
M. Jean-Christophe <b>RICHARD</b> ( <i>Mise en dispo</i> )	HCN	Réanimation Médicale, Médecine d'urgence
M. Horace <b>ROMAN</b>	HCN	Gynécologie Obstétrique
M. Jean-Christophe <b>SABOURIN</b>	HCN	Anatomie – Pathologie
M. Guillaume <b>SAVOYE</b>	HCN	Hépatologie - Gastro
M. Michel <b>SCOTTE</b>	HCN	Chirurgie digestive
Mme Fabienne <b>TAMION</b>	HCN	Thérapeutique
Mlle Florence <b>THIBAUT</b>	HCN	Psychiatrie d'adultes
M. Luc <b>THIBERVILLE</b>	HCN	Pneumologie
M. Christian <b>THUILLEZ</b>	HB	Pharmacologie
M. Hervé <b>TILLY</b>	CB	Hématologie et transfusion
M. François <b>TRON</b> ( <i>Surnombre</i> )	UFR	Immunologie
M. Jean-Jacques <b>TUECH</b>	HCN	Chirurgie digestive
M. Jean-Pierre <b>VANNIER</b>	HCN	Pédiatrie génétique

M. Benoît <b>VEBER</b>	HCN	Anesthésiologie Réanimation chirurgicale
M. Pierre <b>VERA</b>	C.B	Biophysique et traitement de l'image
M. Eric <b>VERSPYCK</b>	HCN	Gynécologie obstétrique
M. Olivier <b>VITTECOQ</b>	HB	Rhumatologie
M. Jacques <b>WEBER</b>	HCN	Physiologie

### MAITRES DE CONFERENCES

Mme Noëlle <b>BARBIER-FREBOURG</b>	HCN	Bactériologie – Virologie
M. Jeremy <b>BELLIEN</b>	HCN	Pharmacologie
Mme Carole <b>BRASSE LAGNEL</b>	HCN	Biochimie
Mme Mireille <b>CASTANET</b>	HCN	Pédiatrie
M. Gérard <b>BUCHONNET</b>	HCN	Hématologie
Mme Nathalie <b>CHASTAN</b>	HCN	Physiologie
Mme Sophie <b>CLAEYSSENS</b>	HCN	Biochimie et biologie moléculaire
M. Moïse <b>COEFFIER</b>	HCN	Nutrition
M. Vincent <b>COMPERE</b>	HCN	Anesthésiologie et réanimation chirurgicale
M. Manuel <b>ETIENNE</b>	HCN	Maladies infectieuses et tropicales
M. Guillaume <b>GOURCEROL</b>	HCN	Physiologie
Mme Catherine <b>HAAS-HUBSCHER</b>	HCN	Anesthésie - Réanimation chirurgicale
M. Serge <b>JACQUOT</b>	UFR	Immunologie
M. Joël <b>LADNER</b>	HCN	Epidémiologie, économie de la santé
M. Jean-Baptiste <b>LATOUCHE</b>	UFR	Biologie Cellulaire
Mme Lucie <b>MARECHAL-GUYANT</b>	HCN	Neurologie
M. Jean-François <b>MENARD</b>	HCN	Biophysique
Mme Muriel <b>QUILLARD</b>	HCN	Biochimie et Biologie moléculaire
M. Vincent <b>RICHARD</b>	UFR	Pharmacologie
M. Francis <b>ROUSSEL</b>	HCN	Histologie, embryologie, cytogénétique
Mme Pascale <b>SAUGIER-VEBER</b>	HCN	Génétique
Mme Anne-Claire <b>TOBENAS-DUJARDIN</b>	HCN	Anatomie
M. Eric <b>VERIN</b>	HCN	Physiologie

### MAITRE DE CONFERENCES ASSOCIE A MI-TEMPS

M. Thierry <b>LEQUERRE</b>	HB	Rhumatologie
M. Fabien <b>DOGUET</b>	HCN	Chirurgie thoracique et cardio-vasculaire

**PROFESSEUR AGREGE OU CERTIFIE**Mme Dominique **LANIEZ**

UFR      Anglais

Mme Michèle **GUIGOT**

UFR      Sciences humaines - Techniques d'expression

<b>II - PHARMACIE</b>
-----------------------

**PROFESSEURS**

M. Thierry <b>BESSON</b>	Chimie Thérapeutique
M. Jean-Jacques <b>BONNET</b>	Pharmacologie
M. Roland <b>CAPRON</b> (PU-PH)	Biophysique
M. Jean <b>COSTENTIN</b> (PU-PH)	Pharmacologie
Mme Isabelle <b>DUBUS</b>	Biochimie
M. Loïc <b>FAVENNEC</b> (PU-PH)	Parasitologie
M. Michel <b>GUERBET</b>	Toxicologie
M. Olivier <b>LAFONT</b>	Chimie organique
Mme Isabelle <b>LEROUX</b>	Physiologie
Mme Elisabeth <b>SEGUIN</b>	Pharmacognosie
M. Marc <b>VASSE</b> (PU-PH)	Hématologie
M Jean-Marie <b>VAUGEOIS</b> (Délégation CNRS)	Pharmacologie
M. Philippe <b>VERITE</b>	Chimie analytique

**MAITRES DE CONFERENCES**

Mle Cécile <b>BARBOT</b>	Chimie Générale et Minérale
Mme Dominique <b>BOUCHER</b>	Pharmacologie
M. Frédéric <b>BOUNOURE</b>	Pharmacie Galénique
Mme Martine <b>PESTEL-CARON</b>	Microbiologie
M. Abdeslam <b>CHAGRAOUI</b>	Physiologie
M. Jean <b>CHASTANG</b>	Biomathématiques
Mme Marie Catherine <b>CONCE-CHEMTOB</b>	Législation pharmaceutique et économie de la santé
Mme Elizabeth <b>CHOSSON</b>	Botanique
Mle Cécile <b>CORBIERE</b>	Biochimie
M. Eric <b>DITTMAR</b>	Biophysique
Mme Nathalie <b>DOURMAP</b>	Pharmacologie
Mle Isabelle <b>DUBUC</b>	Pharmacologie
Mme Roseline <b>DUCLOS</b>	Pharmacie Galénique
M. Abdelhakim <b>ELOMRI</b>	Pharmacognosie
M. François <b>ESTOUR</b>	Chimie Organique



M. Gilles <b>GARGALA</b> (MCU-PH)	Parasitologie
Mme Najla <b>GHARBI</b>	Chimie analytique
Mle Marie-Laure <b>GROULT</b>	Botanique
M. Hervé <b>HUE</b>	Biophysique et Mathématiques
Mme Hong <b>LU</b>	Biologie
Mme Sabine <b>MENAGER</b>	Chimie organique
Mme Christelle <b>MONTEIL</b>	Toxicologie
M. Paul <b>MULDER</b>	Sciences du médicament
M. Mohamed <b>SKIBA</b>	Pharmacie Galénique
Mme Malika <b>SKIBA</b>	Pharmacie Galénique
Mme Christine <b>THARASSE</b>	Chimie thérapeutique
M. Rémi <b>VARIN</b> (MCU-PH)	Pharmacie Hospitalière
M. Frédéric <b>ZIEGLER</b>	Biochimie

### **PROFESSEUR ASSOCIE**

M. Jean-Pierre <b>GOULLE</b>	Toxicologie
------------------------------	-------------

### **MAITRE DE CONFERENCE ASSOCIE**

Mme Sandrine <b>PANCHOU</b>	Pharmacie Officinale
-----------------------------	----------------------

### **PROFESSEUR AGREGE OU CERTIFIE**

Mme Anne-Marie <b>ANZELLOTTI</b>	Anglais
----------------------------------	---------

### **ATTACHE TEMPORAIRE D'ENSEIGNEMENT ET DE RECHERCHE**

M. Bérénice <b>COQUEREL</b>	Chimie Analytique
M. Johann <b>PELTIER</b>	Microbiologie

**CHEF DES SERVICES ADMINISTRATIFS : Mme Véronique DELAFONTAINE**

HCN - Hôpital Charles Nicolle

HB - Hôpital de BOIS GUILLAUME

CB - Centre HENRI BECQUEREL

CHS - Centre Hospitalier Spécialisé du Rouvray

CRMPR - Centre Régional de Médecine Physique et de Réadaptation

<b>III – MEDECINE GENERALE</b>
--------------------------------

**PROFESSEURS**

M. Jean-Loup <b>HERMIL</b>	UFR	Médecine générale
----------------------------	-----	-------------------

**PROFESSEURS ASSOCIES A MI-TEMPS :**

M. Pierre <b>FAINSILBER</b>	UFR	Médecine générale
-----------------------------	-----	-------------------

M. Alain <b>MERCIER</b>	UFR	Médecine générale
-------------------------	-----	-------------------

M. Philippe <b>NGUYEN THANH</b>	UFR	Médecine générale
---------------------------------	-----	-------------------

**MAITRE DE CONFERENCES ASSOCIE A MI-TEMPS :**

M Emmanuel <b>LEFEBVRE</b>	UFR	Médecine générale
----------------------------	-----	-------------------

Mme Elisabeth <b>MAUVIARD</b>	UFR	Médecine générale
-------------------------------	-----	-------------------

Mme Marie Thérèse <b>THUEUX</b>	UFR	Médecine générale
---------------------------------	-----	-------------------

<b>LISTE DES RESPONSABLES DE DISCIPLINE</b>
---

Melle Cécile <b>BARBOT</b>	Chimie Générale et Minérale
M. Thierry <b>BESSON</b>	Chimie thérapeutique
M. Roland <b>CAPRON</b>	Biophysique
M Jean <b>CHASTANG</b>	Mathématiques
Mme Marie-Catherine <b>CONCE-CHEMTOB</b>	Législation, Economie de la Santé
Mle Elisabeth <b>CHOSSON</b>	Botanique
M. Jean <b>COSTENTIN</b>	Pharmacodynamie
Mme Isabelle <b>DUBUS</b>	Biochimie
M. Loïc <b>FAVENNEC</b>	Parasitologie
M. Michel <b>GUERBET</b>	Toxicologie
M. Olivier <b>LAFONT</b>	Chimie organique
M. Jean-Louis <b>PONS</b>	Microbiologie
Mme Elisabeth <b>SEGUIN</b>	Pharmacognosie
M. Mohamed <b>SKIBA</b>	Pharmacie Galénique
M. Marc <b>VASSE</b>	Hématologie
M. Philippe <b>VERITE</b>	Chimie analytique

**ENSEIGNANTS MONO-APPARTENANTS****MAITRES DE CONFERENCES****M. Sahil ADRIOUCH**Biochimie et biologie moléculaire  
(Unité Inserm 905)**Mme Gaëlle BOUGEARD-DENOYELLE**Biochimie et biologie moléculaire  
(Unité Inserm 614)**M. Antoine OUVRARD-PASCAUD**

Physiologie (Unité Inserm 644)

**PROFESSEURS DES UNIVERSITES****M. Mario TOSI**Biochimie et biologie moléculaire  
(Unité Inserm 614)**M. Serguei FETISSOV**

Physiologie (Groupe ADEN)

**Mme Su RUAN**

# **REMERCIEMENTS**

**A mon Président et Directeur de thèse,**

**Madame le Professeur Martine PESTEL-CARON,**

*Pour m'avoir fait l'honneur de diriger et présider le jury de cette thèse.*

*Pour l'intérêt que vous avez porté à mon travail, pour votre disponibilité, vos conseils, vos encouragements et votre aide qui ont permis son aboutissement.*

*Veillez trouver dans ce travail l'expression de mes sincères remerciements.*

**A mes juges,**

**Monsieur le Professeur MARGUET,**

*Pour avoir accepté de juger cette thèse,*

*Veillez trouver ici l'expression de mes vifs remerciements.*

**Monsieur le Docteur Stéphane DOMINIQUE,**

*Pour avoir accepté de juger cette thèse,*

*Veillez trouver ici l'expression de mes sincères remerciements.*

**Monsieur le Docteur Ludovic LEMEE,**

*Pour avoir accepté de juger cette thèse,*

*Merci de ta gentillesse et ta disponibilité pour toutes mes questions.*

**A tous mes collègues,**

**De l'IBC du CHU de Rouen, du laboratoire d'Elbeuf et de Becquerel,**

*Merci pour avoir participé à ma formation et pour l'expérience que vous m'avez apporté.*

**A toute l'équipe du laboratoire Fievez-Igout,**

*Merci pour toutes ces années à travailler ensemble.*

**A toute l'équipe des « Bécassines » du laboratoire de bactériologie du CHU de Rouen**

*Dont je suis fier d'avoir fait parti*

*Merci pour votre gentillesse, vos connaissances, et votre soutien tout au long de cette thèse*

*Je vous apprécie énormément.*

**A mes amis,**

**Amélie, Isa, Sophie et Omi et leurs petites familles**

*Pour toutes ces années d'amitié et de fêtes...*

*Même si je ne suis pas une mordue du téléphone, Merci d'être toujours là*

*Je vous adore.*

**A toute la troupe, Alex, Charlie, Dadou, Manu, Caro, Nounours, Vince, Eliana, Claudia, Romano, Get, Laurent, les deux Nicos, ...**

*Vous êtes des gens formidables,*

*Merci pour votre présence et votre bonne humeur sans faille.*

**Au noyau dur, Elo, Sophie (encore) et la Maléfique**

*Merci pour ce formidable internat que nous avons passé ensemble,*

*Votre soutien dans toutes les épreuves.*

*J'espère qu'il y aura encore pleins d'autres resto et soirée pizza...*

A tous ceux qui sont là aujourd'hui pour partager ce moment avec moi.

**A ma famille et belle-famille,**

*Je tiens fort à vous.*

**A mes frères, Emmanuel et Jérémy et mon petit neveu Noah**

*Pour tous les moments agréables que nous passons ensemble*

*Sans vous, la vie serait beaucoup plus triste.*

*Je vous aime.*

**A mes parents,**

*Auxquels je dédie ce travail,*

*Pour tout ce que vous m'avez inculqué et appris.*

*Merci pour votre soutien durant toutes ces années d'études*

*Pour toujours avoir cru en moi*

*Tout simplement Merci pour tout ce que vous faites pour moi*

*Je vous aime tellement.*

**A Edouard,**

*Pour être toujours présents dans les bons comme dans les mauvais moments,*

*Pour ton soutien et ton encouragement tout au long de ce travail,*

*Un grand merci pour tout ce que tu m'apportes au quotidien.*

*Love u.*



Par délibération en date du 03 mars 1967, la faculté a arrêté que les opinions émises dans les dissertations qui lui sont présentées doivent être considérées comme propres à leurs auteurs et qu'elle n'entend leur donner aucune approbation ni improbation.

# SOMMAIRE

<b>INTRODUCTION</b> .....	<b>8</b>
<b>RAPPELS BIBLIOGRAPHIQUES</b> .....	<b>10</b>
<b>I. LA MUCOVISCIDOSE</b> .....	<b>11</b>
1. <i>Epidémiologie</i> .....	11
2. <i>Physiopathologie</i> .....	13
a. Génétique .....	13
b. Protéine CFTR.....	14
c. Relation génotype/phénotype .....	16
3. <i>Manifestations respiratoires et complications infectieuses</i> .....	18
a. Physiopathologie de l'atteinte respiratoire.....	18
b. Surveillance de la fonction pulmonaire.....	18
c. Symptomatologie .....	19
d. Complications infectieuses.....	19
<b>II. MYCOBACTERIES NON TUBERCULEUSES ET MUCOVISCIDOSE</b> .....	<b>25</b>
<b>A. GENERALITES</b> .....	<b>25</b>
1. <i>Caractéristiques des mycobactéries</i> .....	25
2. <i>MNT et classification de Runyon</i> .....	27
3. <i>Epidémiologie des infections à MNT</i> .....	30
a. Réservoir .....	30
b. Transmission.....	30
c. Prévalence des infections à MNT dans la mucoviscidose.....	31
d. Facteurs prédisposants aux infections à MNT.....	36
4. <i>Critères d'infection pulmonaire</i> .....	36
5. <i>Diagnostic biologique</i> .....	38
a. Examen direct.....	38
b. Cultures.....	40
c. Identification.....	43
<b>B. MYCOBACTERIES DU COMPLEXE <i>ABSCUSSUS</i></b> .....	<b>49</b>
1. <i>Historique et taxonomie</i> .....	49
2. <i>Particularités des mycobactéries du complexe <i>abscussus</i></i> .....	50
a. Génome .....	50
b. Caractéristiques du complexe <i>abscussus</i> .....	52

3. <i>Epidémiologie des infections à mycobactéries du complexe abscessus</i> .....	54
a. Réservoir et transmission.....	54
b. Typage moléculaire.....	55
4. <i>Manifestations cliniques</i> .....	60
a. Physiopathologie.....	60
b. Formes cliniques.....	62
c. Particularités au sein du complexe.....	64
5. <i>Sensibilité in vitro aux antibiotiques</i> .....	65
a. Antibiotiques actifs.....	65
b. Mécanismes de résistance.....	66
c. Méthodes d'étude in vitro.....	69
6. <i>Traitement des infections pulmonaires</i> .....	72
a. Antibiothérapie.....	72
b. Recours à la chirurgie.....	73
c. Echec thérapeutique.....	74
<b>TRAVAUX PERSONNELS</b> .....	<b>75</b>
I. MATERIELS ET METHODES.....	76
A. ETUDE PROSPECTIVE D'UNE NOUVELLE METHODE DE DECONTAMINATION DES PRELEVEMENTS ET DE L'APPORT DU MILIEU DE CULTURE CEPACIA®.....	76
1. <i>Origine des prélèvements</i> .....	76
2. <i>Préparation des prélèvements</i> .....	77
3. <i>Examen microscopique des frottis</i> .....	78
4. <i>Mise en culture des prélèvements</i> .....	79
5. <i>Identification des cultures positives</i> .....	82
a. Méthode phénotypique.....	82
b. Méthode génotypique.....	82
B. ETUDE RETROSPECTIVE DES CAS D'INFECTIONS DUES AUX MYCOBACTERIES DU COMPLEXE <i>ABSCCESSUS</i> CHEZ LES PATIENTS MUCOVISCIDOSIQUES SUIVIS AU CRCM DE ROUEN DE 2004 A 2011.....	84
1. <i>Patients</i> .....	84
2. <i>Typage des souches par électrophorèse en champ pulsé</i> .....	85
II. RESULTATS.....	88
A. ETUDE PROSPECTIVE D'UNE NOUVELLE METHODE DE DECONTAMINATION DES PRELEVEMENTS ET DE L'APPORT DU MILIEU DE CULTURE CEPACIA®.....	88
1. <i>Description générale de la population</i> .....	88
2. <i>Résultats</i> .....	89
B. ETUDE RETROSPECTIVE.....	93
1. <i>Analyse des dossiers clinicobiologiques</i> .....	93
2. <i>Colonisation bactérienne et fongique</i> .....	94

3.	<i>Evolution du poids, de la SaO<sub>2</sub>, du VEMS et du CVF</i>	96
4.	<i>Sérologie anti-mycobactérienne</i>	96
5.	<i>Eradication microbiologique</i>	97
6.	<i>Antibiogramme des souches de mycobactéries du complexe abscessus</i>	99
7.	<i>Traitement antimycobactérien</i>	101
8.	<i>Typage moléculaire</i>	102
III.	<b>DISCUSSION</b>	105
1.	<i>Etude prospective : mise en place de la méthode de décontamination des prélèvements par la chlorhexidine et de l'ensemencement sur milieu Cepacia®</i>	105
2.	<i>Etude rétrospective des cas d'infections dues aux mycobactéries du complexe abscessus chez les patients mucoviscidosiques suivis au CRCM de Rouen</i>	110
	<b>CONCLUSION ET PERSPECTIVES</b>	<b>116</b>
	<b>BIBLIOGRAPHIE</b>	<b>118</b>
	<b>ANNEXES</b>	<b>129</b>

# TABLE DES ILLUSTRATIONS

## Figures

Figure 1 : Prévalence de la mucoviscidose en France en 2010 .....	11
Figure 2 : Evolution du nombre de patients atteints de mucoviscidose et du pourcentage d'adultes depuis 1992 .....	12
Figure 3 : Nombre d'enfants et d'adultes mucoviscidosiques aux Etats-Unis .....	12
Figure 4 : Schéma de l'alignement partiel de la séquence en amino-acide du gène CFTR .....	13
Figure 5 : Les différentes classes de mutations du gène CFTR.....	14
Figure 6 : Protéine CFTR .....	15
Figure 7 : Régulation des flux ioniques.....	15
Figure 8 : Manifestations cliniques liées à l'activité de CFTR .....	17
Figure 9 : Bactéries cliniquement importantes dans la mucoviscidose selon l'âge en 2009 .....	21
Figure 10 : Répartition des bactéries isolées d'ECBC en 1999 et 2009 en France.....	22
Figure 11 : Evolution de la colonisation bactérienne chez les patients mucoviscidosiques aux Etats-Unis.....	23
Figure 12 : Visualisation de <i>Mycobacterium avium</i> au microscope électronique .....	26
Figure 13 : Paroi des mycobactéries.....	26
Figure 14 : BAAR après coloration de Ziehl-Neelsen .....	39
Figure 15 : BAAR après coloration à l'auramine.....	39
Figure 16 : Milieux de Löwenstein-Jensen.....	41
Figure 17 : Milieu MGIT® .....	42
Figure 18 : Automate MGIT 960® BD .....	42
Figure 19 : Identification de mycobactéries par GenoType® <i>Mycobacterium</i> .....	46
Figure 20 : Algorithme d'identification des principales mycobactéries par la méthode PRA .....	47
Figure 21 : Spectre de masse de 3 mycobactéries .....	48
Figure 22 : Génome de <i>M. abscessus sensu stricto</i> CIP 104536T .....	51
Figure 23 : Colonies muqueuses (S) et rugueuses (R) de <i>M. abscessus</i> .....	52
Figure 24 : <i>M. abscessus</i> en microscopie électronique et après coloration de Ziehl.....	53
Figure 25 : Principe générale de l'électrophorèse en champ pulsé .....	56
Figure 26 : Etapes de l'électrophorèse en champ pulsé.....	57
Figure 27 : Pulsotypes obtenus avec des souches de mycobactéries du complexe <i>abscessus</i> .....	57

Figure 28 : Représentation schématique des variations observées sur les profils d'une souche en champ pulsé d'après Tenover et al. ....	58
Figure 29 : Illustration de 4 allèles définis par un nombre différent de régions répétées en tandem .....	59
Figure 30 : Principe de la rep-PCR.....	60
Figure 31 : Granulome causé par <i>M. abscessus</i> chez un patient mucoviscidosique.....	63
Figure 32 : Vue d'ensemble de la paroi cellulaire mycobactérienne et déterminants de la résistance ...	66
Figure 33 : Antibiogramme : technique de microdilution .....	70
Figure 34 : Aspect typique de mycobactéries dans un MGIT négatif .....	81
Figure 35 : Aspect des colonies sur milieu Cepacia® .....	81
Figure 36 : Dendrogramme montrant les relations génétiques des souches de mycobactéries selon les séquences du gène <i>hsp65</i> .....	83
Figure 37 : Répartition des tests effectués sur les prélèvements .....	88
Figure 38 : Tests effectués sur les 126 prélèvements .....	89
Figure 39 : Milieu de culture envahit par un champignon filamenteux .....	92
Figure 40 : Evolution du poids et des paramètres fonctionnels.....	96
Figure 41 : Sensibilité (%) aux antibiotiques des souches de mycobactéries du complexe <i>abscessus</i> des patients suivis au CRCM de Rouen .....	99
Figure 42 : Antibiotiques utilisés lors du traitement d'induction chez les 9 patients.....	101
Figure 43 : Pulsotypes des souches de mycobactéries du complexe <i>abscessus</i> obtenus lors du premier essai.....	103
Figure 44 : Pulsotypes des souches de mycobactéries du complexe <i>abscessus</i> isolés chez 7 patients mucoviscidosiques suivis au CRCM de Rouen .....	104

## Tableaux

Tableau 1 : Classification de Runyon.....	29
Tableau 2 : Caractéristiques des infections à MNT dans la mucoviscidose.....	34
Tableau 3 : Caractères cultureux et biochimiques distinctifs des souches de mycobactéries à croissance rapide.....	44
Tableau 4 : Critères d'interprétation du lien épidémiologique de souches bactériennes d'après l'analyse des profils de macrorestriction.....	58
Tableau 5 : Sensibilité aux antibiotiques des mycobactéries du complexe <i>abscessus</i> d'après Nessar et al.....	65
Tableau 6 : Résistances acquises décrites chez les mycobactéries du complexe <i>abscessus</i> .....	68
Tableau 7 : Concentrations critiques des antimycobactériens vis-à-vis des mycobactéries à croissance rapide selon le CLSI (microdilution).....	71
Tableau 8 : Antibiotiques utilisés pour le traitement des infections à mycobactéries du complexe <i>abscessus</i> .....	72
Tableau 9 : Modalités de réponse pour la lecture des examens microscopiques.....	79
Tableau 10 : Nombre de milieux solides ensemencés.....	80
Tableau 11 : Résultats détaillés des prélèvements associés à une culture de mycobactérie du complexe <i>abscessus</i> .....	90
Tableau 12 : Mycobactéries retrouvées chez les patients du CRCM de Rouen de 2004 à 2011.....	93
Tableau 13 : Caractéristiques de la population étudiée par rapport aux données nationales de 2010.....	95
Tableau 14 : Synthèse des données clinico-biologiques des 10 patients étudiés.....	98
Tableau 15 : Antibiogramme des souches du complexe <i>abscessus</i> isolées chez les 10 patients.....	100
Tableau 16 : Caractéristiques de souches analysées en champ pulsé.....	102

## Liste des abréviations

ABPA : aspergillose broncho-pulmonaire allergique  
ATS : American Thoracic Society  
BAAR : bacilles acido-alcoolo résistants  
CFTR : cystic fibrosis *transmembrane conductance regulator*  
CLSI : Clinical and Laboratory Standards Institute  
CMI : concentration minimale inhibitrice  
CNR : Centre national de Référence  
CRCM : centre de ressources et de compétence de la mucoviscidose  
CVF : capacité vitale forcée  
ECBC : examen cyto-bactériologique des crachats  
ED : examen direct  
EFR : exploration fonctionnelle respiratoire  
IMC : indice de masse corporelle  
IPE : insuffisance pancréatique externe  
MABSC : mycobactéries du complexe *abscessus*  
MAC : mycobactéries du complexe *avium-intracellulare*  
MGIT : Mycobacteria Growth Indicator Tube  
MNT : mycobactéries non tuberculeuses  
PCR : Polymerase Chain Reaction  
RFM : registre français de la mucoviscidose  
SARM : *Staphylococcus aureus* résistant à la méticilline  
SAMS : *Staphylococcus aureus* sensible à la méticilline  
SFM : Société Française de Microbiologie  
SFP : Société Française de Pédiatrie  
VEMS : volume expiratoire maximal par seconde



# **INTRODUCTION**

La mucoviscidose est une maladie génétique grave dont la prévalence est élevée en Haute-Normandie. Les patients atteints constituent un groupe à risque d'infections pulmonaires communautaires. Grâce aux progrès thérapeutiques et à l'amélioration des techniques d'identification, des agents pathogènes tels que les mycobactéries non tuberculeuses (MNT) sont de plus en plus fréquemment identifiées. Leur implication dans la dégradation de l'état clinique de ces patients est désormais reconnue.

Ainsi, des critères définissant les infections à MNT font l'objet de nouvelles recommandations. Les infections liées aux mycobactéries du complexe *abscessus* posent des problèmes thérapeutiques. En effet, celles-ci sont réputées résistantes à de nombreux antibiotiques et leur recherche dans les prélèvements respiratoires des patients atteints de mucoviscidose, indispensables à l'établissement d'un antibiogramme, est rendu difficile par la présence de nombreux micro-organismes, en particulier *Pseudomonas aeruginosa*.

Notre travail, mené en collaboration avec le Centre de Ressources et de Compétence de la Mucoviscidose (CRCM) de Rouen et le laboratoire de microbiologie du CHU de Rouen, avait deux objectifs :

- d'une part, la mise en place d'une étude prospective ayant pour but d'étudier une nouvelle technique de décontamination des prélèvements comparativement à la méthode utilisée en routine au laboratoire, et l'apport de l'utilisation du milieu Cepacia® dans l'isolement des MNT à partir des sécrétions bronchiques des patients atteints de mucoviscidose.

- d'autre part, l'étude rétrospective des dossiers des patients chez lesquels une souche de mycobactérie du complexe *abscessus* a été isolée au CHU de Rouen entre 2004 et 2011 pour recenser leurs caractéristiques cliniques et biologiques et leur évolution au fil du temps. De plus, nous avons tenté de mettre au point une méthode de typage moléculaire des souches de mycobactéries du complexe *abscessus* isolées chez ces patients.

Nos résultats expérimentaux seront exposés après quelques rappels sur la mucoviscidose et les mycobactéries non tuberculeuses, en particulier les mycobactéries du complexe *abscessus*.

# **RAPPELS BIBLIOGRAPHIQUES**

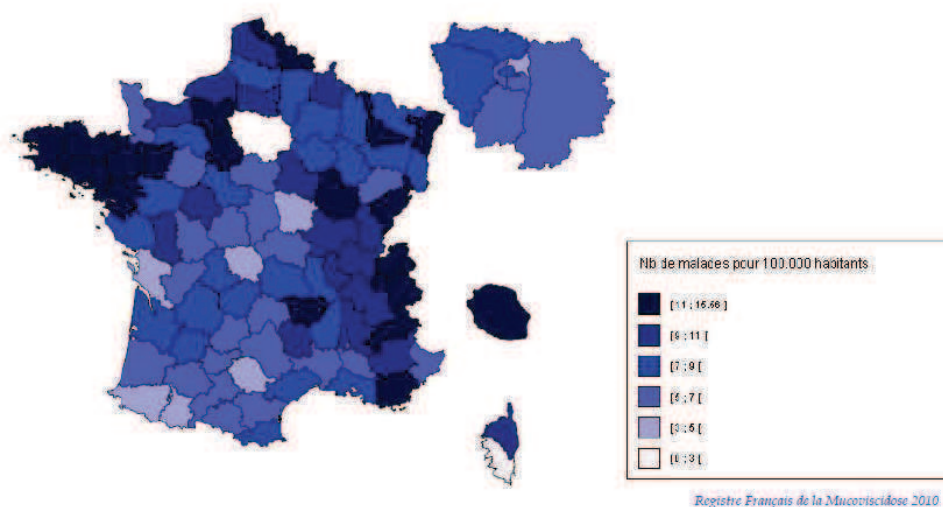
# I. LA MUCOVISCIDOSE

La mucoviscidose ou fibrose kystique est une maladie génétique affectant les épithéliums glandulaires de nombreux organes.

## 1. Epidémiologie

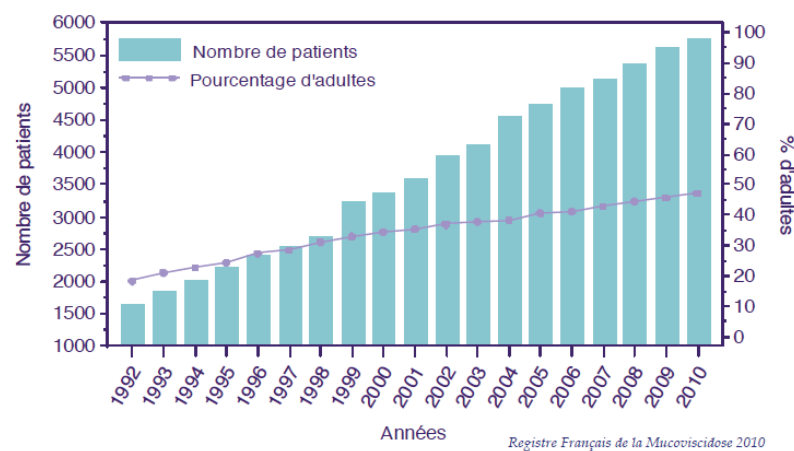
La mucoviscidose est la plus fréquente des maladies génétiques graves dans la population caucasienne. C'est une maladie héréditaire à transmission autosomique récessive, avec une incidence de 1/4500 naissances. Une personne sur 30 est porteur sain. Toutefois, ce chiffre d'incidence moyenne de la mucoviscidose masque des différences importantes existant au niveau géographique et ethnique. Il existe ainsi très peu de cas dans la population africaine (1/15000) et encore moins dans la population asiatique (1/30000) (Ravilly, 2007).

En 2010, 5792 patients atteints ont été enregistrés au Registre Français de la Mucoviscidose (RFM). On estime ce chiffre équivalent à 90% de la totalité de la population atteinte en France (Bellis, 2012). La prévalence est en moyenne de 8,4 malades pour 100 000 habitants (Bellis, 2012), la Haute-Normandie étant une des régions de France dans laquelle la prévalence est la plus élevée (*Figure 1*).



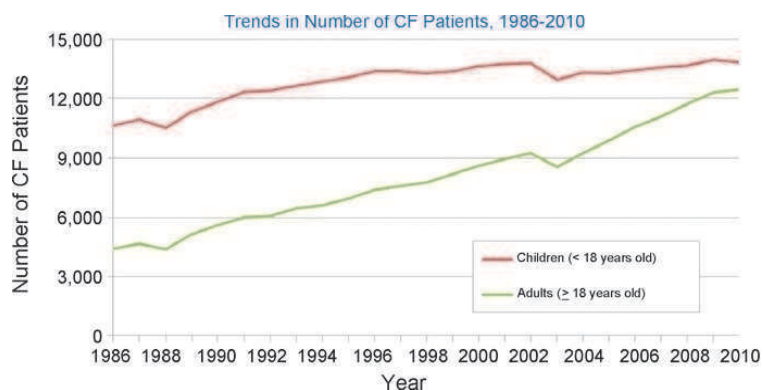
**Figure 1 : Prévalence de la mucoviscidose en France en 2010 (nombre de patients pour 100 000 habitants) (Bellis, 2012)**

Avec l'amélioration des connaissances sur les mécanismes physiopathologiques et génétiques de la maladie et les progrès concernant la prise en charge thérapeutique des complications de la mucoviscidose, la survie des patients s'est considérablement améliorée depuis les années 1960. En effet, alors que la majorité des patients mouraient avant 7 ans en 1965 ([www.vaincrelamuco.org](http://www.vaincrelamuco.org), consulté le 27 septembre 2012), la vie médiane actuelle dépasse 35 ans et l'espérance de vie 40 ans. Par conséquent, on constate que l'effectif de patients enregistré au RFM est en augmentation depuis de nombreuses années ; le nombre de patients adultes dépassera très vraisemblablement le nombre d'enfants dans les prochaines années (*Figure 2*) : ils étaient moins de 20% en 1992 et représentent désormais 45,8% des patients, même si la population reste structurellement jeune, l'âge moyen étant égal à 17,7 ans (Bellis, 2011).



**Figure 2 : Evolution du nombre de patients atteints de mucoviscidose et du pourcentage d'adultes depuis 1992 (Bellis, 2012)**

Le même constat a été effectué par la Cystic Fibrosis Foundation américaine (Quon et Aitken, 2012) (*Figure 3*).



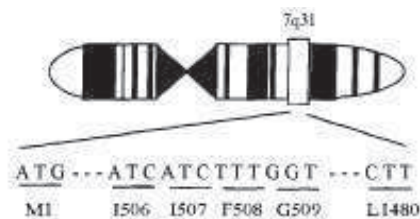
**Figure 3 : Nombre d'enfants et d'adultes mucoviscidosiques aux Etats-Unis (Quon et Aitken, 2012)**

## 2. Physiopathologie

La mucoviscidose est une maladie perturbant le fonctionnement de la protéine CFTR (Cystic Fibrosis Transmembrane conductance Regulator)

### a. Génétique

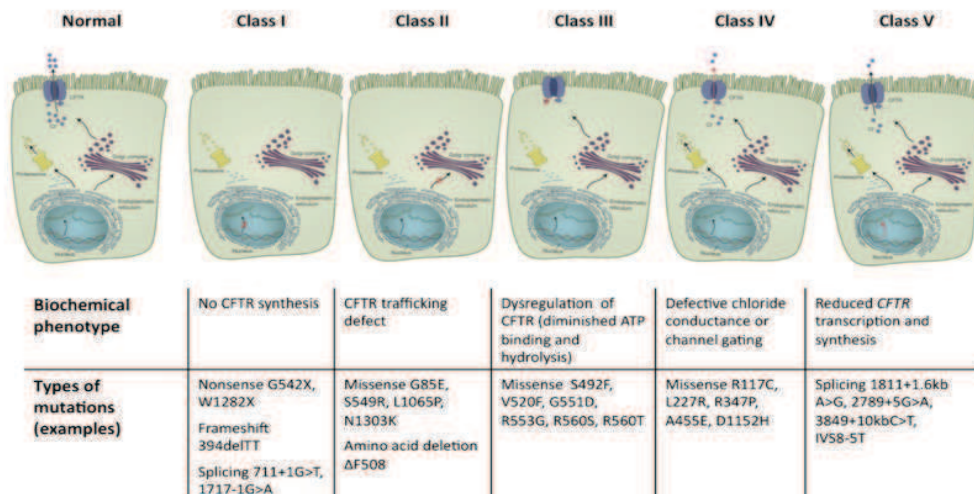
Le gène *CFTR* responsable de la mucoviscidose a été isolé par une série de clonages moléculaires et identifié en 1989 (Riordan, 1989). Ce gène de 27 exons s'étend sur 250 kb sur le bras long du chromosome 7 (locus 7q31) (*Figure 4*). Il est transcrit en ARN messager de 6,5 kb et code pour la protéine CFTR.



**Figure 4 : Schéma de l'alignement partiel de la séquence en amino-acide du gène CFTR (Becq, 2003)**

Aujourd'hui, plus de 1600 mutations de ce gène ont été répertoriées. Elles sont classées en six classes en fonction du mécanisme par lequel elles peuvent causer une perte de fonction totale ou partielle de la protéine CFTR (*Figure 5*) (Ravilly, 2007) :

- **Classe I** : mutations bloquant la synthèse de la protéine CFTR
- **Classe II** : mutations empêchant la maturation de la protéine CFTR dans le réticulum endoplasmique
- **Classe III** : mutations altérant la régulation de l'ouverture du canal chlorure
- **Classe IV** : mutations perturbant la conductance du canal CFTR
- **Classe V** : mutations réduisant la quantité de canaux CFTR fonctionnels sur la membrane
- **Classe VI** : apparue récemment, regroupe les mutations qui induisent une instabilité de la protéine CFTR.



**Figure 5 : Les différentes classes de mutations du gène CFTR**

(Classe VI non représentée)

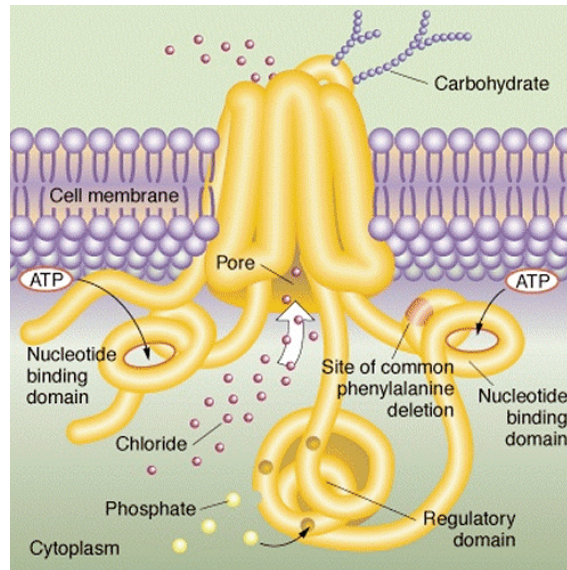
([http://mdsc638-2012.wikispaces.com/file/view/Herman\\_-\\_CF\\_classes.png/302504590/800x420/Herman\\_-\\_CF\\_classes.png](http://mdsc638-2012.wikispaces.com/file/view/Herman_-_CF_classes.png/302504590/800x420/Herman_-_CF_classes.png))

La mutation ΔF508 est la plus fréquente. Elle est retrouvée dans plus de 80% des génotypes en France (Bellis, 2012). Elle consiste en une délétion de trois nucléotides entraînant l'absence d'un acide aminé phénylalanine normalement situé en position 508 sur la protéine CFTR (Bellis, 2012). Elle fait partie des mutations de classe II.

## b. Protéine CFTR

Elle est composée de 1480 acides aminés pour un poids moléculaire de 170 KDa (Becq, 2003). Elle est synthétisée dans le réticulum endoplasmique et est finalement libérée à la membrane des épithéliums sécrétoires de nombreux organes, en particulier les poumons, les glandes sudoripares, le foie, l'intestin, le pancréas, la vésicule biliaire, les glandes salivaires, la thyroïde, le rein et le tractus génital (Ravilly, 2007).

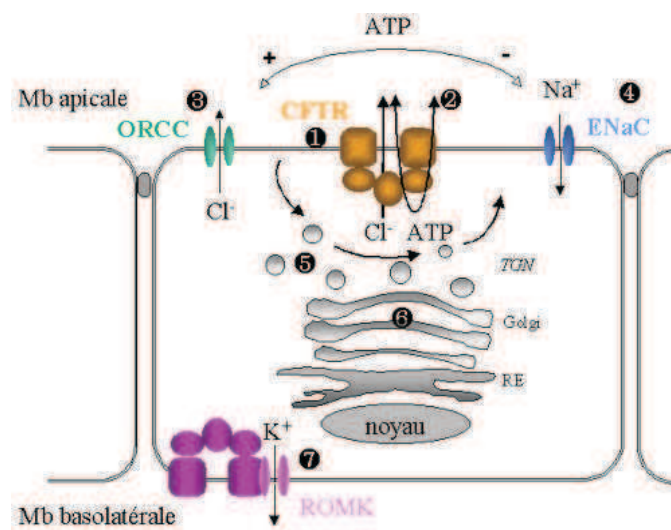
De par sa structure (Figure 6), cette glycoprotéine transmembranaire fait partie de la super famille des transporteurs ABC (*ATP-Binding Cassette*).



**Figure 6 : Protéine CFTR**

(<http://www.massgenomics.org/wp-content/uploads/2011/02/cftrdiagramlarge.gif>)

La protéine CFTR a pour principal rôle celui d'un canal chlorure de faible conductance dont l'ouverture est contrôlée par l'adénosine monophosphate cyclique (*AMPc*) (Ravilly, 2007). Le transport actif d'ions chlorure vers l'extérieur de la cellule est accompagné d'un transport passif d'eau. Cette protéine agit également à la surface de l'épithélium comme régulateur d'autres canaux ioniques notamment en activant un autre canal chlore, le canal ORCC (*Outwardly Rectifying Chloride Channel*) et à l'inverse, en inhibant les canaux *EnaC* (*sodium Epithelial Channel*) qui permettent l'absorption d'ion sodium et d'eau dans les cellules épithéliales (Figure 7)(Ravilly, 2007).



**Figure 7 : Régulation des flux ioniques**

(<http://atlasgeneticsonology.org/Educ/CisticFibFr.html>)



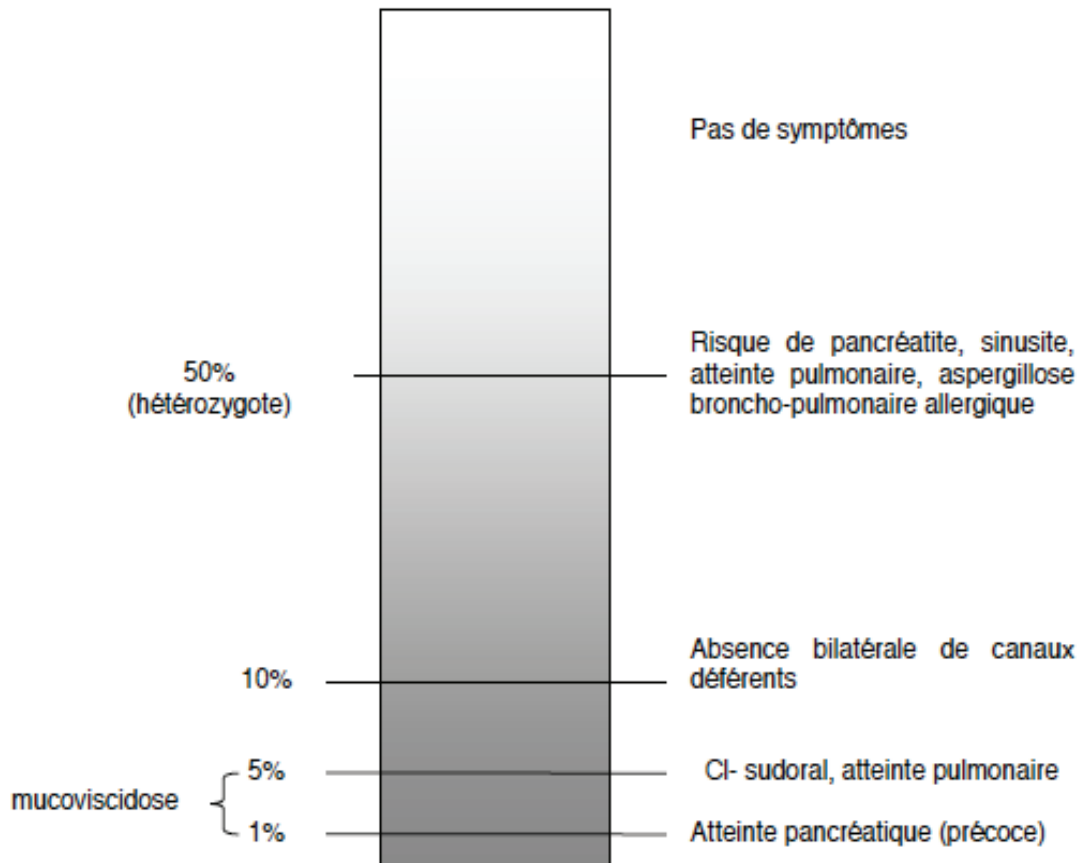
Par ces différentes fonctions, la protéine CFTR contrôle le volume et l'hydratation des sécrétions exocrines permettant une bonne clairance mucociliaire (Durieu et Josserand, 2008; Ravilly, 2007).

Dans la mucoviscidose, le dysfonctionnement de la protéine CFTR entraîne une mauvaise régulation des flux ioniques. On observe une rétention intracellulaire de chlore et une hyper-absorption de sodium, empêchant la sortie passive d'eau. Il en résulte une production de sécrétions déshydratées et visqueuses (Ravilly, 2007). L'accumulation de mucus favorise les infections broncho-pulmonaires et la réaction inflammatoire locale. Dans les glandes sudoripares, les flux d'ions sont inversés, ce qui explique la teneur élevée en chlore dans la sueur des malades et le risque de déshydratation.

La protéine CFTR a également d'autres fonctions telles que la régulation du pH des organelles intracellulaires, la stimulation de l'endocytose et l'exocytose, la régulation de la sécrétion de glycoprotéines et de mucines, le transport de l'ATP et du glutathion, la régulation de la production de certaines cytokines pro- et anti-inflammatoires (Mehta, 2005). Dans la mucoviscidose, on assiste donc à une diminution des défenses contre le stress oxydant.

### **c. Relation génotype/phénotype**

L'expression phénotypique de la maladie dépend du fonctionnement qualitatif et quantitatif de la protéine CFTR : plus son niveau d'activité est bas, plus le phénotype de la maladie est sévère (Ravilly, 2007). Lorsque l'activité de la protéine est inférieure à 10 %, une faible variation de cette activité suffit à modifier de façon importante le phénotype de la maladie (*Figure 8*). Les mutations I à III sont en général associées à des formes sévères de la maladie alors que les mutations IV à VI conduisent à des phénotypes plus modérés (Hubert, 2005).



**Figure 8 : Manifestations cliniques liées à l'activité de CFTR (HAS, Janvier 2009)**

Des études épidémiologiques, notamment celle du Cystic Fibrosis Genotype-Phenotype Consortium (Consortium, 1993), ont mis en évidence une corrélation entre le génotype et les manifestations cliniques concernant la fonction pancréatique. Ainsi, les formes avec une insuffisance pancréatique sont le plus souvent associées à des mutations de classe I, II et III.

La sévérité de l'atteinte pulmonaire est, quant à elle, variable au sein d'un même génotype CFTR, ce qui suggère l'intervention d'autres facteurs. Des gènes modificateurs de la fonction pulmonaire ont été décrits. Par exemple, le polymorphisme du gène TGF $\beta$ -1 (Transforming Growth Factor) impacte sur la sévérité de l'atteinte pulmonaire (Drumm, 2005). Des facteurs environnementaux, tels que le statut social-économique et l'exposition à la pollution aérienne ont aussi montré une influence sur l'atteinte pulmonaire (Quon et Aitken, 2012).

### **3. Manifestations respiratoires et complications infectieuses**

La présence de la protéine CFTR sur de nombreuses cellules de l'organisme implique des manifestations cliniques très diverses.

Une atteinte digestive est présente chez 80% des patients ; il peut s'agir d'insuffisance pancréatique, de manifestations gastro-intestinales, de troubles nutritionnels et d'atteintes hépatobiliaires.

Ces patients présentent également des atteintes génitales, ORL et ostéo-articulaires.

Toutefois, les manifestations respiratoires dominent le tableau clinique et restent la cause majeure de morbidité et de mortalité de la mucoviscidose (Deneuve, 2007). Elles apparaissent souvent dans l'enfance et dans plus de 80% des cas au cours de la première année de vie (Hubert, 2005).

#### **a. Physiopathologie de l'atteinte respiratoire**

Il résulte de l'inefficacité de la clairance mucociliaire, une inflammation très précoce aboutissant à la production d'un mucus visqueux et épais par les cellules glandulaires de l'épithélium respiratoire. Ceci, associé à une perte d'élasticité, engendre un encombrement des voies aériennes inférieures. Des infections broncho-pulmonaires se succèdent alors (Deneuve, 2007).

A long terme, l'inflammation chronique aboutit à des modifications profondes de la structure bronchique : la paroi bronchique forme des bronchectasies et au niveau bronchiolaire apparaissent des zones parenchymateuses atelectasiées et des zones emphysémateuses (Deneuve, 2007).

Le cercle vicieux "obstruction-infection-inflammation" conduit à long terme à l'insuffisance respiratoire et au décès du patient en l'absence de greffe pulmonaire (Deneuve, 2007; SFM, 2010).

#### **b. Surveillance de la fonction pulmonaire**

La surveillance de la fonction pulmonaire repose sur la radiographie, parfois le scanner, et l'exploration fonctionnelle respiratoire (EFR). L'EFR consiste à faire souffler les patients dans un appareil qui mesure plusieurs paramètres, tels que le volume expiratoire maximum en une seconde (VEMS) et la capacité vitale forcée (CVF). Ces paramètres permettent d'évaluer la gravité de l'atteinte respiratoire, de suivre son évolution et de voir l'effet des différentes thérapeutiques.

### **c. Symptomatologie**

Les signes cliniques ne sont pas spécifiques. La broncho-pneumopathie chronique obstructive est la manifestation la plus retrouvée, dominée par une toux chronique, sèche accompagnée d'expectorations purulentes et visqueuses. Chez le nourrisson, il s'agit fréquemment de bronchites traînantes à répétition. Des hémoptysies de faible abondance sont fréquentes chez l'adulte. La cyanose des extrémités, quand elle existe, témoigne de l'évolutivité de l'atteinte respiratoire (Hubert, 2005). La dyspnée est fonction de l'insuffisance respiratoire. A l'auscultation, les râles bronchiques et les sibilants sont souvent discrets, en contradiction avec la richesse des signes radiologiques. A l'examen clinique, l'hippocratisme digital et une dystrophie thoracique se développent en parallèle de l'atteinte respiratoire (Hubert, 2005).

Les poussées de surinfection, appelées exacerbations, sont la conséquence de colonisations bactériennes ou fongiques favorisées par le mucus bronchique visqueux (HAS, Janvier 2009). Elles sont caractérisées par une aggravation des symptômes, une intolérance à l'effort et une altération de l'état général : asthénie majeure, anorexie, amaigrissement et parfois de la fièvre (Deneuille, 2007; Hubert, 2005). A chaque poussée, la fonction respiratoire se trouve dégradée, parfois de façon irréversible. La répétition des poussées infectieuses et l'inflammation chronique au niveau des bronches conduisent à une insuffisance respiratoire à long terme, qui est responsable de 90% des décès.

### **d. Complications infectieuses**

Les infections peuvent être virales (Virus Respiratoire Syncytial, *Influenzavirus*, *Rhinovirus*), fongiques (*Aspergillus fumigatus*, *Candida albicans*, *Scedosporium apiospermum*) et bactériennes.

- **Prélèvements bactériologiques**

Une surveillance régulière et adaptée des sécrétions respiratoires, dès le diagnostic de mucoviscidose, est nécessaire à chaque consultation tous les 1 à 3 mois, selon l'âge et la gravité de l'atteinte respiratoire pour caractériser les germes en cause dans les infections broncho-pulmonaires et leur sensibilité aux antibiotiques (HAS, Janvier 2009; SFP, 2002).

L'examen cyto-bactériologique des crachats (ECBC) permet de fournir des renseignements sur la colonisation bactérienne de l'arbre trachéobronchique (Hubert, 2005). Le recueil peut être optimisé par une séance de kinésithérapie respiratoire, ou par la prise de bronchodilatateur et/ou de rhDNase (HAS, Janvier 2009). Les ECBC quantitatifs ont l'avantage de distinguer les deux objectifs qui sont l'éradication en cas de primo-colonisation et la diminution de l'inoculum en cas d'infection chronique.

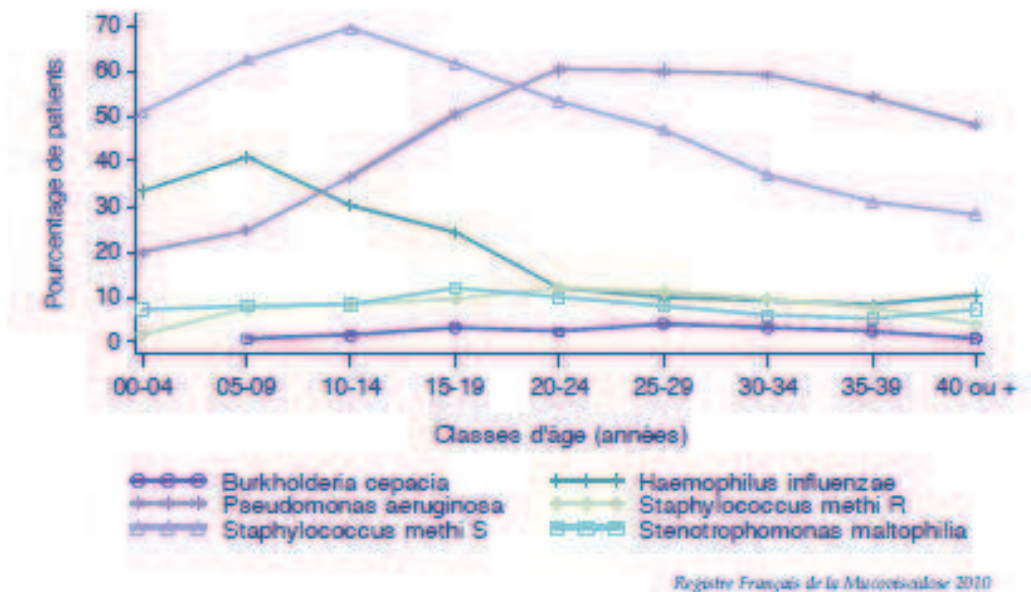
L'écouvillon oro-pharyngé est utilisé chez les enfants qui ne crachent pas spontanément. L'intérêt de ce prélèvement dans l'étude des infections à *S. aureus* est médiocre à cause du caractère commensal de cette bactérie. Il a cependant une bonne valeur prédictive négative (Lenoir, 2007).

L'aspiration naso-pharyngée est réalisée après une séance de kinésithérapie respiratoire. Elle est applicable à tous les âges mais elle est fréquemment utilisée chez le nourrisson (HAS, Janvier 2009; SFP, 2002).

- **Bactéries isolées**

Le Registre Français de la Mucoviscidose (RFM) a établi un graphique (*Figure 9*) permettant de corréler l'âge et la colonisation de cinq bactéries considérées comme importantes du point de vue clinique et retrouvées dans les examens cytobactériologiques des crachats (ECBC).

La colonisation et les infections bactériennes se font par étapes.

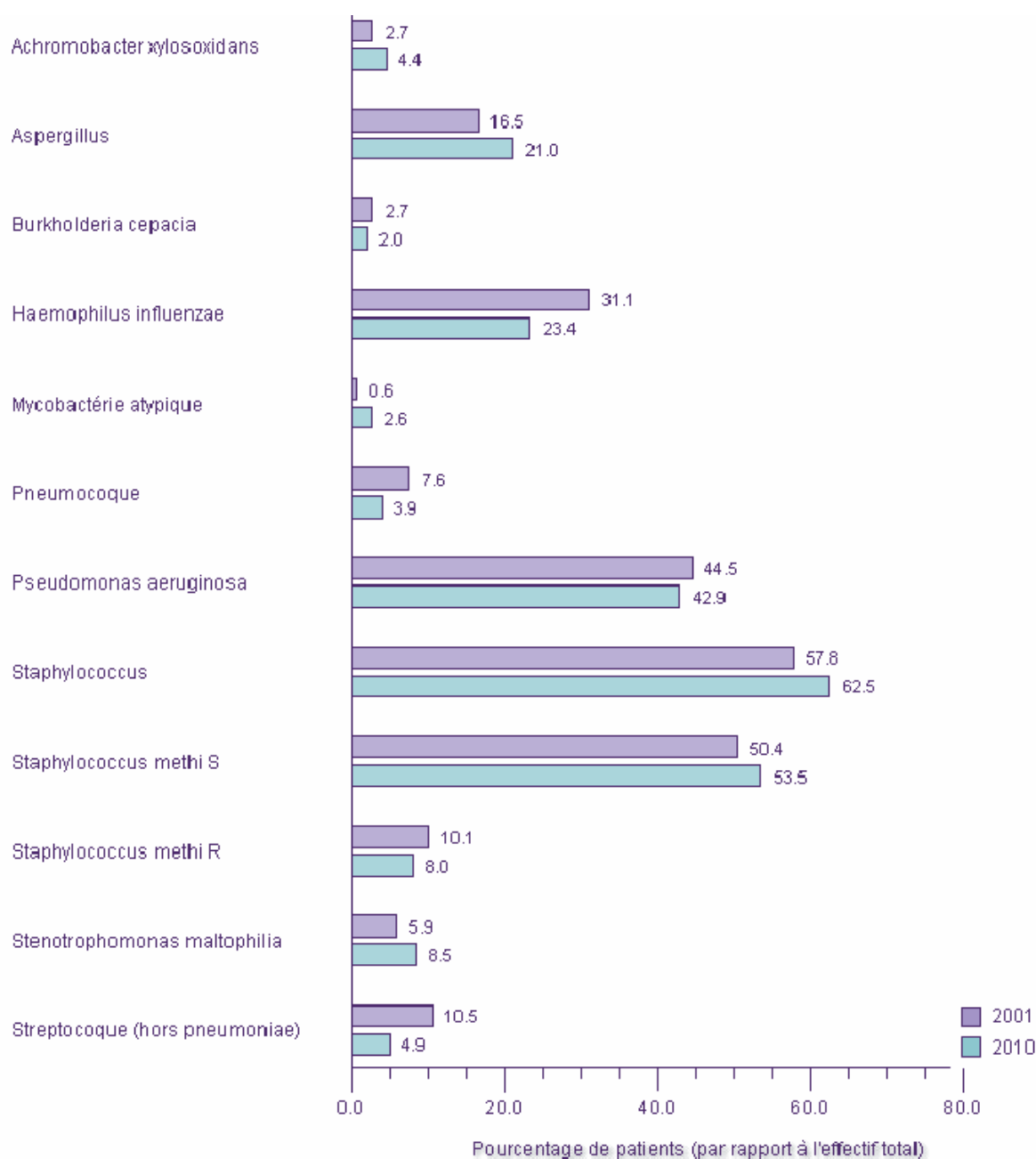


**Figure 9 : Bactéries cliniquement importantes dans la mucoviscidose selon l'âge en 2009 (Bellis, 2012)**

Initialement, ce sont des bactéries dites "banales" telles que *Haemophilus influenzae* et *Staphylococcus aureus* qui colonisent et infectent les poumons (Quon et Aitken, 2012). Les *S. aureus* « variants à petites colonies » ont une localisation intra-cellulaire et sont responsables en partie du caractère pérenne de *S. aureus* dans les voies aériennes bronchiques (SFP, 2002). La virulence de *S. aureus* est liée à sa capacité à adhérer à l'épithélium respiratoire et à échapper aux défenses de l'organisme (Mariani-Kurkdjian et Bingen, 2003). Le tableau clinique est celui d'une infection chronique qui favorise, de quelques mois à plusieurs années plus tard, l'infection à *Pseudomonas aeruginosa* en démasquant des récepteurs épithéliaux qui permettent ainsi l'adhésion du germe (Mariani-Kurkdjian and Bingen, 2003). Cette colonisation est pratiquement inéluctable puisque plus de 95% des patients en phase terminale sont colonisés par *P. aeruginosa* (Mariani-Kurkdjian et Bingen, 2003). Celle-ci constitue un tournant dans l'évolution de la maladie respiratoire. Elle est en grande partie responsable de la dégradation pulmonaire et donc indirectement du pronostic. Les souches "mucoïdes" (microcolonies recouverte d'un biofilm ou "slime") reflètent l'infection chronique à *P. aeruginosa* (Mariani-Kurkdjian et Bingen, 2003). Elles majorent la viscosité des sécrétions bronchiques et réalisent un véritable écran à la phagocytose, à la réponse immunitaire et aux antibiotiques (Mariani-Kurkdjian et Bingen, 2003). *P. aeruginosa* affirme son caractère pathogène notamment par la production de toxines (exotoxines A et S) et de protéases (élastases) susceptibles de provoquer directement des lésions tissulaires (Hubert, 2005).

Des pathogènes « émergents » tels que *Stenotrophomonas maltophilia* et *Achromobacter xylosoxidans* et d'autres pathogènes mieux reconnus tels que le complexe *Burkholderia cepacia* et les mycobactéries non tuberculeuses (MNT) sont également retrouvés à une fréquence variable (Quon et Aitken, 2012).

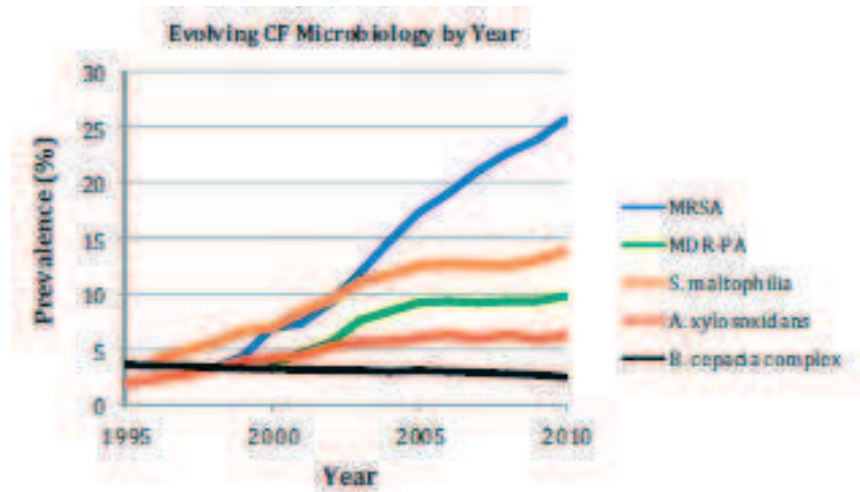
Le RFM a mis en évidence l'évolution de la colonisation bactérienne entre 2001 et 2010 en comparant la présence des germes à ces deux époques (*Figure 10*).



Registre Français de la Mucoviscidose 2010

**Figure 10 : Répartition des bactéries isolées d'ECBC en 1999 et 2009 en France (Bellis, 2012)**

On remarque une baisse importante du nombre de souches de Streptocoques et de *H. influenzae*. Au contraire, on observe une hausse de l'implication de pathogènes tels que *S. maltophilia*, *A. xylosoxidans* et des MNT, comme l'a également constaté la Cystic Fibrosis Foundation américaine (Quon et Aitken, 2012) (Figure 11).



**Figure 11 : Evolution de la colonisation bactérienne chez les patients mucoviscidosiques aux Etats-Unis (Quon et Aitken, 2012)**

La hausse de la prévalence des infections liées à ces bactéries doit être interprétée avec prudence car elle peut correspondre à un changement des protocoles de dépistage et/ou à des techniques de détection microbiologique plus performantes (techniques de biologie moléculaire) (Quon et Aitken, 2012).

Des études réalisées chez des patients avec une infection chronique à *S. maltophilia* ont montré que l'infection n'est pas responsable d'une augmentation du déclin du VEMS (Waters, 2011) ou de la mortalité. Ceci a également été démontré pour les infections à *A. xylosoxidans* (De Baets, 2007). Toutefois, les infections à *S. maltophilia* sont associées à un risque 1,6 fois plus élevé d'exacerbations pulmonaires (De Baets, 2007).

Une baisse de la prévalence du complexe *B. cepacia* est observée dans plusieurs pays : France (3,2 % en 1999 vs 2,1 % en 2009), Etats-Unis (3,6 % en 1995 vs 2,5 % en 2010), Canada (4,9 % en 2003 vs 4,3 % en 2009) et Royaume-Uni (3,7% en 2007 vs 3,1 % en 2009) (Quon et Aitken, 2012). Ceci s'explique par l'amélioration de la prévention de la transmission inter-humaine et par des techniques moléculaires qui réduisent le risque d'erreurs d'identification. Le complexe se compose de 17 espèces étroitement apparentées mais *B. multivorans* et *B. cenocepacia* représentent 70-80% des



infections liées au complexe *B. cepacia* chez les patients atteints de mucoviscidose dans le monde (Quon et Aitken, 2012). Les symptômes liés à ces bactéries sont très hétérogènes. Le déclin de la fonction pulmonaire est plus rapide quand les patients sont infectés par des souches non-mucoïdes par rapport aux patients infectés par des souches mucoïdes (Quon et Aitken, 2012).

#### ▪ **Antibiothérapie**

Lors d'épisodes d'exacerbations, l'antibiothérapie doit être précoce et prescrite à doses élevées. Le rythme, la durée, le choix des antibiotiques et des associations sont adaptés en fonction des germes isolés et de leur sensibilité aux antibiotiques, de l'efficacité des traitements antérieurs et de la tolérance du patient aux produits utilisés (HAS, Novembre 2006). La voie d'administration de l'antibiothérapie dépend du micro-organisme à traiter.

Actuellement, des recommandations concernant la stratégie thérapeutique à adopter vis-à-vis des principales infections ont été données par la Société Française de Pédiatrie (SFP) en 2002 (SFP, 2002) et par la Haute Autorité de Santé (HAS) en 2006 (HAS, Novembre 2006).

Vis à vis de *H. influenzae* et *S. aureus*, la monothérapie orale est en général suffisante mais la voie parentérale peut être utilisée dans les formes sévères d'exacerbation.

L'antibiothérapie contre *P. aeruginosa* nécessite d'obtenir rapidement de fortes concentrations in situ. L'antibiothérapie peut être dans ce cas administrée par voie orale, intraveineuse ou inhalée (HAS, Novembre 2006).

L'amélioration de la prise en charge thérapeutique des patients atteints de mucoviscidose a permis de mieux contrôler les épisodes d'exacerbations. Le taux moyen du VEMS chez les jeunes de 18 ans, marqueur de l'état de la fonction pulmonaire, a augmenté ces vingt dernières années (63% en 1990 vs 80 % en 2010) (Quon et Aitken, 2012). La fonction pulmonaire est meilleure qu'auparavant et donc favorise la survie des patients. Le nombre d'adultes atteints rejoindra très prochainement celui des enfants (Quon et Aitken, 2012).

Cependant, d'autres pathogènes émergent progressivement : les mycobactéries non tuberculeuses et plus particulièrement les mycobactéries du complexe *abscessus* qui posent des problèmes thérapeutiques car elles sont très résistantes aux antibiotiques.

## II. MYCOBACTERIES NON TUBERCULEUSES ET MUCOVISCIDOSE

### A. Généralités

Les mycobactéries appartiennent à la famille des *Mycobacteriaceae* au sein de l'ordre des *Actinomycetales*. Celle-ci ne comprend qu'un seul genre, le genre *Mycobacterium*.

Par leurs aspects cliniques et épidémiologiques, les infections dues à des mycobactéries sont divisées en trois grandes entités que sont :

- la tuberculose dont les agents étiologiques sont principalement *M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. africanum*, *M. canetti*
- la lèpre (*M. leprae*)
- les mycobactérioses provoquées par les mycobactéries non tuberculeuses, dont il existe actuellement plus de 150 espèces (*M. avium*, *M. abscessus*, *M. chelonae*, *M. intracellulare*, *M. xenopi*, etc.).

Les MNT sont également appelées mycobactéries "atypiques" ou sous le terme anglo-saxon de MOTT (*Mycobacteria Other Than Tuberculosis*) (Saiman, 2004). Elles représentent un ensemble hétérogène de micro-organismes émergents en pathologie humaine.

#### 1. Caractéristiques des mycobactéries

Les mycobactéries sont classées phylogénétiquement parmi les bactéries à Gram positif, à haut GC% (contenu en guanine-cytosine) ; ce dernier étant compris entre 57 et 71%, pourcentage proche de celui des genres *Nocardia*, *Rhodococcus* et *Corynebacterium* (Frenay, 2007).

Ce sont des bacilles droits ou légèrement incurvés de 1 à 10  $\mu\text{m}$  de long et 0,2 à 0,6  $\mu\text{m}$  de large (*Figure 12*), aérobies stricts ou micro-aérophiles, immobiles, non ramifiés, non sporulés et producteurs de catalase (Denis, 2007).

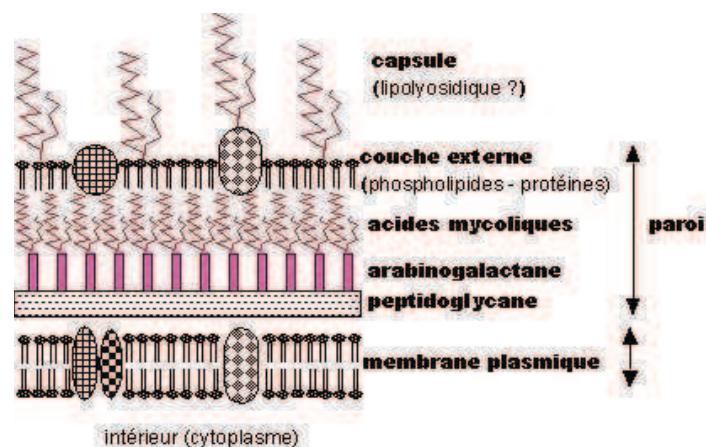


**Figure 12 : Visualisation de *Mycobacterium avium* au microscope électronique**

(<http://www.gefor.4t.com/concurso/micobacterias/avium2.jpg>)

L'enveloppe des mycobactéries est constituée d'une membrane plasmique, d'une paroi et d'une capsule.

Toutefois, les mycobactéries se distinguent par une paroi particulière (*Figure 13*). Celle-ci est très riche en lipides (60% des constituants), notamment en acides mycoliques qui confèrent aux mycobactéries une propriété tinctoriale essentielle : ce sont des Bacilles Acido-Alcool Résistants (BAAR) (Murray, 1995).



**Figure 13 : Paroi des mycobactéries**

(<http://membres.multimania.fr/microbio/systematique/Mycobacteries.htm>)

Cette particularité de la paroi rend les mycobactéries imperméables aux colorants usuels et est utilisée pour les mettre lors d'un examen microscopique. Toutes les mycobactéries sont des BAAR, mais toutes les bactéries acido-résistantes ne sont pas des mycobactéries. En effet, les *Nocardia*, quelques *Actinomycètes* et quelques corynébactéries sont des bactéries faiblement acido-résistantes (Carbonelle, 2003).

La paroi confère également une résistance naturelle aux désinfectants classiques, pouvant être à l'origine de contaminations transmises par l'utilisation d'endoscopes nettoyés par ces produits. Elle résiste aussi aux agents chimiques tels que les solutions acides ou alcalines et les détergents antiseptiques. Cette propriété est mise à contribution avant la mise en culture des produits pathologiques pour éliminer la majorité des bactéries commensales sensibles à ces produits (Denis, 2007). Les mycobactéries restent cependant sensibles à la stérilisation par autoclavage.

Les mycobactéries ont tendance à s'agréger et adhérer aux surfaces grâce à la nature hydrophobe de l'enveloppe cellulaire. Des détergents comme le Tween 80 sont souvent ajoutés au milieu de culture afin de réduire la formation d'agrégats et stimuler la croissance.

## **2. MNT et classification de Runyon**

Actuellement, plus de 150 espèces de MNT ont été décrites (Euzéby, 2007).

Les MNT sont généralement divisées en deux groupes selon leur croissance sur un milieu solide : les mycobactéries à croissance rapide dont les colonies sont visibles en moins de 7 jours et les mycobactéries à croissance lente nécessitant entre 7 et 60 jours de croissance. La présence d'une seule copie du gène codant l'ARN ribosomique 16S ou de deux copies est corrélée à la vitesse de croissance (Denis, 2007).

En plus de ces différences phénotypiques, les espèces mycobactériennes présentent des exigences nutritives variables.

Des activités enzymatiques sont retrouvées pour certaines espèces, servant de base aux tests d'identification biochimique tels que la mise en évidence d'une nitrate réductase, arylsulfatase, pyrazinamidase, uréase.

La température de croissance est aussi un critère bactériologique pour classer les mycobactéries. Elle varie de 30°C (ex : *M. abscessus*) à 42°C (exemple : *M. xenopi*), voire jusqu'à 45°C (Murray, 1995).

La classification classique de Runyon (*Tableau 1*) reste très utilisée pour séparer les MNT en quatre groupes même si elle ne répond pas aux règles de la génétique moderne (homologie ADN-ADN). Cette classification est basée sur la vitesse de croissance et sur la possibilité des colonies à développer ou non une pigmentation. Les groupes I, II et III appartiennent aux mycobactéries à croissance lente et le groupe IV, aux mycobactéries à croissance rapide. Parmi les espèces mycobactériennes, certaines produisent des pigments ou caroténoïdes, leur conférant une pigmentation jaune ou orange, alors que d'autres n'en produisent pas. De plus, certaines espèces produisent ces pigments uniquement en réponse à la lumière, elles sont dites photochromogènes. Si la pigmentation des colonies apparaît à l'obscurité, sans qu'il soit nécessaire de les exposer à la lumière, elles sont scotochromogènes.

Parmi les très nombreuses espèces de MNT, 20 espèces ont actuellement un rôle reconnu en pathologie humaine (Denis, 2007) :

- **MNT à croissance lente** : *M. avium* complex, *M. kansasii*, *M. genavense*, *M. haemophilum*, *M. malmoense*, *M. marinum*, *M. nonchromogenicum*, *M. scrofulaceum*, *M. simiae*, *M. szulgai*, *M. terrae* complex, *M. ulcerans* et *M. xenopi* ;
- **MNT à croissance rapide** : *M. fortuitum*, *M. smegmatis*, *M. immunogenicum*, *M. chelonae* et les mycobactéries du complexe *abscessus*.

## Classification de Runyon

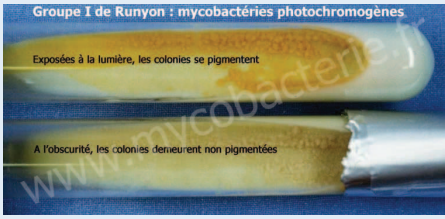


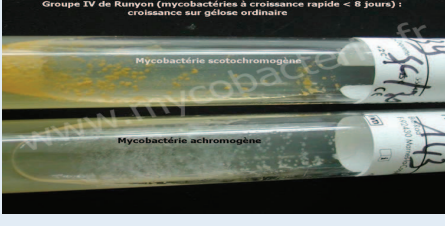
	<p><b>Groupe I</b></p>	<p>Mycobactéries photochromogènes</p>	<p>Regroupe les mycobactéries non pigmentées à l'obscurité mais qui se pigmentent à la lumière</p>  <p>Ex : <i>M. kansasii</i>, <i>M. marinum</i></p>
<p><b>Mycobactéries à croissance lente</b></p>	<p><b>Groupe II</b></p>	<p>Mycobactéries scotochromogènes</p>	<p>Regroupe les mycobactéries pigmentées à la lumière et à l'obscurité</p>  <p>Ex : <i>M. xenopi</i>, <i>M. goodii</i></p>
	<p><b>Groupe III</b></p>	<p>Mycobactéries non chromogènes</p>	<p>Regroupe les mycobactéries non pigmentées à la lumière et à l'obscurité</p>  <p>Ex : <i>M. avium</i>, <i>M. intracellulare</i></p>
<p><b>Mycobactéries à croissance rapide</b></p>	<p><b>Groupe IV</b></p>	<p>Mycobactéries non chromogènes, photochromogènes ou scotochromogènes</p>	<p>Regroupe les mycobactéries ayant un délai de croissance inférieur à 7 jours. Elles poussent également sur gélose ordinaire.</p>  <p>Ex : <i>M. abscessus</i>, <i>M. chelonae</i></p>

Tableau 1 : Classification de Runyon (Lerat, 2011)

### 3. Epidémiologie des infections à MNT

#### a. Réservoir

Contrairement à *M. tuberculosis* pour lequel l'homme est le seul réservoir, l'éventail des niches écologiques des MNT est varié (Denis, 2007).

Les MNT à croissance rapide sont isolées du sol, de l'eau et, à une moindre fréquence, des végétaux et des sphaignes. Les MNT à croissance lente potentiellement pathogènes sont également présentes dans le sol, l'eau douce ou de mer, sur les poussières et, moins fréquemment, sur les végétaux.

Certaines mycobactéries sont également pathogènes chez une ou plusieurs espèces animales domestiques (*M. avium* ssp. *avium* chez les oiseaux ou les rongeurs) (Denis, 2007).

Les MNT et les légionelles sont présentes dans les mêmes systèmes de distribution d'eau et interagissent avec les protozoaires (amibes) et les biofilms (CNR, 2008). Les MNT peuvent être présentes dans le réseau d'eau hospitalière mais aussi dans le réseau urbain. La détection de taux important de *M. avium* dans de nombreux biofilms de douche est une source potentielle d'infection chez l'homme (Feazel, 2009). La température de l'eau est également importante car il a été démontré que les chauffe-eau dont la température est inférieure à 50°C sont plus susceptibles d'abriter des MNT par rapport à des chauffe-eau dont la température est supérieure à 55°C (Falkinham, 2011).

#### b. Transmission

La colonisation et l'infection par les MNT se produit par aérosolisation, par ingestion ou par contamination par l'eau ou le sol d'une plaie cutanée.

Une récente étude publiée par Falkinham (Falkinham, 2011) a montré qu'une souche isolée de crachats d'un patient a été retrouvée dans l'eau de la douche à son domicile. L'infection pulmonaire a pu être acquise par inhalation d'aérosol pendant la douche. Pour un autre patient, la souche correspondait à celle retrouvée dans l'eau d'un robinet. L'ingestion d'eau contaminée est donc certainement une autre source de contamination. Certains groupes ethniques du Canada et d'Asie qui consomment l'eau uniquement après l'avoir fait bouillir sont moins fréquemment colonisés à *M. avium* que ceux qui ne le font pas (Hernandez-Garduno et Elwood, 2012).

Des infections nosocomiales à MNT sont décrites, liées à des injections, des actes chirurgicaux, des dispositifs intra-vasculaires ou des dispositifs médicaux contaminés tels que les bronchoscopes.

De nombreuses études de typage de souches de MNT provenant de patients infectés ont montré l'absence d'une transmission croisée entre patients (Bange, 2001; Sermet-Gaudelus, 2003).

### **c. Prévalence des infections à MNT dans la mucoviscidose**

Jusque dans les années 1990, les infections à MNT au cours de la mucoviscidose semblaient rares et n'étaient l'objet que de cas cliniques rapportés dans la littérature. Mais, elles sont en nette augmentation depuis quelques années (Hubert, 2005; Le Bourgeois, 2005). Cette récente émergence des infections à MNT dans la mucoviscidose s'explique par l'amélioration des techniques bactériologiques d'isolement et d'identification ; ceci a permis de mieux évaluer leur réelle prévalence.

D'après un ensemble d'études de prévalence multicentriques, la prévalence globale des MNT chez les patients mucoviscidosiques est d'environ 10 %. Elle varie suivant le pays et l'âge (Quon et Aitken, 2012).

Afin de mieux connaître la prévalence et la pathogénicité des MNT dans la mucoviscidose, un observatoire des mycobactéries atypiques a été créé en France, en 2003, sous l'égide de l'association "Vaincre La Mucoviscidose".

Le tableau 2 recense les principales études de prévalence des infections à MNT menées chez les patients atteints de mucoviscidose, depuis une vingtaine d'années (1981-2005).



Etude Année (référence)	Pays/Période	Nombre de patients	Classe d'âge des patients (âge moyen +/- écart type)	Prévalence des MNT (%)	Espèces retrouvées
Kilby et al. 1992 (Kilby, 1992)	USA 1981-1990	87	De 18 à 64 ans	19,5%	MAC : 11 MAC et <i>M. chelonae</i> : 2 <i>M. chelonae</i> : 3 <i>M. fortuitum</i> : 1
Aitken et al 1993 (Aitken, 1993)	USA 1990-1991	64	De 17 à 50 ans	12,5%	MAC : 7 <i>M. fortuitum</i> : 1
Hjelt et al. 1994 (Hjelt, 1994)	Danemark 1987-1989	185	De 2,2 à 38,5 ans	3,8%	<i>M. abscessus</i> : 5 <i>M. intracellulare</i> : 2
Fauroux et al. 1997 (Fauroux, 1997)	France 1995-1996	106	enfants de 1 à 18 ans (9,7 +/- 5,3 ans)	6,6%	<i>M. xenopi</i> : 3 <i>M. chelonae</i> : 2 <i>M. chelonae</i> et <i>M. abscessus</i> : 1 <i>M. fortuitum</i> : 1 MAC : 0
Segal et al. 1998 (Segal, 1998)	Brésil	40	De 4 mois à 25 ans	15%	MAC : 6
Torrens et al. 1998 (Torrens, 1998)	Angleterre 1989-1996	372	De 9 à 25 ans	3,8%	<i>M. fortuitum</i> : 5 MAC : 4 <i>M. chelonae</i> : 3 <i>M. malmoense</i> : 1 <i>M. kansasii</i> : 1
Bange et al. 2001 (Bange, 2001)	Allemagne 1997-1999	214	De 21 à 35 ans	7%	<i>M. abscessus</i> : 4 <i>M. intracellulare</i> : 4 <i>M. avium</i> : 2 <i>M. avium</i> et <i>M. abscessus</i> : 1 <i>M. avium</i> et <i>M. simiae</i> : 1 <i>M. simiae</i> : 1 <i>M. interjectum</i> : 1 <i>M. gordonae</i> : 1

MAC : *Mycobacterium avium complex*

**Tableau 2 : Caractéristiques des infections à MNT dans la mucoviscidose (1/3)**

Etude Année (référence)	Pays/Période	Nombre de patients	Classe d'âge des patients (âge moyen +/- écart type)	Prévalence des MNT (%)	Espèces retrouvées
Sermet-Gaudelus et al. 2003 (Sermet-Gaudelus, 2003)	France 1996-1999	298	De 2 mois à 32 ans (âge moyen : 11,3 ans)	9,8%	<i>M. abscessus</i> : 12 <i>M. abscessus</i> et <i>M. gordonae</i> : 3 <i>M. gordonae</i> : 4 MAC : 6 <i>M. fortuitum</i> : 1 <i>M. kansasii</i> : 1 Autres : 2
Olivier et al. 2003 (Olivier, 2003b)	USA 1992-1998	986	A partir de 10 ans (23 +/- 9 ans)	13%	MAC : 85 <i>M. abscessus</i> : 18 MAC et <i>M. abscessus</i> : 5 <i>M. avium</i> et <i>M. intracellulare</i> : 4 <i>M. gordonae</i> : 5 MAC et <i>M. gordonae</i> : 3 <i>M. kansasii</i> : 2 <i>M. lentiflavum</i> : 2 <i>M. peregrinum</i> : 2 <i>M. malmoense</i> : 1 <i>M. terrae</i> : 1
Pierre-Audigier et al. 2005 (Pierre-Audigier, 2005)	France 2000	385	De 1 à 24 ans (12 +/- 6,1 ans)	8,1%	<i>M. abscessus</i> : 12 <i>M. abscessus</i> et <i>M. gordonae</i> : 1 MAC : 6 MAC et <i>M. kansasii</i> : 1 <i>M. gordonae</i> : 5 <i>M. kansasii</i> : 1 <i>M. chelonae</i> : 1 <i>M. lentiflavum</i> : 1 <i>M. scrofulaceum</i> : 1 <i>M. szulgai</i> : 1 <i>M. xenopi</i> : 1

MAC : *Mycobacterium avium complex*

**Tableau 2 : Caractéristiques des infections à MNT dans la mucoviscidose (2/3)**

Etude Année (référence)	Pays/Période	Nombre de patients	Classe d'âge des patients (âge moyen +/- écart type)	Prévalence des MNT (%)	Espèces retrouvées
Constantini et al. 2005	Italie	376	Enfants et adultes	2,6%	ND
Giron et al. 2005 (Giron., 2005)	Espagne 1997-2001	28	Adultes (25,3 +/- 6,7 ans)	25%	<i>M. abscessus</i> : 3 <i>MAC</i> : 2 <i>M. simiae</i> : 1 Autre : 1
Esther et al. 2005 (Esther, 2005)	USA 1993-2002	431	Enfants de moins de 12 ans	4%	<i>MAC</i> : 7 <i>M. abscessus</i> : 6 <i>MAC</i> et <i>M. abscessus</i> : 2 <i>MAC</i> et autre : 1 <i>M. gordonae</i> : 1
Jönsson et al. 2007 (Jonsson, 2007)	Suède 1997-2005	140	Enfants et adultes	10%	<i>M. abscessus</i> : 8 <i>MAC</i> : 4 <i>MAC</i> et <i>M. abscessus</i> : 1 <i>M. lentiflavum</i> : 1
Levy et al. 2008 (Levy, 2008)	Israël 2001-2003	186	A partir de 5ans (20,51 +/- 10,4 ans)	22,6 %	<i>M. simiae</i> : 15 <i>M. abscessus</i> : 12 <i>MAC</i> : 6 <i>M. fortuitum</i> et <i>M. simiae</i> : 2 <i>M. fortuitum</i> et <i>M. abscessus</i> : 1 <i>M. fortuitum</i> : 1 Autres : 5
Radhakrishnan et al. 2009 (Radhakrishnan, 2009)	Canada 2004	98	De 6 à 18 ans	6,1%	<i>MAC</i> : 4 <i>M. abscessus</i> : 2
Roux et al. 2009 (Roux, 2009)	France 2004	1582	De 4 mois à 82 ans (âge moyen : 18,9 ans)	6,6%	- Complexe <i>abscessus</i> : 50 (dont 30 <i>M. abscessus</i> , 9 <i>M. bolletii</i> , 11 <i>M. massiliense</i> ) - <i>MAC</i> : 23 (dont 15 <i>M. avium</i> et 8 <i>M. intracellulare</i> ) - Autres : 34

*MAC* : *Mycobacterium avium* complex

**Tableau 2 : Caractéristiques des infections à MNT dans la mucoviscidose (Jordan, 2007)(3/3)**

Les résultats de ces principales études de prévalence concernant les MNT dans la mucoviscidose montrent de grandes disparités. Tout d'abord, auparavant il y avait une sous-déclaration des cas dans les registres nationaux de la mucoviscidose. Aujourd'hui, la surveillance s'est intensifiée et les méthodes de détection se sont améliorées. Les études anciennes n'utilisaient pas les techniques d'identification actuellement recommandées, d'où une sous-estimation de certaines espèces et notamment de *M. abscessus*. Un autre paramètre majeur concerne l'âge des populations étudiées.

De nombreuses espèces de MNT ont été identifiées dans ces études mais les deux plus fréquentes sont les mycobactéries du complexe *avium-intracellulare* (MAC) et les mycobactéries du complexe *abscessus* (dénommé MABSC par la suite).

Une étude transversale sur la prévalence des infections à MNT a été réalisée aux Etats-Unis chez environ 1000 patients mucoviscidosiques âgés de 10 à 21 ans. Parmi les MNT retrouvées, il y avait 72% de MAC et 16% de MABSC (Olivier, 2003b). En France, la plus grande étude de prévalence sur plus de 1500 patients âgés de 4 mois à 82 ans, a montré que c'était MABSC (48%) qui était prépondérante par rapport aux MAC (22%) (Roux, 2010).

Une étude réalisée dans trois centres parisiens (Pierre-Audigier, 2005) a montré que la prévalence de MNT était plus faible chez les patients âgés de moins de 15 ans mais qu'ils étaient plus susceptibles d'être colonisés par *M. abscessus* et de répondre aux critères microbiologiques de définition des infections à MNT par l'American Thoracic Society (ATS) (Esther, 2005; Pierre-Audigier, 2005; Sermet-Gaudelus, 2003). Toutefois, MABSC peut être isolé à tous les âges tandis que MAC n'est pas retrouvé chez les patients de moins de 15 ans. L'hypothèse suggérée par Griffith (Griffith, 2003) est que l'existence de lésions pulmonaires ne serait pas nécessaire à l'établissement de *M. abscessus* dans les poumons contrairement aux MAC, ce qui expliquerait la grande capacité de *M. abscessus* à infecter les jeunes enfants.

MABSC semble provoquer plus d'infections chroniques tandis que MAC est plus susceptible d'engendrer des infections intermittentes ou transitoires (Quon et Aitken, 2012).

L'impact clinique des infections à MNT est variable, pouvant aller du simple portage asymptomatique jusqu'à une détérioration rapide de l'état du patient provoquant son décès. Cela dépend de l'espèce en cause, de la chronicité de l'infection et des facteurs liés à l'hôte tels que son statut immunitaire (Quon et Aitken, 2012).

#### **d. Facteurs prédisposants aux infections à MNT**

Les facteurs prédisposant aux infections à MNT sont multiples.

Les patients présentant des anomalies génétiques affectant l'immunité innée et adaptative ont une sensibilité accrue à ces infections. Le fonctionnement optimal des lymphocytes T CD4+ et des macrophages est extrêmement important pour la défense contre les mycobactéries. Ainsi, les personnes atteintes par le virus de l'immunodéficience humaine (VIH) sont des personnes à risque de développer une infection à MNT (Doffinger, 2006).

Les malades atteints de mucoviscidose constituent un groupe à risque d'infection à MNT. Les raisons ne sont pas claires, hormis les facteurs dus à la maladie elle-même, en particulier respiratoires, tels que la bronchiectasie et la diminution de la clairance mucociliaire, prédisposant aux infections pulmonaires, y compris aux MNT. Généralement, l'infection est lentement progressive, mais elle peut devenir fulminante ou rapidement progressive (Griffith, 2007) chez des patients atteints de mucoviscidose.

#### **4. Critères d'infection pulmonaire**

L'isolement d'une MNT en culture est essentiel mais n'est pas synonyme d'infection. Le principal problème est donc de distinguer une colonisation d'une infection pulmonaire à MNT, en vue d'instaurer ou non un traitement.

Concernant le diagnostic de mycobactérioses respiratoires, des critères précis ont donc été fournis par l'ATS. Les dernières recommandations datent de 2007 (Griffith, 2007).

Les critères d'infection à MNT sont de trois ordres : cliniques, radiologiques et bactériologiques et ont été établis pour *Mycobacterium avium-intracellulare*, *M. abscessus* et *M. kansasii*. Il y a encore trop peu d'études sur les autres MNT pour être certains que ces critères diagnostiques soient universellement applicables à l'ensemble des MNT ayant un pouvoir pathogène respiratoire.

Le diagnostic d'infection pulmonaire à MNT est donc porté sur :

- les deux critères clinico-radiologiques suivants :

- symptômes pulmonaires associés à des opacités nodulaires ou cavitaires sur la radiographie thoracique ou associés à une bronchiectasie multifocale avec de multiples petits nodules lors d'un scanner haute résolution
- exclusion de tout autre diagnostic

- et sur l'un des critères microbiologiques suivants :

- au moins deux expectorations avec une culture positive
- un lavage bronchique alvéolaire (LBA) avec une culture positive
- une biopsie pulmonaire ou transbronchiale présentant des granulomes tuberculoïdes à l'examen anatomopathologique. Elle doit être associée à une culture positive de la biopsie, d'une expectoration ou d'un LBA.

En 1997, les critères d'infections de l'ATS étaient plus exigeants. Pour confirmer une infection à mycobactéries, il fallait trois cultures positives à partir d'expectorations ou de lavages bronchiques ou seulement deux si l'examen direct était positif (Griffith, 1997).

Actuellement, l'ATS recommande également de consulter des experts lorsque ces MNT sont rarement isolées ou lorsqu'elles sont connues comme agents contaminants de prélèvements et non comme pathogènes opportunistes. Les patients pour lesquels une infection pulmonaire à MNT est suspectée, mais non prouvée par ces critères diagnostiques, doivent être suivis jusqu'à ce que le diagnostic soit établi ou exclu. Si, malgré tout, le diagnostic ne peut pas être posé sur la base de ces critères, un traitement antimycobactérien doit être envisagé (Griffith, 2007).

La fréquence de prélèvements faussement négatifs en début d'infection est élevée, sans doute à cause d'une action partiellement bactéricide de la décontamination des prélèvements sur les mycobactéries (Griffith, 2007).

Concernant les patients atteints de mucoviscidose, les critères diagnostiques d'infection à MNT cités ci-dessus s'appliquent de la même manière mais ils peuvent être plus difficiles à appliquer en raison de la maladie sous-jacente et des infections concomitantes (Griffith, 2007).

## **5. Diagnostic biologique**

La probabilité de mettre en évidence des mycobactéries dépend de la qualité et de la répétition des prélèvements (Carbonelle, 2003).

Le diagnostic biologique d'infection/colonisation à MNT nécessite plusieurs étapes : un examen direct, une mise en culture puis l'identification des colonies isolées. Il n'existe pas de détection moléculaire par PCR, utilisable à partir du prélèvement.

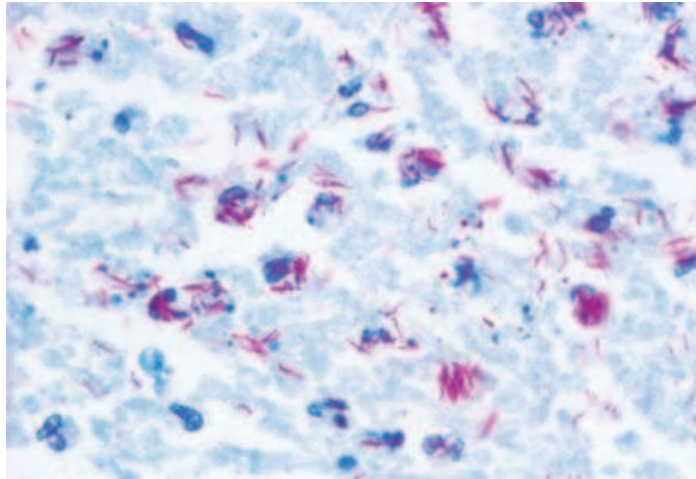
### **a. Examen direct**

L'examen microscopique d'un produit pathologique est la première étape du diagnostic microbiologique. Il est effectué sur le culot du prélèvement homogénéisé et centrifugé après un traitement fluidifiant et décontaminant (Carbonelle, 2003).

Pour mettre en évidence les mycobactéries, on utilise leur propriété d'acido-alcool-résistance, c'est à dire leur capacité à former des complexes stables avec des colorants basiques, fuschine ou fluorochromes phéniqués, qui persistent malgré la double action de l'alcool et des acides forts dilués. Deux méthodes bien adaptées à la pratique quotidienne sont utilisées : la coloration de Ziehl-Neelsen et la coloration à l'auramine (Carbonelle, 2003).

#### *o Coloration de Ziehl Neelsen*

C'est la méthode de référence. Elle utilise la fuschine phéniquée comme colorant, le phénol permettant une meilleure fixation de celle-ci à chaud. La décoloration est réalisée à l'aide d'acide sulfurique et d'éthanol à 90°. Le bleu de méthylène est employé comme contre-colorant (Carbonelle, 2003). L'observation se fait au microscope à transmission optique à l'objectif x100 (grossissement final X1000) sous immersion avec de l'huile minérale. Les BAAR conservent la coloration rouge vif de la fuschine alors que les autres bactéries ou cellules apparaissent en bleu (*Figure 14*).



**Figure 14 : BAAR après coloration de Ziehl-Neelsen**

<http://bestpractice.bmj.com/best-practice/monograph/919/resources/image/bp/4.html>

Au moins 100 champs sont regardés, ce qui requiert environ 15 minutes avant de déclarer une lame négative. C'est une méthode simple, reproductible, qui ne nécessite pas d'équipements sophistiqués mais longue.

- *Coloration à l'auramine*

Cette technique utilise de l'auramine à froid. Le contre-colorant est le rouge-thiazine. La lecture des lames nécessite l'utilisation d'un microscope à fluorescence. Cette méthode permet un gain de temps puisque les bacilles, jaune brillant sur fond rouge sombre de la préparation (*Figure 15*), sont facilement vus au grossissement x400. Le champ microscopique balayé est alors 5 fois plus grand qu'à l'immersion. Tout le frottis est regardé avant de le déclarer négatif. En cas de positivité de l'examen direct par cette technique, celui-ci doit être confirmé par la coloration de Ziehl-Neelsen.



**Figure 15 : BAAR après coloration à l'auramine**

[http://www.lung.ca/tb/tboday/tbdiagnosis/further\\_test.html](http://www.lung.ca/tb/tboday/tbdiagnosis/further_test.html)



En cas de positivité, l'examen microscopique a une spécificité proche de 100%. A contrario, la sensibilité est faible : le seuil de détection est de  $10^4$  BAAR/ml (Carbonelle, 2003). Ce seuil, valable pour *M. tuberculosis*, est encore plus faible pour les MNT.

Un examen direct négatif n'exclut pas la présence de mycobactéries.

## **b. Cultures**

Avant la mise en culture, les prélèvements doivent subir une étape de fluidification-décontamination du fait de leur caractère polymicrobien. La fluidification permet la libération des bactéries contenues dans le mucus, le pus et les cellules. La décontamination a pour but d'éliminer la flore commensale et notamment les bacilles à gram négatif non fermentaires qui sont très fréquemment présents chez les patients mucoviscidosiques. Ces germes envahiraient les milieux de culture avant la détection des mycobactéries qui croissent plus lentement. Toutefois, bien que plus résistantes aux antiseptiques que les autres bactéries, les mycobactéries n'y sont pas complètement insensibles et la décontamination doit être effectuée en respectant scrupuleusement la concentration de l'antiseptique et le temps de contact avec le prélèvement.

Plusieurs méthodes de fluidification – décontamination des prélèvements existent. Celle recommandée par l'ATS consiste en une double décontamination à base d'acide et de soude (Griffith, 2007).

La culture est actuellement la technique la plus sensible pour la mise en évidence des mycobactéries. Elle nécessite des milieux spécifiques et complexes en raison d'une croissance lente et de la nécessité d'apporter des lipides. Elle s'effectue sur des milieux solides et liquides (Griffith, 2007).

### ○ *Milieu solide*

L'ensemencement en milieu solide se fait sur un milieu de Löwenstein-Jensen. C'est un milieu à base de sels minéraux, d'asparagine, de fécule de pomme de terre, de glycérine, de vert malachite (colorant qui inhibe la croissance d'éventuels contaminants) et d'œufs qui pallient aux effets nocifs de la décontamination et apportent des vitamines (*Figure 16*) (Carbonelle, 2003).

On peut également ensemer les prélèvements sur milieu de Coletsos, notamment pour les mycobactéries de croissance difficile. Ce milieu enrichi contient d'avantage d'œuf, du pyruvate de sodium, de la cendre d'anthracite et une solution d'oligo-éléments (Carbonelle, 2003).



**Figure 16 : Milieux de Löwenstein-Jensen**

<http://www.kmlc.co.kr/search.php?Search=Lowensteinjensen+media&SpecialSearch=HTMLWebHtdig&Page=4>

Les tubes sont incubés dans une étuve à 37°C et une étuve à 30°C sur des portoirs spéciaux, en position inclinée. Les tubes ne sont fermés qu'après évaporation du liquide, le milieu devant être sec mais non desséché pour que les mycobactéries puissent s'y développer. Les milieux doivent être incubés 8 semaines au moins et jusqu'à 12 semaines (Carbonelle, 2003).

C'est un milieu sensible et d'un prix de revient modéré. Toutefois, la lecture des tubes est exclusivement manuelle. La surveillance est journalière la première semaine d'incubation, permettant d'éliminer rapidement les tubes contaminés et de détecter les MNT à croissance rapide. Ensuite, la lecture se fait une fois par semaine.

En cas de cultures positives, le nombre de colonies isolées est relevé permettant de suivre l'efficacité d'un éventuel traitement.

#### ○ *Milieu liquide*

L'ensemencement en milieu liquide peut se faire à l'aide de différents milieux. Le plus utilisé est le milieu MGIT<sup>®</sup> (*Mycobacteria Growth Indicator Tube*, BD). Ce milieu doit être additionné d'un mélange de facteurs de croissance : OADC<sup>®</sup> (O : acide oléique, A : albumine bovine, D : dextrose, C : catalase) ; il est rendu sélectif par un mélange d'antibiotiques : PANTA<sup>®</sup> (P : polymyxine B, A : amphotéricine B, N : acide nalidixique, T : triméthoprime, A : azlocilline) afin d'empêcher la croissance de la flore pulmonaire bactérienne et fongique.

Ce milieu liquide est un milieu Middlebrook 7H9 modifié contenant un composé fluorescent, le sel de ruthénium, incorporé à la pastille de silicone au fond du tube. Cette substance émet une fluorescence d'autant plus vive que la pression partielle en oxygène diminue dans le milieu. Initialement, la grande quantité d'oxygène dissous inhibe les émissions du composé. Les micro-organismes, en se multipliant et en respirant, consomment l'oxygène du milieu et permettent l'observation de la fluorescence (*Figure 17*), grâce à un transilluminateur UV, dont l'intensité est proportionnelle au niveau de réduction du milieu.



**Figure 17 : Milieu MGIT<sup>®</sup>.**

**Tubes positifs avec fluorescence rouge du ménisque et du culot.**

<http://www.vgdusa.com/bbl-mgit-tubes.htm>

L'incubation des tubes MGIT se fait à 37°C pendant 42 jours. La croissance peut être révélée de façon manuelle en plaçant le tube sous une lumière ultraviolette ou grâce à l'utilisation d'un automate tel que le MGIT 960<sup>®</sup> Becton Dickinson<sup>®</sup> (*Figure 18*) dont la lecture se fait automatiquement toutes les 60 minutes.



**Figure 18 : Automate MGIT 960<sup>®</sup> BD**

<http://www.bd.com/ds/productCenter/445870.asp>

Cette technique permet une détection de croissance en temps réel et a montré sa supériorité par rapport à des cultures en milieu solide, notamment en réduisant le délai de culture (Carbonelle, 2003). Toutefois, le milieu liquide ne permet ni l'observation de colonies ni leur dénombrement qui est parfois préjudiciable à l'établissement du diagnostic, au suivi de l'efficacité d'un traitement et à la détection de cultures mixtes de mycobactéries.

Les deux types de milieux, liquides et solides, sont donc complémentaires et la sensibilité du diagnostic final est améliorée (Carbonelle, 2003).

### **c. Identification**

Le premier stade de l'identification a pour but de différencier les mycobactéries du complexe *tuberculosis* des autres mycobactéries. L'identification des MNT est en pleine évolution. Elle repose sur les tests phénotypiques (cultureux et biochimiques) mais qui sont de plus en plus remplacés par les tests génotypiques.

#### *o Tests phénotypiques*

Les épreuves d'orientation reposent principalement sur l'étude de la morphologie des bacilles à la coloration de Ziehl-Neelsen et l'étude des caractères cultureux des colonies sur milieux solides selon la classification de Runyon (vitesse de croissance et pigmentation de la souche).

Cependant, les tests biochimiques et enzymatiques sont insuffisants notamment pour différencier les mycobactéries à croissance rapide entre elles (*Tableau 3*). Elles produisent toutes de l'indole et ont une forte activité aryl-sulfatase, les autres tests étant non discriminants (Murray, 1995).

	<i>M. fortuitum</i>	<i>M. peregrinum</i>	<i>M. chelonae</i>	<i>M. abscessus</i>	<i>M. mucogenicum</i>
Pigment	-	-	-	-	-
Nitrate réductase	+	+	-	-	-/+
Citrate de fer ammoniacal	+	+	-	-	-
NaCl à 5%	+	+	-	+	-
Arylsulfatase	+	+	+	+	+
<b><i>Croissance sur :</i></b>					
Citrate de Na	-	-	+	-	+
Mannitol	-	+	-	-	+
Inositol	-	-	-	-	+
Sorbitol	-	-	-	-	-

**Tableau 3 : Caractères cultureux et biochimiques distinctifs des souches de mycobactéries à croissance rapide (Denis, 2007)**

Ces tests sont souvent longs, de lecture difficile et les différences entre espèces sont parfois faibles. Actuellement, ces méthodes sont donc avantageusement remplacées par des techniques de biologie moléculaire (Carbonelle, 2003).

○ ***Tests génotypiques (Denis, 2007; Maugein, 2007)***

Plusieurs techniques sont actuellement disponibles pour éliminer une mycobactérie du complexe *tuberculosis* :

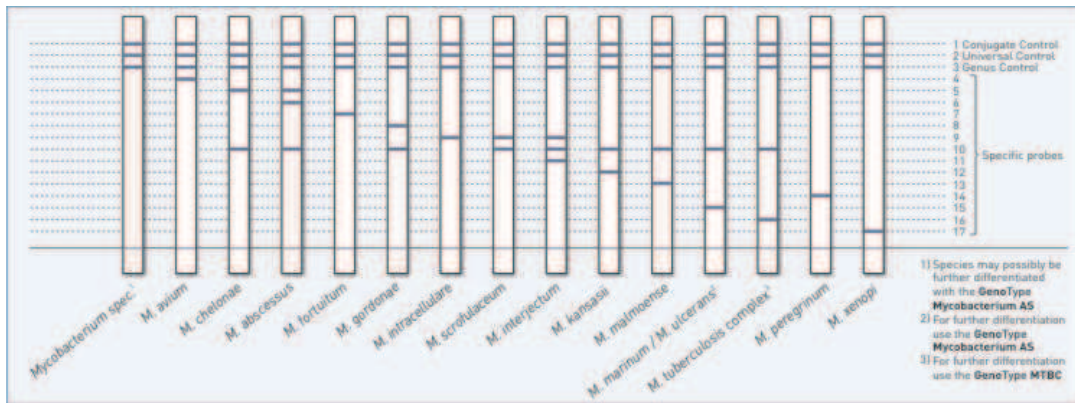
- ***Technique d'hybridation en milieu liquide***: une sonde monospécifique (*Mycobacterium tuberculosis* complex, Accuprobe®) d'ADN complémentaire d'ARNr 16S marquée par un ester d'acridinium est mise en présence d'un lysat de culture préparé à partir de milieux liquides ou solides. Après hybridation avec l'ARN ribosomal et élimination des fragments de sondes non hybridés, la sonde hybridée est détectée par chimioluminescence à l'aide d'un luminomètre. Cette sonde présente une très bonne sensibilité (100%) et spécificité (proche de 100%). Cette sonde permet d'établir rapidement que la souche isolée appartient ou pas au complexe *tuberculosis*.

- Technique immunochromatographique : détection de la protéine immunogénique MPT64 spécifique des mycobactéries du complexe *tuberculosis*, grâce à des anticorps monoclonaux de souris anti-MPT64.
- PCR spécifiques : détection par amplification génique d'un gène spécifique des mycobactéries du complexe *tuberculosis* (ex : fragment du gène de la protéine immunogénique MPT64 nommé MPB64).

La seconde étape consiste à identifier la MNT. Il existe là encore différentes méthodes classées en trois groupes selon leur spectre d'identification : les sondes monospécifiques, les systèmes après amplification et hybridation sur un support solide, les systèmes basés sur une amplification puis un séquençage ou une restriction enzymatique. Certaines de ces techniques sont commercialisées, d'autres sont réservées à des laboratoires spécialisés. Elles peuvent être réalisées à partir de culture liquide ou solide.

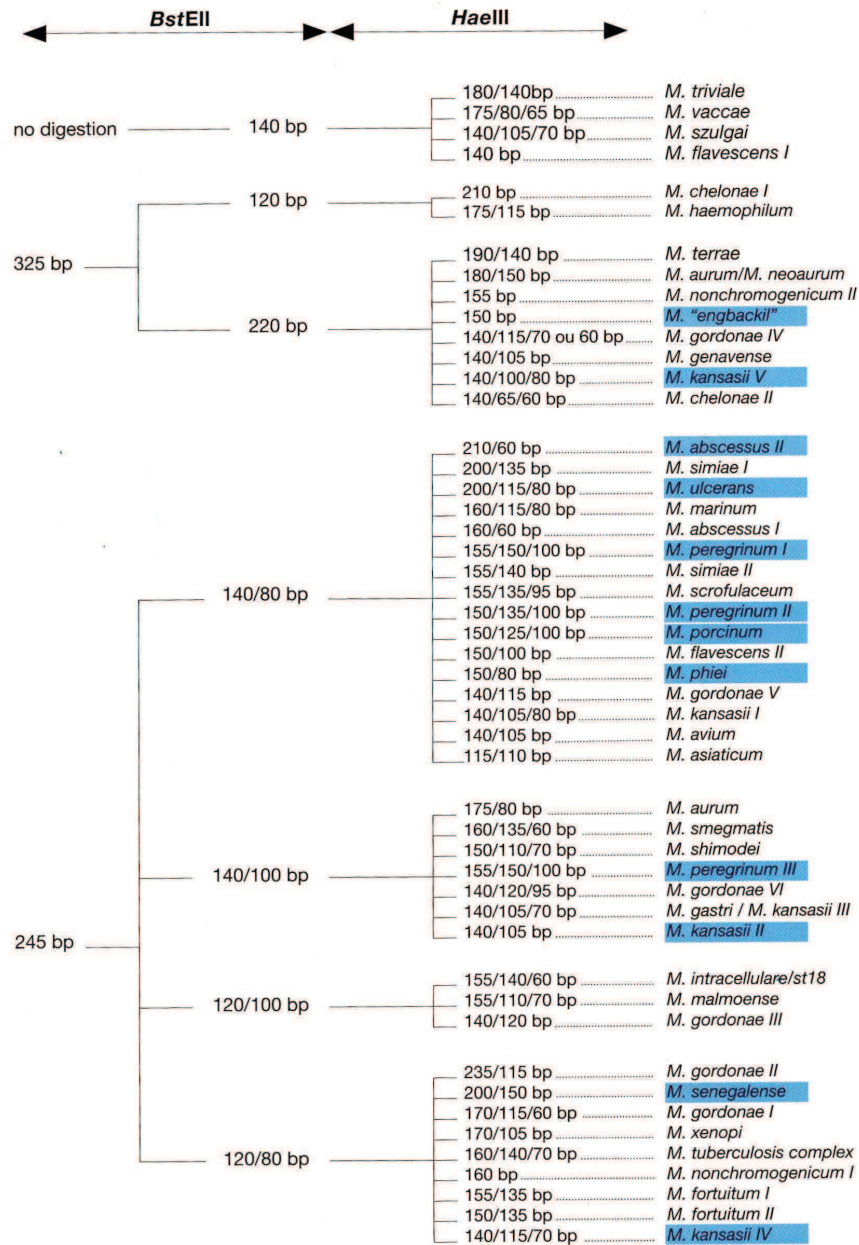
- les sondes monospécifiques (GenProbe®, Biomérieux) : il s'agit d'une technique d'hybridation directe réalisée à l'aide de sondes ADN complémentaires de cibles d'ARNr 16S. Les sondes disponibles permettent l'identification de *M. avium*, *M. intracellulare*, *M. kansasii* et *M. gordonae*. Cette technique a l'avantage d'être rapide (2 heures), d'un faible coût et de nécessiter un appareillage simple. La spécificité est bonne, comprise entre 93,4 % et 100 % selon les auteurs mais le nombre d'espèces identifiées est limité.
- les systèmes de détection après amplification et hybridation sur support solide : ils sont capables d'identifier, selon les kits disponibles, entre 10 et 28 espèces mycobactériennes (INNO-LiPA Mycobacteria®, Innogenetics ; GenoType® Mycobacterium, Biocentric). Seul le kit GenoType® Mycobacterium CM (Common Mycobacteria) permet l'identification des mycobactéries du complexe *abscessus* (Figure 19).

Après amplification par PCR de la région intergénique 16S-23S ARNr et marquage des amplicons à la biotine, ces amplicons sont hybridés à des sondes spécifiques placées en parallèle sur une bandelette de nitrocellulose. La révélation des amplicons se fait par l'addition de streptavidine phosphatase alcaline qui colore en violet les zones de fixation. Ce sont des méthodes très sensibles, permettant d'identifier un grand nombre de MNT mais qui nécessitent plus de temps et un matériel plus complexe que dans le cas d'Accuprobe® (Carbonelle, 2003).



**Figure 19 : Identification de mycobactéries par GenoType® *Mycobacterium* (Carbonelle, 2003)**

- les systèmes de détection universelle fondés sur l'amplification puis la restriction enzymatique du gène *hsp65* (méthode PRA : PCR Restriction Enzyme Analysis) (Telenti, 1993) : il s'agit d'une méthode basée sur le polymorphisme de restriction du gène *hsp65*. Ce gène code une protéine de choc thermique universelle de 65kD. Le gène *hsp65* est un gène bien conservé au cours de l'évolution qui contient des séquences communes au genre *Mycobacterium* mais aussi des séquences spécifiques d'espèce. L'utilisation d'amorces spécifiques du genre *Mycobacterium* permet l'amplification de 439 paires de bases. Les amplicons obtenus sont soumis à une double digestion enzymatique, d'abord par *BstEII* puis par *HaeIII*. Des fragments de taille variée sont obtenus à partir de différentes espèces. La taille des fragments est déterminée après séparation par électrophorèse en gel d'agarose. La prise en compte de la taille des fragments obtenus après digestion avec *BstEII* puis de la taille de bandes obtenues après restriction par *HaeIII* permet d'identifier une cinquantaine d'espèces de mycobactéries (Figure 20). C'est une technique rapide et peu coûteuse.



**Figure 20 : Algorithme d'identification des principales mycobactéries par la méthode PRA (Carbonelle, 2003)**

- les systèmes de détection universelle fondés sur le séquençage : le séquençage du gène *hsp65* constitue une alternative à la méthode de PCR-restriction et est réalisé avec les mêmes amorces. Le séquençage de l'ARNr 16S permet d'identifier la majorité des souches d'intérêt médical après comparaison de la séquence obtenue à des banques de données disponibles sur internet. Les positions 590-609 et 182-202 sont respectivement spécifiques de genre et

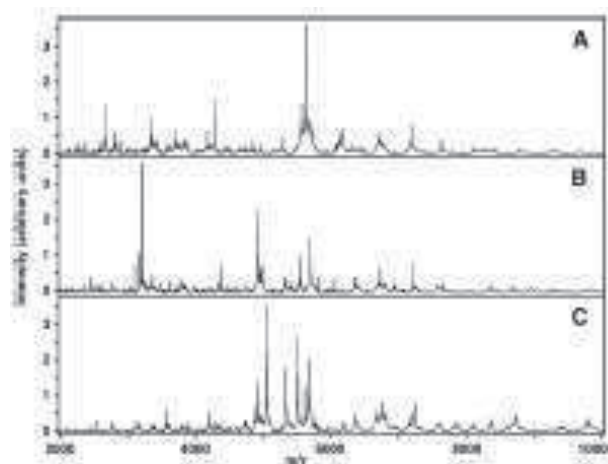


d'espèce (Denis, 2007). Le séquençage d'autres gènes (*rpoB*, *secA*, *sodA*, *recA*) est possible, mais les banques de données concernant ces cibles sont incomplètes (Carbonelle, 2003).

- *Spectrométrie de masse*

Dernièrement, des études ont montré que la spectrométrie de masse (MALDI-TOF : Matrix-Assisted Laser Desorption Ionisation-Time of Flight) pouvait être utilisée en microbiologie clinique pour l'identification des mycobactéries à partir d'un milieu de culture solide (El Khechine, 2011; Saleeb, 2011).

La spectrométrie de masse permet l'étude du déplacement d'entités ioniques dans des champs électromagnétiques et peut permettre l'identification des micro-organismes grâce à l'analyse de leurs protéines ribosomales et membranaires, empreintes digitales de la bactérie. Les ions générés à partir des protéines d'une colonie finement étalée sur la cible en acier, sont séparés en fonction de leur temps de vol (TOF). Pour chaque groupe d'ions de même rapport  $m/z$  (masse/charge ionique), un signal est enregistré au niveau du détecteur sous la forme d'une fonction temps/intensité, l'ensemble des pics ainsi enregistrés constituant un spectre de masse (Figure 21).



**Figure 21 : Spectre de masse de 3 mycobactéries (Saleeb, 2011)**

**A : *M. abscessus* ; B : *M. kansasii* ; C : *M. tuberculosis***

Les spectres générés à partir de bactéries entières sont ensuite comparés aux spectres de référence présents dans la base de données d'un système expert. Cette technique permet une identification rapide, précise et fiable des bactéries. La spectrométrie de masse est peu coûteuse en consommables mais son coût à l'investissement et les contrats de maintenance sont élevés comparativement aux autres automates de laboratoire. L'identification des bactéries dépend de la richesse de la base de données.

## B. Mycobactéries du complexe *abscessus*

### 1. Historique et taxonomie

La souche type de *M. abscessus* a été décrite par Moore et Frerichs en 1953 à la suite d'un cas d'infection du genou avec des lésions d'abcès profonds sous-cutanés (Moore et Frerichs, 1953). D'autres isolats ont été dénommés *M. runyonii* avant d'être reconnus synonymes de *M. abscessus*.

*M. abscessus* a également été considéré pendant de nombreuses années comme une sous-espèce de *M. chelonae*, une mycobactérie à croissance rapide infectant les amphibiens et les poissons et responsable d'infections cutanées chez l'homme.

Ces deux organismes n'ont pas été distingués l'un de l'autre pendant de nombreuses années et ont même été regroupés avec *M. fortuitum* sous l'appellation de "complexe *M. fortuitum*" jusqu'en 1967 (Takeya, 1967). Une étude publiée en 1972 a permis de séparer *M. chelonae* de *M. fortuitum* et a abouti à la définition de deux sous-espèces : *M. chelonae subsp. chelonae* et *M. chelonae subsp. abscessus* sur la base de critères d'identification phénotypiques (Kubica, 1972).

Avec le développement des techniques d'hybridation ADN-ADN et des définitions strictes de spéciation (un taux d'hybridation ADN-ADN entre deux souches inférieur à 70% définit 2 espèces différentes), il a été possible d'élever *M. chelonae subsp. chelonae* et *M. chelonae subsp. abscessus* au rang d'espèce en 1992 (Kusunoki et Ezaki, 1992) sous le nom de *M. chelonae* et *M. abscessus*.

Cependant, dès 1999, le séquençage du gène *hsp65* (Ringuet, 1999) a permis de mettre en évidence une hétérogénéité au sein de l'espèce *M. abscessus* du fait de la description de variants génomiques différant de 5 à 6 pb par rapport à la séquence *hsp65* de la souche type. Cette hétérogénéité a été confirmée par le séquençage du gène codant pour la sous-unité bêta de l'ARN polymérase (*rpoB*) ; ce qui a conduit à proposer l'appellation « complexe *abscessus* » et la division de l'espèce *M. abscessus* sensu lato en trois espèces : *M. abscessus sensu stricto*, *M. massiliense* (Adekambi, 2004) et *M. bolletii* (Adekambi, 2006).

Toutefois, des études phylogénétiques ont montré récemment que la différenciation des trois espèces n'est pas simple. Il y a eu un transfert horizontal de séquences ribosomales *rpoB* entre les 3 espèces, ne permettant pas de les différencier par un simple séquençage du gène *rpoB*. De plus, des approches de séquençage multilocus (*rpoB*, *hsp65*, *sodA*) ne permettent pas clairement de les distinguer (Macheras, 2011). En 2011, Leão et *al.* recommande la création de deux sous-espèces, *Mycobacterium abscessus* subsp. *bolletii*, comprenant *M. massiliense* et *M. bolletii*, et *M. abscessus* subsp. *abscessus*, remplaçant *M. abscessus* sensu stricto (Leao, 2011).

Cependant, d'autres études tendent à différencier ces espèces ou sous-espèces par leur phénotype et leur génotype de résistance aux antibiotiques. Par exemple, une sensibilité à la clarithromycine est observée chez *M. massiliense* tandis que les souches de *M. abscessus sensu stricto* et *M. bolletii* possèdent un gène de résistance inductible à la clarithromycine, le gène *erm(41)* (Bastian, 2011).

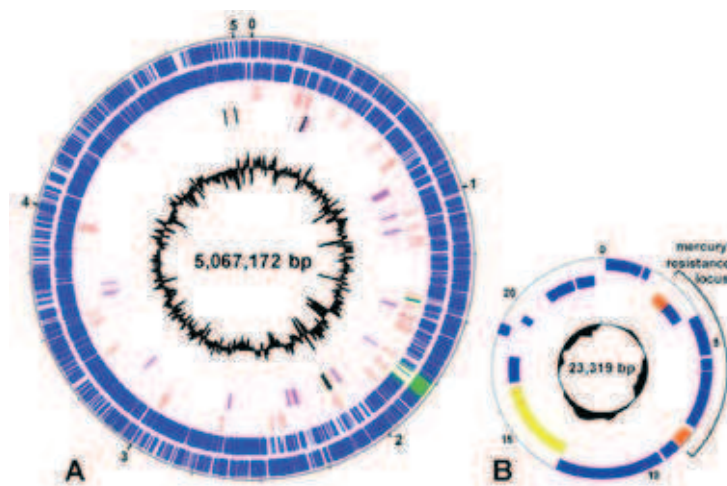
La distinction des différentes sous-espèces de *M. abscessus sensu lato* est donc très complexe. Il est donc probable que le complexe *abscessus* soit encore remanié dans les années qui viennent.

## **2. Particularités des mycobactéries du complexe *abscessus***

### **a. Génome**

L'importance clinique de MABSC a conduit au séquençage du génome de *M. abscessus sensu stricto* par une équipe française en 2009 (Ripoll et al., 2009). Depuis, plusieurs souches du complexe ont été séquencées (Chan, 2012; Choi, 2012; Choo, 2012a; Choo, 2012b).

Les différentes souches possèdent un chromosome circulaire d'environ 5 000 000 pb (*Figure 22*). Cette taille est proche de la taille du génome de *M. tuberculosis* (4,4 Mb), et inférieure à celle du génome de *M. smegmatis* (6,9 Mb), une mycobactérie à croissance rapide non pathogène dont l'organisation des gènes est très similaire à celle de *M. abscessus*.



A : Chromosome ; B : Plasmide de résistance au mercure

**Figure 22 : Génome de *M. abscessus sensu stricto* CIP 104536T (Ripoll, 2009)**

La teneur moyenne en GC du génome de MABSC est de 64 % et le nombre de séquences codantes varie de 4706 à 4923 selon les souches séquencées (Chan, 2012 ; Choi, 2012 ; Choo, 2012a et b ; Ripoll, 2009).

Contrairement aux autres génomes mycobactériens séquencés, le génome de *M. abscessus* est pauvre en séquence d'insertions, mais contient un prophage (81kb) dont la biologie est actuellement inconnue. La souche héberge également un plasmide (Figure 22) contenant des gènes de résistance au mercure présentant 99,9% d'homologie avec le plasmide de *M. marinum*. Ceci suggère le transfert de ce plasmide entre ces deux espèces susceptibles de partager le même écosystème (Ripoll, 2009).

*M. abscessus* possède également des gènes non mycobactériens qui codent pour des facteurs de virulence présents également chez d'autres pathogènes très fréquemment isolés chez les patients atteints de mucoviscidose : *P. aeruginosa* et *B. cepacia*. Ces gènes sont vraisemblablement acquis de bactéries environnementales par transfert horizontal (Medjahed, 2010).

Malgré sa croissance rapide, *M. abscessus* a un certain nombre de caractéristiques de *M. tuberculosis*. C'est un agent pathogène intracellulaire et, contrairement à d'autres mycobactéries à croissance rapide ayant deux opérons d'ARN ribosomal, *M. abscessus* n'en possède qu'un seul (Ripoll, 2009).

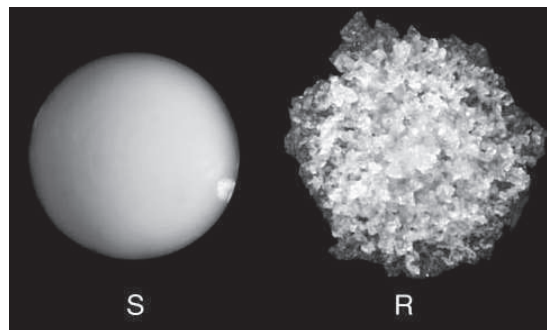
## b. Caractéristiques du complexe *abscessus*

Les souches du complexe *abscessus* ne présentent pas de différences phénotypiques mais quelques différences génotypiques.

- **Caractéristiques phénotypiques**

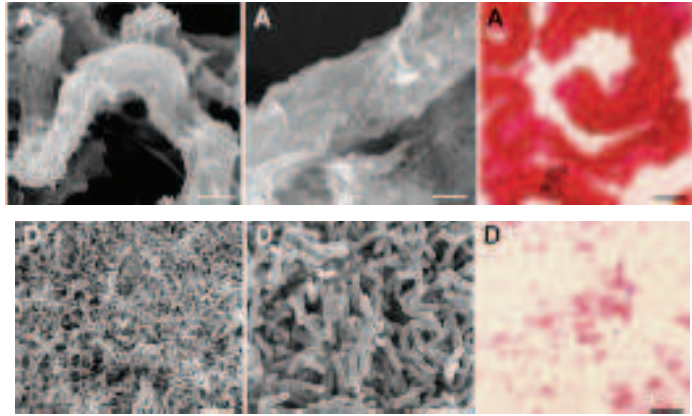
*M. abscessus sensu lato* est une mycobactérie à croissance rapide dont les colonies apparaissent en 3 à 5 jours. Sa croissance est optimale à 30°C. Il croît aussi bien sur milieu Löwenstein-Jensen que sur milieux ordinaires (gélose au sang) (Carbonelle, 2003).

Les colonies ne sont pas pigmentées et ont la particularité de pouvoir être isolées sous deux formes sur un milieu de culture solide : une forme dite muqueuse (nommé S comme *Smooth*) et une autre dite rugueuse (nommé R comme *Rough*) (Figure 23) (Medjahed, 2010).



**Figure 23 : Colonies muqueuses (S) et rugueuses (R) de *M. abscessus* (Medjahed, 2010)**

Récemment, il a été démontré que les colonies rugueuses de *M. abscessus* étaient capables de former de vraies cordes à l'examen direct, comme celles observées chez les mycobactéries du complexe *tuberculosis* ; ceci n'est pas observé avec les souches muqueuses (Figure 24) (Sanchez-Chardi, 2011).



**Figure 24 : *M. abscessus* en microscopie électronique (à gauche et au milieu) et après coloration de Ziehl (à droite).**

**(A) : colonies rugueuses et (D) : colonies muqueuses (Sanchez-Chardi, 2011).**

- **Méthodes génotypiques**

Parmi les méthodes existantes, celles utilisables pour identifier les souches du complexe *abscessus* sont les suivantes :

- analyse des fragments de restriction du gène *hsp65* préalablement amplifié par PCR (méthode PRA) : deux profils peuvent être observés (cf Figure 20 p. 46),
- amplification de la séquence intergénique 16S-23S avec ou sans analyse des fragments de restriction,
- détection après amplification et hybridation sur support solide : Genotype<sup>®</sup> Mycobacterium CM,
- étude de la séquence du gène *hsp65*, du gène 16S, *rpoB*, *secA*, *sodA*...

Les difficultés taxonomiques rencontrées au sein du complexe *abscessus* ont montré qu'un simple séquençage du gène *rpoB* n'est pas suffisant pour différencier les trois sous-espèces. Seule une approche de séquençage multilocus pourrait le permettre selon Zelazny et al. (Zelazny, 2009) : il faut associer le séquençage *rpoB* avec celui de *hsp65* et *secA* par exemple.

- **Spectrométrie de masse**

La spectrométrie de masse MALDI-TOF MS est une méthode efficace pour l'identification des mycobactéries. Toutefois, pour l'identification d'espèces très étroitement liées comme les espèces du complexe *abscessus*, cette méthode n'est pas discriminante (Saleeb, 2011).

### **3. Epidémiologie des infections à mycobactéries du complexe *abscessus***

#### **a. Réservoir et transmission**

Les MABSC sont des bactéries très répandues dans l'environnement, notamment dans l'eau (eau de rivière, eau de lac, eau de mer, eau d'égout) et dans le sol. Les souches de MABSC résistent mieux au chlore que les bactéries coliformes ; elles sont aptes à se multiplier dans l'eau distillée, elles ont été isolées d'échantillons d'eau potable et de système de purification d'eau à usage domestique et elles sont présentes dans les biofilms des conduites d'eau. En milieu hospitalier, l'eau peut être à l'origine d'infections nosocomiales, MABSC étant résistant à de nombreux désinfectants (Euzéby, 2007).

La transmission se fait par ingestion, aérosolisation et par effraction cutanée.

C'est une des principales mycobactéries responsables d'infections iatrogènes sporadiques et épidémiques, souvent liées à la présence de matériel inerte. Les infections post-opératoires, après chirurgie plastique, cardiaque ou orthopédique, représentent près de 45 % des pathologies extrapulmonaires liées à *M. abscessus* (Wallace, 1998).

Parmi les nombreuses épidémies, la plus importante jamais décrite est survenue en Colombie. Sur une période de cinq mois, 350 des 2000 patients qui avaient reçu des injections de lidocaïne contaminée par *M. abscessus* dans le cabinet d'un seul médecin ont développé des abcès sous-cutanés ou des cellulites (Villanueva, 1997). Des épidémies hospitalières ont également été décrites après hémodialyse, par contamination de l'eau du bain de dialyse ou du fait de l'emploi de matériel réutilisable insuffisamment désinfecté. La chirurgie esthétique (liposuction, mammoplastie), une autre source de ces infections, a également donné lieu à des épidémies (Roux, 2010).

Jusqu'à très récemment, aucune transmission inter-humaine de MNT, directe ou indirecte, n'avait été reportée. Cependant, une étude récente de l'Université de Washington a signalé la première épidémie à *M. massiliense* chez cinq patients atteints de mucoviscidose qui fréquentaient la même clinique (Aitken, 2012). Aucune source environnementale n'a été trouvée. Mais le fort d'inoculum de mycobactéries dans les crachats du cas index peut avoir contaminé l'environnement clinique et facilité la transmission inter-humaine. Trois patients, dont le cas index, sont décédés de l'infection à *M. massiliense* résistante à tout traitement antibiotique.

Ces résultats sont préoccupants. Si une épidémie a été décrite pour *M. massiliense*, des épidémies pourront être causées par d'autres mycobactéries du complexe *abscessus*. Ceci renforce l'importance des pratiques d'hygiène afin de contrôler ces infections, même pour les micro-organismes dont la transmission inter-humaine n'est pas connue.

#### **b. Typage moléculaire**

Les méthodes de typage moléculaire sont devenues de précieux outils épidémiologiques dans l'enquête des épidémies à MNT (Griffith, 2007).

Le typage moléculaire des souches de MABSC, peut se faire à l'aide l'électrophorèse en champs pulsé, la méthode de VNTR (Variable-number tandem-repeat) et la rep-PCR. Ces techniques permettent l'étude épidémiologique de souches isolées de patients mais également de souches provenant de l'environnement naturel, domestique ou hospitalier.

L'électrophorèse en champ pulsé est actuellement la méthode la plus utilisée pour l'épidémiologie moléculaire des souches de MNT à croissance rapide (Griffith, 2007). C'est celle utilisée par le centre national de référence (CNR) des mycobactéries en France.

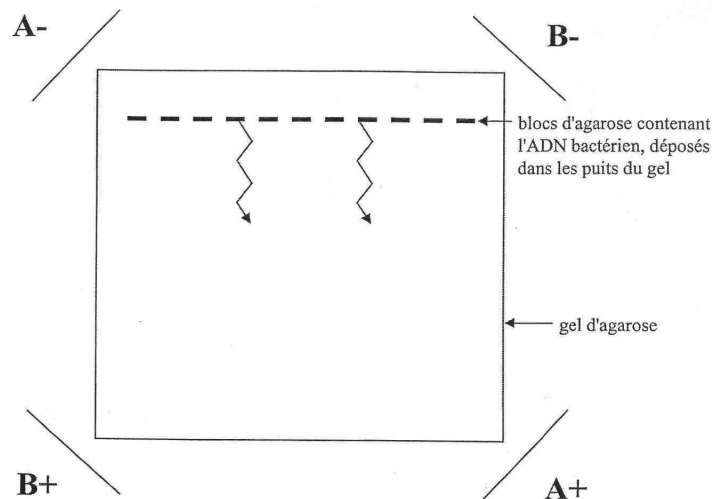
##### **o *Electrophorèse en champ pulsé***

L'électrophorèse en champ pulsé a été développée par Schwartz et Cantor en 1984. Elle est le résultat de la combinaison d'une digestion de l'ADN par des enzymes de restriction à faible nombre de sites de coupures et d'une électrophorèse afin de permettre la séparation de fragments d'ADN de grande taille (> 50 kb) que l'électrophorèse classique en gel d'agarose ne permet pas de résoudre. La



porosité d'un gel d'agarose classique est inférieure au micron alors que la longueur d'une molécule d'ADN de 50 kb complètement étirée est d'environ 18 microns.

Le principe même de l'électrophorèse en champ pulsé repose sur les changements de direction, d'intensité et de durée du champ électrique au cours du temps. Chaque changement de champ électrique réoriente la molécule d'ADN dans le gel, augmentant ainsi la probabilité que la molécule d'ADN soit orientée de façon à passer à travers les mailles du gel (*Figure 25*).



**Figure 25 : Principe générale de l'électrophorèse en champ pulsé (Freney, 2007)**

Le choix de l'enzyme est guidé par deux paramètres :

- le taux de GC % de la bactérie et du site de coupure de l'enzyme : si la bactérie a un GC % élevé comme les MNT, il faut choisir un site de coupure avec un faible GC %. En effet, plus le site de reconnaissance de l'enzyme de restriction est rare sur le chromosome, moins il y aura de fragments et donc de bandes sur le gel.
- le nombre de paires de bases reconnues par l'enzyme : si le site compte 8 bases, la coupure de l'ADN sera plus rare qu'avec un site de seulement 6 bases.

Cette technique nécessite de nombreuses étapes (*Figure 26*):

- culture en milieu liquide de chacune des souches à comparer,
- extraction de l'ADN : étape très délicate car l'ADN ne doit pas être accidentellement fragmenté. Cet ADN est incorporé dans des blocs d'agarose dénommés « plugs »
- purification de l'ADN
- digestion par l'enzyme de restriction
- électrophorèse

- photographie du gel sous lumière ultra-violette après coloration par le bromure d'éthidium.

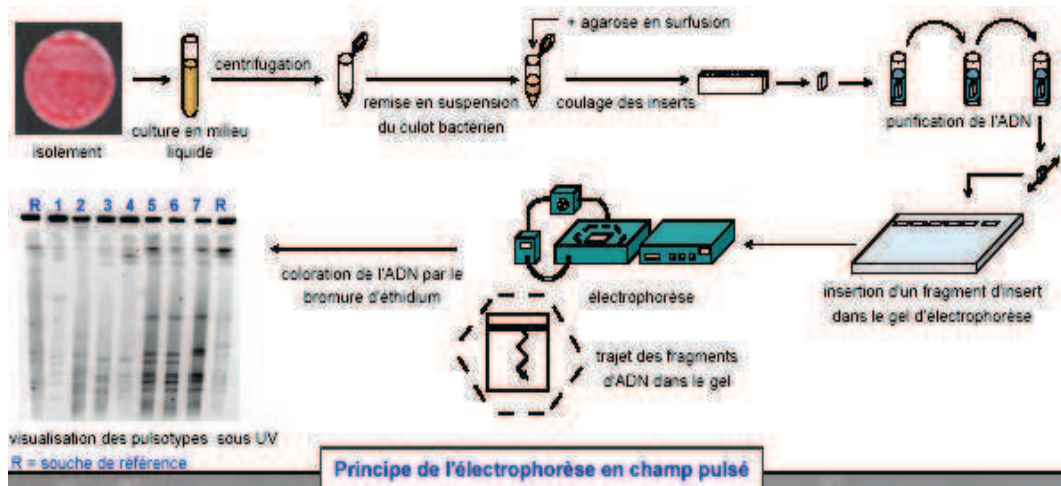


Figure 26 : Etapes de l'électrophorèse en champ pulsé

umr5558-mq1.univ-lyon1.fr/.../EpidémiologieMoléculaire

Le résultat obtenu, après révélation de l'ADN, est un profil de macro-restriction définissant un pulsotype (Figure 27).

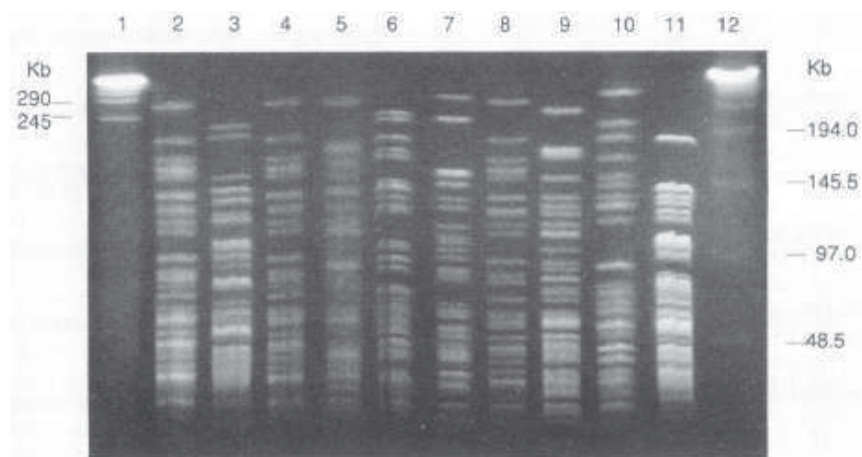
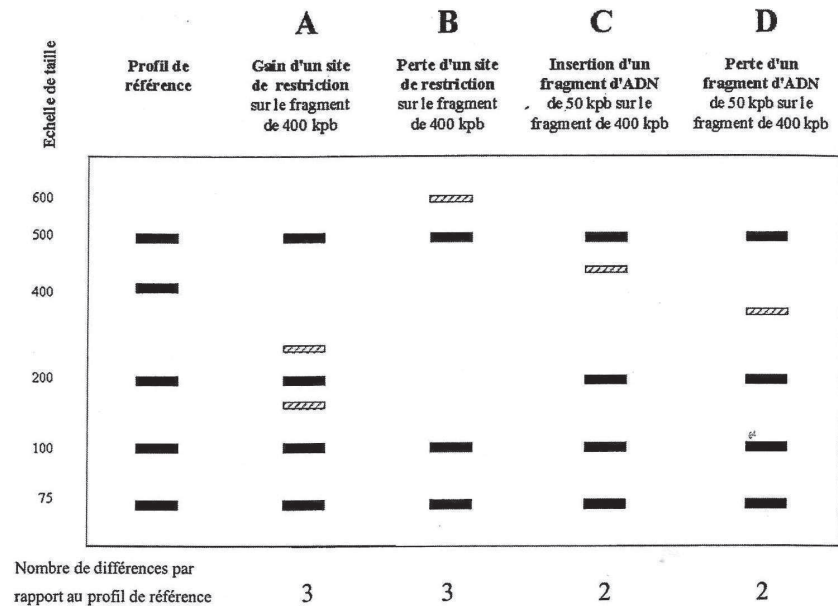


Figure 27 : Pulsotypes obtenus avec des souches de mycobactéries du complexe *abscessus* (Griffith, 1993)

Les pulsotypes, sont comparés visuellement selon les critères de Tenover et *al.* (Tenover, 1995) ou grâce à des logiciels informatiques. Les différences observées entre les profils peuvent être liées,

soit à un gain ou une perte de site de restriction par mutation, soit une insertion ou encore une délétion d'un fragment d'ADN. Les critères de Tenover et *al.* permettent de prendre en compte les éventuels aléas génétiques survenant au sein d'une même souche (Figure 28).



**Figure 28 : Représentation schématique des variations observées sur les profils d'une souche en champ pulsé d'après Tenover et al. (Freney, 2007)**

Ainsi, les profils sont classés en 4 groupes distincts : profils semblables, profils très proches, proches ou différents, selon le nombre de fragments qui diffèrent entre les souches étudiées (Tableau 4).

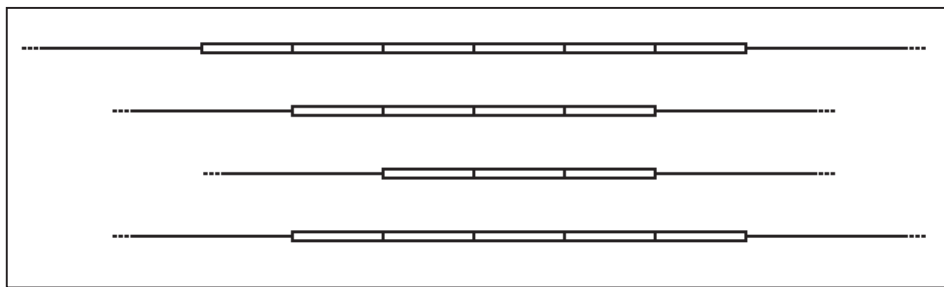
Nombre de modifications génétiques par apport à la souche épidémiologique	Nombre de fragments différenciant la souche testée de la souche épidémiologique	Interprétation microbiologique des profils	Interprétation épidémiologique
0	0	Semblables	Souches faisant partie de l'épidémie
1	2-3	Très proches	Souches faisant probablement partie de l'épidémie
2	4-6	Proches	Souches faisant possiblement partie de l'épidémie
3	$\geq 7$	Différents	Souches non reliées à l'épidémie

**Tableau 4 : Critères d'interprétation du lien épidémiologique de souches bactériennes d'après l'analyse des profils de macrorestriction (Freney, 2007)**

Cette technique présente l'avantage d'une grande résolution, une bonne reproductibilité intra-laboratoire ; elle possède un pouvoir discriminant important et est applicable à un grand nombre d'espèces bactériennes. Toutefois, elle présente de nombreux inconvénients. C'est une technique manuelle, délicate, longue (une semaine environ), coûteuse en terme d'appareillage et nécessite un personnel expérimenté. Les résultats obtenus ne sont pas standardisés : la comparaison de profils est limitée au laboratoire (données non exportables).

- ***MLVA (Multiple Locus VNTR Analysis)***

L'analyse MLVA examine le polymorphisme de plusieurs loci comprenant chacun un nombre variable de régions répétées en tandem (ou VNTR) (*Figure 29*) (Freney, 2007). Il s'agit de petites séquences répétées de 10 pb environ séparées par des séquences non répétitives de 5 pb dont la variation en nombre est fréquente.



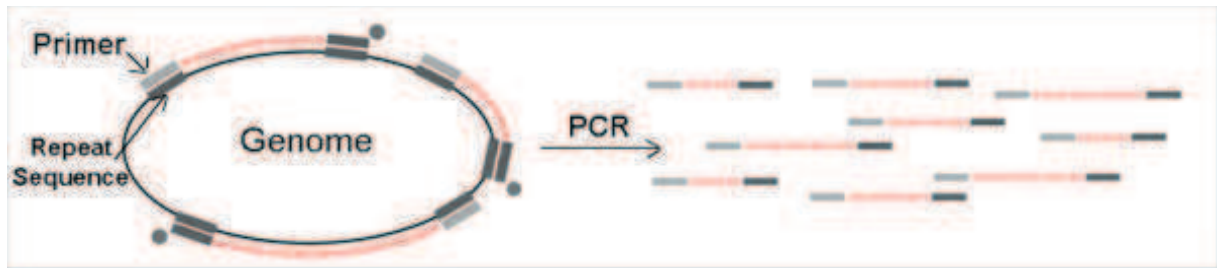
**Figure 29 : Illustration de 4 allèles définis par un nombre différent de régions répétées en tandem**

[http://en.wikipedia.org/wiki/Variable\\_number\\_tandem\\_repeat](http://en.wikipedia.org/wiki/Variable_number_tandem_repeat)

La méthode consiste à amplifier dans une ou plusieurs PCRs multiplex ces régions répétées. L'analyse de la taille des différents VNTRs est réalisée avec un système de haute résolution, tel un séquenceur capillaire à multiples colorants fluorescent et permet l'assignation d'un profil allélique ou code numérique MLVA (Freney, 2007).

- ***rep-PCR (repetitive element polymérase-PCR)***

La rep-PCR, utilisée par le système automatisé Diversilab<sup>®</sup>, utilise des amorces qui se fixent sur des séquences répétitives non codantes dans le génome des micro-organismes permettant l'amplification de nombreux fragments de tailles différentes (amplicons) (*Figure 30*). Les fragments sont ensuite séparés par électrophorèse.



**Figure 30 : Principe de la rep-PCR**

[http://www.biomerieux.fr/servlet/srt/bio/france/dynPage?open=FRN\\_IND\\_BPA\\_PRD&doc=FRN\\_IND\\_BPA\\_PRD\\_G\\_PRD\\_NDY\\_8&pubparams.sform=5&lang=fr](http://www.biomerieux.fr/servlet/srt/bio/france/dynPage?open=FRN_IND_BPA_PRD&doc=FRN_IND_BPA_PRD_G_PRD_NDY_8&pubparams.sform=5&lang=fr)

## 4. Manifestations cliniques

Pour plus de facilité, nous parlerons des mycobactéries du complexe *abscessus* sous le terme général de *M. abscessus* car la plupart des publications concernant la physiopathologie et les manifestations cliniques n'identifient pas toujours précisément la sous espèce en cause.

### a. Physiopathologie

L'étude du génome de *M. abscessus* a révélé l'acquisition par cette espèce de nombreux gènes provenant de bactéries à Gram négatif d'origine environnementale et codant pour les protéines suivantes :

- une phospholipase C qui permet d'échapper aux vacuoles lysosomales,
- des protéines MgtC permettant d'augmenter la concentration intracellulaire en Mg<sup>2+</sup> et donc facilitatrices de la survie bactérienne
- un peptide Méthionine sulfoxyde réducteur A (MsrA) et la superoxyde dismutase (sodA) qui sont des protéines impliquées dans la défense contre le stress oxydatif (Ripoll, 2009).

C'est très vraisemblablement dans ces gènes non partagés par les autres mycobactéries à croissance rapide que repose le pouvoir pathogène spécifique de *M. abscessus* (Ripoll, 2009).

*M. abscessus* possède des facteurs de virulence impliqués dans le « parasitisme » intracellulaire, également retrouvés chez *M. tuberculosis*. Il s'agit des protéines PE (proline-glutamate) et PPE (proline-proline-glutamate) hautement immunogènes, des protéines MCE (*Mammalian Cell*

*Entry*) et Yrbe qui permettent de pénétrer à l'intérieur des cellules hôtes, ainsi que des protéines LpqH-like qui modulent la réponse immunitaire (Ripoll, 2009).

Ont été également identifiées plusieurs voies métaboliques qui favoriseraient l'infection par d'autres micro-organismes pathogènes chez les patients atteints de mucoviscidose, notamment par *P. aeruginosa* (Ripoll, 2009). *M. abscessus* est capable de se multiplier dans les poumons, caractéristique qui le distingue des autres mycobactéries opportunistes comme *M. chelonae* et *M. marinum* qui se multiplient difficilement à 37°C.

L'étude des mécanismes physiopathologiques des infections à *M. abscessus* a beaucoup progressé grâce à un modèle expérimental murin. En effet, celui-ci a montré que l'infection conduit à des dommages histopathologiques mimant étroitement ceux observés chez l'homme, y compris les lésions caséuses (Rottman, 2007).

*M. abscessus* partage un grand nombre de caractéristiques communes avec *M. tuberculosis*. Comme chez celui-ci, le contrôle de l'infection à *M. abscessus* repose sur la production d'interféron-gamma (IFN- $\gamma$ ) et de *Tumor Necrosis Factor- $\alpha$*  (TNF- $\alpha$ ), et sur les lymphocytes T (Rottman, 2007). En effet, les mycobactéries sont phagocytées par les macrophages, lesquels, activés, produisent de l'IL-12 qui, à son tour, stimule la production d'IFN- $\gamma$  par les lymphocytes T. L'IFN- $\gamma$  active les polynucléaires neutrophiles et les macrophages pour éliminer les mycobactéries. De plus, le rétrocontrôle positif entre l'IFN- $\gamma$  et l'IL-12 permet le contrôle de l'infection en grande partie en stimulant la synthèse du TNF- $\alpha$ .

De façon originale, le contrôle de l'infection nécessite également la présence du compartiment lymphocytaire B. Chez la souris, c'est en l'absence de lymphocytes B que l'on voit émerger des souches rugueuses (R) après infection par des souches muqueuses (S) (Roux, 2010).

La forme muqueuse S de *M. abscessus* est capable de produire des glycopeptidolipides (GPL), des lipides de surface, tandis que la forme rugueuse R n'en produit pas. Il a été montré que les GPL masquent des lipoprotéines de surface « phosphatidyl-myo-inositol mannosides ». Ces composés, non masqués avec les variants R de *M. abscessus*, sont des agonistes des récepteurs Toll-like 2 (TLR2) (Roux, 2010). La stimulation des TLR2 par la forme R induit l'expression de l'interleukine-8 (IL-8) et de la  $\beta$ -défensine humaine 2 (HbD2) (Davidson, 2011), présentes à la surface des cellules épithéliales respiratoires, provoquant une réponse pro-inflammatoire excessive. De ce fait, les variants R sont associés à des formes cliniques plus sévères qu'avec les variants S (Roux, 2010).

Le passage de la forme S à R est lié à la perte d'un GPL de surface (Roux, 2010). La forme S de *M. abscessus* produirait les GPL dans certains habitats, lui permettant alors la colonisation de ces milieux par formation de biofilm (Howard, 2006). Par contre, pour une invasion efficace de l'hôte humain, *M. abscessus* pourrait « switcher » à la forme R et ne plus produire de GPL.

## **b. Formes cliniques**

*M. abscessus* est une bactérie pathogène opportuniste qui peut être responsable d'infections respiratoires, cutanéomuqueuses, osseuses, d'atteintes disséminées, de rares infections du système nerveux central et d'infections ou pseudo-infections liées à du matériel contaminé (Lee, 2012).

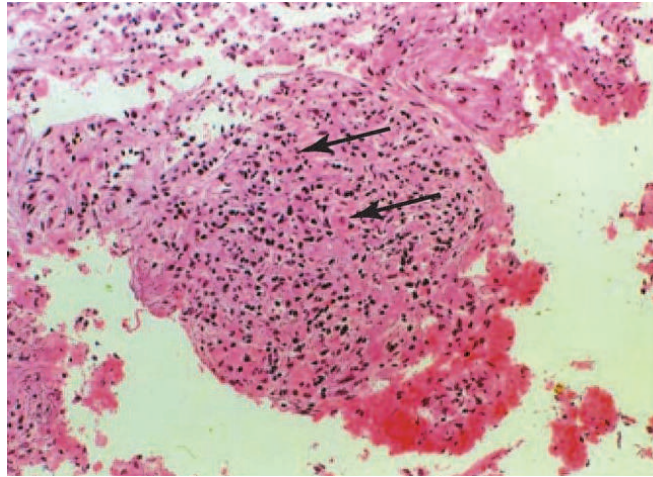
### ▪ *Infections respiratoires*

La majorité des infections pulmonaires à *M. abscessus* survient chez des malades présentant une pathologie sous-jacente telle qu'une dilatation des bronches, la mucoviscidose, des séquelles de tuberculose ou une bronchopneumopathie chronique obstructive (Griffith, 2007). Le reflux gastro-œsophagien est également un facteur de risque (Cullen, 2000). La corticothérapie et l'aspergillose pulmonaire peuvent également contribuer aux infections à *M. abscessus* chez les patients atteints de mucoviscidose (Mussaffi, 2005).

Si les infections pulmonaires chroniques sont la principale manifestation des infections à *M. abscessus*, c'est également la première mycobactérie à croissance rapide impliquée dans les atteintes respiratoires (Lerat, 2011). Dans une étude rétrospective américaine, parmi les 154 cas d'infection pulmonaire à mycobactéries à croissance rapide, 82% étaient dues à *M. abscessus* (Griffith, 1993).

Ces infections peuvent également toucher des sujets antérieurement sains dans 30% des cas, en particulier des femmes caucasiennes âgées de plus de 60 ans généralement non fumeuses (Griffith, 2007).

*M. abscessus* peut persister silencieusement pendant des années et même des décennies chez l'hôte humain (Catherinot, 2007; Cullen, 2000). Il peut induire des lésions granulomateuses organisées avec des cellules épithéloïdes géantes (*Figure 27*) et même dans certains cas, une nécrose caséuse (Cullen, 2000).



**Figure 31 : Granulome causé par *M. abscessus* chez un patient mucoviscidose.  
Les flèches noires indiquent les cellules géantes (Medjahed, 2010)**

Une étude rétrospective américaine incluant 146 patients (Chalermkulrat, 2006) ayant bénéficié d'une transplantation pulmonaire du fait d'une mucoviscidose au stade terminal montre une prévalence de *M. abscessus* avant transplantation voisine de celle de MAC (8%). Après transplantation, la prévalence de MNT est faible (3,4%) mais elle est plus forte si *M. abscessus* était présent avant la transplantation. C'est la seule espèce de MNT significativement liée à une évolution infectieuse péjorative après transplantation, avec des défaillances mortelles du greffon directement dues à la maladie mycobactérienne (Chalermkulrat, 2006).

La similitude des espèces de MNT retrouvées avant et après transplantation indique qu'il existe certainement d'autres réservoirs de *M. abscessus* au-delà des voies respiratoires chez les patients mucoviscidosiques. L'infection à *M. abscessus* a été considérée comme une contre-indication à la transplantation pulmonaire mais des études récentes ont montré que ce n'était plus un critère d'exclusion, les cliniciens doivent cependant, restés alertés d'un risque de récurrence après transplantation et de possibles complications graves (Gilljam, 2010).

- ***Infections de la peau et des tissus mous, infections osseuses***

Les infections les plus courantes des tissus mous causés par *M. abscessus* sont souvent liées à un acte iatrogène et à une inoculation directe de *M. abscessus*, généralement chez des personnes immunocompétentes. Il s'agit dans la majorité des cas d'abcès causés par l'administration sous-cutanée ou intramusculaire de solutions injectables contaminées par *M. abscessus* ou de réutilisation



de matériel souillé (Petrini, 2006). Par ailleurs, des ostéomyélites ont également été rapportées (Brown-Elliott et Wallace, 2002).

*M. abscessus* a été identifié chez des survivants du tsunami de 2004 ayant eu les membres écrasés, l'infection cutanée apparaissant en moyenne deux mois après le traumatisme (Appelgren, 2008).

#### ▪ **Infections disséminées**

Les infections disséminées à *M. abscessus* surviennent généralement chez des patients ayant une immunodépression sous-jacente congénitale, acquise (maladie auto-immune, cancers) ou chez les transplantés. Différentes formes sont décrites telles que des ostéomyélites vertébrales (Pruitt, 1993), des infections sous-cutanées (Prinz, 2004) ou des empyèmes pleuraux (Fairhurst, 2002). De rares endocardites sur prothèses valvulaires ont été reportées.

Exceptionnellement, aucune prédisposition sous-jacente n'est retrouvée lors de ces infections à *M. abscessus*. Ces cas, survenant chez des adultes sans antécédents personnels, ne sont pas évocateurs de déficit héréditaire, mais pourraient être associés à des déficits acquis de l'axe interféron  $\gamma$  – IL12 (Griffith, 2007).

### **c. Particularités au sein du complexe**

Récemment, plusieurs études ont regardé s'il existait une différence de présentation clinique et radiologique entre les différentes espèces du complexe *abscessus*.

Ces études comparent essentiellement les infections à *M. abscessus sensu stricto* aux infections à *M. massiliense*. Aucune différence clinique et radiologique n'a été démontrée (Kim, 2012; Koh, 2011). A l'inverse, il existe une différence notable au niveau de la réponse au traitement, *M. massiliense* étant plus sensible aux antibiotiques que *M. abscessus sensu stricto*.

## 5. Sensibilité *in vitro* aux antibiotiques

### a. Antibiotiques actifs

Les souches de MABSC se caractérisent par une multirésistance naturelle aux antibiotiques, non seulement aux antituberculeux mais aussi à la plupart des antibiotiques utilisables.

Cependant, les MABSC sont naturellement sensibles *in vitro* à certaines  $\beta$ -lactamines (céfoxitine, imipénème), à l'amikacine et aux macrolides (clarithromycine, azithromycine). Parmi les nouvelles molécules, la tigécycline a une puissante activité *in vitro* vis-à-vis des isolats de MABSC (Brown-Elliott, 2012).

La plupart des isolats sont résistants à la doxycycline, la minocycline et au sulfaméthoxazole.

Antibiotiques (ATB)	CMI modale (mg/ml)	Valeurs extrêmes des CMI (mg /ml)	% de souches sensibles
<b>ATB avec un % de sensibilité élevé</b>			
Clarithromycine	0,03	0,03 - 16	83 -99
Amikacine	2 -16	0,25 -128	87 -94
<b>ATB potentiellement actifs mais avec de grandes variations de la sensibilité selon les études</b>			
Cefoxitine	32	16 - 128	11 - 99
Tobramycine	8 - 16	4 - > 128	36 - 95
<b>ATB avec une activité variable</b>			
Imipénème	8	1 – 64	8 -55
Ciprofloxacine	2	0,016 – 8	44 - 57
<b>ATB rarement actifs</b>			
Linézolide	32	0,5 – 128	23
Sulfaméthoxazole	256	4 – 256	1 -12
Doxycycline	32 - >128	0,06 - >128	5 -8
Minocycline	> 64	0,25 - > 64	5
Tetracycline	64	4 - > 128	10

**Tableau 5 : Sensibilité aux antibiotiques des mycobactéries du complexe *abscessus* d'après Nessar et al. (Nessar, 2012)**

L'évaluation de la sensibilité à l'imipénème *in vitro* est très difficile et peut donner des résultats très incohérents (Brown-Elliott, 2012).

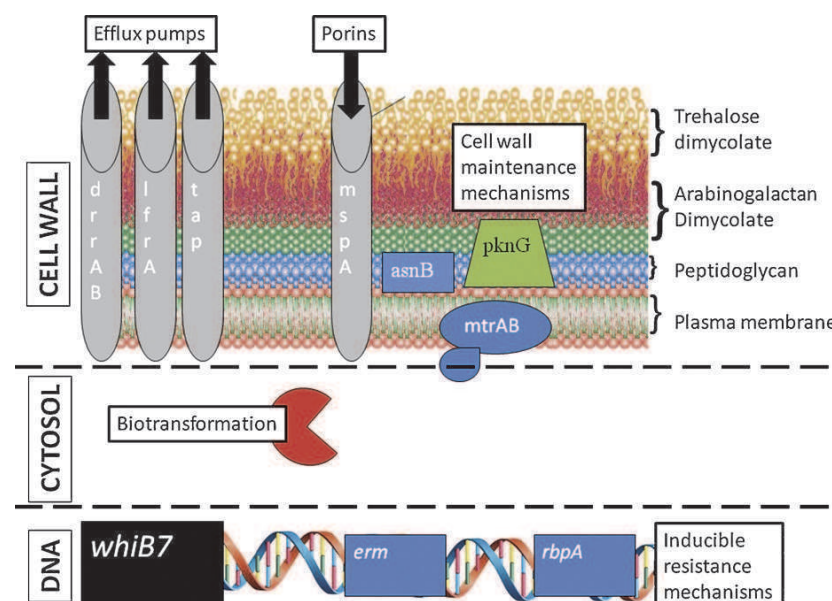
L'amikacine, la céfoxitine et l'imipénème sont les trois antibiotiques administrables par voie intraveineuse les plus actifs *in vitro* sur MABSC (Brown-Elliott, 2012) avec des CMI inférieures aux concentrations atteintes lors des pics sériques.

La clarithromycine est l'antibiotique oral considéré comme le plus actif sur MABSC (Griffith, 2007 ; Nessar, 2012). C'était la molécule de choix jusqu'à la description de la résistance inducible aux macrolides due au gène *erm(41)*.

### b. Mécanismes de résistance

Parmi les mycobactéries à croissance rapide, les MABSC sont probablement les espèces pathogènes opportunistes les plus résistantes aux antibiotiques (Brown-Elliott et Wallace, 2002).

Cette résistance est le résultat d'une interaction complexe entre la résistance naturelle, la résistance inducible et la résistance mutationnelle acquise au cours de l'exposition aux antibiotiques. La connaissance de ces résistances est essentielle pour la sélection et l'optimisation des schémas thérapeutiques. Une vue d'ensemble simplifiée des différents déterminants de la résistance est présentée dans la Figure 32.



**Figure 32 : Vue d'ensemble de la paroi cellulaire mycobactérienne et déterminants de la résistance (van Ingen, 2012)**

### ○ **Résistance naturelle**

De nombreux mécanismes contribuent à la résistance naturelle des mycobactéries du complexe *abscessus* aux antibiotiques.

#### ***La paroi***

Les MABSC possèdent une paroi hautement lipophile, constituant une barrière imperméable aux antibiotiques (Jarlier et Nikaido, 1990), notamment aux  $\beta$ -lactamines et certains aminosides. De plus, le transport des antibiotiques à travers la paroi mycobactérienne est en partie contrôlé par des porines, protéines canaux qui traversent la membrane externe (*cf Figure 32*). Chez les mycobactéries, leur nombre est nettement inférieur à celui des bactéries à gram négatif.

#### ***Les enzymes modifcatrices ou inhibitrices de l'antibiotique***

Les MABSC produisent des enzymes qui dégradent ou modifient certains antibiotiques entraînant leur inactivation.

Les  $\beta$ -lactamases et les rifampicine ADP-ribosyltransférases (Nessar, 2012; Ripoll, 2009) confèrent respectivement une résistance naturelle aux  $\beta$ -lactamines et à la rifampicine.

Les aminoglycosides acétyltransférases et phosphotransférases ont une faible affinité pour les aminosides et n'induisent pas de résistance à l'amikacine (van Ingen, 2012).

#### ***Les pompes à efflux***

Tandis que les porines peuvent restreindre l'entrée des antibiotiques dans la cellule mycobactérienne, les pompes à efflux ont pour rôle de les faire sortir (*cf Figure 32*). Ces pompes confèrent une résistance à de nombreux antibiotiques qui varient selon les espèces de MNT. Dans le génome de *M. abscessus*, les pompes MmpL (Mycobacterial membrane protein Large) sont présentes mais leurs rôles dans la résistance n'est pas établi (Doffinger, 2006).

Les MABSC sont équipées de régulateurs transcriptionnels whiB, inductibles par l'utilisation d'antibiotiques. Ils jouent un rôle dans la régulation des processus cellulaires importants et notamment dans la résistance aux antibiotiques en activant les pompes à efflux (Nessar, 2012 ; van Ingen, 2012).

#### ***Le polymorphisme des gènes cibles***

La résistance naturelle à l'ethambutol et aux fluoroquinolones est liée à la présence de variants nucléotidiques au sein des gènes cibles de ces antibiotiques, respectivement :

- la région ERDR (Ethambutol résistance determining region) du gène *embB*
- les régions QRDRs (Quinolone résistance determining regions) des sous-unités *gyrA* et *gyrB* de l'ADN gyrase

○ **Résistance acquise**

Il n'existe pas d'acquisition d'éléments génétiques mobiles (plasmides ou transposons) chez les MABSC. La résistance acquise est due à des mutations spontanées affectant les cibles-clefs des antibiotiques (*Tableau 6*) ; ces mutations pouvant contribuer à l'altération fonctionnelle d'un ou plusieurs gènes. La présence d'un seul opéron ARNr rend d'autant plus probable ces résistances acquises (Nessar, 2012).

Antibiotics	Gene involved	Mutations	Protein
aminoglycosides	<i>rrs</i>	A1408G, T1406A, C1409T, G1491T	16S RNA
macrolides	<i>rrl</i>	A2058G, A2058C, A2058T, A2059T, A2059C, A2059G	23S RNA
fluoroquinolones	<i>gyrA</i>	Ala90Val	gyrase A subunit

**Tableau 6 : Résistances acquises décrites chez les mycobactéries du complexe *abscessus* (Nessar, 2012)**

***Aminosides***

Les mutations dans le codon 1408 du gène *rrs* de l'ARNr 16S sont responsables de la résistance à haut niveau aux aminosides. Cette résistance aux aminosides est observée chez les patients qui reçoivent des thérapies longues à base d'amikacine tels que les patients atteints de mucoviscidose (Saleeb, 2011).

***Fluoroquinolones***

Les mutations dans le codon 90 de la sous-unité *gyrA* de l'ADN gyrase sont un important mécanisme de résistance aux fluoroquinolones chez *M. massiliense*.

## ***Macrolides***

Il existe deux mécanismes de résistance acquise.

Des mutations ponctuelles sur les positions A2058 ou A2059 du gène *rrl* codant le domaine peptidyltransferase de l'ARNr 23S (Tableau 5) sont associées à un haut niveau de résistance aux macrolides (Saleeb, 2011; Telenti, 1993). Une monothérapie par macrolide ou une bithérapie par macrolide et fluoroquinolone sont des facteurs de risque de développement de cette résistance.

De plus, il a été récemment décrit un gène de résistance naturelle inductible aux macrolides, le gène *erm(41)* (Nash, 2009). Celui-ci confère une résistance à la clarithromycine et l'érythromycine par méthylation de l'ARNr 23S et donc nuit à la liaison de l'antibiotique à sa cible.

Les souches de *M. abscessus sensu stricto* ont un gène *erm(41)* intact mais avec un polymorphisme T/C sur le nucléotide n°28 :

- les souches T28 (Trp10 codon) ont une résistance inductible à la clarithromycine avec des CMI<sub>90</sub> supérieure à 16 µg/ml,

- les souches C28 (Arg10) sont sensibles avec des CMI ≤ 2 µg/ml.

Les souches de *M. bolletii* ont une séquence *erm(41)* similaire à la séquence du gène *erm(41)* de *M. abscessus sensu stricto* T28. Elles sont donc toutes résistantes à la clarithromycine (Bastian, 2011).

Chez *M. massiliense*, le gène *erm(41)* est délété ; ceci rend les souches de cette espèce intrinsèquement sensibles à la clarithromycine (Doffinger, 2006 ; Bastian, 2012).

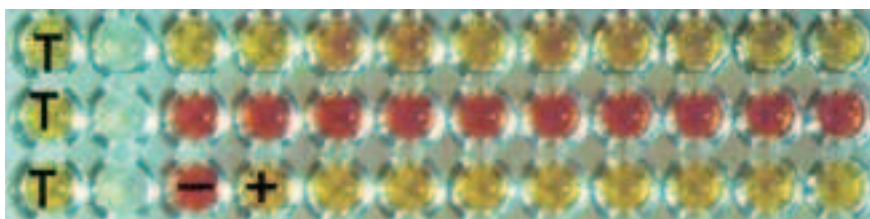
Les séquences *erm(41)* sont spécifiques d'espèces au sein de MABSC et sont concordantes avec la sensibilité à la clarithromycine. Toutefois, l'influence exacte de ce mécanisme de résistance sur l'efficacité d'un traitement à base de macrolides reste à étudier (Saleeb, 2011).

### **c. Méthodes d'étude in vitro**

L'antibiogramme représente le principal outil à partir duquel le clinicien peut adapter son antibiothérapie. Deux types de méthodes peuvent être mises en œuvre.

- **Méthode phénotypique**

Différentes méthodes existent pour tester la sensibilité des mycobactéries à croissance rapide (Brown-Elliott, 2012) : les bandelettes E-test, la méthode de diffusion en gélose (ou « méthode des disques ») et la microdilution. Cette dernière méthode est considérée comme méthode de référence par le Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Elle consiste à mesurer la CMI (Concentration Minimale Inhibitrice) de chaque antibiotique en microplaque (*Figure 33*).



Les puits renferment des concentrations croissantes d'antibiotiques

**Figure 33 : Antibiogramme : technique de microdilution**

<http://www.microbe-edu.org/etudiant/antibio4.html>

C'est une méthode délicate qui doit être mise en place par des laboratoires expérimentés qui isolent un nombre important de MNT. Un inoculum standardisé est essentiel pour la bonne détermination de la CMI (Brown-Elliott, 2012).

Vis-à-vis des mycobactéries du complexe *abscessus*, le panel d'antibiotiques à tester doit inclure l'amikacine, la céfoxitine, la ciprofloxacine, la clarithromycine, la doxycycline ou la minocycline, l'imipénème ou le méropénème, le linézolide, la moxifloxacine, la tobramycine, et le triméthoprime-sulfaméthoxazole (Brown-Elliott, 2012).

La lecture de la CMI se fait après 3 à 5 jours d'incubation à 30°C, excepté pour la clarithromycine pour laquelle une lecture supplémentaire est réalisée au 14<sup>ème</sup> jour afin de détecter une résistance inductible aux macrolides (Brown-Elliott, 2012).

Le CLSI a récemment défini les concentrations critiques permettant d'interpréter les CMI des différents antibiotiques testés par la méthode de microdilution (*Tableau 7*) (Woods, 2011).

Drug	MIC ( $\mu\text{g/mL}$ ) for category:		
	Susceptible	Intermediate	Resistant
Amikacin	$\leq 16$	32	$\geq 64$
Cefoxitin	$\leq 16$	32-64	$\geq 128$
Ciprofloxacin	$\leq 1$	2	$\geq 4$
Clarithromycin	$\leq 2$	4	$\geq 8$
Doxycycline/Minocycline	$\leq 1$	2-4	$\geq 8$
Imipenem/Meropenem	$\leq 4$	8-16	$\geq 32$
Linezolid	$\leq 8$	16	$\geq 32$
Moxifloxacin <sup>b</sup>	$< 1$	2	$\geq 4$
Tobramycin	2	4	$\geq 8$
Trimethoprim-Sulfamethoxazole	$\leq 2/38$		$\geq 4/76$

<sup>a</sup>Breakpoints from the CLSI (formerly NCCLS), NCCLS-M24-A, 2003; CLSI M24-A2, 2011.  
<sup>b</sup> Moxifloxacin breakpoints tentative in M24-2, 2011.

**Tableau 7 : Concentrations critiques des antimycobactériens vis-à-vis des mycobactéries à croissance rapide selon le CLSI (microdilution) (Woods, 2011)**

Concernant la tigécycline, le CLSI n'a pas encore défini de concentrations critiques (Brown-Elliott, 2012).

Pour les cultures qui restent positives après 6 mois de traitement antimycobactérien approprié, le CLSI indique qu'il est justifié de répéter l'antibiogramme afin de suivre l'évolution de la résistance de la souche.

○ **Détection moléculaire de la résistance**

Concernant la détection moléculaire de la sensibilité aux antibiotiques, il n'existe jusqu'à présent, aucun test commercial pour la détection des mutations conférant une résistance de MABSC aux antibiotiques (van Ingen, 2012). Néanmoins, des méthodes spécifiques ont été développées. La détection de la résistance aux macrolide s'effectue par le séquençage partiel du gène codant l'ARNr 23S et du gène *erm(41)* et la détection de la résistance aux aminosides, par le séquençage du gène codant l'ARNr 16S (van Ingen, 2012).



## 6. Traitement des infections pulmonaires

### a. Antibiothérapie

Il n'existe aucun consensus thérapeutique. Le choix des antibiotiques est guidé par la détermination des concentrations minimales inhibitrices (CMI) en milieu liquide.

Les différents antibiotiques utilisés dans le traitement des infections à MABSC sont listés dans le tableau 8.

Rapidly growing species	Type(s) of infection and/or disease	Antimicrobials
<i>M. abscessus</i> subsp. <i>abscessus</i>	Chronic respiratory infection, localized posttraumatic wound infection, catheter infection, disseminated cutaneous infections, eye infection	Linezolid (~50%), moxifloxacin (~15%), ciprofloxacin, levofloxacin (<5%), doxycycline (<5%), clarithromycin-azithromycin (~20%) <sup>a</sup> (oral); amikacin, tigecycline, ceftioxin (70%), imipenem (~50%), <sup>b</sup> linezolid (50%) (parenteral)
<i>M. abscessus</i> subsp. <i>bolletii</i> (formerly <i>M. mageritense</i> )	Chronic respiratory disease, localized posttraumatic wound infection, postsurgical wound infection, catheter infection	Clarithromycin-azithromycin, <sup>c</sup> linezolid (~50%), moxifloxacin (~15%), ciprofloxacin (<5%), doxycycline (<5%) (oral); amikacin, tigecycline, ceftioxin (~70%), imipenem (~50%), linezolid (~50%) (parenteral)

**Tableau 8 : Antibiotiques utilisés pour le traitement des infections à mycobactéries du complexe *abscessus* (Brown-Elliott, 2012)**

L'ATS propose un traitement initial associant plusieurs antibiotiques. La clarithromycine ou l'azithromycine doit être associée à un ou plusieurs agents utilisables par voie parentérale : l'amikacine et/ou la céfoxitine (ou l'imipénème) pendant 8 semaines au minimum, avant un relais oral par la clarithromycine seule. Dans les formes moins sévères ou chez les personnes qui ne tolèrent pas le traitement, des traitements périodiques moins intensifs à base de macrolides oraux ou d'antibiotiques parentéraux peuvent être proposés pour contrôler les symptômes et la progression de l'infection (Brown-Elliott, 2012; Griffith, 2007).

Pour les patients intolérants aux macrolides ou ayant une souche de MABSC résistante aux macrolides, les experts recommandent une association d'antibiotiques par voie parentérale et actifs in vitro (Brown-Elliott, 2012). Le linézolide et la tigécycline sont des molécules alternatives mais il n'existe pas de données sur l'efficacité clinique de ces antibiotiques, qui sont par ailleurs responsables de nombreux effets secondaires.

La plupart des experts recommandent un objectif de 6 à 12 mois de négativation des cultures des prélèvements respiratoires comme critère d'efficacité du traitement (Brown-Elliott, 2012). A l'heure actuelle, les options thérapeutiques sont insuffisantes pour l'éradication des infections à *M. abscessus sensu stricto*. Alternativement, certains experts recommandent donc l'utilisation d'autres paramètres tels qu'une amélioration clinique et/ou une régression des infiltrats pulmonaires et/ou une diminution du nombre de cultures positives à partir des prélèvements respiratoires (Brown-Elliott, 2012).

Les traitements antibiotiques pour les infections non pulmonaires à *M. abscessus sensu stricto* ont montré leur efficacité. Pour les infections pulmonaires à *M. abscessus sensu stricto*, aucune combinaison d'antibiotiques, même basée sur une sensibilité in vitro, n'a prouvé son efficacité pour stériliser les expectorations à long terme (Griffith, 2007).

Les patients infectés par *M. massiliense* ont un taux de réponse plus élevé (88 %) que les patients infectés par *M. abscessus sensu stricto* (25%) (Koh, 2011). Plusieurs études ont montré que le traitement des infections à *M. massiliense* avait permis la négativation des cultures des expectorations (Koh, 2011; Kim, 2012). La résistance inductible au macrolide pourrait expliquer l'absence d'efficacité d'une antibiothérapie incluant un macrolide contre les infections à *M. abscessus subsp abscessus* (Koh, 2011).

Dans l'ensemble, avec les options thérapeutiques actuelles, les infections pulmonaires à MABSC sont souvent chroniques et incurables pour de nombreux patients (Griffith, 2007).

## **b. Recours à la chirurgie**

La résection chirurgicale pulmonaire est parfois le seul traitement (Griffith, 2007), notamment en cas d'atteinte localisée ou excavée ; elle permet alors une résolution complète des symptômes et une négativation des prélèvements. Cette résection peut être totale ou partielle mais concerne seulement les patients qui ont une capacité vitale forcée supérieure à 30% (Hubert, 2005; Le Bourgeois, 2005)

Dans une étude de Griffith et al. (Griffith, 1993), 7 malades, sur les 10 pour lesquels une éradication de la MNT avait été obtenue, avaient bénéficié d'une exérèse chirurgicale associée à une antibiothérapie adaptée, comme le suggère l'ATS.

De même, une étude de survie a été réalisée par Camargos et *al.* chez 21 patients atteints de mucoviscidose (âge moyen de 8,09 +/- 4,4 ans), opérés entre 1988 et 2003, et suivis jusqu'en 2004. Onze ans après la résection, la probabilité de survie était de 93,8% (Camargos, 2008).

Cependant, la plupart des patients ont une atteinte pulmonaire bilatérale et ne peuvent donc pas être candidats à une résection pulmonaire.

Les infections à MNT, et notamment à MABSC, sont classiquement considérées comme un obstacle majeur à la greffe pulmonaire qui représente pourtant souvent la seule chance de survie pour certains patients atteints de mucoviscidose. L'isolement de *M. abscessus* avant la transplantation, constitue un facteur de risque pour le développement d'une maladie à MNT post-transplantation mais n'est pas une contre-indication en soi (Gilljam, 2010).

### **c. Echec thérapeutique**

La surveillance systématique des ECBC après la fin du traitement permet de détecter une éventuelle rechute (Le Bourgeois, 2005). Les patients sont considérés en échec thérapeutique lorsqu'aucune amélioration sur le plan clinique, microbiologique ou radiologique n'apparaît après 6 mois de traitement approprié ou si les cultures restent positives après 12 mois d'antibiothérapie adaptée (Griffith, 2007).

Greendyke et *al.* évoquent l'hypothèse, que l'échec thérapeutique de l'association de l'amikacine, la céfoxitine et la clarithromycine est lié à des concentrations antibiotiques dans les biofilms et les macrophages, inférieures aux concentrations bactéricides (Greendyke et Byrd, 2008).

La négativation bactériologique est difficilement obtenue et parfois seulement de façon transitoire. Pour certains patients en rechute, les symptômes peuvent être contrôlés par des schémas thérapeutiques plus courts de 4 à 12 semaines qui peuvent être répétés comme les cures séquentielles instaurées lors de la prise en charge de l'infection à *P. aeruginosa* (Le Bourgeois, 2005).

# **TRAVAUX PERSONNELS**

En pratique quotidienne, nous sommes confrontés à des difficultés pour isoler les MNT et notamment les mycobactéries du complexe *abscessus* chez les patients atteints de mucoviscidose. En effet, la colonisation à *Pseudomonas aeruginosa* nous contraint à décontaminer les prélèvements respiratoires des patients avant leur mise en culture. Cette technique est parfois trop agressive et destructrice vis-à-vis des mycobactéries ; ce qui occasionne alors des cultures faussement négatives.

Dans ce contexte, nous avons mené une étude prospective dans le but d'étudier une nouvelle technique de décontamination comparativement à la méthode utilisée au laboratoire et l'apport de l'utilisation du milieu Cepacia® dans l'isolement des MNT à partir des sécrétions bronchiques des patients atteints de mucoviscidose suivis au CRCM de Rouen.

Par ailleurs, nous avons procédé à l'étude rétrospective des dossiers des patients chez lesquels une souche de mycobactérie du complexe *abscessus* a été isolée au CHU de Rouen entre 2004 et 2011 pour recenser leurs caractéristiques cliniques et biologiques et leur évolution au fil du temps. En complément, dans un but épidémiologique, nous avons tenté de mettre au point une méthode de typage moléculaire des souches de mycobactéries du complexe *abscessus* isolées chez ces patients.

## **I. MATERIELS ET METHODES**

### **A. Etude prospective d'une nouvelle méthode de décontamination des prélèvements et de l'apport du milieu de culture Cepacia®**

Cette étude a été réalisée de décembre 2011 à avril 2012.

#### **1. Origine des prélèvements**

Les prélèvements analysés étaient exclusivement d'origine broncho-pulmonaire : expectorations, aspirations bronchiques, lavages broncho-alvéolaires et prélèvements bronchiques distaux protégés.

## 2. Préparation des prélèvements

Du fait du caractère polymicrobien des expectorations et des aspirations bronchiques, une étape de fluidification-décontamination a été nécessaire. La technique utilisée au laboratoire de bactériologie du CHU de Rouen (dénommé « Méthode A » par la suite) est réservée aux prélèvements provenant de patients mucoviscidosiques. C'est celle recommandée par l'ATS (Griffith, 2007).

### *Méthode A : méthode conventionnelle avec une double décontamination*

Cette méthode consiste en une double décontamination (DD) : une solution de Mycoprep® (contenant un agent mucolytique, la N-acétylcystéine [NAC], et un agent décontaminant, la soude [NaOH]) a été mise en contact 15 minutes sous agitation avec un volume égal de prélèvement. La décontamination a été stoppée par du tampon phosphate pH=6.8, ajouté jusqu'à un volume de 50 ml. Le tout a été centrifugé 20 minutes à 4000 trs/min. Après avoir éliminé le surnageant, 1 ml d'eau et d'acide oxalique à 5% ont été mis en contact 15 minutes sous agitation avec le culot de centrifugation. L'acide a été neutralisé par de la soude à 4%. Ensuite, la réaction a été stoppée par l'ajout de tampon phosphate (jusqu'à 50 ml) puis le mélange a été centrifugé (20 minutes), le surnageant éliminé et le culot repris par 1 à 2 ml de tampon phosphate.

### *Méthode B : essai d'une nouvelle technique de fluidification-décontamination*

Cette technique de décontamination a été testée, en parallèle de la méthode conventionnelle A, de février à avril 2012, quand le volume de prélèvement était suffisant.

Cette méthode est basée sur l'utilisation d'un antiseptique : la chlorhexidine (Ch) (méthode de Peres, Gevaudan, Gulian et de Micco). Elle se différencie de la méthode A par son temps de réalisation plus court (1h vs 1h30 pour la méthode A) et ne nécessite qu'une étape de décontamination.

Le prélèvement a été fluidifié par 2 ml de dithiothréitol pendant 15 minutes sous agitation. La décontamination a été réalisée par l'ajout de 6 ml de chlorhexidine à 1%, l'ensemble étant agité pendant 15 minutes. La neutralisation a été réalisée, comme pour la méthode A, par l'ajout de tampon phosphate pH=6.8 jusqu'à un volume de 50 ml puis centrifugé pendant 20 minutes. Le culot est repris par 1 ml de tampon phosphate.

### **3. Examen microscopique des frottis**

L'examen direct n'a été effectué que pour les patients connus antérieurement avec une culture positive de MNT pathogène à partir de leurs prélèvements respiratoires.

L'examen microscopique a été effectué à partir du culot du produit respiratoire homogénéisé et centrifugé après un traitement fluidifiant-décontaminant. Le frottis, fixé par la chaleur et l'alcool méthylique, a été coloré par deux méthodes : la coloration à l'auramine puis, pour les frottis positifs, par la coloration de Ziehl-Neelsen.

#### *Coloration à l'auramine*

Le frottis a été recouvert par une solution d'auramine pendant 15 minutes puis recouverte d'alcool-acide (mélange d'alcool à 95° et d'acide chlorhydrique) pendant 5 minutes. La contre-coloration a été réalisée par du rouge de thiazine pendant 1 minute et 30 secondes. La lame a été rincée à l'eau distillée entre les différentes étapes avant d'être séchée à l'air et à l'abri de la lumière. La lecture a été effectuée à l'objectif x40 à sec et avec un microscope à fluorescence. La lame entière a été examinée à la recherche de bâtonnets fluorescents sur fond rouge foncé.

#### *Coloration de Ziehl-Neelsen*

En cas d'examen direct positif à l'auramine, nous avons confirmé la positivité du frottis par recoloration de la lame par le technique de Ziehl-Neelsen : la lame a été recouverte pendant 10 minutes de fuschine phéniquée à chaud ; la décoloration a été réalisée à l'aide d'acide sulfurique à 25% pendant 3 minutes puis par de l'éthanol 90° pendant 5 minutes. La lame a été rincée entre chaque étape puis séchée à l'air. La contre-coloration a été réalisée avec le bleu de méthylène pendant 30 secondes. La lame a été ensuite observée à l'immersion à l'objectif x100 à la recherche de bacilles rose-rouge sur fond bleu.

Les résultats de l'examen microscopique ont été exprimés selon le Tableau 9, adaptées des recommandations du Rémic® (Courcol, 2010).

Résultats rendus
Aucun BAAR détecté
Nombre exact de BAAR (5-10 vus)
< 1 BAAR/champ
1 -10 BAAR/champ
10 - 100 BAAR/champ
>100 BAAR/champ

**Tableau 9 : Modalités de réponse pour la lecture des examens microscopiques**

#### **4. Mise en culture des prélèvements**

Le culot des prélèvements décontaminés a été ensemencé en milieu liquide et solide selon les recommandations de l'ATS (Griffith, 2007). Seule la technique A a permis l'ensemencement en milieu liquide ; la chlorhexidine utilisée dans la méthode B ne se dissolvant pas correctement dans ce milieu.

- *Milieu solide*

L'ensemencement en milieu solide a été réalisé sur des milieux de Löwenstein-Jensen (Bio-Rad) en inoculant 4 à 5 gouttes du culot de prélèvement par tube. Le nombre de tubes ensemencés a varié en fonction de la méthode de décontamination utilisée et en fonction des antécédents de cultures positives pour le patient (*Tableau 10*).



	Méthode A	Méthode B
Patients connus	4 milieux	2 milieux
Patients non connus	2 milieux	2 milieux

**Tableau 10 : Nombre de milieux solides ensemencés**

Ceux-ci ont été incubés en position inclinée, un ou deux à 30°C et un ou deux à 37°C. La lecture des tubes a été faite manuellement une fois par semaine.

En cas de cultures positives, nous avons relevé le délai d'apparition des colonies, leur nombre, leur aspect et la présence ou non d'une pigmentation. En cas de croissance de contaminants sur le milieu, la culture a été interrompue. Le tube a été jeté et la notion de « tube souillé » a été notée.

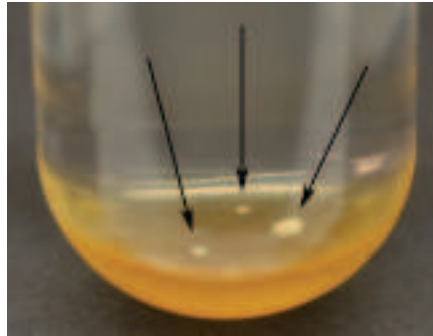
○ *Milieu liquide*

Un tube BBL™ MGIT™ (Becton Dickinson) a été ensemencé avec 0,5 ml du culot de centrifugation des prélèvements décontaminés par la méthode A. Ont été ajoutés 800 µl d'un mélange d'antibiotiques PANTA® (Polymixine B, AmphotéricineB, acide Nalidixique, Triméthoprim, Azlocilline) et de facteurs de croissance OADC® (acide Oléique, Albumine bovine, Dextrose, Catalase).

La croissance a été révélée à l'aide de l'automate BACTEC™ MGIT™ 960 (Becton Dickinson). L'incubation des tubes dans l'automate a été réalisée à 37°C jusqu'au signal de croissance et pour une durée maximale de 42 jours.

En cas de culture positive, nous avons noté le délai d'apparition de la positivité et vérifié après coloration de Ziehl-Neelsen que les micro-organismes qui s'étaient développés dans le milieu étaient bien des BAAR et non des contaminants. Suite à cette vérification, une subculture sur milieu de Löwenstein-Jensen a été faite. En cas de présence de contaminant, une nouvelle décontamination du tube MGIT™ était réalisée pour tenter d'isoler une mycobactérie.

Afin d'augmenter la sensibilité de détection du milieu MGIT™, lorsque l'automate a rendu une culture négative, nous avons effectué un contrôle visuel du milieu MGIT comme suggéré dans certaines publications (Pena, 2012). La présence de petits grains au fond du tube (*Figure 34*) peut en effet indiquer la présence de mycobactéries.

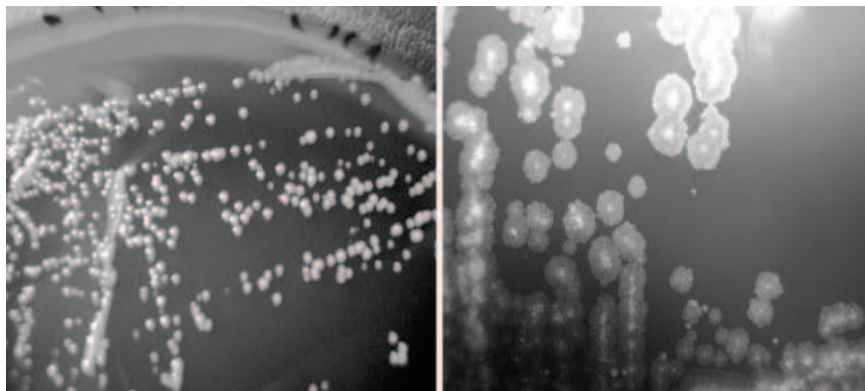


**Figure 34 : Aspect typique de mycobactéries dans un MGIT négatif (Pena, 2012)**

○ *Essai du milieu de culture Cepacia®*

Le prélèvement a été ensemencé sur un milieu Cepacia® (AES Chemunex) sans étape préalable de décontamination. Le prélèvement a juste été dilué au demi dans du Digest-EUR® (Eurobio) pour le fluidifier avant sa mise en culture.

Ce milieu a été incubé 5 jours à 37°C puis à 30°C jusqu'au 14<sup>ème</sup> jour d'incubation. Il a été regardé tous les 2-3 jours. En cas de positivité, le délai de culture ainsi que l'aspect lisse ou rugueux des colonies de mycobactéries ont été relevés (*Figure 35*).



**Figure 35 : Aspect des colonies sur milieu Cepacia®**

A gauche : colonies muqueuses S ; A droite : colonies rugueuses R

## 5. Identification des cultures positives

### a. Méthode phénotypique

Quelques caractères phénotypiques ont été relevés à partir des colonies des milieux Löwenstein-Jensen :

- la morphologie des BAAR en microscopie
- le délai de culture des colonies
- l'aspect lisse (S) ou rugueux (R) des colonies
- la pigmentation des colonies à la base de la classification de Runyon

### b. Méthode génotypique

En parallèle, l'identification a été réalisée grâce à l'amplification par PCR d'un fragment du gène *hsp65* à partir du milieu de culture liquide ou de colonies.

La procédure complète comporte quatre phases :

- extraction de l'ADN à partir de cultures de mycobactéries cultivées en milieu solide ou liquide
- amplification génique en temps réel sur ABI PRISM<sup>®</sup> 7000 (Applied Biosystems) à partir des amorces 102A1 et 102A2
- séquençage du fragment *hsp65* amplifié
- analyse des séquences par confrontation à la base de données BIBI (Bio Informatic Bacterial Identification) permettant d'identifier la souche et l'édition d'un dendrogramme (*Figure 36*).

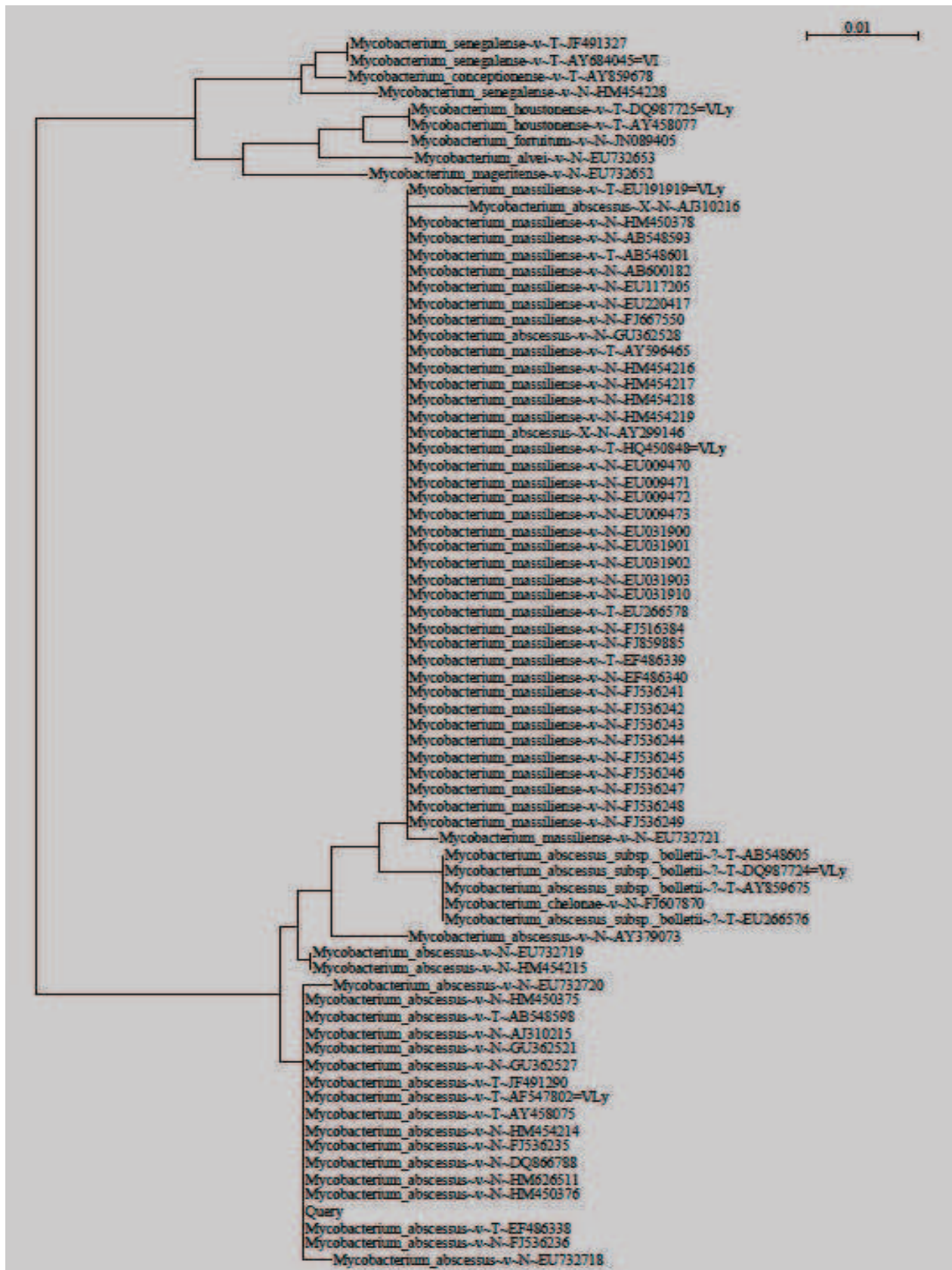


Figure 36 : Dendrogramme montrant les relations génétiques des souches de mycobactéries selon les séquences du gène *hsp65*

## **B. Etude rétrospective des cas d'infections dues aux mycobactéries du complexe *abscessus* chez les patients mucoviscidosiques suivis au CRCM de Rouen de 2004 à 2011**

### **1. Patients**

Nous avons réalisé une étude rétrospective des cas de colonisations/infections pulmonaires par des mycobactéries du complexe *abscessus* chez les patients atteints de mucoviscidose suivis au Centre de Ressources et de Compétence pour la Mucoviscidose (CRCM) de Rouen.

Pour cela, nous avons recensé l'ensemble des prélèvements positifs reçus au laboratoire des mycobactéries du CHU de Rouen entre le 1<sup>er</sup> janvier 2004 et le 31 décembre 2011, soit une période de 8 ans. Ce recensement a été réalisé à l'aide du logiciel MOLIS du laboratoire de bactériologie. Celui-ci renseigne sur l'identité des patients, la date et la nature des prélèvements et le résultat des cultures.

Les données clinico-biologiques concernant notre population ont été collectées à partir du dossier patient informatique (CDP2) par consultation des comptes-rendus d'hospitalisation. De plus, grâce à la consultation des dossiers patients version papier de notre population d'intérêt, nous avons pu collecter des informations relatives aux thérapeutiques administrées et à certaines données cliniques.

Les données suivantes ont été recueillies :

- les données démographiques : sexe, âge
- les données cliniques : génotype CFTR, comorbidités (insuffisance pancréatique externe, diabète, atteinte ORL, reflux gastro-oesophagien),
- les données anthropométriques : poids, indice de masse corporel (IMC),
- les données fonctionnelles : VEMS, CVF et SaO<sub>2</sub>,
- les données thérapeutiques : la prescription d'azithromycine, le nombre de cures d'antibiotiques *per os* ou intraveineuses, la prescription d'une corticothérapie *per os* ou inhalée,
- les données microbiologiques générales : colonisation/infection à *Pseudomonas aeruginosa*, à *Staphylococcus aureus*, à *Stenotrophomonas maltophilia*, présence d'*Aspergillus fumigatus* dans

l'ECBC et d'une aspergillose broncho-pulmonaire allergique (ABPA) via la prescription d'un traitement par antifongique de type itraconazole ou voriconazole,

- les données microbiologiques concernant le diagnostic de colonisation/infection à MNT : espèce isolée, résultats des examens directs et des cultures, sérologie anti-mycobactérienne (taux d'anticorps A60), les résultats de l'antibiogramme réalisé par le CNR des Mycobactéries (Hôpital de la Pitié-Salpêtrière, Paris)
- le traitement ou non de la colonisation/infection à MABSC.

Certains paramètres (poids, VEMS, CVF, SaO<sub>2</sub>) ont été suivis sur quatre périodes :

- un an avant le diagnostic
- au moment du diagnostic
- pendant le traitement de l'infection à MABSC
- deux ans après le diagnostic

L'éradication était définie par des cultures devenues négatives pendant au moins un an tandis que la non-éradication était caractérisée par la persistance de culture positive à MNT, quel que soit le résultat de l'examen direct.

Pour comparer certaines variables qualitatives, nous avons employé le test de Fisher exact (utilisé pour des effectifs théoriques faibles). Tous les calculs ont été réalisés sur le site internet BiostaTGV.

## **2. Typage des souches par électrophorèse en champ pulsé**

Au moins une souche de chaque patient et quand cela a été possible, deux souches d'un même patient ont été étudiées par électrophorèse en champ pulsé.

### **○ Culture des souches**

A partir de subculture des souches sur milieux Cepacia<sup>®</sup>, les différentes souches ont été cultivées dans 10 ml de bouillon 7H9-Tween80-OADC-Sucrose et incubées dans une étuve à 37°C sous agitation pendant 72 heures.

- **Préparation des « plugs »**

Au troisième jour, 8 ml de culture ont été centrifugés à 4°C pendant 20 minutes à 3000 trs/min. Afin de casser la paroi des mycobactéries, le culot a été repris par un faible volume de tampon froid de Phage Buffer IV (PIV : Tris 10mM, pH 7,6 ; NaCl 1M) puis placé dans un mélange de carboglace-éthanol. Après décongélation dans la glace pilée, la suspension bactérienne a été mélangée avec un volume égal d'une solution d'agarose à 1,3% (Incert<sup>®</sup> agarose) maintenue à 50°C dans un bloc chauffant. Le mélange ainsi préparé a été immédiatement aliquoté sous un volume de 200 µl dans une barrette puis incubé à +4°C pendant au moins 30 minutes afin de former les blocs d'agarose nommés « plugs », emprisonnant l'ADN des mycobactéries.

Les barrettes ont été placées préalablement dans un lit de glace puis conservées au réfrigérateur pour que la prise en masse des plugs d'agarose soit la plus rapide possible car elle est indispensable à une bonne conservation de l'ADN.

- **Lyse cellulaire**

Ensuite, ces plugs ont été délicatement démoulés de la barrette puis incubés sous agitation dans 3 ml de solution de lyse renfermant entre autres de la RNase à 20µg/ml et du lysosyme à 5 mg/ml préparé extemporanément. Le tout a été placé dans un bain-marie à 37°C toute une nuit. Le lendemain, la solution de lyse a été retirée délicatement, remplacée par 2 mL d'une solution de protéinase K à 1mg/ml et d'EDTA-sarcosine (1%) (Solution ESP) et placée à 50°C dans un bain-marie pendant 24 h afin de digérer les protéines associées à l'ADN. Le lendemain, la solution a été remplacée par une solution fraîche de protéinase K et placée 24 h supplémentaires dans un bain-marie à 50°C.

- **Lavage des plugs**

A cette étape, il a été important de débarrasser les plugs de toute trace de protéinase K qui détruirait l'enzyme de restriction. Pour cela, les plugs ont été lavés quatre fois sous agitation et à 37°C avec une solution de Tris-EDTA (TE): un lavage de 30 minutes, un de 1 heure, un de 2 heures puis enfin un dernier lavage pendant toute une nuit.

- **Digestion enzymatique**

Une fois lavés, les plugs ont été placés séparément dans un cône Eppendorf<sup>®</sup> contenant chacun 265 µl d'eau distillée stérile, 30 µl de tampon 10x d'enzyme *AseI*, 3 µl d'albumine bovine 100x (BSA) et 3 µl d'enzyme de restriction *AseI*. Les cônes ont été placés dans un bain-marie à 37°C pendant une nuit.

Après digestion, les plugs étaient soit utilisés directement pour l'électrophorèse, soit conservés à +4°C dans une solution fraîche d'ESP.

- **Electrophorèse en champ pulsé**

Pour chaque souche étudiée, un petit morceau de plug a été placé au fond d'un puits d'un gel d'agarose à 1 % (Seakem GTG<sup>®</sup>), en veillant à le plaquer contre la paroi antérieure. Un marqueur de poids moléculaire (Mid Range I PFG Marker, New England Biolabs) a également été placé dans le gel. Les puits ont ensuite été scellés par de l'agarose à 1% ayant servi à fabriquer le gel. Le gel démonté, a été placé dans la cuve de migration de l'appareil servant à l'électrophorèse en champ pulsé (Genepath<sup>™</sup> System, BioRad). La cuve a été préalablement remplie par 1,9 litres de TBE 0,5x (Tris 0,45 mM - Borate 0,45 mM – EDTA 0,01 mM) et 100µM de thiourée. Un système de réfrigération a permis d'assurer une température constante de 14°C. L'électrophorèse a été lancée avec le programme 16 permettant de séparer des fragments d'ADN allant jusqu'à 600 kb.

- **Révélation du gel**

Après 20 heures de migration, le gel a été placé 1 heure dans un bain d'eau distillée auquel ont été ajoutés 400 µl de bromure d'éthidium (1mg/ml). L'excès de bromure d'éthidium a été éliminé par incubation pendant une heure dans un bain d'eau distillée seule. Le gel a ensuite été photographié sur une table à lumière ultra-violette.

- **Interprétation des résultats**

Les profils obtenus ont alors été comparés visuellement selon les critères précédemment définis par Tenover et *al.* (Chapitre Rappels bibliographiques II B 3b p.58).



## II. RESULTATS

### A. Etude prospective d'une nouvelle méthode de décontamination des prélèvements et de l'apport du milieu de culture Cepacia®

#### 1. Description générale de la population

Pendant les 5 mois de notre étude, 126 prélèvements ont été étudiés : 119 crachats, 6 aspirations bronchiques, un prélèvement bronchique distale protégé (PBDP) et un lavage broncho-alvéolaire (LBA).

Ces prélèvements provenaient de 73 patients atteints de mucoviscidose et suivis au CRCM de Rouen. Il y avait 40 hommes et 33 femmes, soit un sex ratio de 1,2. Neuf des 73 patients étaient des enfants ( $\leq 16$ ans). La tranche d'âge s'étendait de 7 à 66 ans pour une moyenne d'âge de 29 ans.

La quantité de prélèvements reçue n'a pas toujours permis de tester les deux techniques de décontamination et la mise en culture sur milieu Cepacia® (Figure 37).

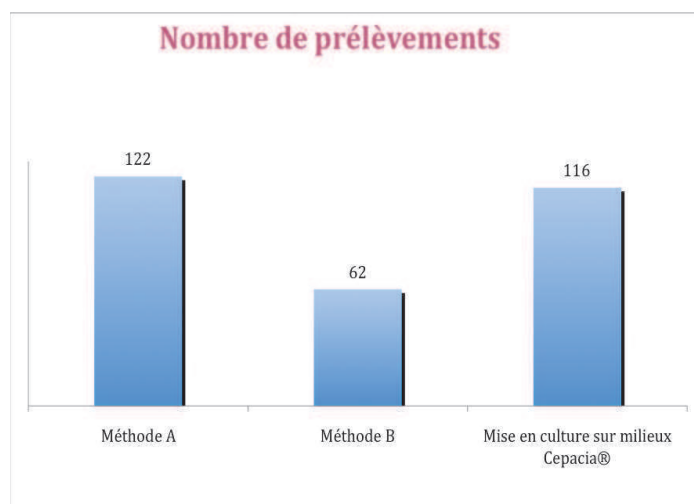
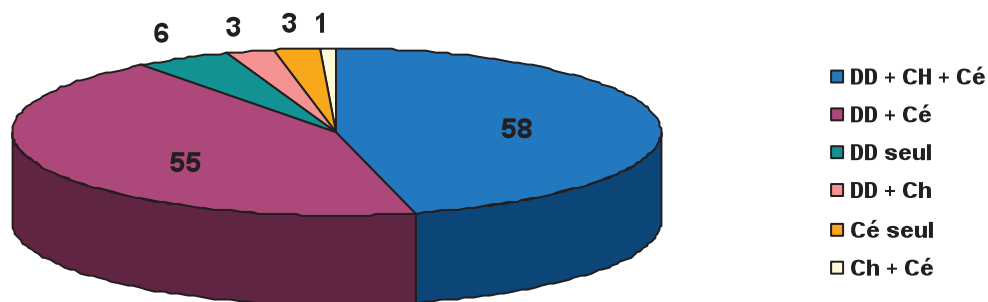


Figure 37 : Répartition des tests effectués sur les prélèvements

Seize prélèvements ont été effectués chez les enfants, soit une moyenne de 1,77 prélèvements par enfant et un total de 110 prélèvements chez les 64 adultes, soit une moyenne de 1,72 prélèvements par adulte.

Sur les 126 prélèvements, 58 prélèvements ont été décontaminés par les méthodes A et B et ensemencés sur le milieu Cepacia®. Pour 55 prélèvements, seule la méthode A et la mise en culture sur milieu Cepacia® ont pu être mises en œuvre (Figure 38).



DD : double décontamination (méthode A)

Ch : décontamination à la chlorhexidine (méthode B)

Cé : milieu Cépacia

**Figure 38 : Tests effectués sur les 126 prélèvements**

## 2. Résultats

### ○ Cultures positives

Sur ces 126 prélèvements, 19 cultures positives (15%) de mycobactérie ont été observées grâce à au moins l'une des trois approches testées : 16 (84%) avec une mycobactérie du complexe *abscessus* et 3 (16%) avec *Mycobacterium gordonae*.

Les 3 souches de *M. gordonae* ont été isolées de 3 patients différents et n'ont jamais été retrouvées sur milieu Cepacia®. Nous les avons retrouvés une fois dans un milieu MGIT™ au 42<sup>ème</sup> jour de culture et les deux autres fois uniquement sur milieu de Löwenstein-Jensen au 35<sup>ème</sup> jour de culture avec les méthodes A et B.

Les 16 cultures positives de mycobactérie du complexe *abscessus* provenaient de 6 patients mucoviscidosiques âgés de 12 à 44 ans (âge moyen = 25,3 ans), soit 2 enfants et 8 adultes. Sur cette période, le taux de prévalence d'infection ou de colonisation à mycobactéries du complexe *abscessus* au sein du CRCM de Rouen est donc de 8,2 %. Neuf patients étaient connus et un seul non connu.

La majorité de ces prélèvements (87,5%) étaient des crachats. Le tableau 11 indique les résultats des examens directs et des cultures liquides et solides selon les techniques effectuées sur ces 16 prélèvements.

Patients	Nature des prélèvements	Méthode A			Méthode B		Cépacia®		
		ED	Cultures liquides (MGIT)	Cultures solides	ED	Cultures solides	Cultures		
1	MAH ALE	Crachats	<1/chp	+ 3 <sup>ème</sup> j	+15 <sup>ème</sup> j 50 col	ne	ne	+3 <sup>ème</sup> j col R	<i>M. abscessus</i>
2		Crachats	-	+ 4 <sup>ème</sup> j	+ 5 <sup>ème</sup> j 100 col	-	+ 5 <sup>ème</sup> j 30 col	+ 2 <sup>ème</sup> j col R	
3	GUI ART	Crachats	-	+ 4 <sup>ème</sup> j	+ 8 <sup>ème</sup> j 50 col	ne	ne	+3 <sup>ème</sup> j col R	<i>M. abscessus</i>
4		Crachats	1-10/chp	+ 2 <sup>ème</sup> j	+ 8 <sup>ème</sup> j 100 col	ne	ne	+3 <sup>ème</sup> j col R	
5		Crachats	ne	ne	ne	<1/chp	+ 6 <sup>ème</sup> j innombrables	+4 <sup>ème</sup> j col R	
6		Crachats	100/chp	+ 2 <sup>ème</sup> j	+ 4 <sup>ème</sup> j 30 col	<1/chp	+ 4 <sup>ème</sup> j 30 col	+ 3 <sup>ème</sup> j ccl R	
7	VAR ARU	Crachats	-	+ 3 <sup>ème</sup> j	souillées	ne	ne	+3 <sup>ème</sup> j col R	<i>M. massiliense</i>
8		Crachats	ne	ne	ne	ne	ne	+3 <sup>ème</sup> j col R	
9		LBA	<1/chp	ne	ne	ne	ne	+3 <sup>ème</sup> j col R	
10		PBDP	-	ne	ne	ne	ne	+6 <sup>ème</sup> j col R	
11		Crachats	1 vu	+ 5 <sup>ème</sup> j	-	-	+3 <sup>ème</sup> j 50 col	+3 <sup>ème</sup> j col R	
12		Crachats	<1/chp	+ 3 <sup>ème</sup> j	+ 10 <sup>ème</sup> j 50 col	10 vus	+ 6 <sup>ème</sup> j 500 col	+ 4 <sup>ème</sup> j col R	
13	T.RU DAM	Crachats	-	+ 3 <sup>ème</sup> j	-	ne	ne	-	<i>M. abscessus</i>
14	COU DOR	Crachats	-	-	-	ne	ne	+10 <sup>ème</sup> j col R	<i>M. bolletii</i>
15		Crachats	-	+ 9 <sup>ème</sup> j	+ 7 <sup>ème</sup> j 4 col	-	+ 15 <sup>ème</sup> j 50 col	-	
16	COB LAU	Crachats	-	+ 6 <sup>ème</sup> j	-	-	+ 6 <sup>ème</sup> j 30 col	+ 6 <sup>ème</sup> j col S	<i>M. abscessus</i>
<b>TOTAL DES POSITIFS</b>			<b>6 / 14</b>	<b>11 / 12</b>	<b>7 / 12</b>	<b>3 / 7</b>	<b>7 / 7</b>	<b>14 / 16</b>	

ne : non effectué ; col : colonies ; R : rugueuses ; S : muqueuses

**Tableau 11 : Résultats détaillés des prélèvements associés à une culture de mycobactérie du complexe *abscessus***

Onze des 122 prélèvements (9%) décontaminés par la méthode A, 7 des 62 prélèvements (11,3%) décontaminés par la méthode B et 14 des 116 prélèvements (12%)ensemencés sur le milieu Cepacia® ont permis d'isoler une mycobactérie.

Nous constatons 100% de positivité (7/7) des milieux Löwenstein-Jensen qui ont été ensemencés après une décontamination par la chlorhexidine (Méthode B).

Trois milieux Löwenstein-Jensen ensemencés après double décontamination étaient négatifs alors que les milieux liquides MGIT ensemencés en parallèle étaient positifs.

Le seul prélèvement pour lequel la culture en milieu liquide MGIT (prélèvement n°14) a été négative correspond au seul prélèvement pour lequel nous avons une quantité très faible (<0,3mL) et mentionné « quantité insuffisante de prélèvements : examen sous réserve » sur le compte-rendu de résultats.

Grâce à l'utilisation du milieu Cepacia® qui ne demande pas d'étape de décontamination, nous avons pu retrouver la mycobactérie présente dans ce prélèvement malgré une faible quantité mais le délai de culture a été plus long que pour les autres prélèvements (10 jours vs 2 à 6 jours).

Toutefois, pour deux prélèvements sur les 16 positifs, les cultures sur milieu Cepacia® étaient négatives.

#### ○ **Volume et aspect des prélèvements**

Le volume et l'aspect de tous les prélèvements ont été notés avant toute manipulation. Concernant les prélèvements positifs à MABSC, nous avons des aspects très différents d'un prélèvement à un autre : muqueux (n=6), muco-purulent (n=6), purulent (n=3) voire très purulent (n=1) ainsi que des volumes différents allant d'une quantité inférieure à 0,3 mL jusqu'à 1 mL. Parmi ces prélèvements, aucun aspect type ne se dégage ; seule la quantité de prélèvements importe pour une recherche fiable des mycobactéries.

#### ○ **Examens directs**

Parmi les 16 prélèvements positifs à MABSC, seulement 6 prélèvements avaient un examen direct (ED) positif.

Parmi les 6 prélèvements qui ont pu être décontaminés à la fois avec la méthode A et la méthode B, nous avons 3 ED positifs avec la méthode A et seulement deux avec la méthode B, avec un nombre de BAAR inférieur à la méthode A.

### ○ Colonies et délai de culture

Le temps de pousse des colonies varie peu d'un milieu à l'autre. Il se situe entre 2 et 15 jours avec une moyenne de 4 jours sur le milieu liquide MGIT et le milieu Cepacia<sup>®</sup>, et de 7 jours sur milieu Löwenstein-Jensen.

Les colonies sur milieu solide étaient toutes non pigmentées. Chez 5 patients, nous avons des mycobactéries du complexe *abscessus* présentant des colonies rugueuses (R) et pour un seul patient, des colonies muqueuses (S).

### ○ Contamination des milieux

Certaines cultures sur milieu Löwenstein-Jensen ont été interrompues à cause d'une contamination des milieux par des bactéries, très souvent *P. aeruginosa*: 47 % des prélèvements (199/423 Löwenstein-Jensenensemencés) pour la méthode A vs 14,5 % (18/124) pour la méthode B ont eu au moins un tube Löwenstein-Jensen contaminés. Ce taux diminue à 35,4% pour la méthode A et 12,9% pour la méthode B si l'on comptabilise uniquement les prélèvements où tous les tubes Löwenstein-Jensenensemencés étaient contaminés (c'est à dire 4 milieux pour les patients non connus avec la méthode A et 2 milieux pour tous les autres).

La contamination concerne 15,5 % des tubes MGIT (19/122). Sachant qu'il est tout de même possible de décontaminer à nouveau ces tubes MGIT, la culture liquide a pu être poursuivie pour 16 des 19 tubes MGIT contaminés, soit un taux de contamination final de 2,4 %.

Sur milieu Cepacia<sup>®</sup>, 60% des cultures ne présentaient aucune croissance bactérienne. Sur 26 milieux, nous avons de rares colonies de *Staphylococcus*, *Stenotrophomonas* ou de levures mais qui n'altéraient pas la poursuite de la culture des mycobactéries. Seulement 7 cultures ont été interrompues (6%) car le milieu Cepacia<sup>®</sup> a été envahi, soit par un *Proteus* soit par un champignon filamenteux (Figure 39).



**Figure 39 : Milieu de culture envahi par un champignon filamenteux**

## B. Etude rétrospective

### 1. Analyse des dossiers clinicobiologiques

Vingt et un patients suivis au CRCM de Rouen ont présenté une culture positive à mycobactéries dans au moins un de leurs prélèvements respiratoires entre janvier 2004 et décembre 2011. Les mycobactéries du complexe *abscessus* étaient les mycobactéries non tuberculeuses les plus souvent retrouvées devant *M. avium intracellulare* (Tableau 12).

En plus de ces patients, il faut ajouter un autre patient pour lequel nous n'avons pas isolé de mycobactéries dans notre laboratoire mais pour lequel une souche de *M. abscessus sensu stricto* a été retrouvée à plusieurs reprises dans les prélèvements respiratoires techniques en laboratoire de ville en 2011.

Mycobactéries	Nombre de patients
<b>MABSC</b>	<b>10</b>
<i>M. abscessus sensu stricto</i>	8
<i>M. bolletii</i>	1
<i>M. massiliense</i>	1
<b>MAC</b>	<b>4</b>
<i>M. avium</i>	1
<i>M. intracellulare</i>	3
<i>M. gordonae</i>	2
<i>M. frederikbergense</i>	2
<i>M. xenopi</i>	2
<i>M. immunogenicum</i>	1
<i>M. proche mucogenicum</i>	1
<b>TOTAL</b>	<b>22</b>

Tableau 12 : Mycobactéries retrouvées chez les patients du CRCM de Rouen de 2004 à 2011

Notre étude a donc comporté l'analyse de dossiers de 10 patients colonisés/infectés par une mycobactérie du complexe *abscessus*. Huit hommes et deux femmes ont été inclus, soit un sex-ratio H/F de 3,5. L'âge médian de ces patients au moment du diagnostic était de 22,7 ans (variation de 12 à 43 ans). Deux des dix patients étaient des enfants de 12 et 14 ans respectivement.

Les données anthropométriques au moment du diagnostic retrouvaient un poids médian de 54 kg et un IMC (indice de masse corporelle) de 18,9 kg/m<sup>2</sup> (*Tableau 12*).

Sur le plan fonctionnel, le VEMS médian était de 70,4 % de la théorique et celui de la CVF de 79,1 % de la théorique.

En terme de morbidité, 3 des 10 patients étaient homozygotes pour la mutation DF508, une majorité de patients présentait une insuffisance pancréatique externe (IPE), une atteinte ORL et un reflux gastro-œsophagien. Un seul patient était atteint de diabète.

De l'azithromycine et des corticoïdes inhalés étaient prescrits chez 50 % des patients (5/10) et 40 % avaient bénéficié de plus de quatre cures d'antibiotiques par an (per os ou intraveineuse).

## **2. Colonisation bactérienne et fongique**

Lors du diagnostic, 100 % des patients étaient colonisés ou infectés par une souche de *S. aureus* sensible à la méticilline (SAMS), 6/10 par *Pseudomonas aeruginosa* et 4/10 par *Stenotrophomonas maltophilia*. Un seul patient était colonisé ou infecté par une souche de *S. aureus* résistant à la méticilline (SAMR). *Burkholderia cepacia* n'était présent chez aucun des patients.

Huit patients sur 10 avaient un examen cyto-bactériologique des crachats (ECBC) positif à *Aspergillus fumigatus* et 7 sur 10 étaient traités pour une aspergillose broncho-pulmonaire allergique (ABPA).

Les patients infectés/colonisés à mycobactéries du complexe *abscessus* étaient significativement plus colonisés à SAMS, *S. maltophilia* et *Aspergillus spp* que la population générale (*Tableau 13*).

	Notre étude	Données nationales 2010	
<b>Nombre de patients</b>	<b>n = 10</b>	<b>n = 5758</b>	<b>p</b>
Sexe ratio H/F	3,5	1,05	<0,01
<b>Anthropométrie/EFR</b>			
Âge lors du diagnostic (an)	22,7 (12-43)		
Poids (kg)	54 (37-69)		
IMC (kg/m <sup>2</sup> )	18,9 (17-21)		
SaO <sub>2</sub> (%)	97,7 (95-100)		
VEMS (%)	70,4 (48-113)		
CVF (%)	79,1 (41-119)		
<b>Comorbidité</b>			
Homozygote F508	3	43,6%	0,06
IPE	9		
Diabète	1	14,8%	0,39
ORL	8		
Traitement par IPP	6	18,8%	<0,01
<b>Microbiologie</b>			
Colonisation <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	6	42,9%	0,13
Colonisation SAMS	10	53,5%	<0,01
Colonisation SAMR	1	8%	0,8
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	4	8,5%	<0,01
<i>Burkholderia cepacia</i>	0	2%	0,5
<i>Aspergillus fumigatus</i>	8	21%	<0,01
Aspergillose Broncho-pulmonaire allergique	7	12,4%	<0,01
<b>Traitement antérieur</b>			
Azithromycine	5	42,4%	0,1
Corticoïdes per os	0	9,7%	<0,01
Corticoïdes inhalés	5	40,8%	0,26
Plus de 4 antibiothérapies par an	4		
<b>Prise en charge</b>			
Respect des critères microbiologiques de l'ATS	10		
Traitement	9		
Eradication bactériologique	3		

**Tableau 13 : Caractéristiques de la population étudiée par rapport aux données nationales de 2010.**



### 3. Evolution du poids, de la SaO2, du VEMS et du CVF

Pour 3 des 10 patients, l'infection étant récente, nous n'avons pas pu intégrer leurs données pour la quatrième période de l'étude, c'est-à-dire la période « 2 ans après le diagnostic ».

Quand nous faisons la moyenne des paramètres de nos patients au cours des 4 périodes étudiées, nous observons un léger déclin du VEMS et du CVF l'année précédant la mise en évidence de la mycobactérie. Cette diminution de la fonction pulmonaire continue même au cours du traitement puis s'intensifie dans les deux ans qui suivent le diagnostic de MNT.

Toutefois, le déclin du VEMS et du CVF n'est pas associé à une perte de poids, ni à une baisse de la saturation en oxygène (*Figure 40*).

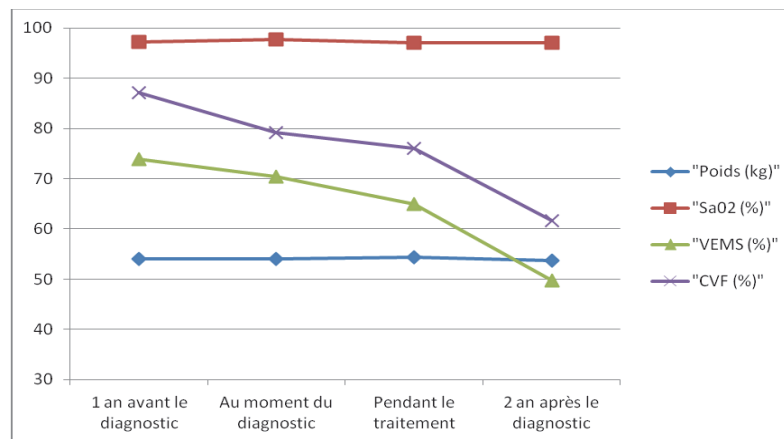


Figure 40 : Evolution du poids et des paramètres fonctionnels

### 4. Sérologie anti-mycobactérienne

Le taux d'anticorps A60 chez nos patients variait de 189 à 1863 UA/ml, avec une moyenne de 593. Tous les patients dépassaient, lors du diagnostic de colonisation/infection à MABSC, le seuil de positivité établi à 225 UA/ml, seuil de positivité en anticorps anti-mycobactériens, lors du diagnostic de colonisation/infection à MABSC.

Malheureusement, nous n'avons pas assez de dosage d'anticorps A60 chez les patients pour suivre l'évolutivité du taux des anticorps pendant le traitement et après celui-ci.

On constate tout de même que pour les trois patients ayant eu une éradication de la mycobactérie, le taux des anticorps a diminué après le traitement mais ce taux n'est passé sous la barre des 225 UA/ml que pour un seul patient (APP GAB).

## **5. Eradication microbiologique**

Dans cette étude, 3 des 10 patients (APP GAB, COU DOR et MAC MIC) ont eu des cultures négatives dans l'année qui a suivi le traitement pour éliminer la colonisation/infection à MABSC.

Il n'y avait pas de différences significatives des données anthropométriques entre patients éradiqués et patients non éradiqués. Par contre, sur la base du VEMS, CVF et SaO<sub>2</sub>, il existait une atteinte fonctionnelle respiratoire plus sévère chez les patients dont l'infection a été éradiquée et une atteinte ORL plus fréquente chez les patients sans éradication de la mycobactérie.

Aucune différence n'était à signaler sur le plan de la colonisation bactérienne et fongique.

Des cures répétées d'antibiotiques (plus de 4 par an) étaient plus souvent associées à l'éradication (*Tableau 14*).

	Non éradiqués	Eradiqués	
	n = 7	n = 3	p
<b>Anthropométrie/EFR</b>			
Âge lors du diagnostique (an)	22	24,3	0,56
Poids (kg)	54,4	53,2	0,81
IMC (kg/m <sup>2</sup> )	19	18,4	0,73
SaO <sub>2</sub> (%)	97,9	95,7	0,07
VEMS (%)	83,9	50,7	0,03
CVF (%)	94,9	69	0,02
<b>Comorbidité</b>			
Homozygote F508	3	0	0,24
IPE	6	3	1
ORL	7	1	0,07
Traitement par IPP	5	1	0,5
<b>Microbiologie</b>			
Mycobactérie du complexe <i>abscessus</i> :			
Au moins un ED positif	7	3	1
Nombre de cultures positives	11,7	3,3	
Autres espèces bactériennes :			
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	4	2	1
SAMS	7	3	1
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	3	1	1
Colonisation fongique :			
<i>Aspergillus fumigatus</i> en culture	6	2	1
Aspergillose Broncho-pulmonaire allergique	4	3	0,48
<b>Traitement antérieur</b>			
Azithromycine	3	2	1
Corticoïdes inhalés	4	2	1
Plus de 4 antibiothérapies par an	1	3	0,03

**Tableau 14 : Synthèse des données clinico-biologiques des 10 patients étudiés**

## 6. Antibiogramme des souches de mycobactéries du complexe *abscessus*

L'antibiogramme des souches de *M. abscessus*, *M. massilense* ou *M. bolletii* a été réalisé chez les 10 patients après envoi de la souche au CNR des mycobactéries. Pour certains de ces patients, plusieurs antibiogrammes ont été effectués au fil des années du fait de la persistance de cultures positives de mycobactérie (Tableau 15).

Les souches envoyées au CNR des mycobactéries étaient peu fréquemment sensibles aux antibiotiques potentiellement actifs vis-à-vis du complexe *abscessus* : 2/13 sensibles à la tobramycine, 1/16 sensible à la céfoxitine, 4/16 sensibles au linézolide et 3/16 sensibles au sulfaméthoxazole. Elles étaient toutes résistantes à la minocycline, à la doxycycline, à la ciprofloxacine et à la moxifloxacine. En revanche, la majorité de ces souches étaient sensibles à l'amikacine (13/16), à la clarithromycine évaluée entre le 3 et 5<sup>ème</sup> jour (12/16) et à la tifécycline (9/14)(Figure 35). Nous constatons néanmoins que lorsque la clarithromycine a été lu au 14<sup>ème</sup> jour (antibiogrammes effectués après janvier 2010), toutes les souches (8/8 dont 7 sensibles et une de sensibilité intermédiaire à la clarithromycine au 3<sup>ème</sup> jour) avaient une résistance inductible à la clarithromycine, y compris la souche de *M. massiliense* du patient VAR ARU.

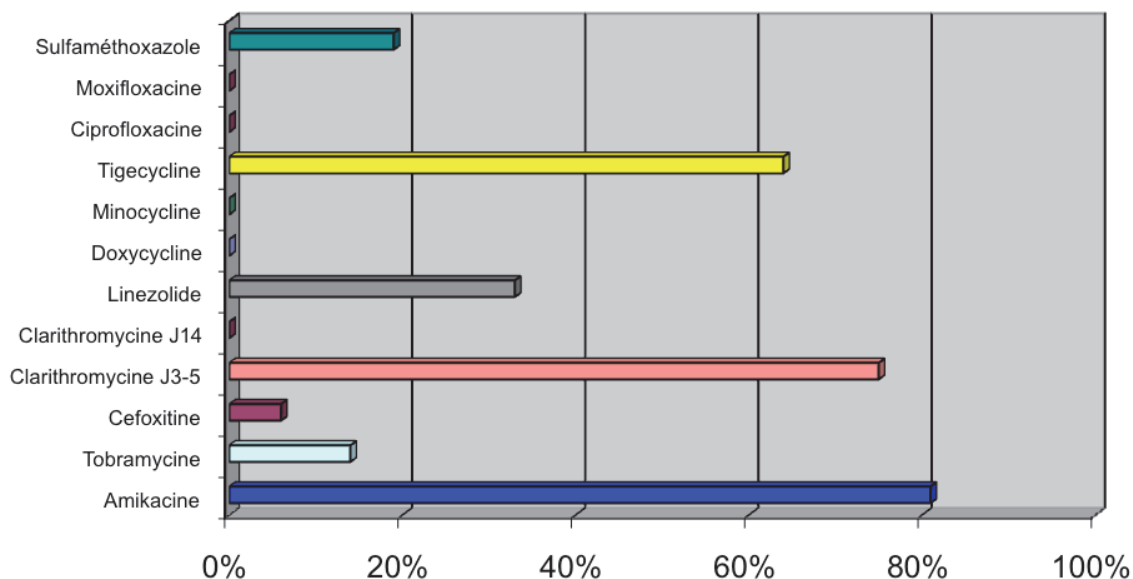


Figure 41 : Sensibilité (%) aux antibiotiques des souches de mycobactéries du complexe *abscessus* des patients suivis au CRCM de Rouen

		APP GAB	BOU BEN		CHA ANA				COB LAU		COU DOR		GUI ART	MAC MIC	MAH ALE	TRU DAM	VAR ARU
Espèces bactériennes		<i>M. abscessus</i>	<i>M. abscessus</i>		<i>M. abscessus</i>				<i>M. abscessus</i>		<i>M. boletii</i>		<i>M. abscessus</i>	<i>M. abscessus</i>	<i>M. abscessus</i>	<i>M. abscessus</i>	<i>M. massiliense</i>
Date d'isolement		10/04/08	01/07/09	27/10/10	10/10/2004 <sup>a</sup>	21/02/05	07/07/2005 <sup>b</sup>	25/09/08	14/11/2011 <sup>c</sup>	05/04/12	23/03/10	02/03/12	13/10/11	14/04/08	11/05/11	01/09/11	30/12/11
	Concentrations critiques (mg/L)																
Amikacine	16-32	R	S (16)	S (16)	S (2)	S (8)	S (4)	S (16)	S (8)	S (16)	S (16)	S (16)	R (>64)	S (16)	S (8)	I (32)	S (16)
Tobramycine	4-8	R	R (>16)	R (16)	S (2)	S (4)	x	R	x	R (16)	R (>16)	R (>16)	R (>16)	R (32)	I (8)	R (>16)	R (16)
Cefoxitine	16-64	R	I (64)	I (32)	S (16)	I (32)	I (32)	I (64)	I (32)	I (32)	I (32)	I (64)	I (32)	I (32)	I (32)	I (64)	I (64)
Clarithromycine J3-5	2-4	S (0,5)	R (>16)	S (1)	S (<0,25)	S (1)	S (0,12)	R (>32)	S (0,5)	S (1)	S (0,5)	S (1)	S (0,5)	R (8)	S (0,25)	I (4)	S (0,25)
Clarithromycine J14	2-4	x	x	R (>16)	x	x	x	x	x	R (>16)	R (>16)	R (>16)	R (>16)	x	R (>16)	R (>16)	R (>16)
Linezolid	8-16	R	R (32)	R (16)	S (2)	S (8)	R (32)	R	I (16)	R (32)	I (16)	I (8)	I (16)	R (32)	S (8)	R (32)	S (8)
Doxycycline	1-8	x	x	R (>16)	R (>16)	R (>16)	R (>16)	x	R (>16)	R (>16)	R (>16)	R (>16)	R (>16)	x	R (>16)	R (>16)	R (>16)
Minocycline	4-8	R	R (>8)	R (>8)	x	x	x	R (>8)	R (>8)	R (>8)	R (>8)	R (>8)	R (>8)	x	R (>8)	R (>8)	R (>8)
Tigecycline	0.25-0.5	S (0,125)	R (1)	R (1)	S (<0,06)	S (0,25)	x	x	R (1)	S (0,25)	S (1)	S (0,12)	S (0,12)	R (0,75)	S (0,06)	S (0,25)	I (0,5)
Ciprofloxacine	1-2	R	R (>4)	R (>4)	x	x	R (>32)	R	R (>4)	R (>4)	R (>4)	R (>4)	R (4)	R (>16)	R (4)	R (>4)	R (>4)
Moxifloxacine	0.5-1	x	x	R (>8)	R (4)	R (16)	R (12)	R	R (>8)	R (>8)	R (8)	R (8)	R (8)	x	R (>8)	R (>8)	R (8)
Sulfaméthoxazole	32	R	R (>256)	R (>256)	R (>64)	R (>64)	R (>256)	R	R (>152)	R (>152)	R (>256)	S (1)	S (2)	R (>8)	R (>32)	R (>152)	S (8)

x : non testée

a : antibiogramme réalisé en microdilution à l'Institut Pasteur de Paris ; b : réalisé sur milieu solide Löwenstein-Jensen ; c : réalisé par le laboratoire Biomnis

**Tableau 15 : Antibiogramme des souches du complexe *abscessus* isolées chez les 10 patients**

Parmi les 5 patients qui ont été traités au long cours par de l'azithromycine (APP GAB, COB LAU, COU DOR, MAH ALE et VAR ARU), chaque souche de MABSC était sensible aux macrolides mais avait une résistance inductible à la clarithromycine.

## 7. Traitement antimycobactérien

Ces 10 patients qui ont eu au moins deux cultures positives à une mycobactérie du complexe *abscessus*, pouvaient donc être considérés comme infectés selon les critères microbiologiques de l'ATS (Griffith, 2007). Neuf sur les 10 patients ont été traités pour la colonisation/infection à *M. abscessus*.

Le traitement d'induction comportait entre 2 et 4 antibiotiques par voie parentérale (Figure 42). L'association la plus fréquente comportait de la clarithromycine, de l'amikacine et de la céfoxitine (4/9 patients). Les 5 autres patients ont été traités par des schémas divers (Annexe 1). La durée du traitement d'induction variait de 20 à 40 jours.

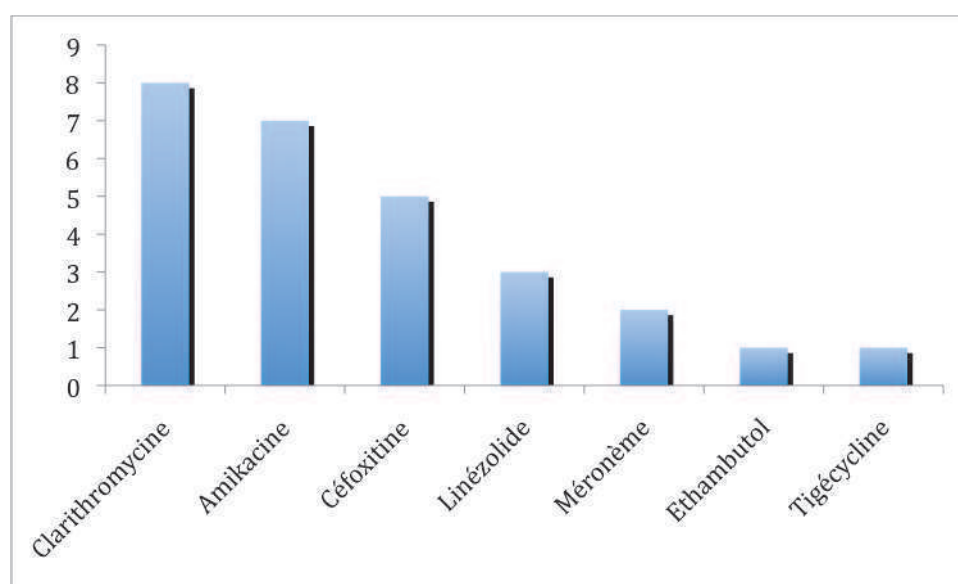


Figure 42 : Antibiotiques utilisés lors du traitement d'induction chez les 9 patients

Le plus souvent, la clarithromycine était associée à l'amikacine (6/9). Tous les patients ont eu un relai oral au moins avec de la clarithromycine. Un relai oral de clarithromycine et de nébulisations d'amikacine était le plus souvent prescrit pour des durées parfois très longues (> 1 an).

Le nombre de cures par voie parentérale par patient variait de 1 à plus de 7 cures.

Pour 3 des 10 patients (APP GAB, COU DOR, MAC MIC) aucune mycobactérie n'a été retrouvée l'année qui a suivi le traitement ; la MNT a été considérée comme éradiquée. Nous n'avons pas retrouvé de différences concernant la prise en charge des patients qui ont eu une éradication microbiologique de MABSC par rapport aux patients non éradiqués.

Après 2 ans de cultures négatives (2010-2012), COU DOR a de nouveau eu plusieurs cultures positives en mars dernier malgré un relai oral de clarithromycine et des nébulisations d'amikacine pendant plus d'un an après les deux cures par voie parentérale (juillet et décembre 2010).

Aucun patient n'a bénéficié d'une transplantation pulmonaire et aucun n'est décédé.

## 8. Typage moléculaire

Les caractéristiques des souches analysées par électrophorèse en champ pulsé sont présentées dans le tableau 16.

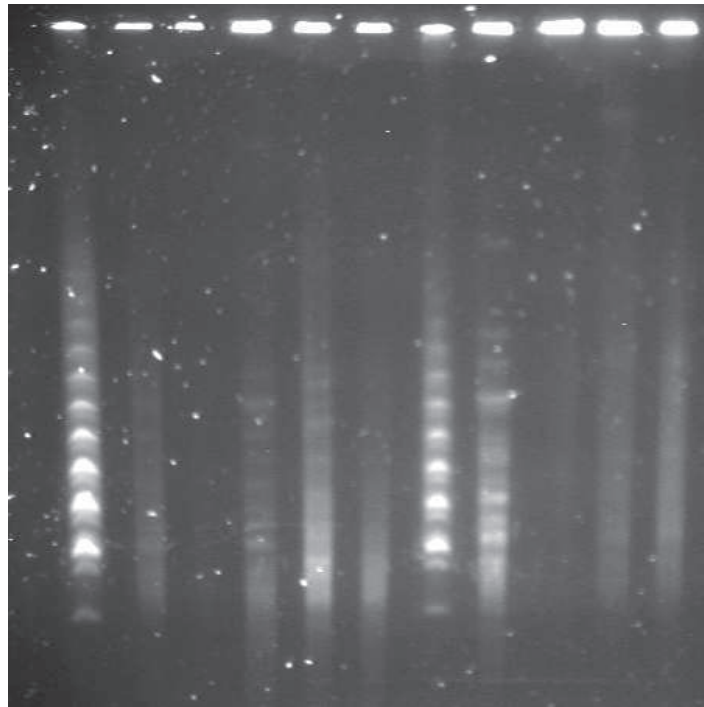
Numéro des souches	Nom du patient	Date d'isolement
1	APP GAB	novembre 2005
2	APP GAB	avril 2008
3	BOU BEN	juillet 2009
4	COU DOR	mars 2010
5	COU DOR	février 2012
6	MAH ALE	mai 2011
7	MAH ALE	décembre 2011
8	VAR ARU	novembre 2011
9	VAR ARU	mars 2012
10	COB LAU	avril 2012
11	GUI ART	octobre 2011
12	GUI ART	mars 2012

**Tableau 16 : Caractéristiques de souches analysées en champ pulsé**

Après de nombreux essais et adaptations du protocole d'électrophorèse en champ pulsé, nous n'avons pas réussi à avoir un résultat de typage moléculaire satisfaisant pour faire l'étude épidémiologique des souches de mycobactéries du complexe *abscessus* isolées chez les patients mucoviscidosiques suivis au CRCM de Rouen.

Les premiers résultats du typage sont représentés sur la Figure 43.

PM 1 2 3 4 5 PM 6 7 8 9



PM : Poids moléculaire Mid Range I

**Figure 43 : Pulsotypes des souches de mycobactéries du complexe *abscessus* obtenus lors du premier essai**

Le marquage des puits par le bromure d'éthidium suggère que la paroi des mycobactéries n'a pas été cassée, que l'ADN est resté piégé dans la cellule.

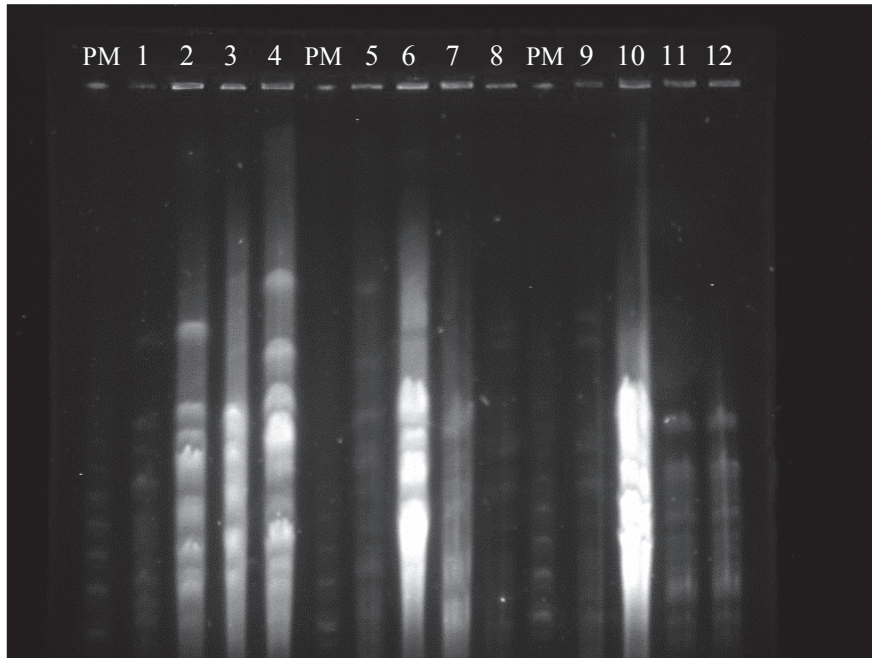
De nombreuses modifications du protocole d'électrophorèse ont été mises en application afin d'améliorer le résultat du typage des souches étudiées. Ces modifications ont porté sur :

- le milieu de culture : le milieu MGIT a été initialement utilisé puis le milieu 7H9-OADC-Sucrose
- la méthode de lyse de la paroi : une solution de lyse a été initialement utilisée seule puis un bain dans la carboglace-éthanol a été ajouté
- la concentration de la solution de lyse : une solution d'ESP à 0,1mg/ml a été utilisée puis enfin une solution à 1 mg/ml
- le lavage des plugs : des lavages plus longs ont été effectués lors des derniers essais



- l'ajout ou non de thiourée dans le bain de migration.

Lors du dernier essai, les pulsotypes obtenus sont présentés sur la figure 44.



PM : Poids moléculaire Mid Range I (15 à 242,5 kb)

**Figure 44 : Pulsotypes des souches de mycobactéries du complexe *abscessus* isolés chez 7 patients mucoviscidosiques suivis au CRCM de Rouen**

Les bandes devraient être rectilignes, fines et multiples pour chaque piste. Compte-tenu de ces résultats de mauvaise qualité, peu de conclusions peuvent être émises.

Cependant, les pulsotypes en position 11 et 12 correspondent à deux isolats de *M. abscessus* cultivés à des périodes distinctes (6 mois d'écart) chez le patient GUI ART. Même si l'image n'est pas parfaite, les profils obtenus semblent identiques et différents de ceux des souches isolées chez les autres patients (n°1 à 9).

De plus, la souche en position 4 de COU DOR semble différente de celle en position 2 de APP GAB et celles en position 11 et 12 de TRU DAM.

### III. DISCUSSION

#### 1. Etude prospective : mise en place de la méthode de décontamination des prélèvements par la chlorhexidine et de l'ensemencement sur milieu Cepacia®

Devant l'émergence des mycobactéries du complexe *abscessus* chez les patients atteints de mucoviscidose et leur extrême résistance aux antibiotiques, nous nous sommes intéressés dans une étude prospective à la difficulté d'isoler ces bactéries au quotidien au laboratoire.

A partir des prélèvements respiratoires provenant de patients atteints de mucoviscidose, la culture des mycobactéries est rendue difficile par la colonisation ou infection des patients par *P. aeruginosa* et donc par la fréquente contamination des milieux par cette espèce. Une étape de décontamination des prélèvements est essentielle. L'ajout de soude ou d'acides dilués aux prélèvements élimine les bactéries de la flore commensale et respecte au moins partiellement les mycobactéries. Pour que la décontamination soit de bonne qualité, il faut que les prélèvements soient homogénéisés, c'est à dire liquéfiés par un agent fluidifiant qui libère les bactéries contenues dans le mucus, le pus et les cellules. Les bactéries commensales sont ainsi mises en contact avec l'agent décontaminant et sont détruites. Toutefois, bien que plus résistantes aux antiseptiques que les autres bactéries, les mycobactéries n'y sont pas complètement insensibles et la décontamination doit être effectuée en respectant scrupuleusement la concentration de l'antiseptique et le temps de contact avec le prélèvement (Carbonelle, 2003). Ainsi, nous avons donc voulu comparer deux méthodes de décontamination A et B pour toutes les prescriptions de recherche de mycobactéries chez les patients mucoviscidosiques entre décembre 2011 et avril 2012 : la méthode A consiste en une double décontamination et la méthode B à une décontamination simple avec un antiseptique, la chlorhexidine.

La recherche de MNT a concerné 64 adultes et seulement 9 enfants, avec une moyenne de 1,7 prélèvements par enfants et par adultes.

94% des prélèvements étudiés étaient des crachats (119/126). C'est un prélèvement plus facile à obtenir et moins invasif que les autres prélèvements respiratoires.

## Méthodes de décontamination

La méthode à la chlorhexidine a été choisie car cet antiseptique possède un large spectre d'activité contre les bactéries contaminantes mais semble avoir des effets minimes sur les mycobactéries (Ferroni, 2006).

Notre étude prospective a montré que la méthode A présentait une grande sensibilité grâce à l'utilisation concomitante des milieux solides et liquides. Lorsque les milieux solides étaient négatifs ou contaminés, le milieu MGIT nous a permis d'isoler la MNT présente dans le prélèvement, sauf pour un prélèvement dont la quantité était minime. De nombreuses études (Bange et Bottger, 2002; Bange, 1999; Whittier, 1993; Whittier, 1997) ont montré l'importance de l'utilisation de cette méthode pour augmenter le taux d'isolement des mycobactéries dans les prélèvements de patients mucoviscidosiques par rapport à une simple décontamination à la soude, utilisée pour les prélèvements hors contexte de mucoviscidose.

Après une simple décontamination, une partie des mycobactéries sont tuées (28 à 33%) (Whittier, 1997); l'ajout d'acide oxalique lors de la méthode A en détruit probablement d'autres. Toutefois, une étude a montré qu'en cas de concentration forte en MNT (examen direct positif), celles-ci peuvent survivre à la méthode A mais qu'en cas de faible concentration ou d'une quantité insuffisante de prélèvement, comme nous l'avons rencontré, cette méthode est défailante car trop agressive.

Sept prélèvements positifs décontaminés par la méthode A ont pu être décontaminés par la méthode B. Tous les milieux Löwenstein-Jensen alorsensemencés ont permis d'isoler la mycobactérie présente dans le prélèvement.

Par contre, nous avons remarqué un manque de sensibilité de l'examen direct quand la méthode B était utilisée (4 ED négatif sur 7 cultures positives pour la méthode B et 6 ED négatif sur 11 cultures positives pour la méthode A). Soit le nombre de BAAR observé était inférieur à celui observé après mise en œuvre de la méthode A, soit l'examen direct était négatif. Ce constat concerne un très petit effectif de prélèvement et doit être confirmé avec un nombre plus important de prélèvements. De Bel et *al.* ont également rencontré ce problème avec la méthode B et ont montré que les frottis effectués après décontamination à la chlorhexidine sont effectivement plus difficiles à interpréter.

L'examen microscopique à la recherche de mycobactérie est dans tous les cas peu sensible. Il faut de 5000 à 10000 bacilles par ml de prélèvements pour que la probabilité de voir au moins un BAAR sur le frottis atteigne 95% (Carbonelle, 2003). L'examen direct est donc toujours effectué sur le culot des prélèvements, patients mucoviscidosiques ou non. En pratique, les MNT prennent d'autant

moins bien la coloration que les mycobactéries tuberculeuses. C'est pourquoi, un examen direct a été effectué uniquement chez les patients mucoviscidosiques connus antérieurement avec une MNT, compte-tenu de la sensibilité limitée de cet examen.

Deux études comportant un nombre d'échantillons supérieur (827 échantillons testés par Ferroni *et al.*, 795 par De Bel *et al.*) à la nôtre, se sont intéressées à la comparaison de ces deux méthodes de décontamination (De Bel, 2011; Ferroni, 2006). Il a été montré que la méthode de décontamination à la chlorhexidine (méthode B) est meilleure que la méthode de double décontamination (méthode A) concernant la culture de MNT des échantillons respiratoires des patients mucoviscidosiques. Ferroni *et al.* ont montré que le taux de faux négatif était de 55% lorsque la méthode de double décontamination était utilisée alors qu'il est beaucoup plus faible (10%) avec la méthode à la chlorhexidine. La méthode à la chlorhexidine serait moins agressive et préserverait donc la viabilité des mycobactéries (Ferroni, 2006).

Malgré le manque de sensibilité de l'examen direct, la décontamination à la chlorhexidine présente de nombreux avantages et semble être la méthode à adopter pour la recherche de MNT dans les prélèvements respiratoires des patients mucoviscidosiques. Néanmoins, un problème majeur ne nous permet pas de l'utiliser en pratique quotidienne : à l'heure actuelle, nous ne sommes pas en mesure de rendre cette méthode compatible avec la mise en culture des prélèvements en milieu liquide MGIT<sup>®</sup>, obligatoire selon les recommandations de l'ATS. La chlorhexidine a besoin d'être neutralisée par un agent tel que la lécithine. Malheureusement, l'ajout de lécithine dans le milieu MGIT génère une fluorescence non spécifique rendant le système de détection automatisée inutilisable. Cette étape de neutralisation est inutile avec les milieux de cultures solides qui contiennent déjà une grande quantité de lécithine.

Le taux de contamination des milieux MGIT<sup>™</sup> était inférieur à celui des milieux solides ensemencés après les méthodes A et B. Les bons résultats obtenus avec le milieu MGIT<sup>™</sup> sont liés à l'ajout de PANTA<sup>®</sup> qui inhibe la croissance des bactéries à gram positif, à gram négatif et des champignons. Notre taux de contamination des milieux Löwenstein-Jensen était particulièrement important avec les prélèvements traités par de la méthode A (35,4%) comparé à ceux de la méthode B (12,9%).

Pour De Bel *et al.*, la méthode B présente également un taux de contamination inférieur à celui de la méthode A (15,4% vs 22,5%) alors que pour Ferroni *et al.*, la méthode B présente un taux de contamination supérieur (20% vs 14,2%). Notre taux de contamination avec la méthode de référence A est anormalement plus élevé que la plupart des études, un taux maximal de 26% ayant été décrit dans une étude portant sur 406 prélèvements (Bange, 1999). Puisque que l'utilisation de la méthode B n'est pas possible à l'heure actuelle, il faudrait faire des modifications de notre protocole de

décontamination (méthode A), notamment sur les temps de contact avec la soude et l'acide oxalique, afin de diminuer le taux de contamination des milieux solides.

#### Milieux de culture et apport du milieu solide Cepacia®

L'ensemencement sur milieu de Löwenstein-Jensen et en milieu liquide MGIT™ se fait après décontamination des prélèvements. Le milieu Löwenstein-Jensen contient des œufs (qui apportent des vitamines et sont inhibiteurs de diverses substances toxiques), de l'amidon de pomme de terre, des sels minéraux, du glycérol et du vert malachite, colorant qui inhibe la croissance d'éventuels contaminants. C'est un milieu sur lequel la plupart des mycobactéries se développent facilement (Carbonelle, 2003).

Notre étude a montré une sensibilité supérieure du milieu liquide MGIT™ par apport au milieu de culture solide. Parmi les prélèvements positifs, un seul MGIT™ était négatif alors que cinq milieux Löwenstein-Jensen et deux milieux Cepacia® n'ont pas permis la croissance de mycobactérie du complexe *abscessus*. Ces résultats sont en accord avec ceux retrouvés dans la littérature. Dans une étude (Idigoras, 2000), la sensibilité du milieu MGIT™ a été évaluée à 75,1% et celle du milieu Lowenstein-Jensen à 60,7%.

Le contrôle visuel des milieux MGIT™ rendus négatifs par l'automate, nous a permis d'isoler un *M. gordonae*, une mycobactérie considérée comme un contaminant. La croissance d'aucune autre MNT n'a pu être détectée par ce moyen. Pena et *al.* ont démontré que la lecture visuelle des MGIT™ négatifs a permis de récupérer 1% de cultures supplémentaires à mycobactéries dont 21 % à *M. avium complex* mais aucune à *M.* du complexe *abscessus* (Pena, 2012). Le milieu MGIT atteint une sensibilité de 89,4% après ce contrôle visuel (Idigoras, 2000).

Le délai de culture moyen des colonies de MNT à croissance rapide était globalement identique entre le milieu MGIT™ et le milieu Cepacia® (4 jours) alors qu'il fallait environ 7 jours avec les milieux Löwenstein-Jensen. Cet avantage du milieu MGIT™ par apport au milieu Löwenstein-Jensen a été décrit de nombreuses fois dans la littérature. L'écart est d'autant plus grand avec les mycobactéries à croissance lente, telles que *M. tuberculosis* : 12 jours pour le milieu MGIT™ contre 22 jours pour le milieu Löwenstein-Jensen (Idigoras, 2000).

Le milieu Cepacia® a été introduit dans le but d'augmenter le taux d'isolement des MNT à croissance rapide. Lorsque la quantité de prélèvement était minime, ce milieu nous a permis de cultiver de rares colonies de *M. boletti* chez un patient (COU DOR) qui n'avait pas eu de cultures positives depuis deux ans, alors que la culture sur Löwenstein-Jensen et milieu MGIT™ était négative. Néanmoins, pour deux des seize prélèvements positifs, le milieu Cepacia® était négatif. L'étude

d'Esther et *al.* a également observé un certain manque de sensibilité du milieu Cepacia® et du milieu Löwenstein-Jensen pour certains prélèvements de patients mucoviscidosiques colonisés à MNT à croissance rapide (Esther, 2011).

Les mycobactéries du complexe *abscessus* ont été isolées en général en moins de 5 jours sur milieu Cepacia®, mis à part pour 3 prélèvements pour lesquels la croissance a été plus longue. Dans l'étude d'Esther et *al.*, qui a concerné la mise en culture d'environ 9000 prélèvements respiratoires provenant de patients mucoviscidosiques, l'incubation du milieu Cepacia® pendant 14 jours au lieu de 5 initialement, a permis d'augmenter le taux de culture des MNT à croissance rapide (2,8% vs 0,7%).

Le taux de contamination des milieux Cepacia® était faible bien que l'ensemencement du prélèvement ait été réalisé sans décontamination. Ce milieu sélectif, normalement destiné à la recherche de *Burkholderia cepacia*, est enrichi en extrait de levure et caséine et contient de la polymyxine B, de la gentamicine et de la vancomycine. La présence d'une base peptonée et de sucres permet un développement optimal des micro-organismes tandis que le cristal violet et les antibiotiques présents dans le milieu inhibent la plupart des espèces microbiennes et notamment les *Pseudomonas*. De plus, le fait qu'il soit coulé en boîte de Pétri et non en tube comme les Löwenstein-Jensen, permet de repérer les colonies de MNT à côté de celles des contaminants.

Nous avons observé la croissance de champignons et de bacilles à gram négatif non fermentants tels que *Stenotrophomonas spp.* en conformité avec ses caractéristiques. Esther et *al.* suggèrent donc que ce milieu soit interprété avec prudence chez les patients infectés par ces micro-organismes ; un fort inoculum de ces espèces pouvant engendrer une inhibition de la croissance des MNT à croissance rapide (Esther, 2011).

Globalement, l'association du milieu Cepacia® avec les milieux de cultures traditionnels, permettrait l'amélioration du dépistage de la colonisation à MNT à croissance rapide chez les patients atteints de mucoviscidose. Cependant, un tel changement engendrerait des coûts supplémentaires et un temps de lecture supplémentaire en pratique quotidienne.

Une autre piste d'amélioration concerne l'évaluation de l'apport du milieu Coletsos pour les prélèvements respiratoires des patients atteints de mucoviscidose. C'est un milieu plus riche que le milieu Löwenstein-Jensen ; il contient des quantités supérieures d'œuf, du pyruvate de sodium, de la cendre d'antracite et une solution d'oligo-éléments. Il est particulièrement indiqué pour la croissance de mycobactéries exigeantes (Carbonelle, 2003).

## 2. Etude rétrospective des cas d'infections dues aux mycobactéries du complexe *abscessus* chez les patients mucoviscidosiques suivis au CRCM de Rouen

Comme décrit dans la littérature, le CRCM de Rouen est confronté au problème lié à l'infection/colonisation par les mycobactéries du complexe *abscessus* chez les patients atteints de mucoviscidose.

Une MABSC a été isolée chez 10 patients : 8 *M. abscessus sensu stricto*, un *M. bolletii* et un *M. massiliense*. Ce dernier a été identifié comme un *M. massiliense* d'après le séquençage du gène *hsp65* mais identifié comme un *M. bolletii* par celui du gène *rpoB*. Cette discordance illustre bien les difficultés d'identification fiable au rang d'espèce.

Précisons que les résultats de ce volet du travail ne sont que descriptifs du fait de l'effectif faible (10 patients) des patients colonisés/infectés par MABSC et de l'absence de groupe témoin (absence d'étude observationnelle rétrospective de dossiers de patients non mucoviscidosiques colonisés/infectés par MABSC). Cependant, il faut souligner que les études cas-témoins publiées récemment ne sont pas fondées sur des effectifs conséquents (22 patients infectés à *M.* du complexe *abscessus* dans l'étude de Verreghen et al., 38 patients infectés à MNT dont 23 par MABSC dans celle d'Esther et al.). La sélection de notre population d'intérêt ne prenait pas en compte les critères cliniques et radiologiques d'infection à MNT. Toutefois, les dix patients ayant eu au moins deux cultures positives à mycobactéries du complexe *abscessus* à partir d'expectorations ; ils remplissaient les critères microbiologiques d'infection à MNT selon le consensus de l'ATS (Griffith, 2007).

### Remarques générales

Lorsque nous comparons le résultat de certains paramètres étudiés avec les données nationales 2010 du RFM (Tableau 13), nous constatons certaines différences significatives concernant :

- le sexe ratio, avec une forte proportion d'homme dans notre population
- le nombre de patients traités pour un reflux gastro-oesophagien
- les colonisations microbiologiques à SAMS, *S. maltophilia* et *Aspergillus fumigatus* plus importante dans notre population

En revanche, la proportion de patients ne diffère pas de la population nationale de patients mucoviscidosiques au niveau du nombre d'homozygote pour la mutation F508, de diabétiques, du nombre de patients traités par azithromycine et par des corticoïdes inhalés.

L'âge des patients au moment du diagnostic de colonisation/infection à MABSC était de 22,7 ans. MABSC était la MNT la plus représentée (10/22) devant *M. avium complex* (4/22). Ces résultats sont en accord avec la grande étude de prévalence réalisée en France chez 1582 patients atteints de mucoviscidose en 2004 (Roux, 2009). Les mycobactéries du complexe *abscessus* étaient les plus représentées (48%) devant MAC (22%); elles infectaient surtout les enfants et jeunes adultes. D'autres études ont fourni les mêmes résultats mais pas l'étude de prévalence américaine au sein de laquelle MAC était plus représentée que MABSC (Olivier, 2003). Il existe deux explications à cela : tout d'abord l'étude américaine ne comprenait que des patients adultes et d'autres part elle incluait des patients depuis 1992 et à cette époque les mycobactéries du complexe *abscessus* étaient peu connues et probablement mal identifiées au rang d'espèce.

#### MABSC et fonction pulmonaire

Notre étude met en évidence une atteinte fonctionnelle plus sévère chez les patients qui ont une éradication de la mycobactérie par rapport aux patients toujours infectés/colonisés. La plupart des études comparent la fonction pulmonaire des patients colonisés ou infectés par rapport aux sujets contrôles (Levy, 2008; Verregghen, 2012). Verregghen et al, qui étudie les facteurs de risque d'infection à MNT dans la mucoviscidose dans une étude cas-témoins, retrouve une différence fonctionnelle significative à la mise en évidence de la MNT entre les sujets infectés et les sujets colonisés (56,4% vs 64,1% ;  $p < 0,01$ ).

Au fil des années de la colonisation/infection à MABSC, nous avons observé un déclin du VEMS et du CVF qui s'intensifiait à l'identification de la MNT et pendant le traitement. Esther et al, dont le travail compare une population de 178 patients atteints de mucoviscidose ayant une culture positive à MNT (dont 38 patients infectés selon les critères de l'ATS), soulignent que les infections chroniques à MNT sont associées à un déclin du VEMS (déclin de -2,33% par an chez les infectés par rapport aux non infectés,  $p < 0,01$ ). Cette étude note également un impact plus particulier des mycobactéries du complexe *abscessus* sur la fonction ventilatoire (-2,42% par an), qu'ils attribuent à la plus forte virulence de cette MNT (Esther, 2010).



### MABSC et colonisation bactérienne

Tous les patients de notre étude présentaient un SAMS dans leur ECBC. *S. maltophilia* était retrouvé chez quatre des dix patients. Ces taux sont beaucoup plus élevés que ceux retrouvés dans la population générale : 53,5% pour SAMS et 8,5% pour *S. maltophilia*.

Verregghen et al ont montré que la présence de *S. maltophilia* était un facteur de risque d'infection à *M. abscessus*. Sur 22 patients infectés à *M. abscessus*, 11 avaient un *S. maltophilia* tandis qu'il n'y avait qu'un seul patient porteur dans le groupe témoin ( $p < 0,002$ ) (Verregghen, 2012).

### MABSC et *Aspergillus fumigatus*

Nous retrouvons une forte présence d'*Aspergillus fumigatus* (80%) dans les ECBC des patients mucoviscidiques suivis au CRCM de Rouen, comparativement aux données nationales (21%) (Bellis, 2012). *Aspergillus fumigatus* apparaît donc comme un facteur associé à la colonisation/infection à mycobactéries du complexe *abscessus*. Ces résultats sont concordants avec plusieurs études cas-témoins (Esther, 2010; Olivier, 2003a; Verregghen, 2012) montrant une fréquence accrue d'*Aspergillus fumigatus* dans l'ECBC des patients infectés ou colonisés avec une MNT. De façon plus approfondie, une étude de Levy et al (Levy, 2008), chez 42 patients mucoviscidiques pour lesquels au moins une MNT était isolée dans l'ECBC, comparés à 144 témoins sans MNT, retrouve que la présence d'*Aspergillus spp.* en culture était un facteur prédictif de colonisation à MNT et que la présence isolée ou conjointe de ces germes était le reflet de la sévérité de la maladie sous-jacente. La possibilité d'une création réciproque de conditions favorables de développement est évoquée.

Parmi les dix patients suivis à Rouen, sept étaient traités pour une aspergillose broncho-pulmonaire allergique. Mussaffi et al. ont montré que l'ABPA était un facteur de risque à d'infection par les MNT et plus particulièrement de MABSC. Il est décrit que négliger la présence d'une potentielle infection aspergillaire pourrait être confondue avec un échec de traitement de l'infection à MNT ou une récurrence de celle-ci (Le Bourgeois, 2005).

### MABSC et traitements antérieurs

Notre étude n'a pas mis en évidence de lien entre les traitements antérieurs (inhibiteur de la pompe à proton, azithromycine, corticoïdes, antibiothérapie) et la colonisation/infection à MABSC.

La littérature relate une plus forte proportion de reflux gastro-oesophagien chez les patients porteurs d'une MNT. Les théories expliquant cette association sont diverses. Le mécanisme du reflux favoriserait les micro-inhalations d'eau contaminée par des MNT présente dans l'estomac (Koh,

2007). Un traitement anti-reflux à plus forte dose chez les porteurs de MNT ne seraient alors que le reflet d'un reflux plus sévère ou masquerait les symptômes de micro-inhalations fréquentes (Levy, 2008; Thomson, 2007).

Dans la mucoviscidose, l'azithromycine au long cours et à faible dose est largement prescrite à visée anti-inflammatoire. Il est recommandé de surveiller chez ces patients l'émergence de MNT. Le rôle de l'azithromycine dans l'émergence de MNT résistantes aux macrolides n'est pas prouvée (Wilms, 2012).

L'article de Choi et *al.* (Choi, 2012) dit que, comparée à la clarithromycine, l'azithromycine a une activité supérieure vis à vis de *M. abscessus* in vitro, ex vivo et in vivo alors que ces deux macrolides ont une activité comparable sur *M. massiliense*. La clarithromycine induit plus fortement l'expression du gène *erm(41)* et donc un plus haut niveau de résistance aux macrolides que l'azithromycine.

#### Intérêt de la sérologie antimycobactérienne : Anticorps A60

Les critères diagnostiques d'infection à mycobactéries fournis par l'ATS, basés sur des critères microbiologiques mais également cliniques et radiologiques, ne semblent pas adéquats chez les patients atteints de mucoviscidose. En effet, les signes cliniques liés à *M. abscessus* sont difficiles à distinguer de ceux de la mucoviscidose elle-même. Les critères microbiologiques sont fiables mais ils ne reflètent pas nécessairement la maladie active. Ainsi, des critères diagnostiques supplémentaires peuvent être utiles avant de débiter un traitement qui sera à la fois long et avec potentiellement de nombreux effets indésirables.

Le test de sérologie A60 permet de détecter des anticorps dirigés contre le complexe antigénique A60, produit au cours d'une infection mycobactérienne. C'est un antigène interspécifique localisé dans le cytosol de toutes les mycobactéries. Comme la coloration de Ziehl-Neelson, ce test est positif pour toutes les mycobactérioses. Le seuil de positivité est établi à 225 UA/ml pour les IgG.

Les patients avaient tous des taux en anticorps A60 supérieurs à la limite de positivité lors du diagnostic de colonisation/infection à MABSC. Malgré des traitements répétés, seul un patient est passé sous le seuil de positivité alors que trois patients ont eu des cultures de MNT qui se sont négativées.

Selon Ferroni et *al.*, la grande sensibilité de ce test permettrait de détecter les mycobactérioses atypiques chez les patients atteints de mucoviscidose, de suivre la production d'anticorps chez les malades sous traitement et donc de suivre l'efficacité de ce dernier (Ferroni, 2005). Cette équipe a étudié la relation entre le traitement de l'infection à MABSC et le taux des anticorps A60. Il semblerait

que le taux des anticorps se négativerait en cas d'éradication de MABSC, resterait stable en cas d'échec thérapeutique et diminuerait puis augmenterait en cas de rechute (Ferroni, 2005).

#### Sensibilité aux antibiotiques et traitement de la colonisation/infection

Les antibiogrammes effectués sur les différentes souches de MABSC sont assez caractéristiques de ces souches. En effet, celles-ci sont résistantes à de nombreux antibiotiques (minocycline, doxycycline). L'amikacine et la clarithromycine sont, le plus souvent, les seuls antibiotiques sensibles comme décrit dans la littérature (Nessar, 2012).

Parmi les 16 antibiogrammes effectués, il existe de nombreux profils différents. Le profil amikacine « sensible », tobramycine « résistante », céfoxitine « intermédiaire » et clarithromycine « sensible » est le plus fréquent (6/16 antibiogrammes dont 2 chez le même patient). Une différence de sensibilité est observée toutefois au niveau du linézolide, de la tigécycline et du sulfaméthoxazole.

La souche de *M. massiliense* de VAR ARU présentait une sensibilité à la clarithromycine mais une résistance inductible. La littérature indique que cette souche, ayant un gène *erm(41)* tronqué ne peut pas présenter une résistance inductible à la clarithromycine. L'identification faite par le CNR par séquençage du gène *hsp65* avait premièrement conclu à une souche de *M. massiliense* tandis qu'un second séquençage du gène *rpoB* avait identifié à un *M. bolletii*. Selon ces indications et le profil de résistance de la souche, VAR ARU est donc colonisé/infecté par une souche de *M. bolletii* et non *M. massiliense*.

Chez certains patients, des traitements lourds et répétés n'ont pas permis l'éradication de MABSC, l'infection chronique durant parfois depuis plus de 6 ans (CHA ANA et TRU DAM).

Chez CHA ANA, 4 souches de *M. abscessus*, isolées entre 2004 et 2008, ont été envoyées pour l'étude de la sensibilité aux antibiotiques. La souche devient de plus en plus résistante aux antibiotiques. CHA ANA a été traité par de la céfoxitine, amikacine et clarithromycine lors du diagnostic puis à plusieurs reprises. Cela a certainement contribué à l'augmentation de la CMI de ces antibiotiques au fil du temps.

De même, COU DOR a été traité par de la céfoxitine, amikacine et clarithromycine. Les deux antibiogrammes effectués sur des souches isolées à deux ans d'intervalle montre également une augmentation de la CMI de la céfoxitine et clarithromycine.

### Typage moléculaire

L'électrophorèse en champ pulsé est la méthode de typage des MNT la plus utilisée ces dernières années. Cette méthode est adaptée à l'épidémiologie des mycobactéries mais elle est lourde, longue à réaliser et demande du matériel et un personnel expérimenté.

Notre expérience a montré que cette méthode était difficile à mettre en place. Malgré différents paramètres modifiés, il reste encore à faire évoluer le protocole : casser de façon plus efficace la paroi car parfois aucun fragment n'était visible sur le gel de migration, et améliorer la purification de l'ADN pour avoir des profils plus nettes.

Les quelques profils que nous avons obtenus semblent nous indiquer que dans le temps, un patient est colonisé par la même souche. Cette souche semble différente des souches retrouvées chez les autres patients suivis au CRCM de Rouen. De nombreuses publications ont montré l'absence de transmission interhumaine des MNT chez les patients atteints de mucoviscidose. Cependant, un article récent montre qu'un patient avec un fort inoculum respiratoire de *M. massiliense* peut représenter un danger de contamination de l'environnement et être à l'origine d'une contamination indirecte des patients mucoviscidosiques fréquentant le même établissement de soins.

Afin de mieux connaître l'épidémiologie des souches isolées chez les patients mucoviscidosiques suivis au CRCM de Rouen, de nouvelles techniques devront être utilisées, comme la MLVA ou la rep-PCR automatisée sur le Diversilab mais elles sont plus coûteuses.

# **CONCLUSION ET PERSPECTIVES**

Les mycobactéries du complexe *abscessus* sont les plus fréquemment impliquées dans les infections respiratoires chroniques, y compris lors de la mucoviscidose. Ces bactéries sont difficiles à identifier de façon fiable au rang d'espèce. Il faut idéalement combiner le séquençage de plusieurs cibles moléculaires. Par ailleurs, les MABSC sont résistantes à haut niveau à de nombreux antibiotiques.

Quotidiennement, le laboratoire de microbiologie est confronté à des difficultés pour isoler les MNT des prélèvements respiratoires des patients mucoviscidosiques. Notre travail montre qu'une décontamination des prélèvements par la méthode A (double décontamination) associée à l'ensemencement des prélèvements sur milieu Cepacia<sup>®</sup> permet probablement d'améliorer l'isolement des MNT. La méthode de décontamination qui utilise la chlorhexidine est prometteuse mais doit être adaptée pour être compatible avec le milieu MGIT<sup>™</sup>.

Comme décrit dans la littérature, le CRCM de Rouen est confronté aux infections par des MNT, principalement à MABSC. Elle atteint les enfants comme les adultes. Malgré des traitements longs et agressifs, l'infection est essentiellement chronique. L'absence de facteurs de risque précis et l'omniprésence de MABSC dans l'environnement suggèrent que l'infection à MABSC chez les patients atteints de mucoviscidose est un événement aléatoire.

Le typage moléculaire des MNT par électrophorèse en champ pulsé est difficile à mettre en place. De ce fait, il pourrait être intéressant de lui préférer la rep-PCR automatisée via le Diversilab<sup>®</sup> malgré son coût.

# **BIBLIOGRAPHIE**

- Adekambi, T., Berger, P., Raoult, D., and Drancourt, M.** (2006). rpoB gene sequence-based characterization of emerging non-tuberculous mycobacteria with descriptions of *Mycobacterium bolletii* sp. nov., *Mycobacterium phocaicum* sp. nov. and *Mycobacterium aubagnense* sp. nov. *Int J Syst Evol Microbiol* **56**(Pt 1), 133-43.
- Adekambi, T., Reynaud-Gaubert, M., Greub, G., Gevaudan, M. J., La Scola, B., Raoult, D., and Drancourt, M.** (2004). Amoebal coculture of "*Mycobacterium massiliense*" sp. nov. from the sputum of a patient with hemoptoic pneumonia. *J Clin Microbiol* **42**(12), 5493-501.
- Aitken, M. L., Burke, W., McDonald, G., Wallis, C., Ramsey, B., and Nolan, C.** (1993). Nontuberculous mycobacterial disease in adult cystic fibrosis patients. *Chest* **103**(4), 1096-9.
- Appelgren, P., Farnebo, F., Dotevall, L., Studahl, M., Jonsson, B., and Petrini, B.** (2008). Late-onset posttraumatic skin and soft-tissue infections caused by rapid-growing mycobacteria in tsunami survivors. *Clin Infect Dis* **47**(2), e11-6.
- Bange, F. C., and Bottger, E. C.** (2002). Improved decontamination method for recovering mycobacteria from patients with cystic fibrosis. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* **21**(7), 546-8.
- Bange, F. C., Brown, B. A., Smaczny, C., Wallace Jr, R. J., and Bottger, E. C.** (2001). Lack of transmission of *Mycobacterium abscessus* among patients with cystic fibrosis attending a single clinic. *Clin Infect Dis* **32**(11), 1648-50.
- Bange, F. C., Kirschner, P., and Bottger, E. C.** (1999). Recovery of mycobacteria from patients with cystic fibrosis. *J Clin Microbiol* **37**(11), 3761-3.
- Bastian, S., Veziris, N., Roux, A. L., Brossier, F., Gaillard, J. L., Jarlier, V., and Cambau, E.** (2011). Assessment of clarithromycin susceptibility in strains belonging to the *Mycobacterium abscessus* group by erm(41) and rrl sequencing. *Antimicrob Agents Chemother* **55**(2), 775-81.
- Becq, F.** (2003). [CFTR and transepithelial ionic transport abnormalities in cystic fibrosis]. *Arch Pediatr* **10 Suppl 2**, 325s-332s.
- Bellis, G., Cazes, M. H., Lemonnier, L., and Sponga, M.** (2012). Bilan des données 2010. *Registre Francais de la Mucoviscidose*.
- Bellis, G., Cazes, M. H., Lemonnier, L., T., M., Rault, G., Ravilly, S., V., S., and M., S.** (2011). Bilan des données 2009. *Registre Francais de la Mucoviscidose*.
- Brown-Elliott, B. A., Nash, K. A., and Wallace, R. J., Jr.** (2012). Antimicrobial susceptibility testing, drug resistance mechanisms, and therapy of infections with nontuberculous mycobacteria. *Clin Microbiol Rev* **25**(3), 545-82.
- Brown-Elliott, B. A., and Wallace, R. J., Jr.** (2002). Clinical and taxonomic status of pathogenic nonpigmented or late-pigmenting rapidly growing mycobacteria. *Clin Microbiol Rev* **15**(4), 716-46.
- Camargos, P., Le Bourgeois, M., Revillon, Y., Tatsuo, E., Sermet-Gaudelus, I., Scheinmann, P., and de Blic, J.** (2008). Lung resection in cystic fibrosis: a survival analysis. *Pediatr Pulmonol* **43**(1), 72-6.



- Carbonelle, B., Dailoux, M., Lebrun, L., Maugein, J., and Pernot, C.** (2003). Mycobactéries. Mycobactérioses. *Bioforma* **29**.
- Catherinot, E., Clarissou, J., Etienne, G., Ripoll, F., Emile, J. F., Daffe, M., Perronne, C., Soudais, C., Gaillard, J. L., and Rottman, M.** (2007). Hypervirulence of a rough variant of the *Mycobacterium abscessus* type strain. *Infect Immun* **75**(2), 1055-8.
- Chalermkulrat, W., Sood, N., Neuringer, I. P., Hecker, T. M., Chang, L., Rivera, M. P., Paradowski, L. J., and Aris, R. M.** (2006). Non-tuberculous mycobacteria in end stage cystic fibrosis: implications for lung transplantation. *Thorax* **61**(6), 507-13.
- Chan, J., Halachev, M., Yates, E., Smith, G., and Pallen, M.** (2012). Whole-genome sequence of the emerging pathogen *Mycobacterium abscessus* strain 47J26. *J Bacteriol* **194**(2), 549.
- Choi, G. E., Cho, Y. J., Koh, W. J., Chun, J., Cho, S. N., and Shin, S. J.** (2012). Draft genome sequence of *Mycobacterium abscessus* subsp. *bolletii* BD(T). *J Bacteriol* **194**(10), 2756-7.
- Choo, S. W., Wong, Y. L., Tan, J. L., Ong, C. S., Wong, G. J., Ng, K. P., and Ngeow, Y. F.** (2012a). Annotated Genome Sequence of *Mycobacterium massiliense* Strain M154, Belonging to the Recently Created Taxon *Mycobacterium abscessus* subsp. *bolletii* comb. nov. *J Bacteriol* **194**(17), 4778.
- Choo, S. W., Wong, Y. L., Yusoff, A. M., Leong, M. L., Wong, G. J., Ong, C. S., Ng, K. P., and Ngeow, Y. F.** (2012b). Genome sequence of the *Mycobacterium abscessus* strain M93. *J Bacteriol* **194**(12), 3278.
- Centre National de Référence des Mycobactéries** (2008). Résumé du rapport d'activité pour l'année 2007.
- Consortium, T. C. F. G.-P.** (1993). Correlation between genotype and phenotype in patients with cystic fibrosis. *The new england journal of medicine* **329**.
- Courcol, R., Herrmann, J. L., Laudat, P., and Pangon, B.** (2010). "Référentiel en microbiologie médicale." 4ème ed. (SFM, Ed.).
- Cullen, A. R., Cannon, C. L., Mark, E. J., and Colin, A. A.** (2000). *Mycobacterium abscessus* infection in cystic fibrosis. Colonization or infection? *Am J Respir Crit Care Med* **161**(2 Pt 1), 641-5.
- Davidson, L. B., Nessar, R., Kempaiah, P., Perkins, D. J., and Byrd, T. F.** (2011). *Mycobacterium abscessus* glycopeptidolipid prevents respiratory epithelial TLR2 signaling as measured by HbetaD2 gene expression and IL-8 release. *PLoS One* **6**(12), e29148.
- De Baets, F., Schelstraete, P., Van Daele, S., Haerynck, F., and Vanechoutte, M.** (2007). *Achromobacter xylosoxidans* in cystic fibrosis: prevalence and clinical relevance. *J Cyst Fibros* **6**(1), 75-8.
- De Bel, A., De Schutter, I., Mouton, C., and Seghers, M.** (2011). Diagnostic of non tuberculous mycobacteria infection in cytic fibrosis : how to decontaminate respiratory samples? *Journal of cystic fibrosis suppl* **1**.

- Deneuve, E., Beucher, J., and Roussey, M.** (2007). Les manifestations respiratoires de la mucoviscidose. *Revue Francophone des Laboratoires* **397**, 37-42.
- Denis, F., Ploy, M.-C., Martin, C., Binger, E., and Quentin, R.** (2007). "Bactériologie médicale : techniques usuelles." (E. Masson, Ed.), 2ème édition.
- Doffinger, R., Patel, S. Y., and Kumararatne, D. S.** (2006). Host genetic factors and mycobacterial infections: lessons from single gene disorders affecting innate and adaptive immunity. *Microbes Infect* **8**(4), 1141-50.
- Drumm, M. L., Konstan, M. W., Schluchter, M. D., Handler, A., Pace, R., Zou, F., Zariwala, M., Fargo, D., Xu, A., Dunn, J. M., Darrah, R. J., Dorfman, R., Sandford, A. J., Corey, M., Zielenski, J., Durie, P., Goddard, K., Yankaskas, J. R., Wright, F. A., and Knowles, M. R.** (2005). Genetic modifiers of lung disease in cystic fibrosis. *N Engl J Med* **353**(14), 1443-53.
- Durie, I., and Josserand, R. N.** (2008). [Cystic fibrosis in 2008]. *Rev Med Interne* **29**(11), 901-7.
- El Khechine, A., Couderc, C., Flaudrops, C., Raoult, D., and Drancourt, M.** (2011). Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry identification of mycobacteria in routine clinical practice. *PLoS One* **6**(9), e24720.
- Esther, C. R., Esserman, D. A., and Gilligan, P.** (2010). Chronic *Mycobacterium abscessus* infection and lung function decline in cystic fibrosis. *Journal of cystic fibrosis* **9**, 117-123.
- Esther, C. R., Jr., Henry, M. M., Molina, P. L., and Leigh, M. W.** (2005). Nontuberculous mycobacterial infection in young children with cystic fibrosis. *Pediatr Pulmonol* **40**(1), 39-44.
- Esther, C. R., Jr., Hoberman, S., Fine, J., Allen, S., Culbreath, K., Rodino, K., Kerr, A., and Gilligan, P.** (2011). Detection of rapidly growing mycobacteria in routine cultures of samples from patients with cystic fibrosis. *J Clin Microbiol* **49**(4), 1421-5.
- Euzéby, J. P.** (2007). *Mycobacterium chelonae*, *Mycobacterium abscessus* (en ligne) "www.bacterio.cict.fr/bacdico/mm/chelonae.html", consulté le 15 septembre 2012.
- Fairhurst, R. M., Kubak, B. M., Shpiner, R. B., Levine, M. S., Pegues, D. A., and Ardehali, A.** (2002). *Mycobacterium abscessus* empyema in a lung transplant recipient. *J Heart Lung Transplant* **21**(3), 391-4.
- Falkinham, J. O., 3rd** (2011). Nontuberculous mycobacteria from household plumbing of patients with nontuberculous mycobacteria disease. *Emerg Infect Dis* **17**(3), 419-24.
- Fauroux, B., Delaisi, B., Clement, A., Saizou, C., Moissenet, D., Truffot-Pernot, C., Tournier, G., and Vu Thien, H.** (1997). Mycobacterial lung disease in cystic fibrosis: a prospective study. *Pediatr Infect Dis J* **16**(4), 354-8.
- Feazel, L. M., Baumgartner, L. K., Peterson, K. L., Frank, D. N., Harris, J. K., and Pace, N. R.** (2009). Opportunistic pathogens enriched in showerhead biofilms. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**(38), 16393-9.

- Ferroni, A., Sermet-Gaudelus, I., Le Bourgeois, M., Pierre-Audigier, C., Offredo, C., Rottman, M., Guillemot, D., Bernede, C., Vincent, V., Berche, P., and Gaillard, J. L.** (2005). Measurement of immunoglobulin G against Mycobacterial antigen A60 in patients with cystic fibrosis and lung infection due to *Mycobacterium abscessus*. *Clin Infect Dis* **40**(1), 58-66.
- Ferroni, A., Vu-Thien, H., Lanotte, P., Le Bourgeois, M., Sermet-Gaudelus, I., Fauroux, B., Marchand, S., Varaigne, F., Berche, P., Gaillard, J. L., and Offredo, C.** (2006). Value of the chlorhexidine decontamination method for recovery of nontuberculous mycobacteria from sputum samples of patients with cystic fibrosis. *J Clin Microbiol* **44**(6), 2237-9.
- Freney, J., Renaud, F., Leclercq, R., and Riegel, P.** (2007). "Précis de Bactériologie Clinique." (E. ESKA, Ed.).
- Gilljam, M., Schersten, H., Silverborn, M., Jonsson, B., and Ericsson Hollsing, A.** (2010). Lung transplantation in patients with cystic fibrosis and *Mycobacterium abscessus* infection. *J Cyst Fibros* **9**(4), 272-6.
- Giron, R. M., Domingo, D., Buendia, B., Anton, E., Ruiz-Velasco, L. M., and Ancochea, J.** (2005). Nontuberculous mycobacteria in patients with cystic fibrosis. *Arch Bronconeumol* **41**(10), 560-5.
- Griffith, D. E.** (1997). Diagnosis and treatment of disease caused by nontuberculous mycobacteria. This official statement of the American Thoracic Society was approved by the Board of Directors, March 1997. Medical Section of the American Lung Association. *Am J Respir Crit Care Med* **156**(2 Pt 2), S1-25.
- Griffith, D. E.** (2003). Emergence of nontuberculous mycobacteria as pathogens in cystic fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* **167**(6), 810-2.
- Griffith, D. E., Aksamit, T., Brown-Elliott, B. A., Catanzaro, A., Daley, C., Gordin, F., Holland, S. M., Horsburgh, R., Huitt, G., Iademarco, M. F., Iseman, M., Olivier, K., Ruoss, S., von Reyn, C. F., Wallace, R. J., Jr., and Winthrop, K.** (2007). An official ATS/IDSA statement: diagnosis, treatment, and prevention of nontuberculous mycobacterial diseases. *Am J Respir Crit Care Med* **175**(4), 367-416.
- Griffith, D. E., Girard, W. M., and Wallace Jr, R. J.** (1993). Clinical features of pulmonary disease caused by rapidly growing mycobacteria: An analysis of 154 patients. *Am J Respir and Crit Care Med* **147**.
- Haute Autoroté de Santé** (Janvier 2009). Le dépistage néonatal systématique de la mucoviscidose en France : Etat des lieux et perspectives après 5 ans de fonctionnement.
- Haute Autoroté de Santé** (Novembre 2006). Mucoviscidose : Protocole national de diagnostic et de soins pour une maladie rare.
- Hernandez-Garduno, E., and Elwood, K.** (2012). Nontuberculous mycobacteria in tap water. *Emerg Infect Dis* **18**(2), 353.

- Hjelt, K., Hojlyng, N., Howitz, P., Illum, N., Munk, E., Valerius, N. H., Fursted, K., Hansen, K. N., Heltberg, I., and Koch, C.** (1994). The role of Mycobacteria Other Than Tuberculosis (MOTT) in patients with cystic fibrosis. *Scand J Infect Dis* **26**(5), 569-76.
- Howard, S. T., Rhoades, E., Recht, J., Pang, X., Alsup, A., Kolter, R., Lyons, C. R., and Byrd, T. F.** (2006). Spontaneous reversion of *Mycobacterium abscessus* from a smooth to a rough morphotype is associated with reduced expression of glycopeptidolipid and reacquisition of an invasive phenotype. *Microbiology* **152**(Pt 6), 1581-90.
- Hubert, D.** (2005). Mucoviscidose. *EMC-Médecine* **2**, 34-41.
- Idigoras, P., Beristain, X., Iturzaeta, A., Vicente, D., and Perez-Trallero, E.** (2000). Comparison of the automated nonradiometric Bactec MGIT 960 system with Lowenstein-Jensen, Coletsos, and Middlebrook 7H11 solid media for recovery of mycobacteria. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* **19**(5), 350-4.
- Jarlier, V., and Nikaido, H.** (1990). Permeability barrier to hydrophilic solutes in *Mycobacterium chelonae*. *J Bacteriol* **172**(3), 1418-23.
- Jonsson, B. E., Gilljam, M., Lindblad, A., Ridell, M., Wold, A. E., and Welinder-Olsson, C.** (2007). Molecular epidemiology of *Mycobacterium abscessus*, with focus on cystic fibrosis. *J Clin Microbiol* **45**(5), 1497-504.
- Jordan, P. W., Stanley, T., Donnelly, F. M., Elborn, J. S., McClurg, R. B., Millar, B. C., Goldsmith, C. E., and Moore, J. E.** (2007). Atypical mycobacterial infection in patients with cystic fibrosis: update on clinical microbiology methods. *Lett Appl Microbiol* **44**(5), 459-66.
- Kilby, J. M., Gilligan, P. H., Yankaskas, J. R., Highsmith, W. E., Jr., Edwards, L. J., and Knowles, M. R.** (1992). Nontuberculous mycobacteria in adult patients with cystic fibrosis. *Chest* **102**(1), 70-5.
- Kim, H. S., Lee, K. S., Koh, W. J., Jeon, K., Lee, E. J., Kang, H., and Ahn, J.** (2012). Serial CT findings of *Mycobacterium massiliense* pulmonary disease compared with *Mycobacterium abscessus* disease after treatment with antibiotic therapy. *Radiology* **263**(1), 260-70.
- Koh, W. J., Jeon, K., Lee, N. Y., Kim, B. J., Kook, Y. H., Lee, S. H., Park, Y. K., Kim, C. K., Shin, S. J., Huitt, G. A., Daley, C. L., and Kwon, O. J.** (2011). Clinical significance of differentiation of *Mycobacterium massiliense* from *Mycobacterium abscessus*. *Am J Respir Crit Care Med* **183**(3), 405-10.
- Kubica, G. P., Baess, I., Gordon, R. E., Jenkins, P. A., Kwapinski, J. B., McDurmont, C., Pattyn, S. R., Saito, H., Silcox, V., Stanford, J. L., Takeya, K., and Tsukamura, M.** (1972). A cooperative numerical analysis of rapidly growing mycobacteria. *J Gen Microbiol* **73**(1), 55-70.
- Kusunoki, S., and Ezaki, T.** (1992). Proposal of *Mycobacterium peregrinum* sp. nov., nom. rev., and elevation of *Mycobacterium chelonae* subsp. *abscessus* to species status: *Mycobacterium abscessus* comb. nov. *Int J Syst Bacteriol* **42**(2), 240-5.

- Le Bourgeois, M., Sermet-Gaudelus, I., Catherinot, E., and Gaillard, J. L.** (2005). Nontuberculous mycobacteria in cystic fibrosis. *Arch Pediatr* **12 Suppl 2**, S117-21.
- Leao, S. C., Tortoli, E., Euzeby, J. P., and Garcia, M. J.** (2011). Proposal that *Mycobacterium massiliense* and *Mycobacterium bolletii* be united and reclassified as *Mycobacterium abscessus* subsp. *bolletii* comb. nov., designation of *Mycobacterium abscessus* subsp. *abscessus* subsp. nov. and emended description of *Mycobacterium abscessus*. *Int J Syst Evol Microbiol* **61**(Pt 9), 2311-3.
- Lee, M. R., Cheng, A., Lee, Y. C., Yang, C. Y., Lai, C. C., Huang, Y. T., Ho, C. C., Wang, H. C., Yu, C. J., and Hsueh, P. R.** (2012). CNS infections caused by *Mycobacterium abscessus* complex: clinical features and antimicrobial susceptibilities of isolates. *J Antimicrob Chemother* **67**(1), 222-5.
- Lenoir, G., Vrielynck, S., Clairicia, M., Fezaa, D. A., Sorin, M., and Sermet-Gaudelus, I.** (2007). Infections bactériennes et mucoviscidose. *Revue Francophone des Laboratoires* **397**, 49-57.
- Lerat, I., Truffot, C., and Veziris, N.** (2011). Infections à *Mycobacterium abscessus* : épidémiologie, aspects cliniques et traitement. *Journal des Anti-Infectieux* **13**, 49-55.
- Levy, I., Grisaru-Soen, G., Lerner-Geva, L., Kerem, E., Blau, H., Bentur, L., Aviram, M., Rivlin, J., Picard, E., Lavy, A., Yahav, Y., and Rahav, G.** (2008). Multicenter cross-sectional study of nontuberculous mycobacterial infections among cystic fibrosis patients, Israel. *Emerg Infect Dis* **14**(3), 378-84.
- Macheras, E., Roux, A. L., Bastian, S., Leao, S. C., Palaci, M., Sivadon-Tardy, V., Gutierrez, C., Richter, E., Rusch-Gerdes, S., Pfyffer, G., Bodmer, T., Cambau, E., Gaillard, J. L., and Heym, B.** (2011). Multilocus sequence analysis and rpoB sequencing of *Mycobacterium abscessus* (sensu lato) strains. *J Clin Microbiol* **49**(2), 491-9.
- Mariani-Kurkdjian, P., and Bingen, E.** (2003). [Pathogenic bacteria in cystic fibrosis]. *Arch Pediatr* **10 Suppl 2**, 342s-346s.
- Maugein, J.** (2007). Identification moléculaire des mycobactéries non tuberculeuses. *Revue Francophone des Laboratoires* **391**.
- Medjahed, H., Gaillard, J. L., and Reytrat, J. M.** (2010). *Mycobacterium abscessus*: a new player in the mycobacterial field. *Trends Microbiol* **18**(3), 117-23.
- Mehta, A.** (2005). CFTR : more than just a chloride channel. *Pediatric pulmonology* **39**, 292-298.
- Moore, M., and Frerichs, J. B.** (1953). An unusual acid-fast infection of the knee with subcutaneous, abscess-like lesions of the gluteal region; report of a case with a study of the organism, *Mycobacterium abscessus*, n. sp. *J Invest Dermatol* **20**(2), 133-69.
- Murray, P. R., Baron, E. J., Pfaller, M. A., Tenover, F. C., and Tenover, R. H.** (1995). "Manual of Clinical Microbiology." (A. Press, Ed.).

- Mussaffi, H., Rivlin, J., Shalit, I., Ephros, M., and Blau, H.** (2005). Nontuberculous mycobacteria in cystic fibrosis associated with allergic bronchopulmonary aspergillosis and steroid therapy. *Eur Respir J* **25**(2), 324-8.
- Nash, K. A., Brown-Elliott, B. A., and Wallace, R. J., Jr.** (2009). A novel gene, erm(41), confers inducible macrolide resistance to clinical isolates of *Mycobacterium abscessus* but is absent from *Mycobacterium chelonae*. *Antimicrob Agents Chemother* **53**(4), 1367-76.
- Nessar, R., Cambau, E., Reyrat, J. M., Murray, A., and Gicquel, B.** (2012). *Mycobacterium abscessus*: a new antibiotic nightmare. *J Antimicrob Chemother* **67**(4), 810-8.
- Olivier, K. N., Weber, D. J., Lee, J. H., Handler, A., Tudor, G., Molina, P. L., Tomaszefski, J., and Knowles, M. R.** (2003a). Nontuberculous mycobacteria. II: nested-cohort study of impact on cystic fibrosis lung disease. *Am J Respir Crit Care Med* **167**(6), 835-40.
- Olivier, K. N., Weber, D. J., Wallace, R. J., Jr., Faiz, A. R., Lee, J. H., Zhang, Y., Brown-Elliott, B. A., Handler, A., Wilson, R. W., Schechter, M. S., Edwards, L. J., Chakraborti, S., and Knowles, M. R.** (2003b). Nontuberculous mycobacteria. I: multicenter prevalence study in cystic fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* **167**(6), 828-34.
- Pena, J. A., Ferraro, M. J., Hoffman, C. G., and Branda, J. A.** (2012). Growth detection failures by the nonradiometric Bactec MGIT 960 mycobacterial culture system. *J Clin Microbiol* **50**(6), 2092-5.
- Petrini, B.** (2006). *Mycobacterium abscessus*: an emerging rapid-growing potential pathogen. *APMIS* **114**(5), 319-28.
- Pierre-Audigier, C., Ferroni, A., Sermet-Gaudelus, I., Le Bourgeois, M., Offredo, C., Vu-Thien, H., Fauroux, B., Mariani, P., Munck, A., Bingen, E., Guillemot, D., Quesne, G., Vincent, V., Berche, P., and Gaillard, J. L.** (2005). Age-related prevalence and distribution of nontuberculous mycobacterial species among patients with cystic fibrosis. *J Clin Microbiol* **43**(7), 3467-70.
- Prinz, B. M., Michaelis, S., Kettelhack, N., Mueller, B., Burg, G., and Kempf, W.** (2004). Subcutaneous infection with *Mycobacterium abscessus* in a renal transplant recipient. *Dermatology* **208**(3), 259-61.
- Pruitt, T. C., Hughes, L. O., Blasier, R. D., McCarthy, R. E., Glasier, C. M., and Roloson, G. J.** (1993). Atypical mycobacterial vertebral osteomyelitis in a steroid-dependent adolescent. A case report. *Spine (Phila Pa 1976)* **18**(16), 2553-5.
- Quon, B. S., and Aitken, M. L.** (2012). Cystic Fibrosis: What to Expect now in the Early Adult Years. *Paediatric Respiratory Reviews*.
- Radhakrishnan, D. K., Yau, Y., Corey, M., Richardson, S., Chedore, P., Jamieson, F., and Dell, S. D.** (2009). Non-tuberculous mycobacteria in children with cystic fibrosis: isolation, prevalence, and predictors. *Pediatr Pulmonol* **44**(11), 1100-6.

- Ravilly, S., Le Roux, E., Bellis, G., and Dufour, F.** (2007). Epidémiologie et physiopathologie de la mucoviscidose. *Revue Francophone des Laboratoires* **397**, 25-36.
- Ringuet, H., Akoua-Koffi, C., Honore, S., Varnerot, A., Vincent, V., Berche, P., Gaillard, J. L., and Pierre-Audigier, C.** (1999). hsp65 sequencing for identification of rapidly growing mycobacteria. *J Clin Microbiol* **37**(3), 852-7.
- Riordan, J. R., Rommens, J. M., Kerem, B., Alon, N., Rozmahel, R., Grzelczak, Z., Zielenski, J., Lok, S., Plavsic, N., Chou, J. L., and et al.** (1989). Identification of the cystic fibrosis gene: cloning and characterization of complementary DNA. *Science* **245**(4922), 1066-73.
- Ripoll, F., Pasek, S., Schenowitz, C., Dossat, C., Barbe, V., Rottman, M., Macheras, E., Heym, B., Herrmann, J. L., Daffe, M., Brosch, R., Risler, J. L., and Gaillard, J. L.** (2009). Non mycobacterial virulence genes in the genome of the emerging pathogen *Mycobacterium abscessus*. *PLoS One* **4**(6), e5660.
- Rottman, M., Catherinot, E., Hochedez, P., Emile, J. F., Casanova, J. L., Gaillard, J. L., and Soudais, C.** (2007). Importance of T cells, gamma interferon, and tumor necrosis factor in immune control of the rapid grower *Mycobacterium abscessus* in C57BL/6 mice. *Infect Immun* **75**(12), 5898-907.
- Roux, A. L., Herrmann, J. L., Gaillard, J. L., and Rottman, M.** (2010). *Mycobacterium abscessus* : an emerging pulmonary pathogen. *Immuno-analyse et Biologie spécialisée* **25**, 26-33.
- Saiman, L.** (2004). The mycobacteriology of non-tuberculous mycobacteria. *Paediatr Respir Rev* **5** Suppl A, S221-3.
- Saleeb, P. G., Drake, S. K., Murray, P. R., and Zelazny, A. M.** (2011). Identification of mycobacteria in solid-culture media by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *J Clin Microbiol* **49**(5), 1790-4.
- Sanchez-Chardi, A., Olivares, F., Byrd, T. F., Julian, E., Brambilla, C., and Luquin, M.** (2011). Demonstration of cord formation by rough *Mycobacterium abscessus* variants: implications for the clinical microbiology laboratory. *J Clin Microbiol* **49**(6), 2293-5.
- Segal, E., Diez, G. S., Prokopio, E., Aguirre, A., Poggio, G., and Chertkoff, L.** (1998). [Nontuberculous mycobacteria in patients with cystic fibrosis]. *Medicina (B Aires)* **58**(3), 257-61.
- Sermet-Gaudelus, I., Le Bourgeois, M., Pierre-Audigier, C., Offredo, C., Guillemot, D., Halley, S., Akoua-Koffi, C., Vincent, V., Sivadon-Tardy, V., Ferroni, A., Berche, P., Scheinmann, P., Lenoir, G., and Gaillard, J. L.** (2003). *Mycobacterium abscessus* and children with cystic fibrosis. *Emerg Infect Dis* **9**(12), 1587-91.
- Société Française de Microbiologie** (2010). "Diagnostic microbiologique des sécrétions broncho-pulmonaires chez un patient mucoviscidosique." Rémic ed.
- Société Française de Pédiatrie** (2002). Conférence de consensus : Prise en charge du patient atteint de mucoviscidose.

- Takeya, K., Nakayama, Y., and Nakayama, H.** (1967). Relationship between *Mycobacterium fortuitum* and *Mycobacterium runyonii*. *Am Rev Respir Dis* **96**(3), 532-5.
- Telenti, A., Marchesi, F., Balz, M., Bally, F., Bottger, E. C., and Bodmer, T.** (1993). Rapid identification of mycobacteria to the species level by polymerase chain reaction and restriction enzyme analysis. *J Clin Microbiol* **31**(2), 175-8.
- Tenover, F. C., Arbeit, R. D., Goering, R. V., Mickelsen, P. A., Murray, B. E., Persing, D. H., and Swaminathan, B.** (1995). Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. *J Clin Microbiol* **33**(9), 2233-9.
- Thomson, R. M., Armstrong, J. G., and Looke, D. F.** (2007). Gastroesophageal reflux disease, acid suppression, and *Mycobacterium avium* complex pulmonary disease. *Chest* **131**(4), 1166-72.
- Torrens, J. K., Dawkins, P., Conway, S. P., and Moya, E.** (1998). Non-tuberculous mycobacteria in cystic fibrosis. *Thorax* **53**(3), 182-5.
- van Ingen, J., Boeree, M. J., van Soolingen, D., and Mouton, J. W.** (2012). Resistance mechanisms and drug susceptibility testing of nontuberculous mycobacteria. *Drug Resist Updat* **15**(3), 149-61.
- Verregghen, M., Heijerman, H. G., and Reijers, M.** (2012). Risk factors for *Mycobacterium abscessus* infection in cystic fibrosis patients ; a case-control study. *Journal of cystic fibrosis*.
- Villanueva, A., Calderon, R. V., Vargas, B. A., Ruiz, F., Agüero, S., Zhang, Y., Brown, B. A., and Wallace, R. J., Jr.** (1997). Report on an outbreak of postinjection abscesses due to *Mycobacterium abscessus*, including management with surgery and clarithromycin therapy and comparison of strains by random amplified polymorphic DNA polymerase chain reaction. *Clin Infect Dis* **24**(6), 1147-53.
- Wallace, R. J., Jr., Brown, B. A., and Griffith, D. E.** (1998). Nosocomial outbreaks/pseudo-outbreaks caused by nontuberculous mycobacteria. *Annu Rev Microbiol* **52**, 453-90.
- Waters, V., Yau, Y., Prasad, S., Lu, A., Atenafu, E., Crandall, I., Tom, S., Tullis, E., and Ratjen, F.** (2011). *Stenotrophomonas maltophilia* in cystic fibrosis: serologic response and effect on lung disease. *Am J Respir Crit Care Med* **183**(5), 635-40.
- Whittier, S., Hopfer, R. L., Knowles, M. R., and Gilligan, P. H.** (1993). Improved recovery of mycobacteria from respiratory secretions of patients with cystic fibrosis. *J Clin Microbiol* **31**(4), 861-4.
- Whittier, S., Olivier, K., Gilligan, P., Knowles, M., and Della-Latta, P.** (1997). Proficiency testing of clinical microbiology laboratories using modified decontamination procedures for detection of nontuberculous mycobacteria in sputum samples from cystic fibrosis patients. The Nontuberculous Mycobacteria in Cystic Fibrosis Study Group. *J Clin Microbiol* **35**(10), 2706-8.



- Wilms, E. B., Touw, D. J., Heijerman, H. G., and van der Ent, C. K.** (2012). Azithromycin maintenance therapy in patients with cystic fibrosis: a dose advice based on a review of pharmacokinetics, efficacy, and side effects. *Pediatr Pulmonol* **47**(7), 658-65.
- Woods, G. L., Brown-Elliott, B. A., Conville, P. S., and Desmond, E. P.** (2011). Susceptibility testing of mycobacteria, nocardia, and other aerobic actinomycetes; approved standard. *CLSI document M24-A2. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA.*
- Vaincre la Mucoviscidose** (en ligne), [www.vaincrelamuco.org](http://www.vaincrelamuco.org), consulté le 27 septembre 2012.
- Zelazny, A. M., Root, J. M., Shea, Y. R., Colombo, R. E., Shamputa, I. C., Stock, F., Conlan, S., McNulty, S., Brown-Elliott, B. A., Wallace, R. J., Jr., Olivier, K. N., Holland, S. M., and Sampaio, E. P.** (2009). Cohort study of molecular identification and typing of *Mycobacterium abscessus*, *Mycobacterium massiliense*, and *Mycobacterium bolletii*. *J Clin Microbiol* **47**(7), 1985-95.

# ANNEXES

<b>Patients</b>	<b>Date du traitement</b>	<b>Traitement reçu</b>	<b>Durée</b>	
<b>APP GAB</b>	10/02/09 cure1	tigécycline amikacine clarithromycine	40 jours	
		relai clarithromycine amikacine inhalé	np	
	de 01/10/2009 à 01/03/2011	clarithromycine amikacine inhalé	15 mois	
<b>BOU BEN</b>	01/04/10 cure1	cefoxitine amikacine clarithromycine	28 jours	
		relai clarithromycine	np	
	oct-10 cure2	cefoxitine amikacine clarithromycine	12 jours	
		relai clarithromycine	np	
	févr-11 cure3	cefoxitine amikacine clarithromycine	10 jours	
		relai clarithromycine	np	
	<b>CHA ANA</b>	2005 cure1	cefoxitine amikacine	40 jours
			relai clarithromycine amikacine inhalé	np
2008 cure2		imipénème amikacine	np	
		2009 cure3	cefoxitine amikacine linézolide	14 jours
cure4			tigécycline amikacine linézolide clarithromycine	21 jours
		2010 cure5	tigécycline amikacine clarithromycine	33 jours
	relai clarithromycine amikacine inhalé		np	
<b>MAH ALE</b>	30/11/11	clarithromycine linézolide	35 jours	

np : non précisé

**Annexe 1 : Traitement des patients infectés à MABSC suivis au CRCM de Rouen (1/3)**

<b>Patients</b>	<b>Date du traitement</b>	<b>Traitement reçu</b>	<b>Durée</b>
<b>COU DOR</b>	01/07/10 cure 1	cefoxitine amikacine clarithromycine linézolide	21 jours
	fin mars 2011	relai clarithromycine amikacine inhalé	8 mois
	01/12/10 cure 2	cefoxitine amikacine clarithromycine	40 jours
	05/04/12	méronème cefoxitine amikacine clarithromycine linézolide	40 jours
<b>GUI ART</b>	29/11/11 cure1	cefoxitine amikacine clarithromycine linézolide	20 jours
		relai clarithromycine amikacine inhalé	
	15/02/12 cure 2	méronème tigécycline sulfaméthoxazole clarithromycine linézolide amikacine	21 jours
	cure3	relai clarithromycine linézolide sulfaméthoxazole amikacine inhalé	np
	25/04/12 cure4	cefoxitine amikacine impénème clarithromycine tigécycline linézolide	70 jours
	en cours	relai clarithromycine amikacine inhalé linézolide	
<b>VAR ARU</b>	cure1 janvier 2012	méronème cefoxitine amikacine clarithromycine	np
		relai clarithromycine amikacine inhalé	np

np : non précisé

**Annexe 1:** Traitement des patients infectés à MABSC suivis au CRCM de Rouen (2/3)

<b>Patients</b>	<b>Date du traitement</b>	<b>Traitement reçu</b>	<b>Durée</b>
<b>MAC MIC</b>	01/12/08	meronem	np
	cure	amikacine clarithromycine	
	fin 01/2009	relai clarithromycine amikacine inhalé	np
	01/10/09	clarithromycine amikacine inhalé	7 mois
<b>TRU DAM</b>	Avril 2005	clarithromycine	
	cure 1	ethambutol	6 mois
		cefpirome tobramycine	np
	cure2 et 3		
	juin-05	imipénème	np
	oct-05	amikacine	
	2006	imipénème	
	cure 4	amikacine	
	2007	imipénème	
	cure 5	linézolide	
		relai clarithromycine	arrêt 03/2010
		relai minocycline	arrêt 06/2010
	2010	cefoxitine	14j
	juin cure 6	amikacine imipénème	
décembre	cefoxitine	14j	
cure7	méronem amikacine mynocycline		
	relai clarithromycine amikacine inhalé		
2011	cefoxitine	14j	
juillet cure 8	zeclar lamprene		
novembre	sulfaméthoxazole		
cure 9	meronem		
2012	tigécycline	30j	
mars cure 10	amikacine céfoxitine clarithromycine		
avril	imipénème	22j	
cure 11	amikacine céfoxitine clarithromycine		
	relai clarithromycine amikacine inhalé	np	

np : non précisé

### **Annexe 1:** Traitement des patients infectés à MABSC suivis au CRCM de Rouen (3/3)

	Date du privt	Nature du privt	Patient	Méthode A	ED	Résultats MGIT	Résultats Cultures solides	Identification	Cepacia	Résultats culture
1	7/12	Crachats	Per A	08/12	-	-	-		19/01	-
2	7/12	Aspiration	Bul A	15/12	-	-	-		pas fait	
3	13/12	Crachats	Des S	15/12		-	1TS		19/01	1 col champignon
4	13/12	Crachats	Pla N	15/12	-	-	-		19/01	-
5	13/12	Crachats	Mah A	15/12	<1	+3	+15j/50col	M.abscessus	6/01	+3j col R
6	13/12	Crachats	Mar R	15/12		-	-		19/01	c+ : 5 col crénelé
7	14/12	Crachats	Sai L	15/12		-	1TS		pas fait	
8	14/12	Crachats	Baz J F	15/12		-	2TS		19/01	-
9	14/12	Crachats	Bou S	21/12		-	-		19/01	-
10	15/12	Crachats	Cou D	21/12	-	-	2TS		19/01	-
11	16/12	Crachats	Con M	21/12		-	4TS		19/01	1 col levure
12	16/12	Crachats	Cit L	21/12		-	3TS		19/01	-
13	16/12	Crachats	Leb C	21/12		-	-		19/01	-
14	20/12	Crachats	Gui A	21/12	-	+4	+8j/50col	M.abscessus	6/01	+3j col R
15	21/12	Crachats	Cob L	30/12	-	-	-		6/01	-
16	22/12	Crachats	Duj F	30/12		-	3TS		19/01	1 col champignon
17	22/12	Crachats	Pre D	30/12		-	-		19/01	-
18	22/12	Crachats	Cou J P	30/12		-	2TS		19/01	-
19	22/12	Crachats	Var A	30/12	-	+3	2TS	M.massiliense	6/01	+3 col R
20	22/12	Crachats	Led L	30/12		-	1TS		pas fait	
21	27/12	Crachats	Mus A	30/12		-	4TS		pas fait	
22	28/12	Crachats	Deu D	30/12		-	-		pas fait	
23	30/12	Crachats	Lef A	10/1		-	4TS		pas fait	

S : séreux ; M : muqueux ; P : purulent ; TP : très purulent ; TS : tube souillé ; col : colonies ; R : rugueuses ; S : muqueuses

### Annexe 2 : Données de l'étude prospective (Décembre 2011)

	Date du prlv	Nature du prlv	Patient	Méthode A	ED	Résultats MGIT	Résultats Cultures solides	Identification	Date du Cepacia	Résultats culture
1	4/1	Crachats	Gea Q	10/1		-	-		19/01	envahit Proteus
2	4/1	Crachats	Cou D	10/1	-	-	2TS		19/01	-
3	4/1	Crachats	Kol D	10/1		-	3TS		19/01	-
4	5/1	Crachats	Gui A	10/1	1 10	+2j	100col 8ème j	M. abscessus	19/01	+3j col R
5	6/1	Crachats	Tru D	10/1	-	+3j	neg 60ème jour	M. abscessus	19/01	c+ staph gde col blanche
6	6/1	Crachats	Fla C	10/1		-	1TS		19/01	-
7	6/1	Crachats	Der A	10/1		-	2TS		19/01	-
8	11/1	Crachats	App G	19/1	-	-	2TS		19/01	coccoB- (haemop) 20col plates
9	11/1	Crachats	Bar E	19/1		-	1TS		19/01	bg- envahit
10	11/1	Crachats	Bou T	19/1		-	1TS		19/01	envahit champignon
11	12/1	Crachats	Mac M	19/1	-	-	2TS		19/01	bg+/- + filament (steno?)
12	13/1	Crachats	Var A	24/1					19/01	+3j col R M. abscessus
13	17/1	LBA	Var A	24/1	<1				19/01	+3j col R M. abscessus
14	17/1	Brosse	Var A	24/1	-				19/01	+6j col R M. abscessus
15	17/1	Crachats	Dho A	19/1		-	3TS		19/01	-
16	17/1	Crachats	Leb S	19/1		-	-		19/01	bg+/- + filament (steno?)
17	17/1	Crachats	Ham D	19/1		-	4TS		19/01	c+ col plate
18	17/1	Crachats	Gea Q	19/1		-	4TS		19/01	envahit Proteus
19	18/1	Crachats	Pla N	19/1	-	-	2TS		19/01	-
20	18/1	Crachats	Cro M	26/1		-	4TS		13/02	-
21	19/1	Crachats	Tav C	26/1		-	4TS		13/02	nb col violette =long bg- (xantho)
22	20/1	Crachats	Ful A	26/1		-	-		13/02	-
23	20/1	Crachats	Des S	26/1		-	4TS		13/02	-
24	20/1	Crachats	Bel C	26/1		-	4TS		13/02	-
25	25/1	Crachats	Rey S	26/1		-	-		13/02	-
26	25/1	Crachats	Ter A	26/1		-	-		13/02	-

S : séreux ; M : muqueux ; P : purulent ; TP : très purulent ; TS : tube souillé ; col : colonies ; R : rugueuses ; S : muqueuses

## Annexe 2 : Données de l'étude prospective (Janvier 2012)

	Nature du prtvt	Patient	Aspect du prtvt	Méthode A	Volume	ED	Résultats MGIT	Résultats Cultures solides	Identification	Méthode B	Volume	ED	Résultats Cultures solides	Cepacia	Résultats culture
1	Crachats	Var A	M	03/02	0,1		-	-		*	QI			x	x
2	Crachats	Kol D	P	03/02	1		-	3TS		28/2	0,25		-	13/02	-
3	Crachats	Cou D	P	03/02	ESR	-	-	-		28/2	QI			13/02	J10 gde col R : Z+ M. boletii
4	Aspiration	Boe R	*	03/02	ESR		-	-		28/2	QI			13/02	-
5	Crachats	Var A	M	03/02	1	10vus	-	-		28/2	QI			13/02	-
6	Crachats	Tho A	M	03/02	1		-	1TS		28/2	0,5		-	13/02	col granuleuse :c+ strepto
7	Crachats	Boi C	P	03/02	0,2		-	4TS		28/2	QI			13/02	-
8	Crachats	Leb C	MP	10/02	1	-	-	-		28/2	1	-	-	13/02	-
9	Crachats	Cit L	P	10/02	0,5		-	4TS		28/2	0,25		-	13/02	-
10	Crachats	Bar E	P	10/02	0,8		-	4TS		28/2	0,5		-	13/02	envahit bg- proteus
11	Crachats	Bie V	P	17/02	0,5		-	4TS		28/2	0,25		-	13/02	-
12	Crachats	Duj E	TP	17/02	0,25		-	4TS		28/2	0,25		-	13/02	-
13	Crachats	Cha N	S	17/02	ESR		-	4TS		28/2	QI			13/02	petite col grise : c+ staph
14	Crachats	Yah J	MP	17/02	1		-	1TS		28/2	1,5		-	06/04	gd CB c+staph et petite Cgrise sèche levure
15	Crachats	App G	P	17/02	1		-	2TS		28/2	1		2TS	06/04	1 col jaune staph et 1 champignon
16	Crachats	Mou H	P	17/02	0,2		-	4TS		28/2	0,3		2TS	06/04	-
18	Crachats	Lec A	MP	17/02	2		+ 42j	4TS	M.gordonae	28/2	2		-	06/04	-
19	Crachats	Ham D	P	24/02	0,3		-	4TS		28/2	0,3		-	06/04	10col grise c+
20	Crachats	Cou D	MP	24/02	0,2	-	-	2TS		28/2	0,2	-	-	06/04	-
21	Crachats	Man G	P	24/02	0,3		-	-		28/2	0,2		-	06/04	-
22	Crachats	Leh D	TP	24/02	0,5		-	1TS		28/2	0,5		2TS	06/04	20col grise c+ staph et col sèche levure
23	Crachats	Led L	MP	24/02	0,5		-	2TS		28/2	0,5		2TS	06/04	-

S : séreux ; M : muqueux ; P : purulent ; TP : très purulent ; TS : tube souillé ; col : colonies ; R : rugueuses ; S : muqueuses

## Annexe 2 : Données de l'étude prospective (Février 2012)



	Nature du prlv	Patient	Aspect du prlv	Méthode A	Volume	ED	Résultats MGIT	Résultats Cultures solides	Identification	Méthode B	Volume	ED	Résultats Cultures solides	Cepacia	Résultats culture
1	Crachats	Varl A	M	5/3	0,5	1 BAAR vu	+5j	neg	M. massiliense	28/2	0,3	-	50 col au 3ème j (30°)		
2	Crachats	Bla J	MP	5/3	1		-	4TS		5/3	1		-	06/04	-
3	Crachate	Col C	M	5/3	0,3		-	-		5/3	0,3		-	06/04	-
4	Crachats	Gui C	MP	5/3	1		-	-		5/3	1		-	06/04	-
5	Crachats	Pre D	MP	5/3	1		-	4TS		5/3	1		1 TS	06/04	-
6	Crachats	Ful A	M	5/3	1,5		-	-		5/3	1,5		-	06/04	-
7	Crachate	Kol D	P	5/3	1		conta	4TS		5/3	1		2TS	06/04	-
8	Crachats	Cou D	TP	5/3	0,3	-	+9j	4 col 7j	M. bolletii	5/3	0,3	-	50 col au 15ème j (30°)	06/04	3 col grise levure
9	Crachats	Leb C	M	16/3	1	-	-	-		29/3	1	-	-	06/04	-
10	Crachats	Tru D	P	16/3	0,1	-	-	-		29/3	0,1	-	-	06/04	col Grise levure col B c+ staph
11	Crachats	Boi C	P	16/3	0,2		-	4TS		29/3	0,2		-	06/04	-
12	Aspiration	Bul A	M	16/3	0,5	-	-	-		29/3	0,5	-	-	06/04	-
13	Crachats	Var A	P	16/3	0,4	<1	+3j	50col 10j	M. massiliense	29/3	0,4	10 vus	500 col au 6ème j	06/04	J4 nb col R M. abscessus
14	Crachats	Der A	MP	16/3	0,1		-	4TS		29/3	0,1		-	06/04	-
15	Crachats	Leb S	P	16/3	1	-	-	1TS		29/3	0,5		-	06/04	-
16	Crachats	Ham D	P	16/3	1		-	3TS		29/3	0,5		2TS	06/04	-
17	Crachats	Tav C	MP	16/3	0,1		-	-		29/3	0,3		-	06/04	nb col Violette bg-xantho
18	Aspiration	Col K	S	16/3	0,1		-	-		x	qi			06/04	-
19	Crachats	Boe R	P	16/3	0,1		-	-		x	qi			06/04	-
20	Crachats	Lap G	P	16/3	0,1		-	-		x	qi			06/04	-
21	Crachats	Mar R	P	16/3	0,1		-	-		x	qi			06/04	-
22	Crachats	Gui A	MP	16/3 souche bactério				+2j	M. abscessus	29/3	1	<1	inn col au 6ème j	06/04	J4 nb col R M. abscessus
23	Aspiration	Rub A	S	29/3	0,8		-	-		29/3	0,2		-	06/04	-
24	Crachate	Tal A	S	29/3	ESR		-	-		x	qi			06/04	-
25	Crachats	Mac M	M	29/3	1	-	-	-		29/3	1	-	-	06/04	col violette bg-
26	Crachats	Mot S	S	29/3	ESR		-	1TS		x	qi			06/04	-
27	Crachats	Mas K	MP	29/3	0,5		conta	4TS		29/3	0,5		-	06/04	1 col jaune staph, 2 col G levure
28	Aspiration	Sco P	M	29/3	ESR		-	4TS		x	qi			06/04	-
29	Crachats	Le R D	P	29/3	1		-	4TS		29/3	0,5		-	06/04	-
30	Crachats	Pla N	MP	29/3	0,5	1 vu	-	-		29/3	0,3	-	-	06/04	-
31	Crachats	Bou T	MP	29/3	0,5		-	2TS		x	qi			06/04	envahit champignon
32	Crachats	Bar E	M	29/3	1		-	4TS		29/3	1		-		

S : séreux ; M : muqueux ; P : purulent ; TP : très purulent ; TS : tube souillé ; col : colonies ; R : rugueuses ; S : muqueuses

## Annexe 2 : Données de l'étude prospective (Mars 2012)

	Nature du prlv	Patient	Aspect du prlv	Méthode A	Volume	ED	Résultats MGIT	Résultats Cultures solides	Identification	Méthode B	Volume	ED	Résultats Cultures solides	Cepacia	Résultats culture
1	Crachats	Kul D	TP	06/04	0,5		-	4TS		06/04	0,5		1TS	06/04	-
2	Crachats	Aub P	S	06/04	0,2		-	2TS		06/04	0,2		-	06/04	-
3	Crachats	Poy A	M	06/04	0,5		-	4TS		06/04	0,5		-	06/04	nb col B c+ staph
4	Crachats	Heu A	S	06/04	0,3		-	-		06/04	0,3		-	06/04	-
5	Crachats	Erru E	M	06/04	0,5		-	2TS		06/04	0,5		-	06/04	-
6	Crachats	Cob L	P	06/04	0,5	-	+J6	-	M. abscessus	06/04	0,5	-	30 col 6ème j 30 et 37°	06/04	2 col S à J6 : Z+ M. abscessus
7	Crachats	Gui A	M	06/04	1	100/ch	+J2	30col 4j	M. abscessus	06/04	1	<1	30 col 4ème j	06/04	J3 : nb col R Z+ M. abscessus
8	Crachats	Lef A	M	18/04	0,4		-	50col 35j	M. gordonae	18/04	0,4		50 col 35è j 30°		
9	Crachats	Leb C	S	18/04	0,5	-	-	-		18/04	0,5	-	-	27/04	-
10	Crachats	Cha N	M	18/04	0,5		-	50col 35j	M. gordonae	18/04	0,5		50 col 35ème j	27/04	2 col c+
11	Crachats	Cou D	P	18/04	0,4	-	-	1TS		18/04	0,4	-	2TS	27/04	levure
12	Crachats	Die K	M	18/04	0,7		-	-		18/04	0,7		-	27/04	6 col c+
13	Crachats	Goi D	MP	18/04	0,5		-	4TS		18/04	0,5		2TS	27/04	-
14	Crachats	Tru D	MP	26/04	0,2	-	-	2TS		26/04	0,2	-	-	27/04	GC = c+ et PC = levures
15	Crachats	Boe R	P	26/04	0,3		conta	4TS		26/04	0,3		-	27/04	-
16	Crachats	Mar R	P	26/04	0,4		-	1TS		26/04	0,4		-	27/04	-
17	Crachats	Bar M	MP	26/04	1		-	2TS		26/04	1		-	27/04	-
18	Crachats	Bie V	MP	26/04	0,6		-	4TS		26/04	0,6		-	27/04	-
19	Crachats	Guil C	M	26/04	0,3		-	4TS		26/04	0,3		-	27/04	-
20	Crachats	Mah A	M	26/04	0,5	-	+J4	100col 5j	M. abscessus	26/04	0,5	-	30 col 5ème j	27/04	J2 : col granuleuse Z+
21	Crachats	Tre J	M	26/04	0,3		-	-		26/04	0,3		-	27/04	PC =levures
22	Crachats	Rur A	S	26/04	0,2		-	1TS		26/04				27/04	-
23	Crachats	Anq J	M	26/04	0,2		-	-		26/04	0,2		-	27/04	-

S : séreux ; M : muqueux ; P : purulent ; TP : très purulent ; TS : tube souillé ; col : colonies ; R : rugueuses ; S : muqueuses

### Annexe 2 : Données de l'étude prospective (Avril 2012)

**Nom – Prénom de l'étudiant :** .....

**Nom du Président de Jury :** .....

**Date de la soutenance de la thèse :** .....

**Mention :** .....

**VU, le Président de Jury,**

**VU, le Directeur de la Section Pharmacie  
De l'UFR Médecine-Pharmacie de Rouen**