

UNIVERSITÉ TOULOUSE III – PAUL SABATIER
FACULTÉS DE MÉDECINE

ANNÉE 2015

2015 TOU3 1511

THÈSE

POUR LE DIPLÔME D'ÉTAT DE DOCTEUR EN MÉDECINE
MÉDECINE SPÉCIALISÉE CLINIQUE

Présentée et soutenue publiquement

par

Michaël PHELIPPEAU

le 02 AVRIL 2015

**Les mycobactéries, pathogènes respiratoires émergents chez les
patients atteints de mucoviscidose : méthodes diagnostiques.**

**L'exemple de *Mycobacterium lentiflavum*
dans une grande ville française.**

Directeur de thèse : Pr Michel DRANCOURT

JURY

Monsieur le Professeur	Alain DIDIER	Président
Monsieur le Professeur	Julien MAZIERES	Assesseur
Monsieur le Professeur	Pierre DELOBEL	Assesseur
Madame le Docteur	Christine SEGONDS	Assesseur
Madame le Docteur	Marie MITTAINE	Suppléant

UNIVERSITÉ PAUL SABATIER
FACULTÉ DE MÉDECINE TOULOUSE-PURPAN

Serment d'Hippocrate

*Sur ma conscience, en présence de mes maîtres et de mes condisciples,
je jure d'exercer la médecine suivant les lois de la morale,
de l'honneur et de la probité.*

*Je pratiquerai scrupuleusement tous mes devoirs envers les malades,
mes confrères et la société.*

REMERCIEMENTS

Aux membres du jury,

Monsieur le Professeur Alain DIDIER, président du jury,

Merci de me faire l'honneur d'avoir accepté de présider ce jury.

Veillez trouver ici cher Maître, l'expression de ma gratitude et de mon respect le plus
sincère.

Monsieur le Professeur Julien MAZIERES,

Merci d'avoir accepté de faire partie de mon jury et par avance pour tous les commentaires toujours constructifs que vous pourrez porter sur mon travail.

Merci également pour l'ensemble des enseignements riches et motivés dont j'ai pu bénéficier à vos côtés.

Monsieur le Professeur Pierre DELOBEL,

Merci d'avoir accepté de juger mon travail.

C'est avec beaucoup de respect et d'admiration que je te présente cette thèse. En espérant que ce travail nous donnera l'assurance de pouvoir encore travailler ensemble à l'avenir.

Madame le Docteur Christine SEGONDS,

Je vous remercie Madame d'avoir accepté de juger ce travail en apportant vos connaissances et votre expertise dans le domaine de la microbiologie, en particulier des mycobactéries.

Madame le Docteur Marie MITTAINÉ,

Je te remercie d'avoir accepté de faire partie de ce jury, tu apporteras une expertise clinique notamment pédiatrique essentielle à l'analyse de cette étude clinique.

A mon directeur de Thèse,

Monsieur le Professeur Michel DRANCOURT :

Merci Monsieur pour votre soutien, votre aide, votre confiance et votre expertise toujours critique et constructive envers mon travail.

Je vous remercie d'avoir accepté de diriger mon Master et cette Thèse.

Etant assuré d'avoir encore considérablement à apprendre à vos côtés, je serais honoré de poursuivre ma formation sous votre enseignement.

Soyez Monsieur assuré de mon plus profond respect.

A ma famille,

Merci à mes parents, mes frères et sœurs et leurs ami(e)s, de m'avoir soutenu dès mon plus jeune âge dans la perspective d'une vie personnelle et professionnelle riche (de devenir une tête chercheuse !), bien plus souvent dans mes bouquins que sur un terrain de sport. Merci pour votre patience, votre disponibilité, et votre courage d'avoir supporté un fils et un grand frère parfois colérique, parfois trop absent.
Profitons ensemble de la suite car elle risque d'être longue.

Merci à mes grands-parents, pour votre grande affection et l'intérêt toujours vif que vous portez à notre avenir.

Merci à ma « tantine » et à ses mec et mectons pour leur joie de vivre, dommage de s'être loupés récemment, qu'à cela ne tienne, à bientôt pour la bringue de juillet!

A mes amis

Kiril, mon grand frère costaud de l'Est !! Merci pour ta patience, ton amitié indéfectible, tes surprises et ton soutien dans les coups durs. Que serais-je devenu si ces années d'étudiant en médecine n'avaient pas été ponctuées de nos « Очи чёрные » scandés à tue-tête ?! A très bientôt pour la Mairie.

Benoit, mon cher collègue, enfin nous y sommes tous les deux après nos années de labeurs. Je te souhaite plein de bonheur pour ta nouvelle vie, un conseil quand même, c'est une manie chez moi : dors 14h par jour dès maintenant, on ne sait jamais de quoi les prochaines nuits de 2015 seront faites.. ! Merci pour tout et à bientôt pour sillonner les chemins vallonnés, en souvenir du (très) bon vieux temps ; j'ai toujours une petite croix pour qui en voudrait...

Camille, j'ai suivi ton exemple de pugnacité, enfin j'ai essayé, en souvenir de nos soirées de colles de D4 et de tout le reste, merci. Plein de bonheur.

Lucie, Paulo et la charmante Juliette. Plein de bonheur à vous, et Lulu je tâcherai aussi de m'inspirer de ce que tu insuffles en bonne humeur et connaissance dans ma pratique.

Patou, François et la déesse Elia, Carole et Jean-Marie, mille bisous fleuris au Tiaré Tahiti, à bientôt sous un cocotier ou au Vieux Port: Maururu maita'i !
Marie et Vincent, les a(i)mants de Marseille qui attirent tout ce qui bouge à Angers vers le sud ensoleillé... merci infiniment pour votre gentillesse et vos sourires, ça vaut aussi pour tous les Steph , Lucie et Mat, Elise et Joël, Emma, Shady, Dr Aubry dit Camille et Lulubardet.

Ludo, Elsa et les marmots ! une grande pensée pour vous pleine d'admiration et d'amitié. A très bientôt je n'en doute pas, éventuellement même sous un soleil tropical...

Noémie, merci pour ces moments toujours plein de bonne humeur depuis l'époque couffoulo-girroussinoise, plein de bonheur.

A tous ceux que je vois moins souvent, les Anne d'Angers et du 82, Maxime, Eva, Jérôme et Aurélie, Touffu, Benjamin Moug', etc... mais que j'espère revoir avec beaucoup de plaisir

Et même si d'aventure, celui ou celle qui, lisant ceci, ne verrait pas son nom ; qu'il ou elle n'y voit pas d'offense, je l'embrasse évidemment !

Merci à mes collègues

Merci à Pierre Barel, Bernard Borel, Jean-Marie Merault, Rose-Marie Rouquet, Gavin Plat, François Petureau, Dominique Giamarchi, Pierre Blanc, Marie-Annick Fisher, Philippe Breton, Eric Parrat, Lourdes Hernandez et toutes les équipes des services de Pneumologie pour avoir fait de moi ce que je pense être un pneumologue, merci pour leur sympathie et leurs encouragements, merci de m'avoir préparé à ce qui suit.

Merci à Muriel, Alexa, Mr le Pr Massip, Mr le Pr Marchou, Guillaume pour leur enseignement et leur sympathie, leur patience et leurs encouragements, votre exemple a motivé ce que j'apprécie dans mon métier de médecin, le soin attentionné dans la prise en charge des maladies infectieuses. J'espère vous revoir prochainement.

Merci à Didier Musso pour sa confiance, son aide et ses conseils précieux qui m'ont beaucoup aidé pour ce qui va suivre.

Merci à Henri-Pierre Mallet, Lam N Guyen pour leur patience et sympathie.

Merci aux tahitiens, Mahera, Sophia, Poe et Patou pour leur joie de vivre et leurs sourires toujours sincères.

Merci à mon docteur et bientôt confrère JF Barré de m'avoir donné envie de faire ce métier, je pourrais maintenant vous appeler moi aussi « Cher confrère ! » avec un infini respect.
Je vous dédie cette thèse.

Enfin le meilleur pour la fin.

A mes deux chéris, Solène et mon Martin, pour qui rien ne compte plus au monde que leur bonheur. Ne grandissons pas trop vite... surtout toi petit Martin.

Merci à toi ma Solène, tu fais de moi un homme épanoui, chaque jour, chaque minute.

Vous êtes d'une patience infinie, votre regard et vos attentions me grandissent chaque jour, comme amant (mari peut être un jour... !) et comme papa.

Les jours passent si vite que j'aimerais passer mille fois plus de temps à vos côtés.

Merci à tous les deux pour votre amour, je vous aime aussi.
(même plus que les mycobactéries... !)

« *Ayez le culte de l'esprit critique* »

Louis Pasteur
(27 déc 1922 – 28 sep 1895)

« *Eppur, si muove* »

Galileo Galilei
(15 fév 1564 – 8 jan 1642)

TABLE DES MATIERES

ABREVIATIONS	1
INTRODUCTION.....	2
REVUE : Méthodes et critères diagnostiques des infections respiratoires à mycobactéries chez les patients atteints de mucoviscidose.....	3
A – Les mycobactéries	3
B – Les méthodes d’isolement	4
1) Les prélèvements respiratoires chez les patients atteints de mucoviscidose.....	4
2) Les prélèvements digestifs	4
3) Les prélèvements invasifs biopsiques	5
C – L’identification des espèces.....	5
1) L’examen direct	
2) La culture.....	5
3) L’identification par les méthodes dites phénotypiques	6
4) L’antibiogramme	7
5) L’identification par méthode moléculaire	7
D – Les critères diagnostiques d’une infection à mycobactéries chez le patient atteint de mucoviscidose	8
EPIDEMIOLOGIE des infections à mycobactéries en France chez les patients atteints de mucoviscidose et l’exemple d’une grande ville française.....	10
A – MATERIELS ET METHODES	10
1) Ethique.....	10
2) Patients	10
3) Méthodes d’isolement	10
4) PCR temps-réel <i>M. lentiflavum</i>	11
a) Design et PCR.....	12
b) Validation <i>in vitro</i>	12
c) Validation sur expectorations inoculées	13
5) Revue de la littérature.....	13

6) Analyses statistiques.....	13
B – RESULTATS.....	14
1) Revue de la littérature des infections à mycobactéries chez les patients atteints de mucoviscidose en France.....	14
a) Les infections tuberculeuses	14
b) Les infections à MNT.	14
2) L’exemple de la cohorte marseillaise de patients atteints de mucoviscidose.....	14
a) La tuberculose dans la cohorte marseillaise.....	14
b) Les infections à MNT dans la cohorte et l’émergence de <i>M. lentiflavum</i>	16
3) Mise en place d’une technique de diagnostic rapide par PCR temps-réel ciblant <i>M. lentiflavum</i> directement à partir des expectorations.	19
C – DISCUSSION.....	21
CONCLUSION	24
BIBLIOGRAPHIE	25
ANNEXES	32
Index des figures et tableaux.....	37

ABREVIATIONS

ADN	Acide désoxyribo-nucélique
ANOVA	Analysis of variance
AP-HM	Assistance Publique des Hôpitaux de Marseille
ARN	Acide ribo-nucléique
ARS	Agence régionale de santé
ATS	American Thoracic Society
BCG	Bacille de Calmette-Guérin
BK	Bacille de Koch
CIP	Collection de l'Institut Pasteur
CF	Cystic fibrosis
CFTR	Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator
CM/AS	Common mycobacteria/additional species
CRCM	Centre de Ressources et de Compétence pour la Mucoviscidose
IDSA	Infectious Diseases Society of America
IMC	Indice de Masse Corporelle
InVS	Institut de Veille Sanitaire
LBA	Lavage broncho-alvéolaire
MALDI-TOF	Matrix assisted laser desorption ionization – time-of-flight
MABSC	<i>Mycobacterium abscessus-chelonae</i> complex
MAC	<i>Mycobacterium avium</i> complex
MGIT	Mycobacteria growth indicator tube
MNT	Mycobactéries non-tuberculeuses
MTC	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> complex
OMS	Organisation mondiale de la santé
PCR	Polymerase chain reaction
RGM	Rapidly-growing mycobacteria
RHZE	R, rifampicine ; H, isoniazide ; Z, pyrazinamide ; E, ethambutol
SGM	Slowly-growing mycobacteria
VEMS	Volume expiré maximal pendant la première seconde

INTRODUCTION

La mucoviscidose est la maladie génétique la plus fréquente en France où elle est diagnostiquée chez 1/4500 naissances/an [1]. Cette maladie autosomique récessive est due à un dysfonctionnement de la protéine CFTR supportée par des mutations ponctuelles dans le gène *CFTR* (chromosome 7) codant pour cette protéine [2]. Une des conséquences du dysfonctionnement du canal chlore de CFTR est l'épaississement des sécrétions exocrines de l'organisme [1], du tractus respiratoire et digestif en particulier ce qui grève principalement le pronostic vital.

Depuis plus de cinquante ans la présence de mycobactéries, essentiellement isolées du tractus respiratoire, est observée et rapportée chez ces patients [3]. Les déterminants de la colonisation et/ou de l'infection de ce tractus respiratoire par les mycobactéries, bactéries appartenant au genre *Mycobacterium*, restent incomplètement expliqués [4]. L'association infection par les mycobactéries – prophylaxie au long court par macrolides est débattue [5]. Il a été rapporté une variation de prévalence de certaines espèces en fonction de l'âge des patients [6,7] et une surreprésentation du sexe féminin inexplicée [8]. Les méthodes moléculaires ont permis un diagnostic plus rapide et précis des espèces isolées mais certaines d'entre elles, par ex. *Mycobacterium abscessus*, posent toujours de réels problèmes thérapeutiques [9] par toxicité et manque d'efficacité des antibiotiques classiquement utilisés.

Ce travail est une synthèse actualisée des différentes méthodes diagnostiques concernant les mycobactéries isolées du tractus respiratoire des patients atteints de mucoviscidose. Autour des résultats épidémiologiques et expérimentaux rapportés à ce jour dans la littérature internationale, seront mis en parallèle l'exemple de l'émergence de *Mycobacterium lentiflavum* dans une cohorte de patients français et les problèmes persistants autour de la détection de ces pathogènes majoritairement opportunistes.

REVUE : Méthodes et critères diagnostiques des infections respiratoires à mycobactéries chez les patients atteints de mucoviscidose

A – Les mycobactéries

Les mycobactéries, bactéries de l'ordre des Actinomycetales, famille des Mycobacteriaceae et du genre *Mycobacterium* [10], sont des bactéries à Gram positif, aérobies et microaérophiles, colorés en rose par la coloration de Ziehl-Neelsen. Leur découverte revient à Robert Koch qui isola en 1882 le bacille de la tuberculose *Mycobacterium tuberculosis* [11] ou bacille de Koch (BK).

Les mycobactéries du complexe tuberculeux regroupent les espèces majoritaires *M. tuberculosis* et *Mycobacterium bovis* dont une souche atténuée par repiquage successif pendant 19 ans au début du XXème siècle a donné le bacille de Calmette et Guérin (BCG) utilisé comme souche vaccinale contre la tuberculose depuis les années 1930 [11]. Les autres espèces tuberculeuses sont minoritairement isolées et sont impliquées dans des anthroponoses : *Mycobacterium africanum*, *Mycobacterium canettii*, *Mycobacterium pinnipedii*, *Mycobacterium microti*, *Mycobacterium orygis*, *Mycobacterium caprae*, *Mycobacterium suricattae* et *Mycobacterium mungi* [12].

Proches phylogénétiquement de ces espèces tuberculeuses, sont décrites *Mycobacterium leprae* ou bacille de Hansen, agent de la lèpre, *Mycobacterium ulcerans*, agent de l'ulcère de Buruli et *Mycobacterium marinum*, agent de la maladie des aquariums et autres dermatoses tropicales verruciformes [13].

Les autres espèces de mycobactéries non-tuberculeuses (MNT) sont des bactéries pour la plupart environnementales et pathogènes pour l'homme en situation le plus souvent opportuniste [14]. Les critères phénotypiques utilisés historiquement pour décrire ces espèces ont permis leur classification selon leur temps de croissance en MNT à croissance rapide (RGM pour « rapidly-growing mycobacteria ») et à croissance lente (SGM pour « slowly-growing mycobacteria »). Une classification colorimétrique a ensuite été utilisée par la capacité des espèces à prendre certaines couleurs en fonction de leur exposition à la lumière [15]. Les autres caractéristiques morphologiques de ces espèces étant peu discriminantes,

l'étude de leur métabolisme initialement puis de la composition de leur membrane cellulaire par chromatographie en phase gazeuse [16] ont permis d'établir progressivement une taxonomie plus précise et plus riche au fur et à mesure de l'isolement de nouvelles espèces. Cependant, les techniques moléculaires ont challengé ces dernières méthodes fastidieuses, coûteuses et peu reproductibles pour la définition au niveau de l'espèce d'un taxon. Initialement le pourcentage d'hybridation ADN-ADN puis le séquençage complet ou partiel des gènes ubiquitaires dits « de ménages » (ex. ARN ribosomal 16S) et ensuite le génotypage par l'étude de la variabilité des séquences intergéniques non-codantes ont révolutionné la description et contribué à l'accroissement quasi exponentiel du nombre d'espèces décrites annuellement.

B – Les méthodes d'isolement

1 – Les prélèvements respiratoires chez les patients atteints de mucoviscidose

Les expectorations spontanées ou facilitées par des méthodes de kinésithérapie respiratoires sont les prélèvements majoritairement recueillis et sur la base desquels les recherches de mycobactéries sont effectuées. Toutefois, les expectorations peuvent être « induites » par l'inhalation de sérum salé hypertonique qui permet de fluidifier les sécrétions bronchiques par afflux massif d'eau libre pour compenser l'hyperosmolarité générée à la surface des bronches [17]. Les sécrétions bronchiques peuvent être récoltées par écouvillonnage pharyngé ou encore aspirées au cours d'une bronchoscopie. Enfin le lavage broncho-alvéolaire (LBA) et le brossage protégé sont des méthodes destinées à collecter les micro-organismes présents au niveau du parenchyme pulmonaire.

2 – Les prélèvements digestifs

Les mycobactéries pathogènes de l'arbre respiratoire peuvent être isolées du tractus digestif secondairement à la déglutition des sécrétions bronchiques. On connaît classiquement le tubage pour aspiration de liquide gastrique au réveil mais a plus récemment été décrite la

possibilité d'isoler par culture [18] ou identifier par méthodes moléculaires [19] avec une grande fiabilité les mycobactéries dans les selles d'individus atteints de tuberculose.

3 – Les prélèvements invasifs biopsiques

En parallèle de ces méthodes non invasives de prélèvement, la possibilité d'identifier des mycobactéries à partir de prélèvements d'adénopathies médiastinales par ponction à l'aveugle ou écho-guidée au cours d'une bronchoscopie a été rapportée récemment [20].

Les méthodes les plus invasives regroupent la biopsie pulmonaire radioguidée, per-endoscopique ou chirurgicale, la biopsie et/ou exérèse ganglionnaire axillaire ou médiastinale par médiastinoscopie, enfin la ponction simple ou la biopsie pleurale en cas d'épanchement liquidien, à l'aveugle ou chirurgicale.

C – L'identification des isolats cliniques

1 – L'examen direct des prélèvements

L'examen microscopique des prélèvements à la recherche de mycobactéries nécessite une coloration spécifique de Ziehl-Neelsen qui permet la coloration en rose de toutes les mycobactéries sur un fond bleu pour tous les autres composants matriciels ou cellulaires non mycobactériens [11]. La lame est examinée en lumière blanche au grossissement 1000 pour un comptage des mycobactéries selon les recommandations de l'OMS [21]. La valeur prédictive de cet examen reste cependant faible par la prévalence limitée des mycobactérioses respiratoires chez les malades atteints de mucoviscidose [8].

2 – La culture

Une fois acheminés au laboratoire, les prélèvements non stériles physiologiquement (respiratoires et selles) sont décontaminés puis sont mis en incubation à 30 et 37°C en milieu liquide (Middlebrook 7H9 dit milieu BACTEC 960) et/ou solide (Löwenstein-Jensen). Il est notable que le milieu de culture à base d'éléments sanguins de mouton ait été le milieu utilisé

par Robert Koch pour isoler *M. tuberculosis* [11,22] et c'est sur cette base qu'une équipe française a récemment mis au point un milieu au sang challengeant ces milieux liquides usuels puisqu'il permet une détection des micro-colonies par auto-fluorescence en quatre jours environ [23]. L'optimisation des paramètres physico-chimiques de culture des mycobactéries est un des enjeux de la mycobactériologie moderne [24].

3 – L'identification par les méthodes dites phénotypiques

Les techniques d'identification conventionnelles basées sur la culture de l'isolat reposent sur les caractéristiques phénotypiques des mycobactéries à savoir l'étude de leur métabolisme en présence de tel ou tel substrat (galeries d'identification biochimiques), études fastidieuses et onéreuses rendues automatisables par la méthode du BIOLOG [25] qui permet une étude approfondie des différentes voies métaboliques des espèces mycobactériennes.

La caractérisation des acides mycoliques présents à la surface des mycobactéries est une méthode alternative utilisée pour la différenciation taxonomique des espèces de mycobactéries [26]. Elle reste réservée aux laboratoires de recherche car trop onéreuse en matériaux et temps-opérateur en plus de nécessiter une grande expérience dans son interprétation.

Depuis l'étude de Pignonne *et al* en 2006, la spectrométrie de masse MALDI-TOF a été proposée comme outil de diagnostic des isolats cliniques de mycobactéries [27]. A l'inverse des protocoles d'identification très simples des bactéries plus « classiques » (cocci à Gram positif ou bacilles à Gram négatif [28]), les protocoles d'identification des mycobactéries se sont complexifiés au fur et à mesure des publications dans le but d'accroître la spécificité de la technique [29-31]. Il est notable qu'en dehors de l'identification des isolats obtenus après de nombreux jours de culture sur milieux solides (nécessité d'une biomasse suffisante pour les protocoles actuels), l'identification des isolats obtenus plus rapidement en milieu liquide est un échec en pratique courante de laboratoire [29]. Aucune étude n'a sans conteste montré la faisabilité de la spectrométrie MALDI-TOF en tant qu'outil diagnostique des isolats cliniques de mycobactéries réalisés en milieu BACTEC 960, le plus utilisé dans les laboratoires de mycobactériologie clinique de France. Les explications possibles sont la présence d'antibiotiques dans le milieu de culture pour éviter la pousse des pathogènes commensaux du prélèvement respiratoire [29], mais le plus probable reste la pollution des

spectres obtenus par les constituants humains du prélèvement qui sont inoculés au moment de la mise en culture.

Avec l'objectif majeur du diagnostic rapide et économique du caractère tuberculeux ou non d'un isolat clinique de mycobactérie, la spectrométrie de masse à partir d'une quantité de biomasse réduite et d'un protocole simplifié semble être un outil moderne à développer dans ce domaine.

4 – L'antibiogramme

L'antibiogramme peut être un outil diagnostique dans la mesure où le profil de sensibilité permet d'orienter le microbiologiste vers un complexe ou une espèce bactérienne en particulier. Les recommandations internationales en matière d'antibiogramme des souches de mycobactéries varient selon les espèces isolées. Lorsqu'il s'agit d'espèces du MTC, l'antibiogramme des quatre antituberculeux de première ligne est essentiel [32]. Les autres antituberculeux sont testés en cas de résistance primaire ou secondaire à ceux de première ligne. La technique utilise le milieu liquide BACTEC 960.

Concernant les MNT, les recommandations et les techniques varient selon l'espèce isolée. Classiquement, les isolats de MAC dont la significativité clinique est établie doivent être testés pour la sensibilité aux macrolides [33] et, sans détailler plus avant, les autres SGM et RGM doivent être testés en fonction du contexte clinique avec des méthodologies en milieu liquide mais dont la reproductibilité pour des équipes peu entraînées est limitée [34]. La réalisation des antibiogrammes requière donc des équipes expérimentées [33].

5 – L'identification par méthode moléculaire.

Les méthodes génotypiques d'identification sont désormais le « gold standard » (onéreux) pour le diagnostic d'une espèce de mycobactérie. Dès les années 1970, l'étude de la quantification d'hybridation ADN-ADN a permis de définir de nombreux taxons en se basant sur une comparaison globale de la composition en nucléotides [35].

L'avènement de l'étude du gène de l'ARN ribosomal 16S spécifique du monde bactérien a permis par son séquençage, d'étudier la variabilité génétique de chaque espèce au niveau nucléotidique, notamment d'élaborer des liens phylogénétiques entre ces espèces [36,37]. Par la suite, le séquençage et l'analyse cumulative des polymorphismes génétiques

d'autres gènes dits « de ménage » (*rpoB*, *sodA*, *hsp65*, *recA*, *gyrB*,...) ont permis de caractériser encore plus finement les variabilités génétiques intra et inter-espèces aboutissant à la caractérisation de nouveaux taxons et/ou sous-espèces associées à des tableaux physiopathologiques de plus en plus précis [38]. Depuis l'avènement des séquenceurs de nouvelle génération, l'étude de ces polymorphismes génétiques se dirige de plus en plus vers l'étude comparative du génome total [39].

Pour le laboratoire de microbiologie clinique, l'utilisation de PCR en temps réel comme le GenXpert pour *M. tuberculosis* et/ou de bandelettes réactives types CM/AS [40] permet de faire le diagnostic d'un grand nombre d'espèces de mycobactéries tuberculeuses ou non. En particulier, les PCR temps-réel permettent d'obtenir un résultat d'identification en 2h après inactivation de l'isolat clinique. Plusieurs systèmes ont été proposés pour le diagnostic des infections les plus fréquentes, c'est à dire les mycobactéries du complexe tuberculeux (MTC), du complexe *Mycobacterium avium* (MAC) et celles du complexe *M. abscessus* [41,42].

Le séquençage partiel du gène *rpoB* (région hypervariable V) [43] apparaît comme étant à l'heure actuelle la technique de PCR-séquençage la plus rentable en précision diagnostique pour l'identification en routine au niveau de l'espèce des isolats de mycobactéries [44]. En effet, l'amplicon séquencé par cette technique [43] est d'environ 720 pb et permet d'obtenir, par comparaison aux séquences déposées dans la base de données génotypique GenBank, l'identification précise de l'isolat clinique en moins de 2 jours. Cette méthode s'avère d'une précision supérieure au séquençage du gène 16S ou d'autres régions de ce gène *rpoB* moins hypervariables [45] du fait d'un polymorphisme plus important de cette région hypervariable V du gène *rpoB* [43].

D – Les critères diagnostiques d'une infection à mycobactéries chez le patient atteint de mucoviscidose

Comme pour les autres patients, la présence d'une mycobactérie du complexe tuberculeux isolée à partir d'un prélèvement respiratoire (y compris les selles) doit faire évoquer une tuberculose-maladie et faire pratiquer d'autres prélèvements à la recherche de

mycobactéries tuberculeuses, faire l'objet d'une déclaration à l'ARS du département, faire isoler le patient dans une chambre hospitalière de niveau P3 si possible et faire réaliser un antibiogramme de l'isolat [46]. La décision d'initier une thérapie antituberculeuse avant l'obtention de l'antibiogramme dépend de l'état clinique du patient, *a fortiori* de sa fonction respiratoire, de son histoire clinique et thérapeutique à savoir s'il a été en contact avec un sujet tuberculeux, et qu'elle était l'origine géographique de ce sujet contact potentiel qui peut déterminer une probabilité de résistance intrinsèque de la souche transmise [47].

La présence de MNT chez le patient atteint de mucoviscidose doit être confirmée sur plusieurs prélèvements respiratoires successifs [33] en dehors d'un prélèvement endoscopique (LBA) ou biopsique de tissu supposé stérile (parenchyme, adénopathie,...) pour lesquels un seul prélèvement suffit pour atteindre le critère « microbiologique » établi par l'American Thoracic Society (ATS) en 2007 [33]. L'association de critères cliniques comme la symptomatologie respiratoire nouvelle, l'apparition de lésions scannographiques évocatrices (bronchiolite, micronodules disséminés,...) à ce critère microbiologique, ajouté à l'élimination d'une autre étiologie possible (infectieuse ou non) aux anomalies radio-cliniques rencontrées, peut faire porter le diagnostic d'infection à mycobactérie [33]. Il n'y a en effet pas d'atteinte radiographique pathognomonique ou typique d'une atteinte pulmonaire à MNT, *a fortiori* dans le cas de la mucoviscidose, ni corrélation des patterns scannographiques avec telle ou telle espèce. Les lésions observées sur le plan iconographique peuvent être micronodulaires segmentaires, lobaires ou diffuses, caverneuses ou de type alvéolaire mais encore fibro-interstitielles non spécifiques [33].

Depuis les recommandations internationales de 2007, il n'existe pas d'étude de corrélation microbio-clinique ayant pu déterminer les critères d'infection respiratoire spécifiquement chez les patients atteints de mucoviscidose. Il était toutefois proposé en 2004 sur la base d'une étude prospective contrôlée de ne pas tenir compte du critère de modification des atteintes radiographiques pour poser le diagnostic d'infection respiratoire à mycobactérie chez les patients atteints de mucoviscidose en présence des critères microbiologiques et d'une altération des paramètres cliniques, respiratoires en particulier [48].

Epidémiologie des infections à mycobactéries en France chez les patients atteints de mucoviscidose et l'exemple d'une grande ville française.

A - MATERIELS ET METHODES

1 – Ethique

En accord avec la Loi n° 2004-800 relative à la bioéthique publiée dans le *Journal Officiel de la République Française* le 6 Aout 2004, le consentement des patients n'a pas été recueilli pour cette étude car aucun autre prélèvement n'était nécessaire que celui déjà prescrit par le médecin responsable, c'est à dire la recherche de mycobactéries dans les prélèvements respiratoires.

2 – Patients

Les patients étudiés étaient hospitalisés ou avaient consulté à l'Assistance Publique des Hôpitaux de Marseille (AP-HM) dont certains étaient suivis dans les cohortes des Centres Pédiatriques et Adultes de Ressources et de Compétence pour la Mucoviscidose (CRCM) de l'AP-HM, services des Prs Jean-Christophe Dubus et Martine Reynaud-Gaubert.

3 – Méthodes d'isolement

Entre 2010 et 2014, les prélèvements respiratoires (expectorations, aspirations bronchiques, LBA et tubages gastriques) issus de ces patients ont été analysés au Laboratoire de Référence des Mycobactéries de l'AP-HM. La méthode d'isolement utilisée tout au long de l'étude était invariablement l'inoculation des prélèvements décontaminés à la soude dans un milieu de culture liquide Middlebrook 7H9 (tube MGIT, Becton Dickinson, Le Pont-de-Claix, France) incubés dans un automate BACTEC 960. Après une confirmation par une coloration de Ziehl de la pureté d'une culture positive après incubation à 37°C en atmosphère microaérophile (5% de CO₂), chaque isolat était inactivé par la chaleur (95°C, une heure) puis

identifié par séquençage partiel du gène *rpoB* (43) en cas de négativité soit d'une PCR temps-réel pour *M. tuberculosis*, soit d'un test de diagnostic rapide commercial (Xpert TB Rif). Pour chaque couple patient/isolat, les résultats des données cliniques et para-cliniques étaient consignés dans un fichier Excel® sur serveur AP-HM sécurisé.

4 – PCR temps-réel *M. lentiflavum*

a-Design et PCR

Dans le but d'identifier *M. lentiflavum* par PCR temps-réel, deux amorces et une sonde couplée à un fluorochrome ont été désignées et leur sensibilité/spécificité ont été testées *in silico* à partir des séquences disponibles dans la base de donnée GenBank (Annexe 1). Les suspensions de mycobactéries étaient inactivées à 95°C pendant 30min puis après 10min de refroidissement, étaient centrifugées à 10 000g pendant 5 min. Une fois le surnageant retiré, 20 µL de protéinase K et 180 µL de tampon G2 (Qiagen, Courtaboeuf, France) étaient ajoutés puis le tube était vortexé. Le tube était positionné dans un bain sec à 60°C pendant 1 h. L'ADN était ensuite extrait à l'aide de l'automate EZ1 Advanced XL (Qiagen) et 5 µL d'ADN étaient ajoutés à 15 µL de mix de PCR temps-réel qui comprenaient 10 µL de MasterMix (Eurogentec, Angers, France), 3,5 µL d'eau distillée stérile, 0,5 µL de sonde à 2,5 µM et 0,5 µL de chaque amorce à 20 µM (Annexe 1). La réaction de polymérisation était réalisée à l'aide d'un thermocycleur CFX (Bio-Rad, Marnes-la-Coquette, France) et les paramètres des cycles étaient les suivants : 50°C pendant 2 min suivi de 40 cycles de 5 min à 95°C, 35s à 60°C et 30s à 45°C.

b-Validation in vitro

La sensibilité/spécificité de cette PCR temps-réel a été déterminée à partir de 30 isolats cliniques (Annexe 2) de MNT identifiées préalablement par séquençage partiel du gène *rpoB* [43] (dont six souches de *M. lentiflavum*). Les mêmes paramètres de culture, d'extraction ADN et PCR ont été appliqués en présence d'un témoin négatif et positif de PCR.

c-Validation sur expectorations inoculées

La technique de PCR temps-réel *M. lentiflavum* été testée à partir de trois expectorations issues de trois patients différents (dont 2 présentant une mucoviscidose à phénotype sévère), artificiellement inoculées par 6 souches de *M. lentiflavum* et 8 autres souches sous-cultivées d'isolats respiratoires de mycobactéries (*Mycobacterium simiae*, *M. avium* subsp. *avium*, *M. abscessus* subsp. *abscessus*, *M. abscessus* subsp. *bolletii*, *M. chelonae*, *Mycobacterium intracellulare*, *Mycobacterium chimaera*, *Mycobacterium kansasii*, et *M. bovis* BCG souche Tokyo préalablement identifiées par séquençage du *rpoB* [43]), soient 42 expectorations inoculées, en présence de deux témoins négatifs et d'un témoin positif de PCR. L'examen direct des expectorations avant inoculation était négatif et la culture de celles-ci est restée négative sur milieu liquide MGIT (Becton Dickinson) après 4 semaines d'incubation en milieu microaérophile, 5% de CO₂. L'inoculation des expectorations a été réalisée à partir de sous-cultures en milieu liquide MGIT calibrée initialement à 0,5 McFarland, en ajoutant 20µL de solution de culture à 0,5 McFarland diluée 500 fois dans 180µL d'expectoration en vue d'obtenir un examen direct de l'expectoration inoculée révélant la présence de mycobactéries à la coloration de Ziehl-Neelsen à une concentration de 1/champ. Les expectorations inoculées ont été inactivées et l'ADN a été extrait comme décrit ci-dessus (A-4-a).

5 – Revue de la littérature

Les bases de données MEDLINE, Scopus, ISI Web Of Knowledge, ont été utilisées pour effectuer la recherche bibliographique de ce travail. Les mots clés « cystic fibrosis », « mycobacteria », « *Mycobacterium lentiflavum* » et « tuberculosis » ont permis de sélectionner les articles d'intérêts scientifiques.

6 – Analyses statistiques

Les analyses statistiques ont été réalisées à l'aide du logiciel EpiInfo v3.5.4. La significativité statistique était acceptée pour $p < 0,05$ pour l'ensemble des tests réalisés.

B – RESULTATS

1 – Revue de la littérature des infections à mycobactéries chez les patients atteints de mucoviscidose en France

a-Les infections tuberculeuses

En France, seuls deux cas de tuberculose sont rapportés dans la littérature [46,49] depuis la fin des années 90. Il en est de même dans la littérature internationale, les cas de tuberculose sont sporadiques dans les pays du Nord [50-55] mais surviennent plus fréquemment dans les pays où l'incidence de la tuberculose dépasse 50cas/100 000 habitants [56,57] et semblent cependant subir un biais de publication. Par rapport à une incidence globale moyenne en France depuis la fin des années 90 à 7-9 cas/100 000 habitants, (dans le sous-groupe des personnes nées en France métropolitaine, l'incidence est <3/100 000 habitants) [58], la survenue de tuberculose chez les patients atteints de mucoviscidose semble donc être un évènement plutôt rare.

b-Les infections à MNT

Les données de la littérature récente des quinze dernières années suggèrent en France la prédominance des espèces du complexe *M. abscessus* sur les espèces du complexe *M. avium* [8]. Il a également été montré que les mycobactéries du complexe *M. avium* infectaient des patients plus âgés que ceux présentant une infection respiratoire aux espèces du complexe *M. abscessus* [6,7]. Les espèces isolées appartenant à ce dernier complexe sont *M. abscessus* subsp. *abscessus*, *M. abscessus* subsp. *bolletii* et *M. abscessus* subsp. *massiliense*. Ces derniers pathogènes étaient isolés chez des patients d'âges différents et présentaient une sensibilité aux macrolides dans 100% des cas en ce qui concernait *M. abscessus* subsp. *massiliense* [9]. Il apparaît donc crucial de pouvoir distinguer ces sous-espèces au moment du diagnostic.

Il ne semblait pas y avoir de modification d'incidence des infections à mycobactéries chez les patients suivis en France par l'administration d'azithromycine au long cours [59]. A partir d'une étude rétrospective, Coolen *et al* décrivait la possibilité d'une diminution

d'incidence de ces infections chez les patients atteints de mucoviscidose, traités par ce macrolide au long cours [60].

2 – L'exemple de la cohorte marseillaise de patients atteints de mucoviscidose.

La cohorte marseillaise de patients atteints de mucoviscidose (cohorte CF) étudiée de 2010 à 2014 inclus (5ans) était composée de 235 (66,4%) patients adultes et 119 (43,6%) pédiatriques. L'âge moyen de ces deux populations adultes et pédiatriques était respectivement de 32 +/- 7,8 et 9,3 +/- 6,1 ans. Le sex-ratio F/M dans ces deux populations adultes et pédiatriques était respectivement 137/98 (58,3%) et 62/57 (52%). Dans la cohorte adulte étaient suivis des patients présentant une mucoviscidose de phénotype moins sévère.

a-La tuberculose dans la cohorte marseillaise

Dans notre cohorte CF, une seule jeune femme atteinte de mucoviscidose typique homozygote deltaF508 de 14 ans a présenté en 2011 un seul isolat clinique de *M. tuberculosis* et a été traitée efficacement par un traitement standard de 6mois (2RHZE + 4RH) au vu de la sensibilité de cet isolat aux antituberculeux de première ligne.

Les données du laboratoire des mycobactéries concernant les patients ayant présenté un isolat clinique de *M. tuberculosis* complex étaient complètement disponibles et analysées pour la période 2011-2013.

Une différence significative entre le nombre de patients atteints de mucoviscidose présentant un isolat respiratoire de mycobactérie tuberculeuse (n=1 ; 4,5%) et le nombre de patients présentant une tuberculose sans mucoviscidose associée (n=105 ; 69,5%), $p < 0,0001$ était observée (Figure 1). L'âge des patients atteints de mucoviscidose (21,5 +/- 14,3 ans) était inférieur à celui des autres patients (49,3 +/- 19,7 ans), $p < 0,0001$, ANOVA. L'association entre mucoviscidose et tuberculose étaient également significative de façon indépendante en analyse multivariée (régression logistique, $p = 0,0001$) au même titre que le fait d'être né hors de France métropolitaine ($p = 0,0003$) et l'âge ($p = 0,0005$) étaient des facteurs indépendants associés au risque de développer une tuberculose (Tableau 1).

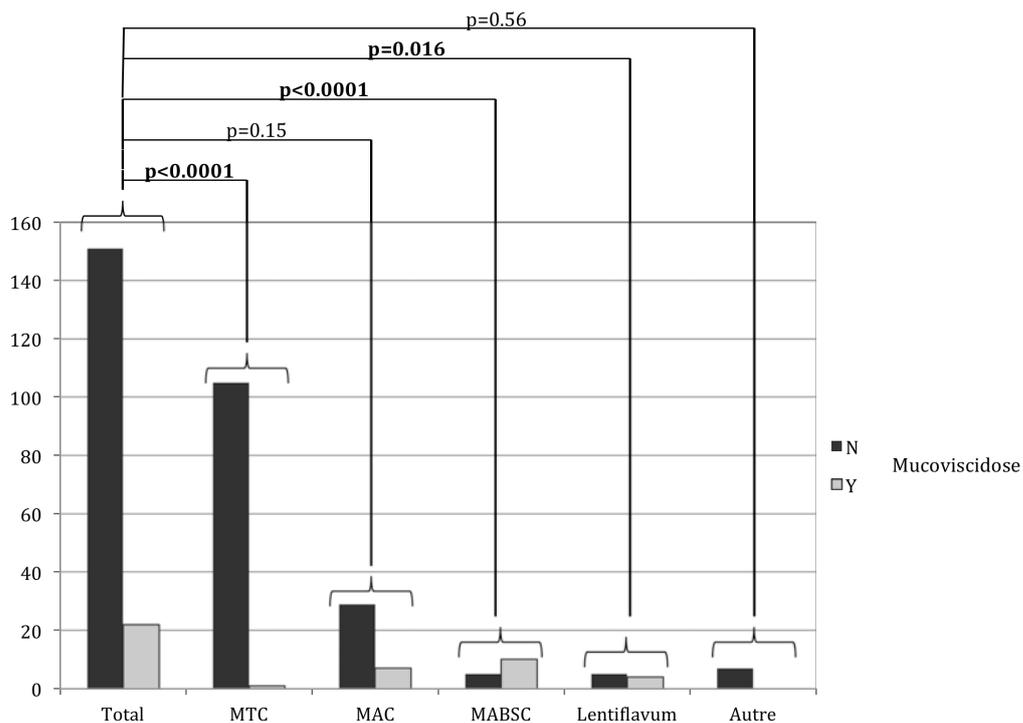


Figure 1 : Ensemble des patients (n=173) présentant au moins une culture de mycobactérie issue des prélèvements respiratoires, répartis et comparés par complexe de mycobactérie isolé, atteints ou non de mucoviscidose, 2011-2013.

Facteur associé	Odds Ratio	Intervalle de confiance à 95%	p
AGE	<u>0,9608</u>	<u>0,9394-0,9827</u>	<u>0,0005</u>
CF (Y/N)	<u>0,0101</u>	<u>0,0011-0,0957</u>	<u>0,0001</u>
SEXE (M/F)	1,8341	0,8228-4,0883	0,1380
Nés en France (Y/N)	<u>0,2128</u>	<u>0,0919-0,4925</u>	<u>0,0003</u>

Tableau 1 : Analyse multivariée par régression logistique des facteurs associés ou non à la survenue d'une tuberculose à partir de 173 patients ayants présenté au moins un isolat clinique de mycobactérie respiratoire, 2011-2013.

b-Les infections à MNT dans la cohorte et l'émergence de *M. lentiflavum*

Sur les 354 patients de la cohorte CF étudiée de 2010 à 2014, 25 patients (12 enfants et 13 adultes) ont présenté au moins un isolat clinique respiratoire de mycobactérie non tuberculeuse. Le répertoire des espèces identifiées est présenté dans la figure 2. Douze patients (48%) présentaient au moins une fois *M. abscessus*, huit (32%) présentaient *M. avium* et six (24%) présentaient *M. lentiflavum* (Figure 2) ; un patient ayant présenté à la fois *M. avium* et *M. lentiflavum* successivement pendant la période d'étude.

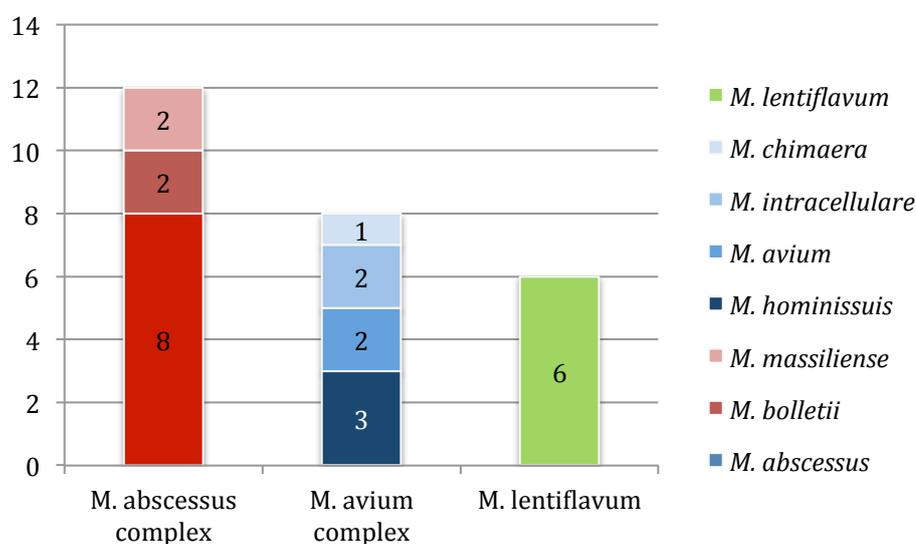


Figure 2 : Ensemble des patients (n=25) atteints de mucoviscidose ayant présenté au moins un isolat clinique de mycobactérie non-tuberculeuse, répartis par complexe d'espèce, 2010-2014.

Le nombre d'isolat moyen par individu ne différait statistiquement pas selon les espèces isolées, 2 +/- 1,3 isolats de *M. lentiflavum*, 7,6 +/- 10,5 pour *M. avium* et 5,6 +/- 5,9 isolats pour *M. abscessus* ; p=0,19 (test de Mann-Whitney). Le taux d'isolement (nombre de positif / nombre total de prélèvements collectés pendant la période d'étude) ne variait pas non plus significativement : 8,2% +/- 6,2% pour *M. lentiflavum*, 25,7% +/- 16,3% pour *M. avium* et 26,1% +/- 31% pour *M. abscessus*, p=0,10 (test de Mann-Whitney).

Les douze isolats de *M. lentiflavum* présentaient une similarité dans la séquence partielle du gène *rpoB* de 99,6% +/- 0,003% par rapport à la souche de référence *M. lentiflavum* CIP 105465^T (numéro d'accès GenBank EU109300).

De façon surprenante, *M. lentiflavum* n'a été isolé que chez des patients CF de sexe masculin (sex ratio F/M=0/6). Cette répartition était statistiquement différente de la répartition du sex-ratio de la cohorte CF (199/155 ; 56,2%), $p=0,02$ (test exact de Fisher), de la répartition du sex-ratio des patients présentant un isolat clinique de MNT autre que *M. lentiflavum* (11/9 ; 55%), $p=0,02$ et était également différente du sex-ratio des patients ayant cultivé *M. abscessus* (6/6 ; 50%), $p=0,054$ et ayant cultivé *M. avium* (5/3 ; 63%) $p=0,03$ (Figure 3).

Le nombre d'isolat par individu (F=5,5 +/- 5,4 ; M=5,3 +/- 8,3) et le taux d'isolement (F=23,8 +/- 18,8% ; M=20,2 +/- 26,6%) ne variait pas en fonction du sexe, $p=0,95$ et $p=0,75$ respectivement (test T de Student).

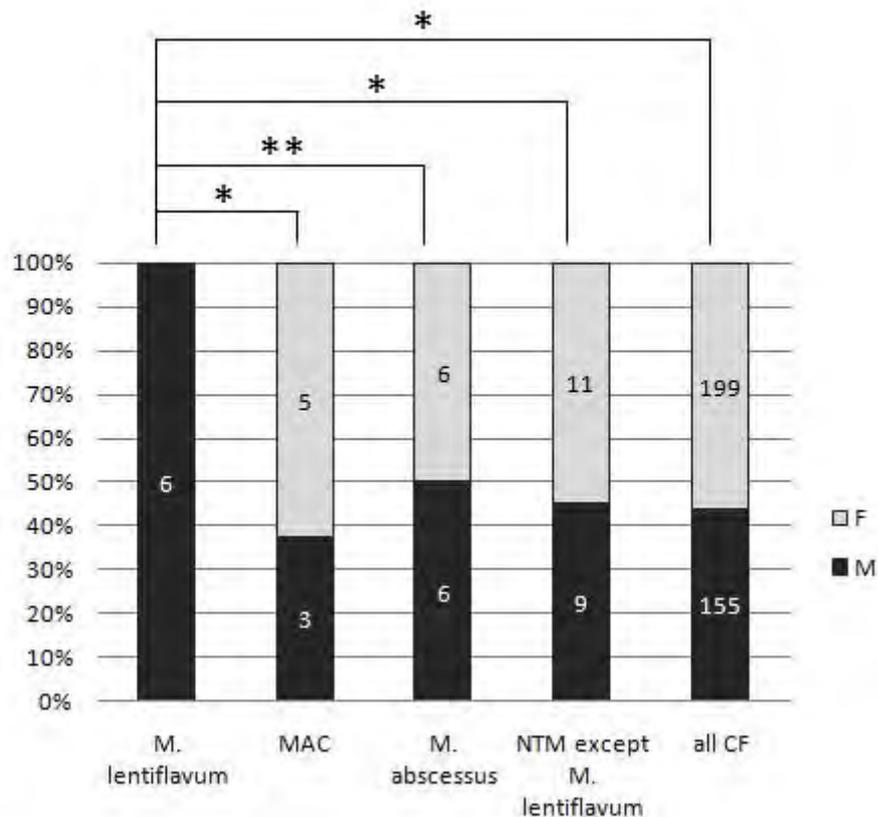


Figure 3 : Répartition selon le sexe dans les groupes de patients de la cohorte CF (n=354), chez ceux ayant cultivés au moins un isolat respiratoire de mycobactérie non-tuberculeuse excepté *M. lentiflavum* (n=20), puis ceux ayant cultivé une espèce du complexe *M. abscessus* (n=12), *M. avium* (n=8) et *M. lentiflavum* (n=6). * $p<0,05$; ** $p=0,053$.

L'âge moyen des patients ayant cultivé une mycobactérie du groupe *M. avium* (26,5 +/- 19,9 ans), du groupe *M. abscessus* (19,2 +/- 10,9 ans) et *M. lentiflavum* (22,2 +/- 11,4 ans) ne différait pas significativement entre eux ni de celui de la cohorte CF (20,6 +/- 11,6 ans) (Figure 4).

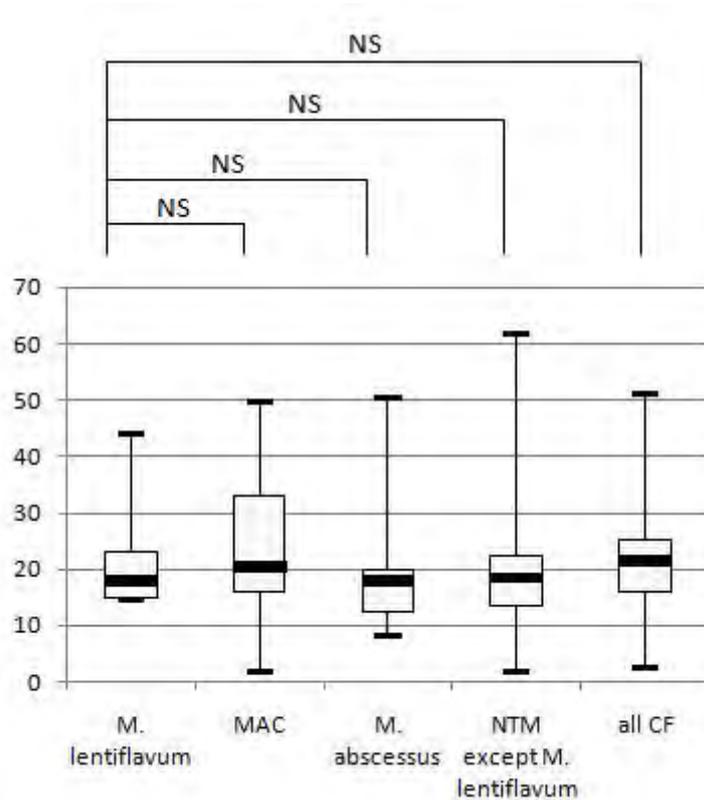


Figure 4 : Répartition selon l'âge dans les groupes de patients de la cohorte CF (n=354), chez ceux ayant cultivés au moins un isolat respiratoire de mycobactérie non-tuberculeuse excepté *M. lentiflavum* (n=20), puis ceux ayant cultivé une espèce du complexe *M. abscessus* (n=12), *M. avium* (n=8) et *M. lentiflavum* (n=6). NS=non significatif

Les antibiogrammes réalisés en milieu liquide sur automate BACTEC 960 ont montré qu'aucun isolat de *M. lentiflavum* n'était sensible à la clarithromycine alors que six isolats de *M. avium* et six de *M. abscessus* l'étaient (p=0,13 ; test exact de Fisher). Sept isolats (58%) de *M. abscessus* étaient sensibles à l'amikacine, contre deux (25%) pour *M. avium*. Deux isolats (33%) de *M. lentiflavum*, trois (37%) *M. avium* et quatre (33%) *M. abscessus* étaient sensibles aux rifamycines (rifampicine ou rifabutine). Aucune des souches de *M. lentiflavum*, tous les *M. avium* et deux (33%) *M. abscessus* étaient respectivement sensibles à l'éthambutol.

La significativité clinique des isolats de *M. lentiflavum* était investiguée en reportant précisément les données cliniques (VEMS + IMC) et microbiologiques (identification des pathogènes respiratoires) sur une échelle temporelle. Trois patients présentaient un seul isolat clinique de *M. lentiflavum* pendant la période d'étude et étaient considérés comme « colonisés » au regard des critères de l'ATS et de l'Infectious Diseases Society of America (IDSA) [33]. Les trois autres patients présentaient entre deux et quatre isolats cliniques de *M. lentiflavum* et validaient donc le critère microbiologique [33] pour une « infection respiratoire » éventuelle à *M. lentiflavum*. L'évolution des paramètres cliniques et des isolats microbiologiques chez ces trois patients sont reportés en fonction du temps (Annexes 3-5).

Alors que tous ces patients ayant cultivé *M. lentiflavum* étaient également colonisés et/ou infectés par d'autres pathogènes respiratoires comme *Staphylococcus aureus* ou *Aspergillus* sp., deux patients présentaient un déclin de leur VEMS et l'apparition de nouveaux nodules bronchiolaires sur des coupes scannographiques par rapport à des imageries précédentes et validaient donc ainsi les critères cliniques et microbiologiques de l'ATS/IDSA [33] pour une infection respiratoire à *M. lentiflavum* (Annexes 3 et 4).

Chez un de ces deux patients (Annexe 3), un traitement antibiotique par ethambutol, rifabutine et clarithromycine a permis de négativer les cultures ultérieures de mycobactéries et une augmentation de son VEMS a été observée au cours de ce traitement actif contre *M. lentiflavum*. Ce patient ayant été transplanté bi-pulmonaire en septembre 2014, aucune culture de mycobactérie n'a été observée à l'issue de la culture de quatre lavages broncho-alvéolaires en 4 mois de suivi (Annexe 3).

3 – Mise en place d'une technique de diagnostic rapide par PCR temps-réel ciblant *M. lentiflavum* directement à partir des expectorations.

Devant l'émergence de *M. lentiflavum* dans cette population fragile, il a été décidé de mettre au point une technique de PCR temps-réel afin d'identifier en 1h30 si un isolat clinique de mycobactérie, en particulier issu d'un prélèvement respiratoire de patient CF, appartenait à l'espèce *M. lentiflavum*. La spécificité et sensibilité de la séquence des sondes et amorces a été validée *in silico* à 100% et 100% respectivement de similarité pour la séquence du gène *smpB* de *M. lentiflavum*.

Testée sur une collection de 30 isolats cliniques dont 6 *M. lentiflavum* isolés chez nos patients atteints de mucoviscidose (Annexe 2), cette technique atteignait une sensibilité et spécificité de 100% et 100% respectivement.

Enfin, cette technique de PCR a été testée sur trois expectorations chacune inoculées par six isolats cliniques de *M. lentiflavum* et huit isolats de mycobactéries. Elle a montré une spécificité de 100% et une sensibilité de 83% (Tableau 2) pour un seuil de Ct à 39.

	Expectorations inoculées par <i>M. lentiflavum</i>	Expectorations inoculées par une autre MNT
Test positif (Ct<39)	15	0
Test négatif (Ct>39)	3	24

Tableau 2 : Résultats de la PCR temps-réel *M. lentiflavum* appliquée à 42 expectorations inoculées par *M. lentiflavum* et huit autres espèces de mycobactéries.

C – DISCUSSION

Dans cette étude, nous avons confirmé la présence et l'identification de MNT colonisant et infectant le tractus respiratoire de 7% des patients atteints de mucoviscidose sur une période de 5 ans, avec une prédominance des espèces du complexe *M. abscessus*. Ces données sont comparables aux données de la littérature [61,62], en particulier française issue des autres CRCM [8].

Nous rapportons, en 20 ans, un troisième cas français de tuberculose associée à la mucoviscidose, ce qui contraste donc avec les milliers de cas recensés dans la population de même âge [58] et fait évoquer un facteur protecteur de la mucoviscidose vis-à-vis de la tuberculose. Les caractéristiques des atteintes radiographiques pulmonaires n'étaient pas comparées dans ce travail. Certains auteurs ont depuis les années 80 émis l'hypothèse d'une association négative entre mucoviscidose et tuberculose expliquée par un facteur de sélection des individus porteurs de mutations au niveau du CFTR [63,64]. Les bases physiopathologiques d'une telle hypothèse restent à démontrer.

Les méthodes d'identification utilisées au cours de cette période étaient basées sur la biologie moléculaire avec le séquençage partiel du gène *rpoB* qui reste le marqueur moléculaire le plus sensible en matière de variabilité génétique [43] par rapport aux autres gènes de ménage, ARNr 16S, gènes *hsp65*, *sodA*, *gyrB* et *recA* notamment [44]. Une PCR temps-réel *M. lentiflavum* « sur-mesure », validée sur un panel de 16 espèces de mycobactéries (dont *M. lentiflavum* et *M. simiae*) potentiellement fréquemment identifiées dans les prélèvements respiratoires de patients atteints de mucoviscidose, a confirmé sa faisabilité directement dans les prélèvements respiratoires. Cette méthode de PCR temps-réel requiert donc d'être testée comme outil de screening prospectif à partir de l'ADN directement extrait (après inactivation) des expectorations de patients atteints de mucoviscidose.

De façon surprenante, *M. lentiflavum* était dans notre cohorte de 354 patients la troisième espèce de mycobactérie identifiée dans les prélèvements respiratoires de six patients (1,7%) ce qui correspond à la plus importante cohorte mondiale. Par rapport aux autres cohortes, y compris françaises [8] qui ont rapporté de façon plus anecdotique la présence de *M. lentiflavum* dans les prélèvements respiratoires, l'hypothèse la plus probable est qu'il s'agisse d'une émergence épidémique.

M. lentiflavum a de plus été identifié comme pouvant être continuellement présent dans les circuits d'eau [65] et il est en effet probable que cette mycobactérie soit, à l'instar des espèces amoébo-résistantes des complexes *M. avium* et *M. tuberculosis* [66], véhiculée par les amibes libres de l'eau, déjà identifiées dans les circuits d'eau municipaux ou hospitaliers [67]. Bryant *et al* a montré au Royaume-Uni, la détection de transmission croisée intra-hospitalière et étudié l'ensemble du patrimoine génétique des souches de *M. abscessus* subsp. *massiliense* par séquençage complet du génome pour argumenter cette hypothèse [68]. Dans le but de distinguer l'émergence de transmission croisée et d'acquisition externe d'origine environnementale, d'autres auteurs ont utilisé le génotypage des espèces isolées [69,70].

Il est également possible que *M. lentiflavum* soit sous-diagnostiqué en raison d'un délai moyen de trois semaines nécessaire à la pousse en milieu conventionnel liquide de cette bactérie fastidieuse. De plus, de la proximité de son patrimoine génétique avec d'autres MNT comme *M. simiae* [71] et de la faible fiabilité des tests commerciaux utilisant des bandelettes réactives type CM/AS [72] pour l'identification de cette espèce résulte une possible erreur d'identification de *M. lentiflavum* dans les cultures positives de mycobactéries non-tuberculeuses. L'absence de génome publié à ce jour de *M. lentiflavum* est également un frein à l'étude de cette espèce.

Une équipe turque rapportait neuf isolats cliniques cultivés à partir d'un seul patient de sexe masculin [57]. Cette étude vient par ailleurs conforter notre hypothèse que *M. lentiflavum* est un microorganisme émergent chez les patients, en particulier de sexe masculin, atteints de mucoviscidose et peut jouer chez eux un rôle pathogène qui reste à éclaircir.

En effet, alors que cette bactérie a longtemps été considérée comme un germe environnemental non pathogène ou agent d'adénite non grave de l'enfant [73], plusieurs cas d'infections disséminées ont été rapportés [74,75] dont un cas récent d'hémophagocytose lympho-histiocytaire qui a conduit au décès d'un patient greffé cardiaque en quelques jours alors que *M. lentiflavum* était identifié en culture issu de tous les prélèvements biopsiques *ante* et *post-mortem* effectués [76]. La gravité de cette atteinte dans un contexte de greffe d'organe solide et la possibilité d'une diffusion sur un mode épidémique font proposer la surveillance particulièrement attentive de *M. lentiflavum* chez les patients atteints de mucoviscidose greffés ou en attente d'une greffe pulmonaire.

La réalisation d'un screening systématique par PCR temps-réel des prélèvements respiratoires de patients atteints de mucoviscidose en attente de greffe ou déjà greffés est dans ce cas une technique peu invasive et fiable pour réaliser cette surveillance. Cette proposition

requiert une validation en pratique clinique sur une plus large série prospective de patients et de prélèvements.

Le traitement des infections à *M. lentiflavum* n'est pas clairement codifié par les recommandations internationales [33], probablement du fait de la difficulté de standardiser les méthodes d'antibiogramme et de la rareté de l'isolement de cette bactérie en situation pathogène pour l'homme. Il semble que *M. lentiflavum* soit sensible aux antibiotiques actifs contre les espèces du complexe *M. simiae* à savoir les rifamycines, l'ethambutol et la clarithromycine [77,78] avec le fait pour cette dernière molécule, que l'utilisation de l'azithromycine en prophylaxie des infections à *Pseudomonas* chez les patients atteints de mucoviscidose rende incertaine l'efficacité des macrolides en général. Les tests antibiotiques ne sont pas standardisés et il n'existe à ce jour aucune étude de corrélation microbio-clinique pour déterminer un consensus thérapeutique des infections à *M. lentiflavum*.

CONCLUSION

Les infections à mycobactéries représentent un réel challenge pour le pneumologue et le microbiologiste clinique qui prennent en charge les patients atteints de mucoviscidose. L'épidémiologie de ces infections évolue dans le temps, la zone géographique étudiée et bien sûr avec les méthodes diagnostiques utilisées pour les isoler des prélèvements respiratoires de ces patients.

Les méthodes modernes d'identification des laboratoires de microbiologie requièrent des outils moléculaires coûteux mais précis pour le diagnostic exact au niveau de l'espèce, méthodes récemment challengées par le développement de l'identification des isolats par la spectrométrie de masse MALDI-TOF. Cette précision diagnostique a montré son importance en pratique clinique, particulièrement pour déterminer la possibilité d'un traitement par macrolides dans les infections à mycobactéries du complexe *M. abscessus*.

Le problème principal reste en effet la prise en charge thérapeutique de ces malades infectés par les mycobactéries car les schémas thérapeutiques proposés comprennent le plus souvent des antimicrobiens particulièrement toxiques et prescrits pour une durée importante.

L'exemple de l'émergence épidémique de *M. lentiflavum* dans notre cohorte de patients atteints de mucoviscidose soulève au moins deux problématiques : quel est le niveau de transmissions croisées de ces pathogènes environnementaux au sein de nos institutions hospitalières et comment les détecter ; et quelle est la signification clinique de cette bactérie opportuniste dans les infections respiratoires chez les patients atteints de mucoviscidose, notamment les greffés. La première question pourra probablement être résolue par l'intermédiaire de techniques moléculaires complexes que sont le génotypage voire le séquençage du génome complet de tous les isolats cliniques et environnementaux de *M. lentiflavum*. La détection rapide de cette espèce chez les patients atteints de mucoviscidose, préalable nécessaire aux techniques de séquençage, pourra être réalisée par l'intermédiaire de la PCR temps-réel que nous proposons à l'issue de ce travail de recherche, et pourra permettre de mieux appréhender la signification clinique de l'isolement de cette bactérie opportuniste.

Vu permis d'imprimer
Le Doyen de la Faculté
De Médecine Rangueil

E. SERRANO

Vu le Président de Thèse
le 10/03/15
A. DIDIER
Professeur ALAIN DIDIER
CHIEF DE SERVICE
RPPS Toulouse
24
Pôle des Maladies Respiratoires
CHU Toulouse - Hôpital Larrey
24, chemin de Pouvourville
TSA 30030 - 31059 Toulouse cedex 9

BIBLIOGRAPHIE

1. Hubert D, Dussert D. Mucovscidose de l'adulte. In : Traité de Pneumologie, 2ème édition par Aubier M, Crestani B, Fournier M, Mal H. Paris : Médecine-Sciences. Flammarion, 2009.- p738-749.
2. Boyle MP, De Boeck K. A new era in the treatment of cystic fibrosis: correction of the underlying CFTR defect. *Lancet Respir Med.* 2013 Apr;1(2):158-63. Review. Erratum in: *Lancet Respir Med.* 2013 Apr;1(2):101.
3. Bar-On O, Mussaffi H, Mei-Zahav M, *et al.* Increasing nontuberculous mycobacteria infection in cystic fibrosis. *J Cyst Fibros.* 2015 Jan;14(1):53-62.
4. Prevots DR, Adjemian J, Fernandez AG, *et al.* Environmental risks for nontuberculous mycobacteria. Individual exposures and climatic factors in the cystic fibrosis population. *Ann Am Thorac Soc.* 2014 Sep;11(7):1032-8.
5. Binder AM, Adjemian J, Olivier KN, *et al.* Epidemiology of nontuberculous mycobacterial infections and associated chronic macrolide use among persons with cystic fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med.* 2013 Oct 1;188(7):807-12.
6. Catherinot E, Roux AL, Vibet MA, *et al* ; OMA group. Mycobacterium avium and Mycobacterium abscessus complex target distinct cystic fibrosis patient subpopulations. *J Cyst Fibros.* 2013 Jan;12(1):74-80.
7. Pierre-Audigier C, Ferroni A, Sermet-Gaudelus I, *et al.* Age-related prevalence and distribution of nontuberculous mycobacterial species among patients with cystic fibrosis. *J Clin Microbiol.* 2005 Jul;43(7):3467-70.
8. Roux AL, Catherinot E, Ripoll F, *et al.* Multicenter study of prevalence of nontuberculous mycobacteria in patients with cystic fibrosis in france. *J Clin Microbiol.* 2009 Dec;47(12):4124-8.
9. Roux AL, Catherinot E, Soismier N, *et al* ; OMA group. Comparing Mycobacterium massiliense and Mycobacterium abscessus lung infections in cystic fibrosis patients. *J Cyst Fibros.* 2015 Jan;14(1):63-9.
10. <http://www.catalogueoflife.org/>, Mars 2015.
11. Cambau E, Drancourt M. Steps towards the discovery of Mycobacterium tuberculosis by Robert Koch, 1882. *Clin Microbiol Infect.* 2014 Mar;20(3):196-201.

12. Parsons SD, Drewe JA, Gey van Pittius NC, *et al.* Novel cause of tuberculosis in meerkats, South Africa. *Emerg Infect Dis.* 2013 Dec;19(12):2004-7.
13. Doig KD, Holt KE, Fyfe JA, *et al.* On the origin of *Mycobacterium ulcerans*, the causative agent of Buruli ulcer. *BMC Genomics.* 2012 Jun 19;13:258.
14. Chu H, Zhao L, Xiao H, *et al.* Prevalence of nontuberculous mycobacteria in patients with bronchiectasis: a meta-analysis. *Arch Med Sci.* 2014 Aug 29;10(4):661-8. Review.
15. Murray PR, Krogstad DJ. Preliminary identification of mycobacteria isolated from clinical specimens. *J Clin Microbiol.* 1981 Mar;13(3):468-71.
16. Ohashi DK, Wade TJ, Mandle RJ. Characterization of ten species of mycobacteria by reaction-gas-liquid chromatography. *J Clin Microbiol.* 1977 Nov;6(5):469-73.
17. Planting NS, Visser GL, Nicol MP, *et al.* Safety and efficacy of induced sputum in young children hospitalised with suspected pulmonary tuberculosis. *Int J Tuberc Lung Dis.* 2014 Jan;18(1):8-12.
18. Bonnave PE, Raoult D, Drancourt M. Gastric aspiration is not necessary for the diagnosis of pulmonary tuberculosis. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2013 Apr;32(4):569-71.
19. Nicol MP, Spiers K, Workman L, *et al.* Xpert MTB/RIF testing of stool samples for the diagnosis of pulmonary tuberculosis in children. *Clin Infect Dis.* 2013 Aug;57(3):e18-21. Erratum in: *Clin Infect Dis.* 2014 Jul 1;59(1):145.
20. Navani N, Molyneaux PL, Breen RA, *et al.* Utility of endobronchial ultrasound-guided transbronchial needle aspiration in patients with tuberculous intrathoracic lymphadenopathy: a multicentre study. *Thorax.* 2011 Oct;66(10):889-93.
21. http://www.who.int/tb/laboratory/policy_sputum_smearpositive_tb_case/en/; Mars 2015.
22. Koch R. Die Aetiologie der Tuberculose: Nach einem in der physiologischen Gesellschaft zu Berlin am 24. März cr. gehaltenen Vortrage. *Berliner Klinische Wochenschrift.* 1882 Apr;15.
23. Ghodbane R, Raoult D, Drancourt M. Dramatic reduction of culture time of *Mycobacterium tuberculosis*. *Sci Rep.* 2014 Feb 28;4:4236. doi: 10.1038/srep04236.
24. Lagier JC, Edouard S, Pagnier I, *et al.* Current and past strategies for bacterial culture in clinical microbiology. *Clin Microbiol Rev.* 2015 Jan;28(1):208-36.

25. Khatri B, Fielder M, Jones G, *et al.* High throughput phenotypic analysis of *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium bovis* strains' metabolism using biolog phenotype microarrays. *PLoS One*. 2013;8(1):e52673.
26. Butler WR, Jost KC Jr, Kilburn JO. Identification of mycobacteria by high-performance liquid chromatography. *J Clin Microbiol*. 1991 Nov;29(11):2468-72.
27. Pignone M, Greth KM, Cooper J, *et al.* Identification of mycobacteria by matrix-assisted laser desorption ionization-time-of-flight mass spectrometry. *J Clin Microbiol*. 2006 Jun;44(6):1963-70.
28. Fournier PE, Drancourt M, Colson P, *et al.* Modern clinical microbiology: new challenges and solutions. *Nat Rev Microbiol*. 2013 Aug;11(8):574-85. Review.
29. Lotz A, Ferroni A, Beretti JL, *et al.* Rapid identification of mycobacterial whole cells in solid and liquid culture media by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *J Clin Microbiol*. 2010 Dec;48(12):4481-6.
30. El Khéchine A, Couderc C, Flaudrops C, *et al.* Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry identification of mycobacteria in routine clinical practice. *PLoS One*. 2011;6(9):e24720.
31. Mather CA, Rivera SF, Butler-Wu SM. *J Clin Microbiol*. Comparison of the Bruker Biotyper and Vitek MS matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry systems for identification of mycobacteria using simplified protein extraction protocols. 2014 Jan;52(1):130-8
32. http://www.who.int/tb/features_archive/xdr_mdr_policy_guidance/en/, Mars 2015.
33. Griffith DE, Aksamit T, Brown-Elliott BA, *et al.*; ATS Mycobacterial Diseases Subcommittee; American Thoracic Society; Infectious Disease Society of America. An official ATS/IDSA statement: diagnosis, treatment, and prevention of nontuberculous mycobacterial diseases. *Am J Respir Crit Care Med*. 2007 Feb 15;175(4):367-416. Review.
34. Brown-Elliott BA, Nash KA, Wallace RJ Jr. Antimicrobial susceptibility testing, drug resistance mechanisms, and therapy of infections with nontuberculous mycobacteria.
35. Gross WM, Wayne LG. Nucleic acid homology in the genus *Mycobacterium*. *J Bacteriol*. 1970 Nov;104(2):630-4.
36. Cox RA, Katoch VM. Evidence for genetic divergence in ribosomal RNA genes in mycobacteria. *FEBS Lett*. 1986 Jan 20;195(1-2):194-8.

37. Böddinghaus B, Rogall T, Flohr T, *et al.* Detection and identification of mycobacteria by amplification of rRNA. *J Clin Microbiol.* 1990 Aug;28(8):1751-9.
38. Adékambi T, Reynaud-Gaubert M, Greub G, *et al.* Amoebal coculture of "Mycobacterium massiliense" sp. nov. from the sputum of a patient with hemoptoic pneumonia. *J Clin Microbiol.* 2004 Dec;42(12):5493-501.
39. Bryant JM, Grogono DM, Greaves D, *et al.* Whole-genome sequencing to identify transmission of Mycobacterium abscessus between patients with cystic fibrosis: a retrospective cohort study. *Lancet.* 2013 May 4;381(9877):1551-60.
40. Mäkinen J, Marjamäki M, Marttila H, *et al.* Evaluation of a novel strip test, GenoType Mycobacterium CM/AS, for species identification of mycobacterial cultures. *Clin Microbiol Infect.* 2006 May;12(5):481-3.
41. Sevilla IA, Molina E, Elguezabal N, *et al.* Detection of Mycobacteria, Mycobacterium avium Subspecies, and Mycobacterium tuberculosis Complex by a Novel Tetraplex Real-Time PCR Assay. *J Clin Microbiol.* 2015 Mar;53(3):930-40.
42. Kim K, Kim BJ, Shim TS, *et al.* Development of peptide nucleic acid multi-probe-real-time PCR method targeting hsp65 gene for identification between Mycobacterium abscessus strains. *J Clin Microbiol.* 2015 Feb 4. [Epub ahead of print]
43. Adékambi T, Colson P, Drancourt M. rpoB-based identification of nonpigmented and late-pigmenting rapidly growing mycobacteria. *J Clin Microbiol.* 2003 Dec;41(12):5699-708.
44. Adékambi T, Drancourt M. Dissection of phylogenetic relationships among 19 rapidly growing Mycobacterium species by 16S rRNA, hsp65, sodA, recA and rpoB gene sequencing. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2004 Nov;54(Pt 6):2095-105.
45. Kim BJ, Lee SH, Lyu MA, *et al.* Identification of mycobacterial species by comparative sequence analysis of the RNA polymerase gene (rpoB). *J Clin Microbiol.* 1999 Jun;37(6):1714-20. *Clin Microbiol Rev.* 2012 Jul;25(3):545-82. Review.
46. Morand PC, Burgel PR, Carlotti A, *et al.* Mediastinal tuberculosis in an adult patient with cystic fibrosis. *J Clin Microbiol.* 2011 Feb;49(2):750-1.
47. Véziris N, Robert J. Résistance aux antituberculeux et impasse thérapeutique. *Med Sci (Paris)* 2010;26:976–980
48. Leitritz L, Griese M, Roggenkamp A, *et al.* Prospective study on nontuberculous mycobacteria in patients with and without cystic fibrosis. *Med Microbiol Immunol.* 2004 Nov;193(4):209-17.

49. Feigelson J, Delaisi B, Pecau Y, *et al.* Pneumopathie tuberculeuse au cours d'une mucoviscidose. *Arch Pediatr.* 1997 Dec;4(12):1209-12.
50. Smith MJ, Efthimiou J, Hodson ME, *et al.* Mycobacterial isolations in young adults with cystic fibrosis. *Thorax.* 1984 May;39(5):369-75.
51. Solano Reina S, González González A, Ancochea Bermúdez J, *et al.* [Association of mucoviscidosis in an adult with pulmonary tuberculosis]. *Rev Clin Esp.* 1988 Oct;183(5):281-2. Spanish.
52. Hjelte L, Petrini B, Källenius G, *et al.* Prospective study of mycobacterial infections in patients with cystic fibrosis. *Thorax.* 1990 May;45(5):397-400.
53. Pedraza Gutiérrez F, San José Alemany C, Cobos Barroso N, *et al.* [Isolation of mycobacteria in patients with cystic fibrosis: a prospective study]. *An Esp Pediatr.* 1996 Aug;45(2):157-60. Spanish.
54. Manika K, Giouleka P, Zarogoulidis K, *et al.* Multidrug-resistant tuberculosis in an adult with cystic fibrosis. *Respiration.* 2013;85(4):350-3.
55. Máiz L, Gómez-Mampaso E, Escobar H. [Pulmonary tuberculosis in a patient with cystic fibrosis]. *Arch Bronconeumol.* 2001 Sep;37(8):361. Spanish.
56. Krut'ko VS, Zakashanskaia RI. [A case of mucoviscidosis associated with pulmonary tuberculosis in an adult]. *Probl Tuberk.* 1986;(3):71-2. Russian.
57. Satana D, Erkose-Genc G, Tamay Z, *et al.* Prevalence and drug resistance of mycobacteria in Turkish cystic fibrosis patients. *Ann Clin Microbiol Antimicrob.* 2014 Aug 13;13:28.
58. <http://www.invs.sante.fr/Dossiers-thematiques/Maladies-infectieuses/Infections-respiratoires/Tuberculose/Donnees-epidemiologiques> ; Mars 2015.
59. Catherinot E, Roux AL, Vibet MA, Bellis G, *et al*; OMA group. Inhaled therapies, azithromycin and Mycobacterium abscessus in cystic fibrosis patients. *Eur Respir J.* 2013 May;41(5):1101-6.
60. Coolen N, Morand P, Martin C, *et al.* Reduced risk of nontuberculous mycobacteria in cystic fibrosis adults receiving long-term azithromycin. *J Cyst Fibros.* 2015 Feb 28.
61. Olivier KN, Weber DJ, Wallace RJ Jr, *et al*; Nontuberculous Mycobacteria in Cystic Fibrosis Study Group. Nontuberculous mycobacteria. I: multicenter prevalence study in cystic fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med.* 2003 Mar 15;167(6):828-34.

62. Qvist T, Gilljam M, Jönsson B *et al*; Scandinavian Cystic Fibrosis Study Consortium (SCFSC). Epidemiology of nontuberculous mycobacteria among patients with cystic fibrosis in Scandinavia. *J Cyst Fibros*. 2015 Jan;14(1):46-52.
63. Meindl RS. Hypothesis: a selective advantage for cystic fibrosis heterozygotes. *Am J Phys Anthropol*. 1987 Sep;74(1):39-45.
64. Lubinsky M. Hypothesis: Cystic fibrosis carrier geography reflects interactions of tuberculosis and hypertension with vitamin D deficiency, altitude and temperature. Vitamin D deficiency effects and CF carrier advantage. *J Cyst Fibros*. 2012 Jan;11(1):68-70.
65. Marshall HM, Carter R, Torbey MJ, *et al*. *Mycobacterium lentiflavum* in drinking water supplies, Australia. *Emerg Infect Dis*. 2011 Mar;17(3):395-402.
66. Drancourt M. Looking in amoebae as a source of mycobacteria. *Microb Pathog*. 2014 Dec;77:119-24.
67. Adékambi T, Ben Salah S, Khelif M, *et al*. Survival of environmental mycobacteria in *Acanthamoeba polyphaga*. *Appl Environ Microbiol*. 2006 Sep;72(9):5974-81.
68. Bryant JM, Grogono DM, Greaves D, *et al*. Whole-genome sequencing to identify transmission of *Mycobacterium abscessus* between patients with cystic fibrosis: a retrospective cohort study. *Lancet*. 2013 May 4;381(9877):1551-60.
69. Jönsson BE, Gilljam M, Lindblad A, *et al*. Molecular epidemiology of *Mycobacterium abscessus*, with focus on cystic fibrosis. *J Clin Microbiol*. 2007 May;45(5):1497-504.
70. Cândido PH, Nunes L de S, Marques EA, *et al*. Multidrug-resistant nontuberculous mycobacteria isolated from cystic fibrosis patients. *J Clin Microbiol*. 2014 Aug;52(8):2990-7.
71. Springer B, Wu WK, Bodmer T, *et al*. Isolation and characterization of a unique group of slowly growing mycobacteria: description of *Mycobacterium lentiflavum* sp. nov. *J Clin Microbiol*. 1996 May;34(5):1100-7.
72. Lee AS, Jelfs P, Sintchenko V, *et al*. Identification of non-tuberculous mycobacteria: utility of the GenoType *Mycobacterium* CM/AS assay compared with HPLC and 16S rRNA gene sequencing. *J Med Microbiol*. 2009
73. Haase G, Kentrup H, Skopnik H, *et al*. *Mycobacterium lentiflavum*: an etiologic agent of cervical lymphadenitis. *Clin Infect Dis*. 1997 Nov;25(5):1245-6.

74. Niobe SN, Bebear CM, Clerc M, *et al.* Disseminated *Mycobacterium lentiflavum* infection in a human immunodeficiency virus-infected patient. *J Clin Microbiol.* 2001 May;39(5):2030-2.
75. Ibáñez R, Serrano-Heranz R, Jiménez-Palop M, *et al.* Disseminated infection caused by slow-growing *Mycobacterium lentiflavum*. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2002 Sep;21(9):691-2.
76. Thomas G, Hraiech S, Dizier S, *et al.* Disseminated *Mycobacterium lentiflavum* responsible for hemophagocytic lymphohistocytosis in a man with a history of heart transplantation. *J Clin Microbiol.* 2014 Aug;52(8):3121-3.
77. Piersimoni C, Goteri G, Nista D, *et al.* *Mycobacterium lentiflavum* as an emerging causative agent of cervical lymphadenitis. *J Clin Microbiol.* 2004 Aug;42(8):3894-7.
78. van Ingen J, Totten SE, Heifets LB, *et al.* 2012. Drug susceptibility testing and pharmacokinetics question current treatment regimens in *Mycobacterium simiae* complex disease. *Int. J. Antimicrob. Agents.* 2011 ;39:173–176.

ANNEXES

Annexe 1 :

Caractéristiques des sonde et amorces de PCR temps-réel ciblant *Mycobacterium lentiflavum*

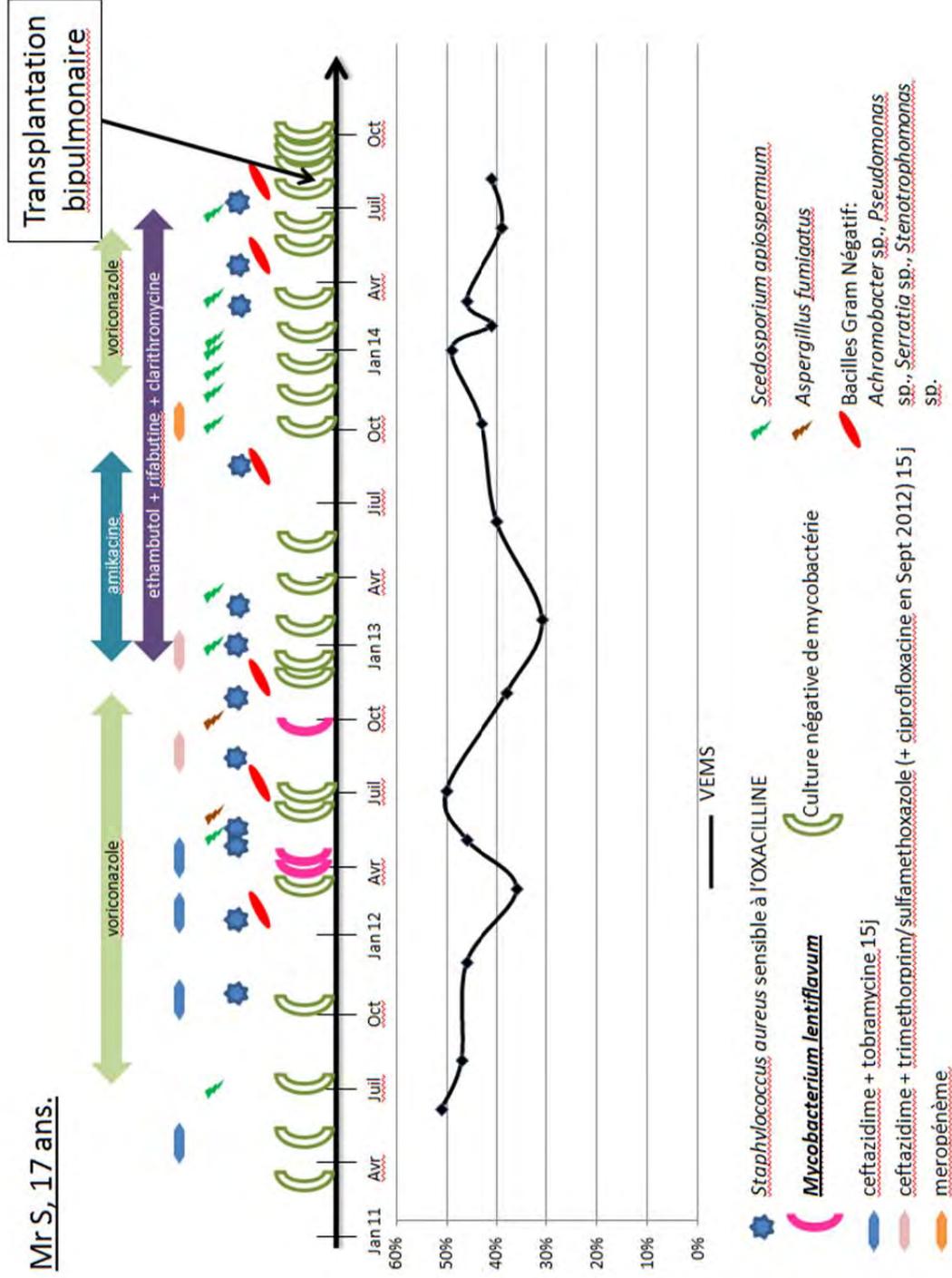
Gène cible	<i>smpB</i>
Amorces	
MlentismpB MBF	CAACTTGCACATTCCCGAGT
MlentismpB MBR	CCCGATCAGTGTGTCGATCT
Sonde	
MlentismpB MBR	6FAM-TCGCACTCGGAAGTTGTTGTTACATAGGC
Dilution	0.1nmol/μL puis 1/40

Annexe 2 :

Résultats du test de sensibilité/spécificité de la PCR temps-réel *Mycobacterium lentiflavum* à partir de 30 isolats cliniques appartenant à 16 espèces de mycobactéries non-tuberculeuses.

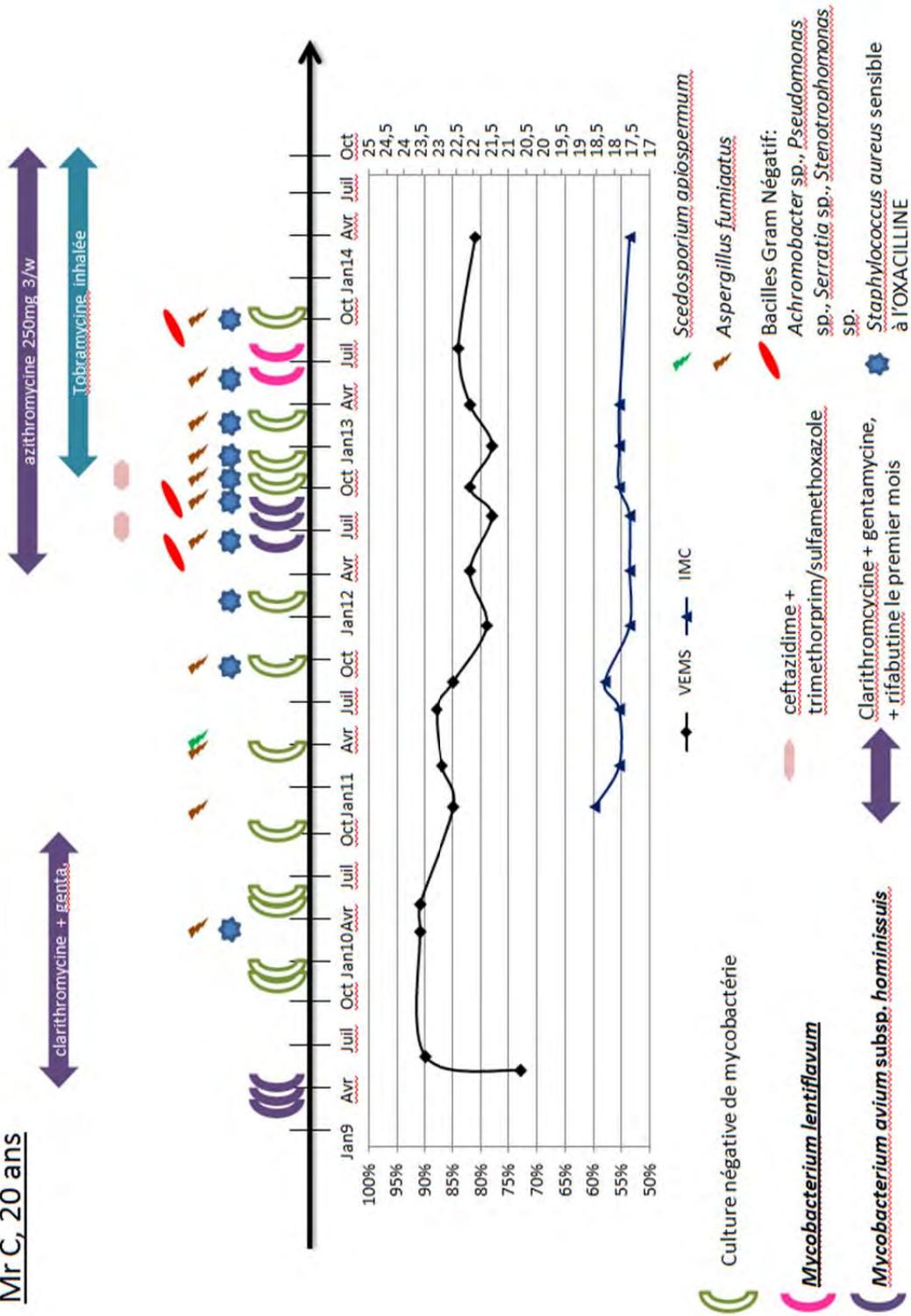
Espèces du genre <i>Mycobacterium</i> utilisées	Nombre d'isolats	PCR temps-réel positive
<i>Mycobacterium abscessus</i> subsp. <i>abscessus</i>	1	0
<i>Mycobacterium abscessus</i> subsp. <i>bolletii</i>	1	0
<i>Mycobacterium avium</i> subsp. <i>avium</i>	3	0
<i>Mycobacterium avium</i> subsp. <i>hominissuis</i>	1	0
<i>Mycobacterium bovis</i> Bacille Calmette–Guerin souche Tokyo	1	0
<i>Mycobacterium chelonae</i>	2	0
<i>Mycobacterium chimaera</i>	1	0
<i>Mycobacterium europaeum</i>	2	0
<i>Mycobacterium fortuitum</i>	1	0
<i>Mycobacterium gordonae</i>	1	0
<i>Mycobacterium intracellulare</i>	1	0
<i>Mycobacterium kansasii</i>	2	0
<i>Mycobacterium lentiflavum</i> (dont 6 <i>M. lentiflavum</i> appartenant aux 6 patients décrits dans cette étude)	9	9
<i>Mycobacterium porcinum</i>	1	0
<i>Mycobacterium simiae</i>	2	0
<i>Mycobacterium xenopi</i>	1	0
TOTAL	30	9

Annexe 3 :



Annexe 5 :

Mr C, 20 ans



INDEX DES FIGURES ET TABLEAUX

- Figure 1 : Ensemble des patients (n=173) présentant au moins une culture de mycobactérie issue des prélèvements respiratoires, répartis et comparés par complexe de mycobactérie isolé, atteints ou non de mucoviscidose, 2011-13.
- Figure 2 : Ensemble des patients (n=25) atteints de mucoviscidose ayant présenté au moins un isolat clinique de mycobactérie non-tuberculeuse, répartis par complexe d'espèce, 2010-2014.
- Figure 3 : Répartition par sexe dans les groupes de patients de la cohorte CF (n=354), chez ceux ayant cultivés au moins un isolat respiratoire de mycobactérie non-tuberculeuse excepté *M. lentiflavum* (n=20), puis ceux ayant cultivé une espèce du complexe *M. abscessus* (n=12), *M. avium* (n=8) et *M. lentiflavum* (n=6). *p<0,05 ; **p=0,053.
- Figure 4 : Répartition selon l'âge dans les groupes de patients de la cohorte CF (n=354), chez ceux ayant cultivés au moins un isolat respiratoire de mycobactérie non-tuberculeuse excepté *M. lentiflavum* (n=20), puis ceux ayant cultivé une espèce du complexe *M. abscessus* (n=12), *M. avium* (n=8) et *M. lentiflavum* (n=6). NS=non significatif
- Tableau 1 : Analyse multivariée par régression logistique des facteurs associés ou non à la survenue d'une tuberculose à partir de 173 patients ayant présenté au moins un isolat clinique de mycobactérie respiratoire, 2011-13.
- Tableau 2 : Résultats de la PCR temps-réel *M. lentiflavum* appliquée à 42 expectorations inoculées par *M. lentiflavum* et 8 autres espèces de mycobactéries.

Mycobacteria as emerging respiratory tract pathogens in cystic fibrosis patients: identification and diagnostic criteria.

Outbreak of *Mycobacterium lentiflavum* respiratory isolates in a large French city.

Abstract

Nontuberculous mycobacteria (NTM) are opportunistic respiratory pathogens in patients with cystic fibrosis. Their identification is based on non-invasive specimens and precise modern molecular techniques such as partial sequencing of the *rpoB* gene.

Over a 5-year period, 25/354 (7%) cystic fibrosis patients yielded at least one clinical isolate of NTM while only one patient (0.3%) yielded only one isolate of *Mycobacterium tuberculosis* suggesting an independent protective link ($p = 0.0001$) between cystic fibrosis to tuberculosis.

Six patients had *Mycobacterium lentiflavum* isolated in sputum during the study period, a fact that seems consistent with an outbreak. Detecting in routine *M. lentiflavum* directly in sputum using our new real-time PCR may help to disclose probable cross-transmissions.

Les mycobactéries, pathogènes respiratoires émergents chez les patients atteints de mucoviscidose : méthodes diagnostiques.

**L'exemple de *Mycobacterium lentiflavum*
dans une grande ville française.**

RESUME EN FRANÇAIS :

Les mycobactéries nontuberculeuses (MNT) sont des pathogènes respiratoires opportunistes des patients atteints de mucoviscidose. Leur identification repose sur des prélèvements non invasifs et des techniques moléculaires modernes précises tel le séquençage partiel du gène *rpoB*.

Sur une période de 5ans, 25/354 (7%) patients atteints de mucoviscidose ont présenté au moins un isolat clinique de MNT alors qu'un seul patient (0.3%) a présenté un isolat de *Mycobacterium tuberculosis*. La mucoviscidose semble être un facteur indépendant protecteur ($p=0,0001$) de survenue d'une tuberculose.

Six patients ont présenté un isolat respiratoire de *Mycobacterium lentiflavum* au cours de la période d'étude, fait qui semble compatible avec une émergence épidémique. Le développement d'une PCR temps-réel pourra permettre un screening des expectorations en routine en vue de dépister les transmissions croisées.

TITRE EN ANGLAIS : Mycobacteria as emerging respiratory tract pathogens in cystic fibrosis patients: identification and diagnostic criteria. Outbreak of *Mycobacterium lentiflavum* in a large French city.

DISCIPLINE ADMINISTRATIVE : Médecine spécialisée clinique

MOTS-CLÉS : mycobactéries, mucoviscidose, *Mycobacterium lentiflavum*, PCR temps-réel, *rpoB*, MALDI-TOF, séquençage, tuberculose.

INTITULÉ ET ADRESSE DE L'UFR OU DU LABORATOIRE :

Université Toulouse III-Paul Sabatier
Faculté de médecine Toulouse-Purpan,
37 Allées Jules Guesde 31000 Toulouse

Directeur de thèse : Michel DRANCOURT