



**HAL**  
open science

# Diagnostic clinico-biologique des nocardioses : analyse rétrospective d'une série de 41 cas à l'APHM (2014-2020)

Camille Petit

► **To cite this version:**

Camille Petit. Diagnostic clinico-biologique des nocardioses : analyse rétrospective d'une série de 41 cas à l'APHM (2014-2020). Sciences pharmaceutiques. 2020. dumas-02983325

**HAL Id: dumas-02983325**

**<https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-02983325>**

Submitted on 29 Oct 2020

**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.

# THÈSE D'EXERCICE / DOCTEUR JUNIOR

Phase d'Approfondissement du DES de Biologie Médicale

Soutenu le 09 octobre 2020

Par Mme Camille PETIT  
Née le 25 novembre 1993  
À Saint Martin d'Hères

Conformément aux dispositions de l'Arrêté du 12 avril 2017  
portant organisation du troisième cycle des études de Médecine et de Pharmacie

THÈSE

POUR LE DIPLÔME D'ÉTAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE

----oOo----

**DIAGNOSTIC CLINICO-BIOLOGIQUE DES NOCARDIOSES :  
ANALYSE RETROSPECTIVE D'UNE SERIE DE 41 CAS A L'APHM (2014-2020)**

----oOo----

**JURY :**

Président : Monsieur le Professeur Jean-Marc ROLAIN  
Directrice de thèse : Madame le Docteur Sophie BARON  
Membres : Monsieur le Professeur Pierre-Edouard FOURNIER  
Monsieur le Docteur Gregory DUBOURG



# THÈSE D'EXERCICE / DOCTEUR JUNIOR

Phase d'Approfondissement du DES de Biologie Médicale

Soutenu le 09 octobre 2020

Par Mme Camille PETIT  
Née le 25 novembre 1993  
À Saint Martin d'Hères

Conformément aux dispositions de l'Arrêté du 12 avril 2017  
portant organisation du troisième cycle des études de Médecine et de Pharmacie

THÈSE

POUR LE DIPLÔME D'ÉTAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE

----oOo----

**DIAGNOSTIC CLINICO-BIOLOGIQUE DES NOCARDIOSES :  
ANALYSE RETROSPECTIVE D'UNE SERIE DE 41 CAS A L'APHM (2014-2020)**

----oOo----

**JURY :**

Président : Monsieur le Professeur Jean-Marc ROLAIN  
Directrice de thèse : Madame le Docteur Sophie BARON  
Membres : Monsieur le Professeur Pierre-Edouard FOURNIER  
Monsieur le Docteur Gregory DUBOURG

27 Boulevard Jean Moulin – 13385 MARSEILLE Cedex 05  
Tel. : 04 91 83 55 00 – Fax : 04 91 80 26 12

#### **ADMINISTRATION :**

<i>Doyen :</i>	Mme Françoise DIGNAT-GEORGE
<i>Vice-Doyens :</i>	M. Jean-Paul BORG, M. François DEVRED, M. Pascal RATHELOT
<i>Chargés de Mission :</i>	Mme Pascale BARBIER, M. David BERGE-LEFRANC, Mme Manon CARRE, Mme Caroline DUCROS, Mme Frédérique GRIMALDI, M. Guillaume HACHE
<i>Conseiller du Doyen :</i>	M. Patrice VANELLE
<i>Doyens honoraires :</i>	M. Patrice VANELLE, M. Pierre TIMON-DAVID,
<i>Professeurs émérites :</i>	M. José SAMPOL, M. Athanassios ILIADIS, M. Henri PORTUGAL, M. Philippe CHARPIOT
<i>Professeurs honoraires :</i>	M. Guy BALANSARD, M. Yves BARRA, Mme Claudette BRIAND, M. Jacques CATALIN, Mme Andrée CREMIEUX, M. Aimé CREVAT, M. Gérard DUMENIL, M. Alain DURAND, Mme Danielle GARÇON, M. Maurice JALFRE, M. Joseph JOACHIM, M. Maurice LANZA, M. José MALDONADO, M. Patrick REGLI, M. Jean-Claude SARI
<i>Chef des Services Administratifs :</i>	Mme Florence GAUREL
<i>Chef de Cabinet :</i>	Mme Aurélie BELENGUER
<i>Responsable de la Scolarité :</i>	Mme Nathalie BESNARD

#### **DEPARTEMENT BIO-INGENIERIE PHARMACEUTIQUE**

Responsable : Professeur Philippe PICCERELLE

#### **PROFESSEURS**

BIOPHYSIQUE	M. Vincent PEYROT M. Hervé KOVACIC
GENIE GENETIQUE ET BIOINGENIERIE	M. Christophe DUBOIS
PHARMACIE GALENIQUE, PHARMACOTECHNIE INDUSTRIELLE, BIOPHARMACIE ET COSMETOLOGIE	M. Philippe PICCERELLE

## MAITRES DE CONFERENCES

BIOPHYSIQUE

M. Robert GILLI  
Mme Odile RIMET-GASPARINI  
Mme Pascale BARBIER  
M. François DEVRED  
Mme Manon CARRE  
M. Gilles BREUZARD  
Mme Alessandra PAGANO

GENIE GENETIQUE ET BIOTECHNOLOGIE

M. Eric SEREE-PACHA  
Mme Véronique REY-BOURGAREL

PHARMACIE GALENIQUE, PHARMACOTECHNIE INDUSTRIELLE,  
BIOPHARMACIE ET COSMETOLOGIE

M. Pascal PRINDERRE  
M. Emmanuel CAUTURE  
Mme Véronique ANDRIEU  
Mme Marie-Pierre SAVELLI

BIO-INGENIERIE PHARMACEUTIQUE ET BIOTHERAPIES  
PHARMACO ECONOMIE, E-SANTE

M. Jérémy MAGALON  
Mme Carole SIANI

## ENSEIGNANTS CONTRACTUELS

ANGLAIS

Mme Angélique GOODWIN

**DEPARTEMENT BIOLOGIE PHARMACEUTIQUE**  
Responsable : Professeur Françoise DIGNAT-GEORGE

## PROFESSEURS

BIOLOGIE CELLULAIRE

M. Jean-Paul BORG

HEMATOLOGIE ET IMMUNOLOGIE

Mme Françoise DIGNAT-GEORGE  
Mme Laurence CAMOIN-JAU  
Mme Florence SABATIER-MALATERRE  
Mme Nathalie BARDIN

MICROBIOLOGIE

M. Jean-Marc ROLAIN  
M. Philippe COLSON

PARASITOLOGIE ET MYCOLOGIE MEDICALE, HYGIENE ET  
ZOOLOGIE

Mme Nadine AZAS-KREDER

## MAITRES DE CONFERENCES

BIOCHIMIE FONDAMENTALE, MOLECULAIRE ET CLINIQUE	M. Thierry AUGIER M. Edouard LAMY Mme Alexandrine BERTAUD Mme Claire CERINI Mme Edwige TELLIER M. Stéphane POITEVIN
HEMATOLOGIE ET IMMUNOLOGIE	Mme Aurélie LEROYER M. Romaric LACROIX Mme Sylvie COINTE
MICROBIOLOGIE	Mme Michèle LAGET Mme Anne DAVIN-REGLI Mme Véronique ROUX M. Fadi BITTAR Mme Isabelle PAGNIER Mme Sophie EDOUARD M. Seydina Mouhamadou DIENE
PARASITOLOGIE ET MYCOLOGIE MEDICALE, HYGIENE ET ZOOLOGIE	Mme Carole DI GIORGIO M. Aurélien DUMETRE Mme Magali CASANOVA Mme Anita COHEN
BIOLOGIE CELLULAIRE	Mme Anne-Catherine LOUHMEAU

## ATER

BIOCHIMIE FONDAMENTALE, MOLECULAIRE ET CLINIQUE	Mme Anne-Claire DUCHEZ
BIOLOGIE CELLULAIRE ET MOLECULAIRE	Mme Alexandra WALTON

## A.H.U.

HEMATOLOGIE ET IMMUNOLOGIE	Mme Mélanie VELIER
----------------------------	--------------------

## DEPARTEMENT CHIMIE PHARMACEUTIQUE

Responsable : Professeur Patrice VANELLE

## PROFESSEURS

CHIMIE ANALYTIQUE, QUALITOLOGIE ET NUTRITION	Mme Catherine BADENS
CHIMIE PHYSIQUE – PREVENTION DES RISQUES ET NUISANCES TECHNOLOGIQUES	M. David BERGE-LEFRANC
CHIMIE MINERALE ET STRUCTURALE – CHIMIE THERAPEUTIQUE	M. Pascal RATHELOT M. Maxime CROZET
CHIMIE ORGANIQUE PHARMACEUTIQUE	M. Patrice VANELLE M. Thierry TERME
PHARMACOGNOSIE, ETHNOPHARMACOGNOSIE	Mme Evelyne OLLIVIER

**MAITRES DE CONFERENCES**

BOTANIQUE ET CRYPTOGRAMIE, BIOLOGIE CELLULAIRE	Mme Anne FAVEL Mme Joëlle MOULIN-TRAFFORT
CHIMIE ANALYTIQUE, QUALITOLOGIE ET NUTRITION	Mme Catherine DEFOORT M. Alain NICOLAY Mme Estelle WOLFF Mme Elise LOMBARD Mme Camille DESGROUAS M. Charles DESMARCHELIER
CHIMIE PHYSIQUE – PREVENTION DES RISQUES ET NUISANCES TECHNOLOGIQUES	M. Pierre REBOUILLON
CHIMIE THERAPEUTIQUE	Mme Sandrine ALIBERT Mme Caroline DUCROS M. Marc MONTANA Mme Manon ROCHE Mme Fanny MATHIAS
CHIMIE ORGANIQUE PHARMACEUTIQUE HYDROLOGIE	M. Armand GELLIS M. Christophe CURTI Mme Julie BROGGI M. Nicolas PRIMAS M. Cédric SPITZ M. Sébastien REDON
PHARMACOGNOSIE, ETHNOPHARMACOLOGIE	M. Riad ELIAS Mme Valérie MAHIOU-LEDDET Mme Sok Siya BUN Mme Béatrice BAGHDIKIAN

**MAITRES DE CONFERENCE ASSOCIES A TEMPS PARTIEL (M.A.S.T.)**

CHIMIE ANALYTIQUE, QUALITOLOGIE ET NUTRITION	Mme Anne-Marie PENET-LOREC
CHIMIE PHYSIQUE – PREVENTION DES RISQUES ET NUISANCES TECHNOLOGIQUES	M. Cyril PUJOL
DROIT ET ECONOMIE DE LA PHARMACIE	M. Marc LAMBERT
GESTION PHARMACEUTIQUE, PHARMACOECONOMIE ET ETHIQUE PHARMACEUTIQUE OFFICINALE, DROIT ET COMMUNICATION PHARMACEUTIQUES A L'OFFICINE ET GESTION DE LA PHARMAFAC	Mme Félicia FERRERA

**A.H.U.**

CHIMIE ANALYTIQUE, QUALITOLOGIE ET NUTRITION	M. Mathieu CERINO
--	-------------------

**ATER**

CHIMIE PHYSIQUE – PREVENTION DES RISQUES ET NUISANCES TECHNOLOGIQUES	M. Duje BURIC
---	---------------



**DEPARTEMENT MEDICAMENT ET SECURITE SANITAIRE**

Responsable : Professeur Benjamin GUILLET

**PROFESSEURS**

PHARMACIE CLINIQUE	M. Stéphane HONORÉ
PHARMACODYNAMIE	M. Benjamin GUILLET
TOXICOLOGIE ET PHARMACOCINETIQUE	M. Bruno LACARELLE Mme Frédérique GRIMALDI M. Joseph CICCOLINI

**MAITRES DE CONFERENCES**

PHARMACODYNAMIE	M. Guillaume HACHE Mme Ahlem BOUHLEL M. Philippe GARRIGUE
PHYSIOLOGIE	Mme Sylviane LORTET Mme Emmanuelle MANOS-SAMPOL
TOXICOLOGIE ET PHARMACOCINETIQUE	Mme Raphaëlle FANCIULLINO Mme Florence GATTACECCA
TOXICOLOGIE GENERALE ET PHARMACIE CLINIQUE	M. Pierre-Henri VILLARD Mme Caroline SOLAS-CHESNEAU Mme Marie-Anne ESTEVE

**A.H.U.**

PHYSIOLOGIE / PHARMACOLOGIE PHARMACIE CLINIQUE	Mme Anaïs MOYON M. Florian CORREARD
---	--

**ATER.**

TOXICOLOGIE ET PHARMACOCINETIQUE	Mme Anne RODALLEC
----------------------------------	-------------------

## CHARGES D'ENSEIGNEMENT A LA FACULTE

Mme Valérie AMIRAT-COMBRALIER, Pharmacien-Praticien hospitalier

M. Pierre BERTAULT-PERES, Pharmacien-Praticien hospitalier

Mme Marie-Hélène BERTOCCHIO, Pharmacien-Praticien hospitalier

Mme Martine BUES-CHARBIT, Pharmacien-Praticien hospitalier

M. Nicolas COSTE, Pharmacien-Praticien hospitalier

Mme Sophie GENSOLLEN, Pharmacien-Praticien hospitalier

M. Sylvain GONNET, Pharmacien titulaire

Mme Florence LEANDRO, Pharmacien adjoint

M. Stéphane PICHON, Pharmacien titulaire

M. Patrick REGGIO, Pharmacien conseil, DRSM de l'Assurance Maladie

Mme Clémence TABELLE, Pharmacien-Praticien attaché

Mme TONNEAU-PFUG, Pharmacien adjoint

M. Badr Eddine TEHHANI, Pharmacien – Praticien hospitalier

M. Joël VELLOZZI, Expert-Comptable

Mise à jour le 23 janvier 2020

**Aux membres du jury,**

***A Monsieur le Professeur Jean-Marc Rolain,***

Vous me faites l'honneur de présider ce jury de thèse et de juger ce travail, je vous en remercie très sincèrement.

***A Monsieur le Professeur Pierre-Edouard Fournier,***

Merci d'avoir accepté sans hésiter de faire partie de ce jury.  
Veuillez trouver ici le témoignage de mon profond respect.

***A Madame le Docteur Sophie Baron,***

Merci de m'avoir proposé ce sujet et si bien encadrée tout au long du projet. J'ai apprécié travailler avec toi et beaucoup appris à tes côtés, tant au cours de ce travail que pendant mes stages à l'IHU. Merci pour ta gentillesse, ton écoute, et le temps que tu m'as accordé.  
Je suis très heureuse que ma thèse soit ta première en temps que directrice.

***A Monsieur le Docteur Gregory Dubourg,***

Je suis heureuse que tu aies accepté de faire partie de ce jury.  
Je te remercie de m'avoir donné l'envie de m'inscrire en M2 et de m'avoir soutenue au cours de cette démarche. Merci pour ta sérénité, ta patience ainsi que pour tout ce que tu m'as appris et, je l'espère, m'apprendras encore.

***Une pensée à Madame le Docteur Frédérique Gouriet,***

Qui aurait dû faire partie de ce jury.  
Merci pour ton enseignement mais aussi pour ton dynamisme, et ta bonne humeur.

## **A ma famille,**

**A Vincent ;** Merci de faire partie de ma vie depuis plus de 7 ans, de partager mes moments de joies, mais aussi ceux du quotidien et de supporter parfois mes petits accès de mauvaise humeur incontrôlables. Tu es la plus belle chose qui me soit arrivée.

**A ma plus grande fan, Maman ;** Merci pour ton amour, pour avoir toujours cru en moi et avoir su trouver les mots pour m'encourager dans mes moments de doute. Merci de t'être toujours rendue disponible pour relire mes documents importants ... (même en pleine nuit). Je ne me lasserai jamais de nos longues conversations téléphoniques à débattre sur la vie.

**A Mamat ;** Merci pour ta bonne humeur, ton écoute, tes bons conseils ainsi que pour tout le mal que tu te donnes pour nous faire plaisir et que l'on ne manque jamais de rien. Tu as toujours pris soin de moi. Sache que tu pourras toujours compter sur moi.

**A Papa ;** Merci de m'avoir soutenue tout au long de ces années d'études. Des révisions de table de multiplication dans la voiture en primaire aux longues soirées passées sur mes DM de maths, tu ne m'as jamais laissée tombée. Merci également m'avoir fait partager ta passion pour le surf, le cheval, la plongée et les plus beaux coins de France (parce qu'il n'y a pas que le boulot qui compte).

**A Vero ;** Merci pour ta générosité et toutes tes petites attentions. Tes bons petits plats m'ont bien réconfortée pendant les périodes de révisions. Tu t'es toujours pliée en quatre pour m'aider quand j'en ai eu besoin.

**A mes frères et sœurs : Yanou, Soso (ma pâtissière préférée), Nanouche et Plouc-plouc (désolée c'était trop tentant de t'afficher).** Merci pour nos bêtises d'enfance, nos bons délires et pour tous ces moments inoubliables passés ensemble. J'espère que l'on en aura pleins d'autre ! Je vous aime et suis fière de vous.  
Spéciale dédicace à ma relectrice **Anna**, merci pour le temps que tu y as consacré.

**A mes grands-parents de Grenoble, Bandol, Cravans et Paladru,**  
Vous m'avez toujours soutenue, réconfortées et encouragées ... Je pense très fort à vous.  
(PS : merci GP pour la relecture)

**A mes oncles, tantes et cousins ;** Merci pour tous ces bons moments passés ensemble. J'ai énormément de chance de vous avoir.

**Cri-cri,** je me rappelle de toi préparant ta thèse à Cravans. Aujourd'hui c'est mon tour, merci pour ta présence dans ce moment important.

**A Jean-Denis et Lucie ;** Merci de m'avoir accueillie dans votre famille avec tant de gentillesse et de générosité.

**A Gladys, Clément ;** Merci pour votre générosité, votre écoute et vos conseils.  
Des bisous au petit **Ambroise**

## **A mes amis d'enfance et de la fac**

**A Elena, Cindy, Sarah et Yasmine ;** Merci d'être à mes côtés depuis toutes ces années dans les bons moments comme les mauvais. Je sais qu'à n'importe quelle heure du jour et de la nuit je peux compter sur vous.

**A Sarah et Sally ;** Pour ces superbes années de lycée.

**A mon binôme de TP Caro et à toute la petite bande de pharma : Marie, Agathe, Victo, Benoit, Manon, Antho, Karine, Anne-Laure, Christopher, Marion, Ramzy**

Merci pour tous les bons moments qu'on a partagés ensemble et pour ceux à venir !

A quand le prochain petit week-end ?

**A Axelle ;** Cette 2<sup>nd</sup> année de préparation d'internat n'aurait jamais été la même sans toi.

**Et aux autres ....**

## **A mes amis, co-internes, collègues, chefs**

**A Nono et au Dr Guiotte ;** Pour l'accueil que vous m'avez réservé à mon arrivée sur Marseille, et pour cette belle amitié qui s'est développée par la suite. Merci pour votre présence, votre soutien, votre dynamisme et votre gentillesse.

**A Marie et Mahé (le seul, l'unique pharmacien moniteur de ski) ;** Merci pour votre joie de vivre communicative. Votre départ pour Briançon ne suffira pas à vous débarrasser de nous !

**A tous les quatre ;** Pour tous ces petits repas, apéros skype, randos, et autres super moments passés ensembles (... Et pour les futurs !). Merci d'avoir pris vos billets d'avion pour nous rendre visite à la Réunion, ça m'a beaucoup touchée. Je garde le programme du séjour de côté pour que l'on puisse, un jour, réellement le faire tous ensemble.

**Aux filles,** pour votre écoute et nos petits rendez-vous zoom spécial TBC.

**A Lionel et Nanie ;** Pour votre accueil à chacun de nos passages sur Narbonne.

**A Estelle ;** Pour ta bonne humeur, ta sincérité et ta gentillesse.

Merci pour ton soutien en tant que VP Bio ... mais surtout en temps qu'amie. Je garde un super souvenir de nos semestres communs et de notre binôme de choc. J'ai tellement aimé râler à tes côtés. Je n'oublierai jamais ton visage impassible contrastant avec mon désarroi lors DU fameux prélèvement de gale.

**A Paul P ;** Cousin de mes premiers jours d'internat, puis ami.

Merci d'être toujours là pour moi et de m'avoir tant de fois, en sortie de soirée, ramenée jusque devant ma porte.

**A Céline ;** Merci pour ta douceur, ta gentillesse et ton soutien.

**A Valentine** ; Merci pour ta bienveillance, ton écoute et bien sûr ton humour.  
Merci également pour le calendrier que vous aviez fabriqué avec Paul pour mon séjour à la Réunion =) Je le garde précieusement en souvenir.

**A Théo** ; Mon tout premier co-interne. Atypique au premier abord mais avec un cœur énorme.  
Tu me manqueras pendant ton séjour aux USA, profite-en bien et n'oublie pas de tourner 7 fois ta langue dans ta bouche avant de parler =)

**A Léa** ; Merci pour ta douceur et tes conseils toujours avisés.

**A Alizée** ; Pour tous ces bons moments ! Hâte de te retrouver à l'IHU ;-)

**A Tracy et Nicolas S** ; mes « aînés » d'hémato ; Merci pour votre aide et votre gentillesse.

**A mes co-internes actuels : Paul R, Quentin, Marc M, Philippe, Nicolas P, Clara, Sara, Marc F, Margaux, Ines, Marine S, Marine D, Céline, Mathilde, Laurine**

Merci pour votre soutien pendant cette période pré-thèse.

**Philippe** ; merci beaucoup pour ton expertise sur les dossiers compliqués +++

**Marc M** ; merci pour tes bons conseils, pour m'avoir appris à utiliser les tableaux croisés dynamiques et pour m'avoir boostée en avançant ta thèse beaucoup plus vite que moi ^^

**A l'équipe de choc de parasito : Marceau, Erwan, Remi, Camille, Maelia**

Pour votre humour en toute situation.

**A tous mes anciens Co-internes de biochimie, d'hématologie et de l'IHU**

**Avec une pensée particulière pour mes camarades de bactério et du POC de l'Hiver 2018**

**Ainsi qu'à tous mes amis de promos et de soirée.**

**Aux biologistes et techniciens de biochimie Timone, hématologie conception et de l'IHU**

Avec une pensée particulière pour :

**L'équipe de bacterio** ; Merci pour vos conseils votre aide et votre bonne humeur !

**Sophie**, du secteur Toxo ; Tu as toujours un mot gentil pour Estelle et moi quand on te croise dans les couloirs.

**A Coralie** ; Pour ta bienveillance et ta pédagogie, tu m'as beaucoup appris.

**A Estelle Menu** ; Pour ta gentillesse et pour m'avoir rassurée plus d'une fois.

**A Maxime** ; Je te dois la majorité de mes connaissances en cytologie.

**A toute l'équipe du CHOR** ; Pour votre accueil et votre gentillesse.

Avec une pensée particulière pour ma co-interne **Justine (Bourdon)**

Je garde un super souvenir de semestre.

**A mes amis d'inter-CHU Charlotte, Boris, Paola, Thibault, Nadia, Zack**

Je n'oublierai jamais ce semestre au soleil (... et sous la pluie).

***« L'Université n'entend donner aucune approbation, ni improbation aux opinions émises dans les thèses. Ces opinions doivent être considérées comme propres à leurs auteurs. »***

## **Table des matières**

INTRODUCTION .....	6
PARTIE A : REVUE DE LA LITTERATURE.....	8
I. Histoire taxonomique du genre <i>Nocardia</i> .....	8
II. Réservoir et modes de transmission.....	15
III. La nocardiose chez l'homme : différentes formes cliniques.....	16
1) La nocardiose cutanée ou sous-cutanée primaire.....	16
2) La nocardiose invasive .....	17
3) Autres manifestations cliniques de la nocardiose .....	20
IV. Facteurs de risques.....	21
1) Transplantation d'organe solide .....	21
2) Autres pathologies impliquant la prise d'immunosuppresseurs.....	23
3) Immunodépression non médicamenteuse.....	24
4) Pathologies pulmonaires .....	25
5) Autres comorbidité fréquentes .....	25
6) Les nocardioses du patient immunocompétent.....	26
V. Diagnostic.....	27
1) Prélèvements et pertinence clinique.....	27
2) Examen direct .....	29
3) Culture.....	30
4) Identification.....	32
5) Détection directe du germe à partir du prélèvement .....	42
VI. Etude de la sensibilité <i>in-vitro</i> aux antibiotiques .....	45
1) Antibiotiques à tester .....	45
2) Méthode de référence.....	45



3) Méthodes alternatives.....	48
4) Sensibilité attendue .....	50
VII. Traitement .....	52
PARTIE B .....	57
I. Protocoles appliqués au laboratoire de microbiologie (IHU, AP-HM) .....	57
1) Mise en évidence de <i>Nocardia</i> par culture bactérienne .....	57
2) Mise en évidence de <i>Nocardia</i> par biologie moléculaire .....	61
II. Epidémiologie des cas de nocardiose (2014-2020, AP-HM) .....	61
1) Matériels et méthodes.....	61
2) Résultats.....	62
3) Discussion.....	72
CONCLUSIONS / PERSPECTIVES.....	79
BIBLIOGRAPHIE.....	85
ANNEXES.....	98
ANNEXE 1 : Protocoles de dépôts et extraction protéique (IHU, AP-HM).....	98
ANNEXE 2 : Spectres de <i>Nocardia</i> , base de données MALDI-TOF (IHU, AP-HM) .....	99

## **Liste des tableaux**

Tableau 1: Profils de sensibilité aux antimicrobiens des espèces/taxons de Nocardia les plus important(e)s sur le plan clinique (10).....	10
Tableau 2: Espèces de Nocardia valablement décrites et considérées comme pathogènes pour l'homme en 2018 (11).....	13
Tableau 3: Complexes communément désignés d'espèces de Nocardia (11).....	44
Tableau 4: Profils de sensibilité aux antimicrobiens attendus pour les espèces les plus fréquemment isolées. ....	51
Tableau 5: Antibiotiques utilisables en probabiliste lors de la prise en charge d'une nocardiose .....	54
Tableau 6 : Panel d'antibiotiques actuellement testés en première intention .....	60
Tableau 7: Répartition des espèces en fonction du type de nocardiose.....	65
Tableau 8: Etude des facteurs de risques .....	66
Tableau 9: Répartition du type de nocardiose en fonction du statut immunitaire et de la présence ou non de pathologie pulmonaire sous-jacente .....	68
Tableau 10 : Résultats de la sensibilité des souches de Nocardia spp. aux différents antibiotiques testés.....	71
Tableau 11 : Comparaison des résultats obtenus à ceux de Haussaire et al (157) et Lebeaux et al (3).....	73

## Liste des figures

Figure 1 : Relations phylogénétiques des genres les plus étroitement liés à <i>Nocardia</i> (17) .....	8
Figure 2 : Arbre phylogénétique de groupements d'espèces de <i>Nocardia</i> . Analyse génomique multilocus (MLSA) basée sur les séquences concaténées des gènes <i>gyrB</i> , <i>16S</i> , <i>secA1</i> , <i>hsp65</i> et <i>rpoB</i> de 237 souches (20) .....	12
Figure 3: Actinomycétome - <i>N. brasiliensis</i> (31) .....	17
Figure 4: Nocardiose cérébrale, imagerie (IRM) (37).....	19
Figure 5: Kératite nocardique (39) .....	20
Figure 6: Répartition du temps (en mois) entre la transplantation d'organe solide et la survenue d'une nocardiose dans les 117 cas (33).....	22
Figure 7: Proposition de stratégie diagnostic de nocardiose chez le patient transplanté (4) .	28
Figure 8: <i>N. otitidiscaviarum</i> – Coloration modifiée de Kinyoun (Laboratoire de microbiologie, AP-HM) .....	30
Figure 9: Aspect des colonies de <i>Nocardia</i> - <i>Nocardia</i> . Spp (Laboratoire de microbiologie, AP-HM).....	32
Figure 10: Superposition spectrale représentative de <i>Nocardia mexicana</i> . Les spectres de bibliothèque (noir) et d'isolat (rouge) affichent des décalages de pics (99) .....	35
Figure 11 : Lignes directrices proposées pour la prise en charge des infections à <i>Nocardia</i> chez le patient atteint de mucoviscidose (75) .....	56
Figure 12: Conditions de culture et stratégie d'identification bactérienne .....	58
Figure 13: Répartition des types de nocardiose (en %) .....	63
Figure 14: Répartition globale des espèces (en %) .....	64

## **Abréviations**

AP-HM = Assistance Publique des Hôpitaux de Marseille

BPCO = Bronchopneumopathie chronique obstructive

CASFM = Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie

CLSI = Clinical and Laboratory Standard Institute

CMI = Concentration minimale inhibitrice

CMV = Cytomégalovirus

DDB = dilatation des bronches

DDH = Hybridation ADN-ADN (DNA-DNA Hybridization)

DIP = déficits immunitaires primitifs

ECBC = Examen cytobactériologique des crachats

Gélose COS = Gélose Columbia + 5% sang de mouton (Biomérieux®)

Gélose PVX = Gélose « chocolat » + Polyvitex (Biomérieux®)

Gélose ANC = Géloses additionnée d'acide nalidixique et de colistine

Gélose VPN = Gélose contenant de la vancomycine, de la colistine et de la nystatine  
(ou géloses de Thayer-Martin)

Gélose BCYE = Géloses tamponnées à l'extrait de levure et au charbon actif (BCYE)

IHU = Institut méditerranée infection

LBA = Lavage broncho-alvéolaire

LCR = liquide céphalo-rachidien

MALDI-TOF = matrix-assisted laser desorption-ionization - time of flight

MHE = gélose Muller-Hinton

MHF = gélose Muller-Hinton additionnés de sang

NGS = Séquençage nouvelle génération

OFN = Observatoire Français de la Nocardiose

PCR = Polymérase chain reaction

SFM = Société Française de Microbiologie

SNC = système nerveux central

TMP-SMX = Triméthoprim-sulfaméthoxazole = Cotrimoxazole

VIH = Virus de l'immunodéficience humaine

# INTRODUCTION

La nocardiose est une pathologie rare, causée par des bactéries appartenant au genre *Nocardia*, omniprésentes dans l'environnement (1,2). A titre indicatif, entre janvier 2010 et décembre 2015, l'Observatoire Français de la Nocardiose (OFN) dénombrait 793 isolats de *Nocardia* reçus de différents laboratoires dont 696 provenant de laboratoires français (3), soit un peu plus de 150 isolats par an. Néanmoins, il s'agit d'une pathologie potentiellement mortelle. Elle affecte essentiellement les patients immunodéprimés, notamment ceux ayant subi une transplantation d'organe solide (4,5), qui se contaminent soit par inhalation d'air ou de poussière contaminée, soit par voie transcutanée en cas de lésion traumatique de la peau (1). Malgré tout, l'immunocompétence n'exclut pas le diagnostic, et de nombreux cas ont déjà été décrits, en particulier chez des patients présentant une pathologie pulmonaire sous-jacente (6–8). La clinique est dominée par des atteintes cutanées, pulmonaires et/ou cérébrales mais d'autres localisations (oculaire, cardiaque, hépatique, splénique ...) sont possibles. (2,4)

Le diagnostic clinico--biologique de cette pathologie est relativement complexe. D'un point de vue clinique, les symptômes sont aspécifiques et peuvent facilement orienter vers d'autres pathologies infectieuses, voire néoplasiques (1,2,4), ce qui peut entraîner un retard de mise en place d'une antibiothérapie adaptée, et une issue fatale dans certaines formes disséminées ou graves de la maladie (4,5). Il est donc nécessaire d'identifier les populations à risque afin de mieux dépister cette infection. D'un point de vue microbiologique, l'isolement de bactéries du genre *Nocardia* à partir de prélèvements cliniques est fortement impacté par les conditions de culture, il est donc préférable que le laboratoire soit informé de la nécessité de leur recherche (1,5,9). Par ailleurs les caractéristiques phénotypiques et notamment structurales de ce germe compliquent considérablement les étapes, pourtant essentielles, d'identification d'espèce et d'évaluation de la sensibilité *in-vitro* aux antibiotiques (10–14). De plus, du fait de l'évolution des outils de biologie moléculaire pour l'identification bactérienne, de nombreuses espèces de *Nocardia* ont été décrites récemment et la taxonomie bactérienne dans cette famille évolue constamment. Il existe actuellement 111 espèces publiées et validées (<https://lpsn.dsmz.de/genus/nocardia>) (dernière mise à jour le 09/09/2020), dont plus d'une cinquantaine sont impliquées en pathologie humaine (Conville, JCM, 2017).

Avec 4 hôpitaux et 3 400 lits, l'Assistance Publique des Hôpitaux de Marseille (AP-HM) est le 3<sup>ème</sup> centre hospitalier de France. Il abrite plusieurs services particulièrement concernés par cette pathologie : une unité de neurochirurgie, un service dédié à la transplantation rénale, un pôle de pneumologie en capacité de réaliser des transplantations pulmonaires et comprenant les centres de compétences régionaux labellisés pour la prise en charge de patients souffrant de mucoviscidose ou de maladies pulmonaires rares ; ainsi qu'un important pôle de maladie infectieuse (Institut méditerranée infection (IHU)) (15).

L'objectif de ce travail était d'étudier l'épidémiologie des nocardioses diagnostiquées à l'AP-HM entre janvier 2014 et juillet 2020 et d'évaluer la méthodologie appliquée, au sein de notre laboratoire (laboratoire de bactériologie, IHU, AP-HM), au diagnostic microbiologique des nocardioses afin de déterminer de potentiels axes d'amélioration.

Afin de répondre au mieux à cette problématique, la première partie de ce travail a été consacrée à la réalisation d'une revue de la littérature sur le sujet. Nous avons axé nos recherches sur la compréhension des étapes critiques à l'origine de la complexité du diagnostic clinico-biologique de cette pathologie, ainsi que sur les méthodes de détection des *Nocardia* disponibles. Dans un second temps, les informations obtenues ont été confrontées ; d'une part, à nos procédures de diagnostic microbiologique (culture/identification/antibiogramme) ; et d'autre part, à l'épidémiologie des cas de nocardiose diagnostiqués entre 2014 et 2020, à l'AP-HM.

# PARTIE A : REVUE DE LA LITTÉRATURE

## I. Histoire taxonomique du genre Nocardia

Les bactéries du genre *Nocardia*, appartiennent à la famille des *Nocardiaceae*, ordre des *Actinomycetales* dans lequel on trouve également des espèces des genres *Streptomyces*, *Actinomyces*, *Corynebacterium* ou *Mycobacterium* (Figure 1) (1). Elles appartiennent à un phylum de bactéries filamenteuses proches morphologiquement des champignons, mais leur paroi est composée de peptidoglycane et dépourvue de chitine. Leurs filaments se présentent généralement sous forme de mycélium vrai rudimentaire ou ramifié et septé. Comme la majorité des Actinomycètes, ce sont des bactéries non mobiles qui arborent une coloration Gram positive et présentent une résistance partielle aux acides forts et à l'alcool en lien avec la présence d'acide mycolique dans leur paroi cellulaire. Cependant, bien que la majorité des actinomycètes soient connus comme germes anaérobies, les *Nocardia* présentent, elles, un métabolisme aérobie (1,16).

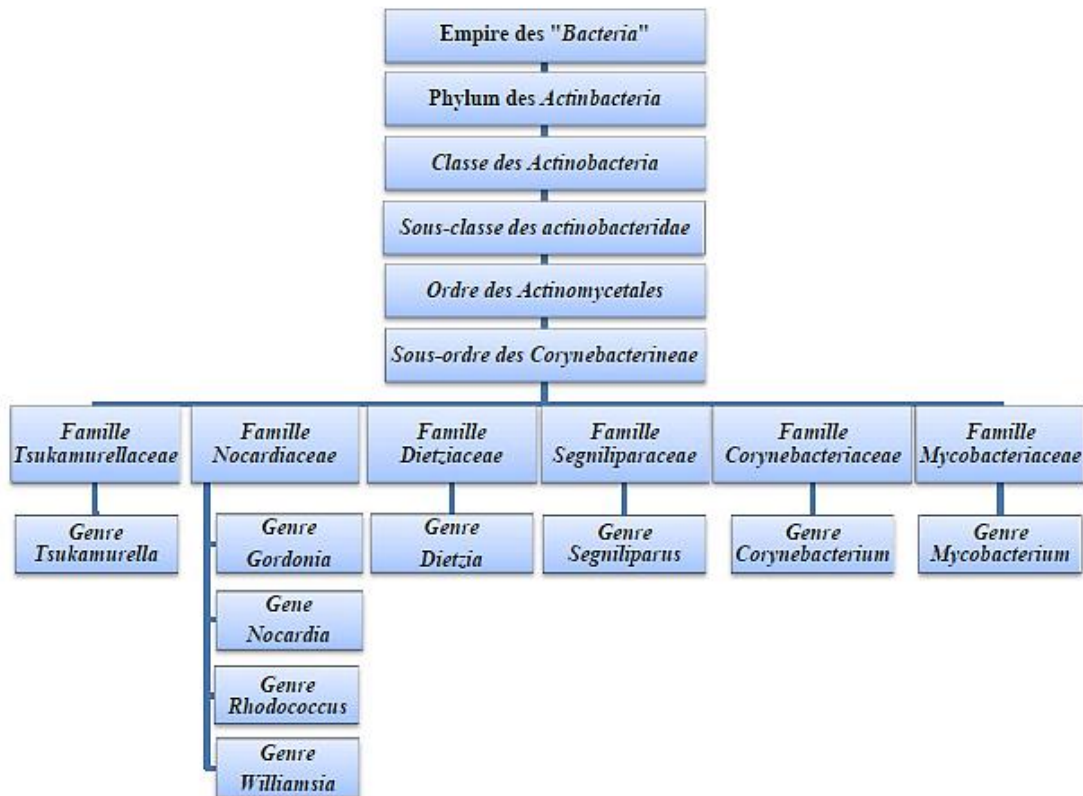


Figure 1 : Relations phylogénétiques des genres les plus étroitement liés à *Nocardia* (17)

Le genre *Nocardia* a été proposé en 1889 par Trevisan pour honorer le vétérinaire français Edmond Nocard qui l'avait identifié pour la première fois un an plus tôt, en Guadeloupe, à partir de vaches atteintes de farcin (18). *Nocardia farcinica* est alors devenue l'espèce type représentative de l'ensemble du genre. Eppinger en 1891 a isolé un microorganisme similaire chez un homme présentant une infection disséminée mortelle. Celui-ci a été nommé par la suite *Nocardia asteroides* (1,18).

L'identification des espèces de *Nocardia* est complexe, et la taxonomie du genre a énormément évoluée depuis sa découverte. Pendant de nombreuses années, elle était basée uniquement sur des critères morphologiques et biochimiques, notamment la capacité d'hydrolyse de certains substrats comme la caséine, la xanthine, la tyrosine et l'hypoxanthine (1). Avec ce mode d'identification laborieux et chronophage, la plupart des souches ont été considérées comme appartenant à l'espèce *N. asteroides*, l'élevant ainsi au rang d'espèce de *Nocardia* la plus fréquemment retrouvée dans les infections humaines (10). Cependant, les travaux de *Wallace et al* (19), parus en 1988, ont montré que ce qui était à l'origine appelé « *Nocardia asteroides* » correspondait en réalité à un groupe de bactéries présentant un profil hétérozygote de sensibilité aux anti-infectieux. Ce groupe a été renommé par la suite « complexe *Nocardia asteroides* » et scindé en plusieurs taxons correspondant aux différents profils de sensibilité : *Nocardia abscessus* (type I) ; le complexe *Nocardia brevicatena-paucivorans* (type II) ; le complexe *Nocardia nova* (type III) qui comprend *N. nova*, *Nocardia veterana*, *Nocardia africana*, *Nocardia kruczakiae*, *Nocardia elegans* ; le complexe *Nocardia transvalensis* (type IV) qui comprend *Nocardia blacklochiaie*, *Nocardia transvalensis*, *Nocardia wallacei* ; *Nocardia farcinica* (type V) ; et *Nocardia asteroides* (type VI) qui comprenait également à l'origine *Nocardia cyriacigeorgica*.



Tableau 1: Profils de sensibilité aux antimicrobiens des espèces/taxons de *Nocardia* les plus important(e)s sur le plan clinique (10)

Espèces	Profil type de sensibilité aux antibiotiques (19)	Caractéristiques principales du schéma thérapeutique
<b><i>N. abscessus</i></b>	I	Sensible à l'ampicilline, à l'amoxicilline-acide clavulanique, à la ceftriaxone, au linézolide et à l'amikacine ; la plupart ont des CMI d'imipénème présentant une résistance ; résistant à la ciprofloxacine et à la clarithromycine
<b>Complexe <i>N. brevicatena/paucivorans</i></b> Groupe sans nom	II	Identique au type I, mais les CMI de la kanamycine sont faibles (<1 fig / ml) ; sensible à l'érythromycine, la clarithromycine, au linézolide et à la ceftriaxone ; CMI très faibles à l'imipénème et à l'amikacine
<b>Complexe <i>N. nova</i></b> <b><i>N. nova, N. veterana, N. africana, N. kruczakiae, N. elegans</i></b>	III	Sensible à l'ampicilline mais résistant à l'amoxicilline-acide clavulanique ; sensible à l'érythromycine, la clarithromycine, au linézolide et à la ceftriaxone ; CMI très faibles en imipénème et en amikacine
<b>Complexe <i>N. transvalensis</i></b> <b><i>N. wallacei, N. blacklockiae</i></b>	IV	Résistant à tous les aminosides, y compris l'amikacine ; sensible à la ciprofloxacine, la ceftriaxone, au linézolide et à l'imipénème ; résistant à l'érythromycine et à la clarithromycine
<b><i>N. farcinica</i></b>	V	Résistant à l'ampicilline, aux céphalosporines à large spectre et à la clarithromycine ; résistant aux aminoglycosides à l'exception de l'amikacine ; sensible à la ciprofloxacine, au linézolide et à l'imipénème
<b><i>N. cyriacigeorgica</i></b>	VI	Résistant à l'ampicilline, à l'amoxicilline-acide clavulanique, à la clarithromycine et à la ciprofloxacine ; sensible à la ceftriaxone, l'amikacine, au linézolide et à l'imipénème
<b><i>N. brasiliensis</i></b>	N / A	Sensible à la minocycline, à l'amoxicilline-acide clavulanique et au sulfaméthoxazole ; résistant à la kanamycine, au céfamandole, à l'ampicilline, à la ciprofloxacine et à la clarithromycine
<b><i>N. pseudobrasiliensis</i></b>	N / A	Sensible à la ciprofloxacine, à la clarithromycine et au sulfaméthoxazole ; résistant à la kanamycine, au céfamandole, à l'ampicilline, à la minocycline, au linézolide et à l'amoxicilline-acide clavulanique
<b><i>N. otitiscaviarum</i></b> (Anciennement <i>N. caviae</i> )	N / A	Sensible à la kanamycine, à la gentamicine, à l'amikacine, au sulfaméthoxazole et à la ciprofloxacine ; résistant à la ceftriaxone, à l'ampicilline, à l'amoxicilline-acide clavulanique, au linézolide et à l'imipénème (souvent résistant à toutes $\beta$ -lactamines)
<b><i>N. asteroides</i> ATCC 19247<sup>T</sup></b>	VII	Souche de type ATCC sensible à l'ampicilline Autres susceptibilités aux médicaments identiques à celles du schéma VI

C'est l'avènement de la biologie moléculaire qui a le plus fait évoluer la taxonomie du genre *Nocardia*. En effet à partir des années 1990, plusieurs publications ont confirmé que le « complexe *Nocardia asteroides* » (appellation désormais obsolète) était bel et bien composé d'un groupe hétérogène d'espèces (Tableau 1). Il a également été révélé qu'un grand pourcentage d'isolats précédemment identifiés comme *N. asteroides* appartenait en réalité à d'autres espèces, dont principalement *N. nova*, *N. farcinica* et *N. cyriacigeorgica*. Ainsi cette espèce précédemment considérée comme la plus impliquée dans les nocardioses humaines, s'est vu rétrograder au rang de cause rare de maladie (10). Avec la mise en place du séquençage de l'ADN et notamment du gène de l'ARNr 16S, la diversité du genre a considérablement augmentée (Figure 2) ; il est maintenant composé de plus de 111 espèces différentes (<https://lpsn.dsmz.de/genus/nocardia>) (dernière mise à jour le 09/09/2020), dont environ 50% actuellement considérées comme pathogènes pour l'homme (10,11,18,20). Le Tableau 2 répertorie les différentes espèces connues de *Nocardia*, l'année de leur description et leur implication clinique décrite à l'heure actuelle.

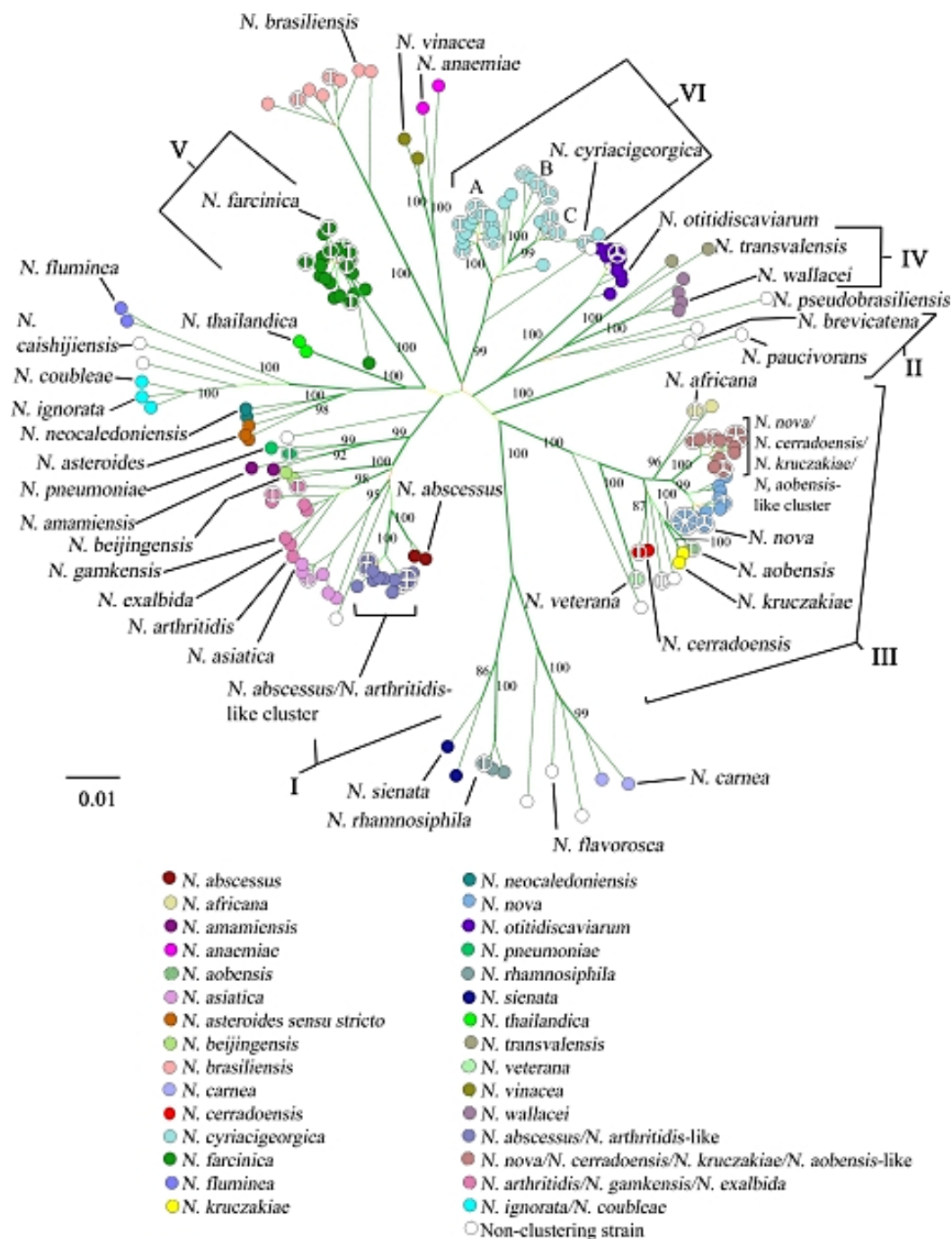


Figure 2 : Arbre phylogénétique de groupements d'espèces de *Nocardia*. Analyse génomique multilocus (MLSA) basée sur les séquences concaténées des gènes *gyrB*, *16S*, *secA1*, *hsp65* et *rpoB* de 237 souches (20)

Tableau 2: Espèces de *Nocardia* valablement décrites et considérées comme pathogènes pour l'homme en 2018 (11)

Espèce	Année description	≤ 4 cas publiés	Formes cliniques communément associées		
			Cutanée primaire	Pulmonaire	Disséminée
<i>N. abscessus</i>	2000		+ <sup>a</sup>	+	+
<i>N. africana</i>	2001			+	
<i>N. amamiensis</i>	2007	+	+ <sup>a</sup>	+	
<i>N. amikacinitolerans</i>	2013		+ <sup>a</sup>	+	
<i>N. anaemiae</i>	2005	+			
<i>N. aobensis</i>	2005				
<i>N. araoensis</i>	2004	+	+	+	
<i>N. arthritidis</i>	2004	+	+	+	
<i>N. arizonensis</i>	2015	+		+	
<i>N. asiatica</i>	2004			+	
<i>N. asteroides</i>	1891	+			
<i>N. beijingensis</i>	2001		+ <sup>a</sup>	+	+
<i>N. blacklockiae</i>	2008	+		+	
<i>N. boironii</i>	2016		+		
<i>N. brasiliensis</i>	1909		+ <sup>a</sup>		
<i>N. brevicatena</i>	1961	+			
<i>N. carnea</i>	1891	+		+	+
<i>N. cerradoensis</i>	2003	+		+	+
<i>N. concava</i>	2005			+	+
<i>N. cyriacigeorgica</i>	2001		+ <sup>a</sup>	+	+
<i>N. donostiensis</i>	2016	+		+	
<i>N. elegans</i>	2005			+	+
<i>N. exalbida</i>	2006	+	+ <sup>a</sup>		
<i>N. farcinica</i>	1889		+ <sup>a</sup>	+	+
<i>N. harenae</i>	2006	+	+		
<i>N. higoensis</i>	2004	+		+	+
<i>N. ignorata</i>	2001	+	+		
<i>N. inohanensis</i>	2004	+	+		
<i>N. jinanensis</i>	2009	+	+		
<i>N. kroppenstedtii</i>	2014	+		+	+
<i>N. kruczakiae</i>	2004		+ <sup>a</sup>	+	
<i>N. mexicana</i>	2006		+	+	+
<i>N. mikamii</i>	2010			+	+
<i>N. neocaledoniensis</i>	2004	+	+		
<i>N. niigatensis</i>	2004		+		
<i>N. ninae</i>	2007	+		+	
<i>N. niwae</i>	2011			+	
<i>N. nova</i>	1983			+	+
<i>N. otitidiscaviarum</i>	1924		+ <sup>a</sup>	+	+
<i>N. paucivorans</i>	2000				+

<i>N. pneumoniae</i>	2004	+		+	
<i>N. pseudobrasiliensis</i>	1995			+	+
<i>N. puris</i>	2003	+	+ <sup>a</sup>		+
<i>N. shinanonensis</i>	2016	+	+ <sup>a</sup>		
<i>N. sienata</i>	2004	+		+	
<i>N. takedensis</i>	2005		+	+	
<i>N. terpenica</i>	2007	+		+	
<i>N. testacea</i>	2004	+		+	
<i>N. thailandica</i>	2005	+	+ <sup>a</sup>	+	
<i>N. transvalensis</i>	1927		+ <sup>a</sup>	+	+
<i>N. vermiculata</i>	2005	+			
<i>N. veterana</i>	2001			+	
<i>N. vulneris</i>	2015		+		
<i>N. wallacei</i>	2006				+
<i>N. yamanashiensis</i>	2004	+	+		

<sup>a</sup> Atteinte oculaire également décrite

## II. Réservoir et modes de transmission

Les *Nocardia* sont ubiquitaires dans l'environnement, elles sont retrouvées en tant que composants saprophytes dans l'eau douce, l'eau salée, le sol, la poussière, la végétation en décomposition et les matières fécales animales (1,2,21).

La transmission humaine se fait le plus souvent par voie aérienne, par inhalation d'air ou de poussière contaminée ; mais peut aussi se faire par voie transcutanée notamment à partir du sol, en cas de lésion traumatique de la peau. Bien que peu fréquente une contamination par voie digestive reste possible.

Il semblerait que certaines espèces suivent une répartition géographique non homogène. Par exemple *N. brasiliensis*, généralement associée à des cas de nocardiose cutanée primaire est plus fréquemment isolée dans les pays au climat tropical ou subtropical (1,22). De manière générale, les cas de nocardiose semblent plus fréquents dans les zones géographiques avec un climat chaud et aride (comme aux sud-ouest des Etats-Unis). Il est possible que les conditions sèches, poussiéreuses et souvent venteuses de cette région facilitent l'aérosolisation et donc l'inhalation des *Nocardia* (9).

Les nocardioses sont majoritairement des infections sporadiques, mais de rares cas groupés d'infections nosocomiales ont déjà été rapportés. Il s'agissait soit de nocardiose à point de départ pulmonaire survenant chez des patients à risque ; soit de complications post-opératoires. Les sources probables de contaminations retenues étaient l'air circulant, les poussières provenant de travaux de construction ou encore un portage cutané du personnel de santé. Dans certains cas une parenté génétique des isolats bactériens a pu être retrouvée. A l'heure actuelle aucune transmission respiratoire de personne à personne n'a été décrite, bien que cela puisse être lié à la relative faible fréquence d'association étroite des patients à haut risque. (23–29)

### III. La nocardiose chez l'homme : différentes formes cliniques

La nocardiose est responsable d'un large éventail de syndromes cliniques. On peut distinguer deux entités : la nocardiose cutanée ou sous-cutanée primaire, et la nocardiose dite « invasive » qui regroupe plusieurs types de manifestations.

#### 1) La nocardiose cutanée ou sous-cutanée primaire

Il s'agit d'une infection localisée contractée par inoculation directe. Elle survient à la suite d'une lésion traumatique de la peau, qui facilite l'entrée des *Nocardia*, fréquemment présentes dans l'environnement. Plusieurs cas ont été rapportés chez des patients ayant pour habitude de marcher pied nus à l'extérieur, ou plus fréquemment après s'être blessé en jardinant (1,4). Elle se manifeste par l'apparition de nodules, de pustules, d'abcès superficiels (simples ou multiples) voir d'une cellulite localisée. L'infection peut se propager aux ganglions lymphatiques régionaux, on parle alors de nocardiose lymphocutanée (2,4,30). Bien que toutes les espèces de *Nocardia* puissent être en cause, *N. brasiliensis* est la plus fréquemment retrouvée (1,22). Les nocardioses cutanées peuvent ressembler aux leishmanioses cutanées, aux formes de cryptococcoses cutanéomuqueuses ainsi qu'aux infections des tissus mous causées par des bactéries telles que *Streptococcus pyogenes*, *Staphylococcus aureus* ou par des mycobactéries à croissance rapide. Les atteintes lymphocutanées peuvent avoir une présentation clinique similaire à celle de la sporotrichose, d'où le terme de « nocardiose sporotrichoïde ». Enfin, à un stade très avancé l'infection peut évoluer en mycétome : une pseudotumeur inflammatoire localisée au niveau du tissu sous-cutané, contenant des grains fongiques ou actinomycosique (on parle d'actinomycétome). Ce type d'atteinte est rarement observé dans les pays développés, car les patients consultent généralement un médecin avant son apparition.



*Figure 3: Actinomycétome - N. brasiliensis (31)*

## 2) La nocardiose invasive

Cette entité clinique peut elle aussi être divisée en deux grandes classes : la nocardiose pulmonaire et la nocardiose disséminée.

- La Nocardiose pulmonaire

Il s'agit d'une infection localisée contractée à la suite de l'inhalation de *Nocardia* présentes sous forme aérosolisée dans la poussière. La voie respiratoire étant la principale voie d'exposition bactérienne, c'est la forme de nocardiose la plus fréquente (2). La symptomatologie est d'intensité variable et peut inclure : une altération de l'état général, de la fièvre, des sueurs nocturnes, une toux (productive ou sèche), un essoufflement, des douleurs thoraciques et des hémoptysies. Même si des présentations cliniques sévères et aiguës ont été décrites, l'évolution est généralement subaiguë, voire chronique (4). Les résultats de l'imagerie pulmonaire sont très variables et peuvent mimer une multitude de pathologies (4,8,32). En effet, bien que la présence de nodules (simples ou multiples) soit l'anomalie la plus fréquemment retrouvée (33), aucune des images radiologiques suivantes ne permet d'exclure le diagnostic de nocardiose pulmonaire : syndrome cavitare, « signe du



halo », syndrome alvéolaire, syndrome interstitiel, opacité en verre dépoli. La présence d'un épanchement pleural est également fréquemment rapportée.

Cette présentation clinique et radiologique non spécifique peut être à l'origine d'un retard de diagnostic. La nocardiose pulmonaire peut mimer l'exacerbation d'une maladie sous-jacente (BPCO, sarcoïdose pulmonaire ...), et peut être confondue avec une néoplasie ainsi qu'avec un grand nombre d'étiologies infectieuses responsables de pneumopathie (2). On peut citer notamment les infections fongiques (aspergillose, mucormycose, histoplasmosse, blastomycose, cryptococcose ...), mais également bactériennes et mycobactériennes (tuberculeuse ou non) (34).

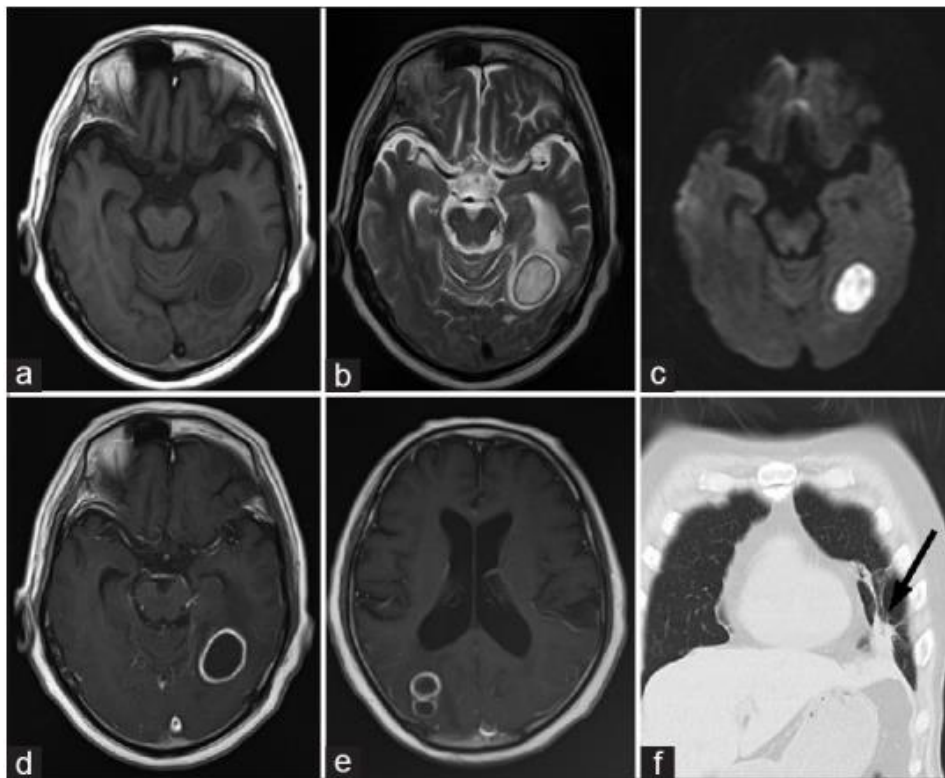
- La nocardiose disséminée

Depuis son site primaire d'inoculation, *Nocardia* peut ensuite, disséminer par voie hématogène ou par propagation contiguë, et atteindre d'autres organes. Une infection disséminée est définie par l'implication d'au moins deux organes non contigus qui peuvent ou non comprendre un foyer pulmonaire. L'infection se manifeste alors en général par la formation d'abcès et peut ressembler à un processus bactérien pyogène ou évoluer en une masse inflammatoire progressive granulomateuse.

- La nocardiose cérébrale

Il semblerait que *Nocardia* ait un tropisme particulier pour le système nerveux central (SNC) puisqu'il est le site extra-pulmonaire le plus courant (2,4,8). L'imagerie révèle des abcès simples ou multiples, avec un rehaussement d'anneaux périphériques pouvant être associé à un œdème environnant. Ceci peut se traduire cliniquement par des céphalées, des nausées, des vomissements, des convulsions, une altération de la conscience, une hypertension intracrânienne, voire un coma. Bien que des présentations aiguës puissent exister, les symptômes neurologiques se développent généralement progressivement et les patients peuvent rester longtemps asymptomatiques. Cela souligne l'importance critique d'un bilan d'imagerie adapté en cas de maladie invasive (4,6,33). La nocardiose cérébrale accompagne généralement

la maladie pulmonaire, mais une maladie isolée du SNC peut survenir, ce qui complique encore le diagnostic. En effet, l'évènement pulmonaire préalable peut être auto-limité et transitoire, ou subclinique. De plus la présentation clinique et radiologique de la nocardiose du SNC étant, tout comme celle de la nocardiose pulmonaire, très peu spécifique, un certain nombre de diagnostics différentiels doivent être pris en considération (2). Peuvent être citées : les tumeurs malignes (primaires ou secondaires) (35,36), les abcès bactériens, la toxoplasmose cérébrale, la cryptococcose, la cysticercose, l'aspergillose, la mucormycose, ainsi que la tuberculose miliaire. La symptomatologie peut également se rapprocher de celle d'un infarctus vasculaire.



*Figure 4: Nocardiose cérébrale, imagerie (IRM) (37)*

#### Nocardioses disséminées non cérébrales

Outre le SNC, d'autres sites d'atteintes secondaire tels que la peau, les tissus mous, les yeux, le foie, la rate, les os, les valves cardiaques, les articulations, les glandes surrénales, la thyroïde, les muscles, les testicules ... ont été décrits (2,4). *Nocardia* peut en réalité disséminer dans pratiquement tous les organes.

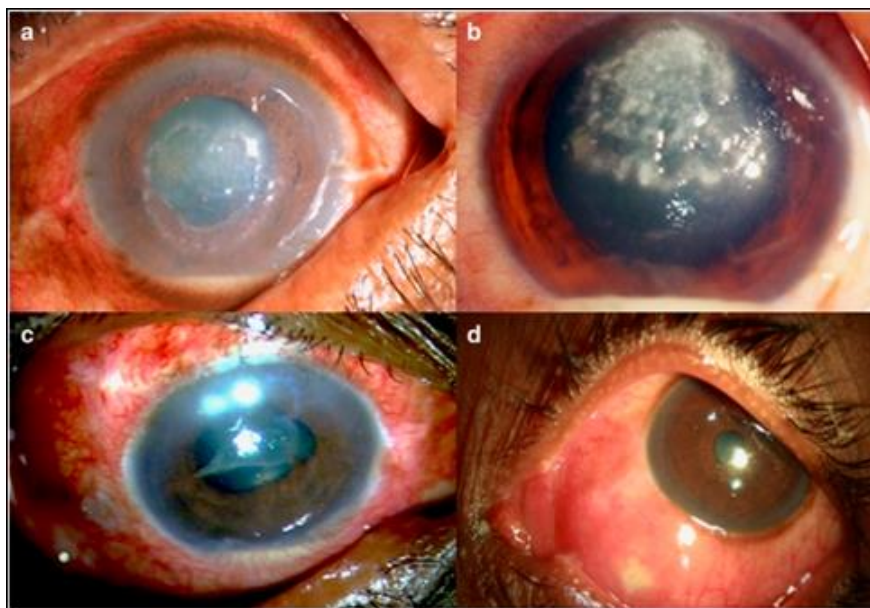
Bien que cette dissémination passe par voie hématogène, l'objectivation d'une bactériémie est très rare.

En cas de diagnostic de nocardiose cutanée, il est important de rechercher d'autres foyers pour bien distinguer une forme cutanée primaire d'une forme disséminée avec localisation cutanée secondaire.

### 3) Autres manifestations cliniques de la nocardiose

- Nocardiose oculaire

Même si ce n'est pas la localisation la plus courante, des cas de nocardioses oculaires ont été fréquemment rapportés. S'il s'agit d'une localisation secondaire, l'atteinte pourra être catégorisée comme nocardiose disséminée. Mais il peut également s'agir de formes primaires survenant à la suite de traumatisme oculaire mineur chez des individus en bonne santé ou après une chirurgie oculaire telle qu'une extraction de la cataracte. Cliniquement cette atteinte peut se traduire par une uvéite, une choroïdite exsudative, un abcès rétinien, un décollement de la rétine, une kératite ou une iritis. L'endophtalmie nocardique entraîne une cécité de l'œil atteint et est associée à une mortalité élevée. (1,38,39)



*Figure 5: Kératite nocardique (39)*

- Infections liées aux soins

Malgré l'omniprésence des *Nocardia* dans l'environnement, les infections liées aux soins sont rares, mais du fait d'un mode d'inoculation différent, celles-ci peuvent être classées à part. Il s'agit d'infection de site opératoire (25–27), de cathéters veineux centraux (1,40,41), ou encore de péritonite sur dialyse péritonéale (1,42–44). Comme dans les autres formes de nocardiose, l'infection peut ensuite disséminer vers d'autres organes.

#### IV. Facteurs de risques

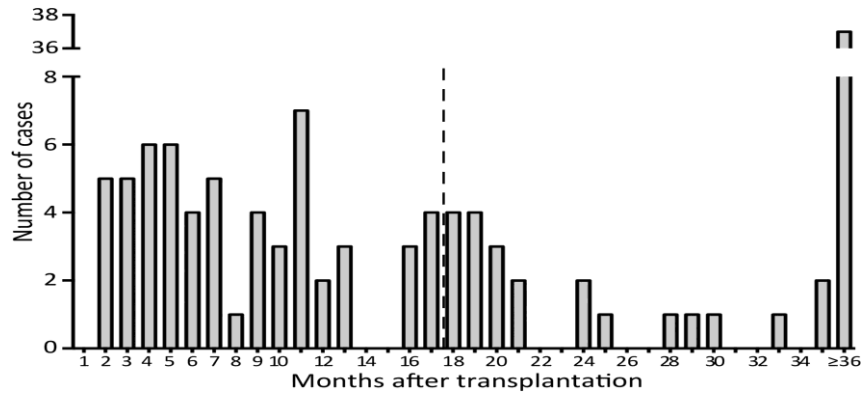
La nocardiose est une maladie opportuniste rare qui touche majoritairement l'adulte d'âge mûr (> 50 ans), avec une prédominance masculine retrouvée dans plusieurs séries de cas (7,8,32,45,46), mais inconstante (6,47).

##### 1) Transplantation d'organe solide

La transplantation d'organe solide concerne 25% des cas de nocardiose (4) et constitue le principal facteur prédisposant. Les receveurs de cœur, rein et foie sont historiquement les plus cités, mais des travaux récents suggèrent une place importante de la transplantation pulmonaire (5,48). La fréquence de survenue varie entre <1% et 3,5% selon les études et l'organe concerné (5). Les nocardioses invasives représentent 80 à 90% des cas, avec une localisation extra-pulmonaire chez 1/3 des patients; à l'inverse les atteintes cutanées primaires ne concernent que 10% des cas (4).

*J. Coussement et al* (33) ont réalisé une étude rétrospective dans le but de préciser les facteurs de risque de nocardiose chez le patient transplanté. 117 cas survenus entre 2000 et 2014 dans 36 centres européens (France, Belgique, Suisse, Pays-Bas, Espagne) ont pu être inclus. 41% d'entre eux ont été diagnostiqués dans l'année suivant la transplantation, tandis que 31,6% ne sont survenus que plus de 3 ans après. La durée médiane entre la transplantation et le diagnostic de nocardiose était de 17,5 mois (extrêmes : 2 à 244), mais différait significativement selon l'organe transplanté (cœur,

10 mois [intervalle, 3–198] ; poumon, 17 mois [intervalle, 2–106] ; et rein, 20 mois [intervalle, 2–244] mois ;  $P = 0,035$ , test de Kruskal – Wallis) (Figure 6).



*Figure 6: Répartition du temps (en mois) entre la transplantation d'organe solide et la survenue d'une nocardiose dans les 117 cas (33)*

Cinq facteurs de risque ont pu être identifiés : des taux sanguins résiduels élevés d'inhibiteurs de la calcineurine (ciclosporine, tacrolimus) au cours du mois précédant la découverte de la nocardiose, l'utilisation de tacrolimus au moment du diagnostic, la dose de corticostéroïde, l'âge du patient et la durée de séjour en unité de soin intensif après transplantation. Ce dernier paramètre pourrait refléter une fragilité générale du receveur, le rendant plus susceptible de développer des complications post-transplantation.

Dans une seconde étude cas-témoins menée dans un centre médical spécialisé en transplantation à Pittsburgh (48), les auteurs sont également arrivés à la conclusion que la prise de fortes doses de corticostéroïde et/ou d'anti-calcineurine augmentait le risque de survenue de cette maladie. Cela semble dû à leur action inhibitrice de la prolifération des lymphocytes T, cellules jouant un rôle majeur dans la lutte contre les infections à *Nocardia* (4,6,49).

De façon intéressante, la survenue d'infection par cytomégalovirus (CMV) au cours des 6 mois précédents semble significativement liée au risque de survenue de nocardiose (6–8,50). Cette co-infection pourrait être expliquée par le fait que le CMV est un virus

immunomodulateur qui augmente indirectement le risque d'infections bactériennes, fongiques et virales. (51)

Le rejet d'allogreffe a souvent été considéré comme un évènement prédisposant, mais les facteurs de confusion, tels que l'intensité de l'immunosuppression, n'étaient pas souvent pris en compte. Dans l'étude menée à Pittsburgh (48), son impact semblait significatif dans l'analyse univariée, mais ne l'était plus dans le model multivarié.

Bien que moins citée dans la littérature, car moins fréquente, la greffe de cellule souche hématopoïétique serait elle aussi un facteur de risque de nocardiose, avec un risque supérieur en cas de greffe allogénique versus autologue (2,4,5,52).

## 2) Autres pathologies impliquant la prise d'immunosuppresseurs

De manière générale, toute pathologie impliquant la prise de fortes doses de traitements immunosuppresseurs impactant l'immunité cellulaire peut être à risque de nocardiose. Peuvent être citées à titre d'exemple les maladies rhumatismales (vascularite, lupus érythémateux disséminé, polyarthrite rhumatoïde, maladie de Still, syndrome de Sjögren ...) et les maladies inflammatoires chronique de l'intestin (53–55).

La corticothérapie à haute dose, associée ou non à la prise d'autres traitements immunosuppresseurs (anti-calcineurine, azathioprine, cyclophosphamide, méthotrexate ...) reste le traitement le plus fréquemment cité. Des cas de nocardiose ont également été rapportés chez des patients traités par anti-TNF (*Tumor Necrosis Factor*) (53,56) ou Alemtuzumab (anticorps monoclonal humanisé dirigé contre l'antigène CD52 présent sur les lymphocytes B et T ainsi que sur les monocytes, thymocytes et macrophages) (57).

Les cures de chimiothérapie que reçoivent les patients souffrant d'hémopathie maligne ou de cancer solide engendrent généralement une immunodépression globale, profonde, et sont également à prendre en compte (55,58).

Bien que les études réalisées sur model animal n'aient montré que peu de contribution de l'immunité humorale dans la prévention de l'infection à *Nocardia*, un cas de nocardiose cérébrale à tout de même été rapporté chez un patient traité par Rituximab, un anticorps monoclonal dirigé contre les lymphocytes B (59,60).

Enfin, des cas de nocardiose cutanée primaire chez des patients immunocompétents après injection intra-lésionnelle de stéroïdes ont également été signalés. Ce traitement immunosuppresseur pourrait donc être un facteur de risque même en cas de traitement local (61,62).

### 3) Immunodépression non médicamenteuse

L'infection par le virus de l'immunodéficience humaine (VIH), en lien avec l'altération du système immunitaire qu'elle entraîne, est un facteur de risque de nocardiose cité à de nombreuses reprises. Le risque est majoré au stade avancé de la maladie lorsque le nombre de lymphocytes T CD4+ est inférieur à 100 cellules / mm<sup>3</sup>. (55,63,64)

Les patients atteints de déficits immunitaires primitifs (DIP) sont également exposés à la survenue de ce type d'infection. Une étude rétrospective observationnelle menée par *Lafont et al* (65) a permis de répertorier 79 cas de DIP compliqués d'une nocardiose (12 cas français non publiés, 67 cas issus de la littérature). La granulomatose septique chronique, pathologie caractérisée par un dysfonctionnement de la NADPH oxydase des cellules phagocytaires, était le principal DIP identifié ( $n = 61$  ; 77,5 %) ; suivie par la lymphopénie CD4 idiopathique ( $n = 4$ ), le déficit immunitaire commun variable ( $n = 4$ ), le déficit en IL12R $\beta$ 1 ( $n = 2$ ), le déficit en IL12p40 ( $n = 2$ ), et le déficit immunitaire combiné sévère ( $n = 2$ ).

En résumé, toute immunodépression, quelle que soit son origine (déficit immunitaire primitif, déficit immunitaire secondaire, immunodépression d'origine idiopathique ...) peut être considérée comme facteur de risque de nocardiose.

#### 4) Pathologies pulmonaires

La nocardiose pulmonaire, manifestation clinique la plus courante, est selon plusieurs études plus fréquemment retrouvée chez les patients souffrant d'affections respiratoires chroniques (asthme, bronchectasie, mucoviscidose, sarcoïdose, lipoprotéinose alvéolaire, néoplasies pulmonaires, tuberculose ... ) (46,66–72). Parmi ces pathologies, la bronchopneumopathie chronique obstructive (BPCO) arrive en première position. Bien que la prise de corticoïdes soit fréquente chez ces patients et entraîne un risque supplémentaire de développer la maladie, la BPCO semble être à elle seule un facteur prédisposant notable (7,34,45,55). Ceci pourrait être expliqué par une altération de la mobilité ciliaire et des lésions épithéliales impactant les défenses immunitaires locales

*Ott et al* (8), dans une étude rétrospective multicentrique visant à déterminer les facteurs de risque de nocardiose pulmonaire, menée entre 1995 et 2011 dans différents centres européens, retrouvaient 58% (25/43) de patients présentant une comorbidité pulmonaire, et celle-ci était le seul facteur de risque présent dans 28% des cas.

Cependant, l'interprétation de la présence de *Nocardia* dans les prélèvements respiratoires de patients atteints de pathologies pulmonaires, immunocompétents, est difficile. En effet, il peut s'agir d'une réelle infection, à l'origine d'une mortalité élevée, à court ou moyen terme (73), mais elle peut aussi simplement être le témoin d'une colonisation de l'arbre bronchique sans conséquences cliniques (74,75).

#### 5) Autres comorbidité fréquentes

Bien qu'ils ne soient pas des facteurs de risque prouvés, le diabète et l'alcoolisme sont des comorbidités fréquemment rapportées dans la littérature (1,50,76–81).



## 6) Les nocardioses du patient immunocompétent

Contrairement aux idées reçues, la fréquence de survenue de nocardiose chez l'immunocompétent est loin d'être négligeable. Selon plusieurs rapports, jusqu'à un tiers des patients ne présenterait pas d'immunodépression (2,6,7).

Il semblerait que la clinique soit alors dominée par des manifestations cutanées (ou sous-cutanées) primaires (1,82) et pulmonaires (surtout en cas de pathologie respiratoire sous-jacente) (7); mais des formes disséminées, notamment cérébrales ont également été signalées à de nombreuses reprises (36,79,83–85). Au travers d'une étude comparant patients immunodéprimés et immunocompétents, *Steinbrick et al* (6) ont approuvé cette hypothèse. La symptomatologie dépendait du site de l'infection mais ne différait pas significativement entre les deux groupes. Les infections disséminées étaient plus fréquentes dans le groupe immunodéprimé, en particulier chez les patients ayant subi une transplantation d'organe. De même, la mortalité au sein de ce groupe était supérieure. Cependant, d'autres études contredisent ces résultats et retrouvent une dissémination aussi courante chez l'immunocompétent que chez l'immunodéprimé (7). La nocardiose doit donc être envisagée dans le diagnostic différentiel de pneumonie, d'abcès cérébral ou d'infection des tissus mous, que le patient soit immunodéprimé ou non.

Il est également important de garder à l'esprit que les patients sont considérés comme immunocompétents après exclusion des principales causes d'immunodépression connues. Il est possible qu'un défaut sous-jacent inconnu ou rare dans la réponse de l'hôte soit présent chez eux (86).

Enfin, les auto-anticorps anti-cytokines sont une cause émergente de sensibilité spécifique aux agents pathogènes, encore très peu recherchés en routine. Le récent rapport de la présence d'anticorps anti-GM-CSF en tant que facteur de risque de nocardiose pourrait expliquer certains cas d'infection disséminée (87).

## V. Diagnostic

Les signes cliniques et les résultats de l'imagerie n'étant pas spécifiques, le diagnostic de certitude repose sur l'identification du microorganisme dans un échantillon clinique provenant d'un site pathologique. Mais le diagnostic microbiologique peut se révéler complexe. Ainsi, de manière à optimiser les chances d'isolement et d'identification du pathogène, il est préférable que le laboratoire de microbiologie soit averti de la suspicion de nocardiose (1,4).

### 1) Prélèvements et pertinence clinique

En partant du fait que *Nocardia* peut disséminer dans pratiquement tous les organes, l'origine des échantillons cliniques reçus par le laboratoire peut être très variée.

De manière générale, les prélèvements profonds sont à privilégier aux superficiels. En effet, la contamination des échantillons par d'autres germes, notamment par des bactéries à croissance rapide, peut masquer la présence de *Nocardia*. Ainsi en cas de suspicion de nocardiose cutanée, les prélèvements cutanéomuqueux ne doivent être réalisés qu'après déterision de la zone ; et les biopsies et drainages de plaies sont préférables aux simples écouvillonnages. Sur le même principe, devant une suspicion de nocardiose pulmonaire, la recherche du pathogène doit être effectuée au minimum sur expectoration, et idéalement sur liquide pleural, lavage bronchoalvéolaire ou aspiration bronchique. En cas de négativité, notamment face à une pneumopathie nodulaire, une biopsie pulmonaire ou une aspiration à l'aiguille fine peuvent être envisagées (4).

Lors d'atteinte disséminée profonde, et particulièrement de nocardiose cérébrale, le diagnostic microbiologique est crucial mais nécessite une intervention chirurgicale risquée. Les échantillons extra-neurologiques, principalement pulmonaires, peuvent alors être d'une grande aide. En effet, une imagerie évocatrice associée à une preuve microbiologique de nocardiose pulmonaire peut parfois permettre d'éviter la réalisation d'une biopsie cérébrale. Il est cependant important de garder à l'esprit qu'une co-infection reste possible, en particulier chez le patient immunodéprimé

(infection fongique principalement). En cas d'évolution non satisfaisante après plus de 15 jours d'antibiothérapie adaptée, cette éventualité doit être prise en compte, et la chirurgie de nouveau discutée (4,17).

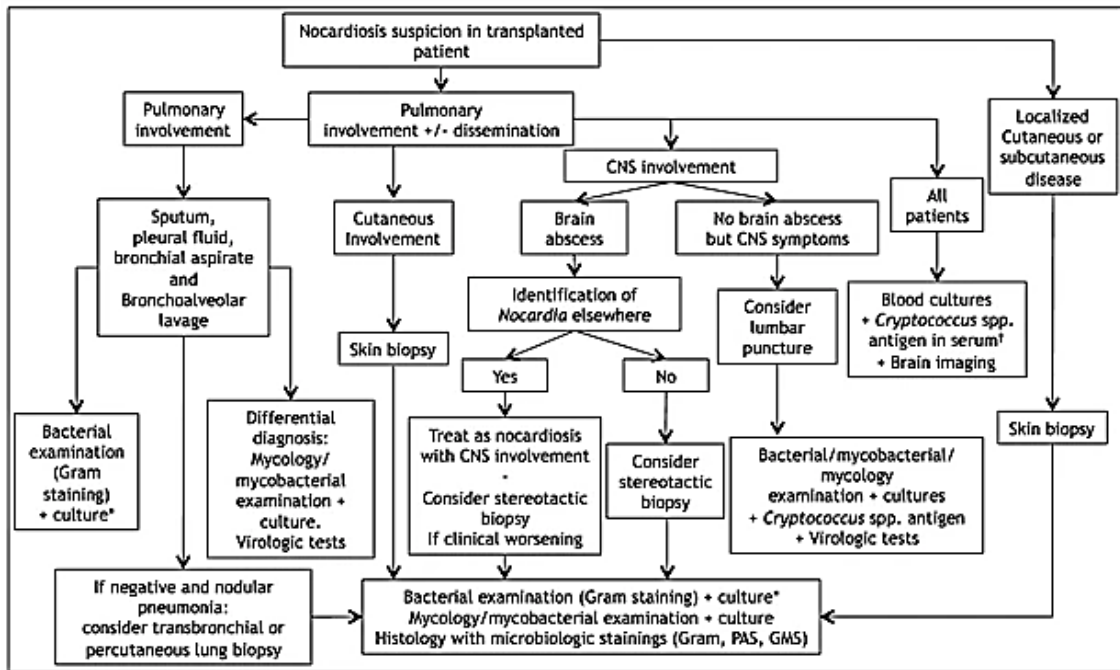


Figure 7: Proposition de stratégie diagnostic de nocardiose chez le patient transplanté (4)

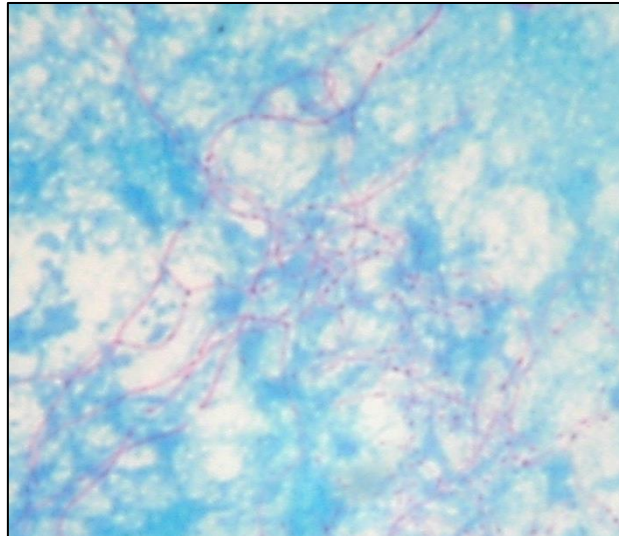
Outre les problèmes de sensibilité, la spécificité de l'isolement de *Nocardia* peut également être mise à défaut. Bien que les *Nocardiaceae* ne soient ni des commensaux de la flore humaine ni des contaminants courants de laboratoire, la seule détection de *Nocardia* dans un prélèvement respiratoire, principalement dans des expectorations, ne représente pas nécessairement une infection en cours (8). En effet, des cas de colonisation de l'arbre respiratoire ont été décrits, en particuliers chez des patients présentant une pathologie pulmonaire chronique (mucoviscidose notamment). De plus, les manifestations respiratoires dues à la pathologie sous-jacente et la fréquente présence concomitante sur les prélèvements d'autres germes compliquent encore l'interprétation. Ainsi dans certaines situations, l'impact clinique est très complexe à évaluer ; il peut s'étendre de la simple colonisation ne nécessitant pas de traitement, à l'infection active potentiellement mortelle (75,88–91).

De manière simplifiée, une culture positive d'expectoration, d'aspiration bronchique ou de lavage bronchoalvéolaire, est au vu des risques, à considérer comme une infection et à traiter chez tout patient immunodéprimé ; mais soumise à interprétation chez le patient immunocompétent. Différents critères, comme la présence de comorbidités respiratoires, les résultats de l'imagerie pulmonaire, la présence de signes cliniques évocateurs d'infection des voies pulmonaires inférieures, le nombre de cultures positives, leurs origines, et la présence d'autres germes pathologiques sur celles-ci ; doivent être pris en compte (8,74).

## 2) Examen direct

L'examen direct des échantillons reçus pour recherche de *Nocardia* correspond à la première étape du diagnostic. Des frottis minces sont réalisés à partir des échantillons cliniques ou du culot de centrifugation puis observés au microscope. Il est également possible de réaliser un examen direct à partir de matériel cultivé mais la morphologie bactérienne est souvent altérée et le rendu après coloration, beaucoup moins typique (1,9,10,16,17). La coloration de Gram est la plus simple et la plus sensible ; *Nocardia* apparaît comme un organisme filamenteux, mince, ramifié, à Gram-positif (à la différence des mycobactéries), présentant un aspect tigré ou moucheté. Ces filaments étant très fragiles, il arrive fréquemment qu'ils se cassent lors de la réalisation du frottis, et peuvent donc faussement apparaître de taille réduite, ce qui leur donne une apparence bacillaire voire coccoïde. La présence de *Nocardia* sur le frottis est généralement associée à un contexte de purulence, ainsi de nombreux polynucléaires neutrophiles peuvent être observés. La deuxième coloration la plus fréquemment utilisée est la technique modifiée de Kinyoun (ou coloration de Ziehl-Neelsen à froid) (16). Celle-ci permet de mettre en évidence le caractère acido-alcool-résistant partiel (coexistence d'organismes résistants et non résistants) de *Nocardia*. Les bactéries résistantes à l'acide apparaissent alors de couleur rouge, sur fond bleu (Figure 8). Par ailleurs, *Nocardia* se révèle aussi positive à la coloration de Gomori-Grocott, classiquement utilisée en mycologie pour rechercher la présence de *Pneumocystis jirovecii*. La positivité de l'examen direct est un argument important en faveur du diagnostic de nocardiose. En revanche, compte tenu de la faible valeur prédictive

négative, notamment de la coloration de Kinyoun, la négativité de l'examen direct ne doit pas stopper les investigations (1,9,10,16,17).



*Figure 8: N. otitidiscaviarum – Coloration modifiée de Kinyoun (Laboratoire de microbiologie, AP-HM)*

### 3) Culture

- Milieux de culture et durée d'incubation

Les *Nocardia* poussent généralement facilement sur la plupart des milieux bactériologiques de routine non sélectifs : gélose columbia + 5% sang de mouton (COS), gélose « chocolat » au sang cuit enrichie (PVX), milieu d'hémoculture BACTEC® ... (1,9). Leur présence peut également être retrouvée sur des milieux de culture pour mycobactéries, cependant certaines procédures utilisées pour la décontamination des échantillons peuvent inhiber leur croissance (1,9).

Les cultures doivent être incubées en aérobiose ou éventuellement en présence de 5% à 10% de CO<sub>2</sub>, entre 32°C et 37°C. Les premières colonies peuvent apparaître à partir de 48 à 72h d'incubation, mais la croissance de certaines souches peut nécessiter jusqu'à 2 voire 3 semaines (1,5,9,17). En pratique courante, il est fortement recommandé de laisser en culture les prélèvements au moins 2 semaines (dans une

atmosphère suffisamment humidifiée pour éviter le dessèchement des géloses) avant de rendre un résultat définitif, afin de diminuer le risque de faux négatif (1).

Sur les milieux de culture de routine, une forte croissance d'autres espèces bactériennes peut masquer la présence des *Nocardia*, et entraîner un risque que les boîtes soient à tort jetées trop tôt. L'utilisation de milieux plus sélectifs comme les géloses contenant de l'acide nalidixique et de la colistine (ANC), les géloses de Thayer-Martin contenant de la vancomycine, de la colistine et de la nystatine (VPN), ou les géloses tamponnées à l'extrait de levure et au charbon actif (BCYE) peut donc être avantageuse dans certains cas (1,5,9,16).

Ceci rappelle l'importance de la notification de la suspicion de nocardiose au laboratoire de microbiologie qui prend en charge les prélèvements.

- Aspect des colonies

La morphologie des colonies obtenues en culture est très variable. Celle-ci peut différer selon l'espèce, mais aussi d'une souche à une autre, ainsi qu'en fonction de son âge et des conditions de culture mises en œuvre. Les colonies sont généralement crénelées, friables, à surface cérébriforme et souvent incrustées dans la gélose. La présence fréquente d'hyphes aériens se traduit par un aspect poudreux, crayeux. Elles sont majoritairement de couleur blanche mais peuvent aussi être pigmentées (jaune, orange, rouge, beige...). Les colonies de *N. farcinica* par exemple, ont tendance à devenir orange avec l'âge (1,17).



*Figure 9: Aspect des colonies de Nocardia- Nocardia. Spp (Laboratoire de microbiologie, AP-HM)*

#### 4) Identification

En raison de la nature et de la gravité des infections que peuvent causer ces bactéries, l'appartenance au genre *Nocardia* doit être confirmée au plus vite. Dans la mesure du possible, une identification précise de l'espèce doit être associée. Les différentes espèces de *Nocardia* pouvant présenter des particularités pathogéniques et un profil de sensibilité aux antibiotiques différent, ce diagnostic présente en plus de son utilité épidémiologique un intérêt clinique majeur (11,17,92).

- Identification biochimique

Traditionnellement, l'identification d'espèce de *Nocardia* était établie sur les caractères phénotypiques des isolats et les résultats d'une batterie de tests biochimiques. Cependant, ces tests sont très chronophages et nécessitent une expertise spécifique. Le profil de sensibilité aux antimicrobiens constituait également une aide au diagnostic (19). Néanmoins, en raison du nombre croissant d'espèces cliniquement pertinentes, ces méthodes ne sont plus considérées comme adéquates pour permettre la discrimination entre les espèces. Il est maintenant recommandé d'avoir recours à des techniques plus performantes telles que la spectrométrie de masse ou la biologie moléculaire (1,10,11,17,18).

- Identification protéomique

La spectrométrie de masse par MALDI-TOF MS (*matrix-assisted laser desorption-ionization – time of flight mass spectrometry*) est une méthode d'identification basée sur la comparaison du profil protéique d'une bactérie à une base de données de profils protéiques bactériens connus. Cette méthode, rapide et simple d'utilisation, a révolutionné le diagnostic bactériologique et est couramment utilisée par les laboratoires de microbiologie (10,93,94) pour l'identification bactérienne. Elle est généralement très efficace pour les bactéries les plus couramment isolées en routine, mais certains micro-organismes sont plus difficiles à identifier, et un aménagement du mode opératoire peut alors être nécessaire. C'est le cas des bactéries du genre *Nocardia* qui, en raison de leur paroi épaisse riche en acide mycolique, présentent plus de difficultés d'identification. Plusieurs études ont été menées pour améliorer l'identification des espèces de *Nocardia* par cette méthode.

Les travaux de recherche menés par *Khot et al* (95) et *Taggart et al* (96) ont démontré que l'âge des cultures de *Nocardia* joue un rôle important dans le succès de l'identification par MALDI-TOF MS. Il semblerait que l'utilisation de colonies à un stade précoce de croissance (dès qu'une fine pousse commence à être visible) permette une très nette amélioration des scores d'identification. La raison de cette amélioration n'est pas claire, il pourrait s'agir d'une plus faible adhérence des jeunes colonies au milieu de culture, celles-ci ayant avec l'âge tendance à sécher et à s'enfouir dans la gélose. L'hypothèse d'une influence réduite sur le spectre des caractéristiques secondaires, telles que les pigments et le mycélium aérien, qui peuvent varier avec le temps et selon l'isolat, a également été évoquée. Les milieux de culture auraient, eux, un impact indirect sur le résultat. Ainsi, bien qu'un grand nombre soit utilisable, les milieux riches, favorisant une croissance rapide et abondante, tels que les géloses au sang de mouton, seraient préférables.

L'épaisse paroi hydrophobe riche en acide mycolique des *Nocardia* représente un frein à l'ionisation des protéines par la matrice. En 2010, *Verroken et al* (97) ont mis en place un pré-traitement permettant sa dislocation. Quelques colonies bactériennes devaient



être placées dans 500µL d'eau distillée et le tout porté à ébullition pendant 30 min. Une seconde technique consistant à plonger la solution de colonies trois fois dans de l'azote liquide à -196 °C pendant 5 secondes, permettait également l'obtention d'un résultat satisfaisant, mais a été abandonnée au vu de la rare disponibilité de ce produit dans les laboratoires de routine et des contraintes liées à sa manipulation. Dans les publications les plus récentes, la rupture des parois bactériennes est maintenant réalisée au moyen de billes de silice ou de verre et d'un vortexage efficace (92,98–100).

Plusieurs études ont également démontré que la mise en place d'une étape d'extraction protéique contribue grandement à améliorer les performances de l'identification par spectrométrie de masse des *Nocardia* (11,101). Celle-ci peut consister en un simple ajout d'acide formique (1µL) sur le dépôt de micro-organisme, avant apposition de la matrice (102,103). Mais les processus plus complexes incluant l'utilisation d'éthanol, puis d'acide formique (70%) et d'acétonitrile (pur) (92,95,98–100,103,104); sont plus efficaces.

La seconde étape critique correspond à l'appareillage et à la stratégie d'identification choisie. Différents systèmes MALDI-TOF sont actuellement commercialisés. Chaque appareil est accompagné d'un logiciel de pilotage incluant : une base de données et un système expert utilisant des critères décisionnels et des algorithmes qui lui sont propres. Les plus répandus sont le système proposé par Bruker daltonics (appareil Microflex®, logiciel Biotyper®) et la plateforme Vitek-MS de bioMérieux (associée à un spectrophotomètre Shimadzu Axima®) (93). Les échecs d'identification rencontrés au cours de cette étape peuvent être attribués à trois causes : une base de données incomplète, une impossibilité de différencier des espèces proches ou une acquisition imparfaite.

La nocardiose étant une maladie rare, les spectres des différentes espèces ne sont pas toujours présents en quantité suffisante dans les banques de données standards. Les espèces les plus communes (ex : *N. cyriacigeorgica*, *N. farcinica*, *N. otitidiscaviarum*, *N. paucivorans*, *N. wallacei* ...) sont généralement plus simples à identifier et obtiennent

de meilleurs scores que les espèces moins courantes (11,99,104). Il n'est pas rare que ces dernières (ex : *N. Mexicana*, *N. arthritidis*, *N. pneumoniae*, *N. pseudobrasiliensis*, *N. asiatica*, *N. beijingensis* ...) ne puissent pas obtenir d'identification par MALDI-TOF, voire reçoivent une identification incorrecte. Pour parfaire à ce défaut, de nouveaux spectres peuvent être ajoutés aux bibliothèques standards, par mise à jour de la base de données ou par ajout de bibliothèques internes, personnalisées. A noter que, deux souches d'une même espèce peuvent présenter des alignements spectraux légèrement différents (Figure 10), ainsi la présence d'un spectre par espèce dans la base de données est insuffisante.

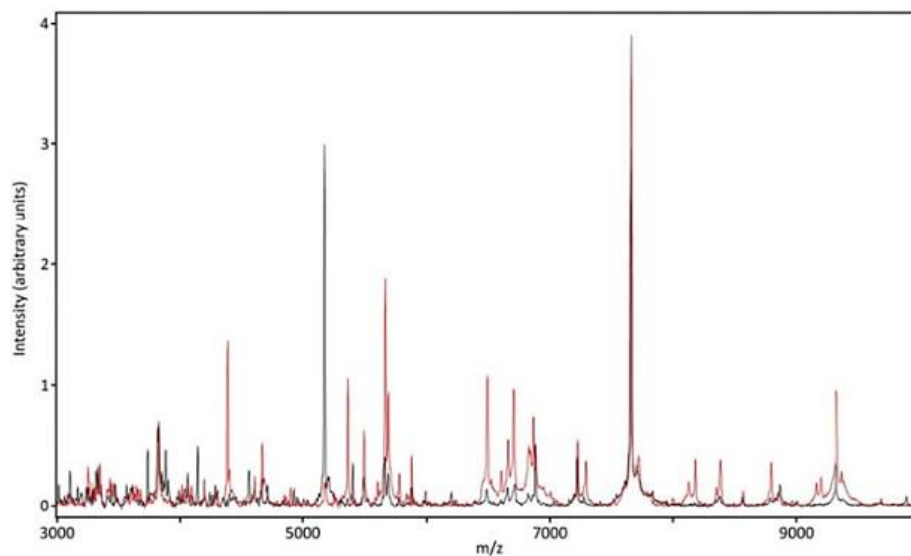


Figure 10: Superposition spectrale représentative de *Nocardia mexicana*. Les spectres de bibliothèque (noir) et d'isolat (rouge) affichent des décalages de pics (99)

Des études menées sur la performance des mises à jour les plus récentes telles que la version 3.0 du système Vitek MS rapportent des résultats prometteurs. En effet cette dernière permettrait l'obtention de plus de 85% d'identifications correctes, au niveau de l'espèce ou au minimum au niveau du complexe phylogénétique (92,101,104). Les publications portant sur le système Bruker sont également nombreuses. L'utilisation des banques de données standards, seules, n'aboutit qu'à un taux limité d'identification fiable ; mais l'incrémentation du système par des bibliothèques personnalisées permettrait l'obtention de résultats tout aussi satisfaisants qu'avec le système concurrent (11,95–100,102,103,105,106). A titre d'exemple, dans une étude

multicentrique, Blosser et al (99) démontrent que l'incrémentation de la base de données de référence (Biotyper® v4.0.0.1 comportant 72 entrées de *Nocardia*) par deux bibliothèques complémentaires : NIH *Nocardia* (v2, 64 entrées ; National Institutes of Health, Bethesda) et OSU *Nocardia* (v1.1, 26 entrées; Ohio State University, Columbus) ; fournit un avantage global de 36,9% pour l'identification d'espèce.

Un autre problème rencontré est celui du manque de diversité moléculaire au sein de certains complexes phylogénétiques. Le MALDI-TOF permet dans l'ensemble une identification correcte du complexe, mais il est parfois impossible de discriminer les espèces en faisant partie. Il arrive aussi qu'un isolat soit identifié à tort comme appartenant à une autre espèce du même complexe. Les complexes de *N. nova* (*N. nova*, *N. africana*, *N. aobensis*, *N. elegans*, *N. cerradoensis* et *N. kruczakiae*) et *N. transvalensis* (*N. transvalensis*, *N. wallacei*, *N. blacklockiae*) semblent particulièrement concernés (92,96,104). Dans la majorité des cas, cela n'a pas d'impact clinique car ces espèces partagent le même profil de sensibilité aux antibiotiques. Mais il faut rester vigilant car il existe des exceptions, comme dans le cas du complexe « *N. abscessus* et espèces apparentées » (*N. abscessus*, *N. arthritidis*, *N. asiatica*, *N. beijingensis*, *N. pneumoniae*) (11,99).

Lorsqu'aucune identification ne peut être obtenue, ou que le score est insuffisant, l'hypothèse d'une acquisition imparfaite doit aussi être évoquée. Le renouvellement du processus d'identification (depuis l'étape de pré-traitement) a à plusieurs reprises démontré son intérêt (99,101). Le seuil utilisé pour l'interprétation des scores d'identification est également remis en cause par certains. Dans de nombreux laboratoires de microbiologie ayant recours à la technologie Bruker, un score  $\geq 2$  est requis pour l'identification d'espèce (ou à défaut du complexe phylogénétique) et un score  $\geq 1,7$  ou  $1,8$  pour l'identification du genre. Il est également nécessaire que celui-ci diffère de plus de 10% de celui des autres identifications proposées. Au cours d'une étude multicentrique menée sur 150 isolats de *Nocardia*, Blosser et al (99) ont examiné l'impact que pouvait avoir l'application d'un score seuil de  $1,8$  au lieu de  $2,0$  sur l'identification d'espèce. Cet abaissement a permis une identification moyenne de

5,6% isolats supplémentaires, sans pour autant entraîner de diminution de la précision. Ainsi cette stratégie, déjà appliquée dans certains centres pour les mycobactéries (107,108), est critiquable (102) mais reste à étudier (100).

- Biologie moléculaire

En cas d'échec de la technologie MALDI-TOF, le recours à des techniques de biologie moléculaire, bien qu'elles soient plus coûteuses et disponibles uniquement dans certains laboratoires, permet l'obtention d'un résultat fiable.

Dès 1999, *Laurent et al* (109) ont décrit une méthode de PCR permettant de distinguer les *Nocardia* des autres actinomycètes. Puis en 2004, *Brown et al* (110) ont mis au point des amorces spécifiques de *N. farcinica*.

Conjointement, des protocoles d'identification basés sur l'analyse par polymorphisme de longueur de fragment de restriction (RFLP) du gène de la protéine de choc thermique de 65kDa (*hsp 65*) puis du gène de l'ARNr 16S, ont vu le jour et ont progressivement été perfectionnés. Cette technique implique une amplification par PCR d'une zone ciblée du gène d'intérêt puis la digestion des amplicons obtenus par des endonucléases de restriction sélectionnées en amont pour leur spécificité. Le produit de digestion est ensuite soumis à une électrophorèse sur un gel d'agarose, en résulte un modèle de polymorphisme de longueur de fragment de restriction, qui peut être caractéristique d'une espèce (1,18,111,112).

Parallèlement, des améliorations techniques considérables ont permis l'émergence de nouvelles technologies de séquençage et ont révolutionné la taxonomie du genre *Nocardia*. Le séquençage « à haut débit », plus rapide et moins coûteux c'est progressivement démocratisé jusqu'à remplacer les méthodes de RFLP devenues obsolètes (1,113).

▪ **Séquençage du gène de l'ARNr 16S**

Bien que l'hybridation ADN-ADN soit le gold-standard, la partie de l'ADN actuellement la plus utilisée à des fins taxonomiques en bactériologie est le gène codant pour la sous-unité 16S de l'ARN ribosomal (ARNr 16S). Ce gène présente l'avantage d'être ubiquitaire au sein du règne des bactéries, de disposer d'une structure hautement conservée, mais également, d'être à l'heure actuelle, celui dont les séquences nucléotidiques sont les plus répertoriées dans les banques de données. La séquence de ce gène mesure environ 1550 pb et est composée à la fois de régions communes à toutes les bactéries et de régions variables permettant de distinguer les genres et les espèces. Le document MM18-A du CLSI indique que pour les actinomycètes aérobies, une similarité de séquence supérieure à 99,6% (avec une séparation d'au moins 0,4% vis-à-vis des autres espèces) doit être atteinte pour considérer deux souches comme appartenant à la même espèce (114). Le séquençage de la totalité du gène est parfois requis, notamment lors de la description d'une nouvelle espèce ou pour la distinction de taxons ou des souches particulières. Cependant un séquençage partiel du gène, plus simple et moins coûteux (généralement les 500 premières paires de bases proches de l'extrémité 5'; zone réputée pour sa variabilité), fournit une différenciation adéquate pour l'identification de la majorité des isolats bactériens cliniques (1,10,115).

Une des difficultés majeures avec l'utilisation du gène de l'ARNr 16S pour l'identification d'espèces de *Nocardia* est le polymorphisme interspécifique insuffisant de certaines d'entre-elles. En effet, bien que le séquençage partiel du gène (500pb) permette la différenciation de la majorité des espèces actuellement reconnues, celui-ci reste insuffisant pour les espèces étroitement apparentées. Ainsi un séquençage étendu du gène est nécessaire pour différencier *N. abscessus* / *N. asiatica* / *N. arthritidis* / *N. beijingensis* , *N. elegans* / *N. veterana* , *N. higoensis* / *N. shimofusensis* , *N. farcinica* / *N. kroppenstedtii* et *N. brasiliensis* / *N. vulnérais* (10,11,116). Cependant, le séquençage étendu de l'ARNr 16S n'est pas toujours suffisant : certaines espèces, pourtant distinctes par technique d'hybridation ADN-ADN, ne présentent au sein de la séquence du gène de l'ARNr

16S, que quelques paires de bases de différence. C'est le cas de *N. brevicatena* et *N. paucivorans* ainsi que de *N. kruczakiae* et *N. veterana* pour lesquelles des divergences de séquences respectives de seulement 0,5% (sur 1494 pb) et 0,2% (sur 1352 pb) ont été retrouvées (117,118). En revanche, une hétérogénéité intraspécifique notable est parfois retrouvée chez certains isolats (ex : *N. nova*), soulignant l'importance de l'obtention de séquence de haute qualité (18,117).

Une autre limite à l'utilisation du séquençage du gène de l'ARNr 16S comme seul outil de diagnostic d'espèce vient du fait que les *Nocardia*, à l'image d'autres genres bactériens, puissent posséder, au sein de leur génome, un nombre variable de copies du gène de l'ARNr 16S, et que celles-ci puissent être différentes. Bien que rare, ceci a déjà été décrit chez *N. nova*, *N. concava*, *N. ignorata* et *N. yamanashiensis* (119,120). La présence de multiples copies différentes du gène de l'ARNr 16S doit être suspectée lors de l'observation, sur le chromatogramme de séquence, au niveau de la région variable du gène, de pics se chevauchants, entraînant la désignation de bases ambiguës. Il est alors nécessaire d'avoir recours à d'autres méthodes pour obtenir une identification d'espèce fiable (10,11).

- **Séquençage d'autres gènes**

Afin de pallier aux limites de l'identification par séquençage de l'ARNr 16S, d'autres gènes ont été étudiés pour discriminer les espèces de *Nocardia spp.* Parmi les pistes explorées, citons les gènes *hsp65*, déjà utilisé pour la réalisation de PCR ciblées ou de technique d'identification par RFLP (113,121); *secA1*, gène monocopie codant pour une protéine sécrétoire essentielle de *Nocardia* (122,123); *gyrB* codant pour la sous-unité  $\beta$  de l'ADN gyrase ; *sodA* codant pour l'enzyme superoxyde dismutase ou encore le gène *rpoB* codant pour la sous-unité  $\beta$  de l'ARN polymérase. Ces gènes ont permis de discriminer les différentes espèces appartenant au genre *Nocardia* avec des résultats souvent meilleurs que le séquençage de l'ARNr 16S mais variables selon les espèces, en particulier au sein d'un même complexe (124–127). A titre d'exemple, le gène *rpoB*, à l'exception de celui appartenant à la souche RIF-R *Nocardia farcinica*, semble être présent sous forme de copie unique au sein du génome bactérien. Le séquençage de sa région

hypervariable, située entre les paires de bases 2300 et 3300 a déjà été réalisé chez de nombreux genres et a permis l'obtention d'identifications robustes, reproductibles et précises. De plus les séquences du gène *rpoB* ont l'avantage de figurer parmi les plus représentées dans les bases de données. Cependant, la diversité intra-espèces de ce gène reste inégale, les souches de *N. nova* présentent un niveau élevé de variations de séquences tandis que celles de *N. farcinica* semblent plus homogènes (128).

L'une des solutions utilisée pour combiner les avantages de chacun de ces gènes est de sélectionner 3-5 gènes d'intérêt parmi les gènes précédemment cités, de les séquencer de manière complète ou partielle (dans les zones discriminantes notamment), puis de concaténer leurs séquences afin de réaliser un arbre phylogénétique (20,106,129–131). Cette technique, appelée analyse génomique multilocus (Multilocus Séquence Analysis, MLSA) s'est avéré prometteuse. *McTaggart et al* (20), ont ainsi démontré en 2010 que la MLSA utilisant les séquences partielles de 5 gènes (GyrB-16S-secA1-hsp65-rpoB) permettait par la méthode Neighbour Joining de construire un arbre phylogénétique (Figure 2) fournissant un système d'identification global, capable de différencier les espèces de *Nocardia* actuellement reconnues, et de repérer des souches singulières qui pourraient représenter des espèces non publiées.

Toutefois, ces méthodes d'identification par séquençage uni ou multilocus, bien que très prometteuses, restent coûteuses, fastidieuses et présentent toutes des limites. Actuellement, seul le recours à la technique d'hybridation ADN- ADN garantie l'obtention d'un résultat exact. L'analyse d'un plus grand nombre d'espèces et d'isolats représentant chaque espèce est nécessaire pour déterminer l'utilité des polymorphismes de ces différents gènes pour une identification fiables des espèces.

- **Séquençage du génome entier**

Grace aux progrès technologiques et à la diminution de son cout, le séquençage ciblé de gènes tend également à être remplacé par le séquençage du génome entier du germe d'intérêt. Ce procédé offre, pour l'identification de bactéries telles que celles du genre *Nocardia*, d'importants avantages. En effet, le génome obtenu

peut soit servir de base pour l'analyse des séquences des gènes d'intérêt précédemment cités (*ARNr 16S*, *hsp65*, *secA1*, *gyrB*, *sodA*, *rpoB*), soit être directement comparé au génome entier de bactéries représentatives de chaque espèce. Cette dernière option, favorisée par le développement de plateformes constamment incrémentées par de nouveaux génomes (<https://tygs.dsmz.de/>) se démocratise de plus en plus. Il s'agit d'une méthode d'hybridation ADN-ADN *in silico* de génome à génome qui tend à remplacer la DDH classique (132). De plus, l'arrivée sur le marché de systèmes tels que MiSeq® (Illumina, San Diego, Californie, Etats-Unis) ou minION® (Oxford Nanopore, Oxford, Royaume-Uni), systèmes ayant un prix abordable, relativement simple d'utilisation et permettant de rendre un résultat dans un délai compétitif avec les techniques traditionnelles, incite d'autant plus au séquençage de génome entier.

- **Bases de données génétiques**

La démocratisation et la baisse du coût du séquençage génomique, d'un gène ou du génome entier bactérien a permis d'obtenir un nombre exponentiel de séquences bactériennes. Ces séquences sont la plupart du temps déposées dans des bases de données publiques, en libre accès et internationales, dont la plus grande est la base Genbank® créée par le NCBI (National Center for Biotechnology Information). Ces bases de données sont très régulièrement incrémentées et permettent de comparer les génomes entre eux mais sont imparfaites car en accès libre et donc à risque d'erreur. Ainsi, en raison de l'évolution rapide de la taxonomie du genre *Nocardia*, les identifications d'espèce de certaines séquences anciennement publiées peuvent ne plus correspondre à la nomenclature actuelle. Il arrive également que des séquences soient publiées sous le nom d'espèces encore non reconnues officiellement, ou sous la dénomination « *Nocardia. spp* ». (1,10).



## 5) Détection directe du germe à partir du prélèvement

Comme détaillé précédemment, la nocardiose est une maladie opportuniste grave dont le diagnostic est long et difficile. La détection et l'identification directes du pathogène sur prélèvement représentent un atout majeur dans sa prise en charge. En effet, s'affranchir de l'étape de culture permet non seulement un gain de temps, mais aussi une augmentation importante de la sensibilité en rendant possible le diagnostic biologique même en cas de culture négative (antibiothérapie débutée avant le prélèvement, incubation trop courte ...).

L'amplification du gène de l'*ARNr 16S* par PCR sur les prélèvements tissulaires ou liquides biologiques issus de sites normalement stériles peut permettre la détection de *Nocardia* (133). En cas de positivité, cette étape de détection sera suivie d'une étape d'identification réalisée par séquençage des amplicons obtenus. Du fait de l'amplification simultanée de tous les ADN bactériens, la technique n'a d'intérêt que si le prélèvement est mono microbien, ainsi elle n'est pas applicable aux prélèvements respiratoires.

Des méthodes plus propres au diagnostic des nocardioses ont également été développées. En 2005, *Couble et al* (134) ont décrit un test permettant une détection rapide de *Nocardia spp* directement à partir d'échantillons cliniques humains. Son efficacité a été confirmée en utilisant 18 échantillons de patients atteints de nocardiose diagnostiqués par des cultures conventionnelles et 20 prélèvements de patients atteints de tuberculose confirmée utilisés comme témoins négatifs. Depuis quelques années, l'OFN propose également ce type d'analyse. Dans les deux cas il s'agit de PCR réalisées à l'aide des amorces spécifiques du genre *Nocardia*, NG1 (5'-ACCGACCACAAGGGGG-3 ') et NG2 (5'-GGTTGTAAACCTCTTTCTGA-3 ') préalablement décrites par *Laurent et al* (109), qui permettent l'amplification d'un fragment de 590 pb du gène de l'*ARNr 16S*. En cas de positivité de la PCR, l'OFN réalise ensuite une étape d'identification par amplification et séquençage de gène *hsp65* (135). Une étude multicentrique a révélé une sensibilité de 88% et une spécificité de 74% pour ce test (135). Cependant, le nombre limité de patients testés implique des études

complémentaires pour permettre une évaluation fiable des performances de l'analyse. Au vu des données actuellement disponibles, un résultat de PCR négatif ne doit pas à lui seul exclure le diagnostic de Nocardiose.

De plus, tout comme lors de l'isolement de *Nocardia* en culture, une PCR positive à *Nocardia* dans les prélèvements respiratoires doit être interprétée en fonction du contexte clinique. Du fait d'une sensibilité augmentée par rapport à la culture, il peut être d'autant plus difficile de différencier une infection d'une colonisation (136). Afin de réduire le risque d'erreurs de diagnostic et l'excès de traitement antibiotique, l'OFN suggère que l'analyse ne soit réalisée sur les prélèvements respiratoires que lors d'un contexte de forte suspicion de nocardiose (135). La réalisation de PCR quantitative, pourrait être une piste à explorer.

Tableau 3: Complexes communément désignés d'espèces de *Nocardia* (11)

Complexe	Base de complexation	Espèces incluses dans le complexe
<b>Complexe de <i>N. abscessus</i></b>	Profil MS MALDI-TOF	<i>N. abscessus</i> , <i>N. arthritidis</i> , <i>N. asiatica</i> , <i>N. beijingensis</i> , <i>N. pneumoniae</i>
	Séquence génique (500 pb d'ARNr 16S)	<i>N. abscessus</i> , <i>N. arthritidis</i> , <i>N. asiatica</i> , <i>N. beijingensis</i>
<b>Complexe de <i>N. nova</i></b>	Séquences géniques (ARNr 16S et / ou <i>secA1</i> )	<i>N. africana</i> , <i>N. aobensis</i> , <i>N. cerradoensis</i> , <i>N. elegans</i> , <i>N. kruczakiae</i> , <i>N. mikamii</i> , <i>N. nova</i> , <i>N. vermiculata</i> , <i>N. veterana</i>
	Schéma de sensibilité aux antibiotiques	<i>N. africana</i> , <i>N. elegans</i> , <i>N. kruczakiae</i> , <i>N. nova</i> , <i>N. veterana</i>
	Profil MS MALDI-TOF	<i>N. africana</i> , <i>N. aobensis</i> , <i>N. elegans</i> , <i>N. kruczakiae</i> , <i>N. nova</i> , <i>N. veterana</i>
<b>Complexe de <i>N. transvalensis</i></b>	Schéma de sensibilité aux antibiotiques	<i>N. blacklockiae</i> , <i>N. transvalensis</i> , <i>N. wallacei</i>
	Séquences géniques (ARNr 16S, <i>secA1</i> )	
	Profil MS MALDI-TOF	
<b>Complexe de <i>N. brevicatena</i> et <i>N. paucivorans</i></b>	Schéma de sensibilité aux antibiotiques	<i>N. brevicatena</i> , <i>N. paucivorans</i>
	Séquences géniques (ARNr 16S, <i>secA1</i> )	
	Profil MS MALDI-TOF	
<b>Complexe de <i>N. otitidiscaviarum</i></b>	Séquences géniques (ARNr 16S, <i>hsp65</i> )	Diverses souches de <i>N. otitidiscaviarum</i>
<b>Complexe de <i>N. cyriacigeorgica</i></b>	Séquence du gène d'ARNr 16S	Diverses souches de <i>N. cyriacigeorgica</i>
<b>Complexe de <i>N. farcinica</i></b>	Séquences géniques (ARNr 16S, <i>secA1</i> )	<i>N. farcinica</i> , <i>N. kroppenstedtii</i>

## VI. Etude de la sensibilité *in-vitro* aux antibiotiques

### 1) Antibiotiques à tester

Le CLSI « Clinical and Laboratory Standard Institute » préconise de tester en première intention (12) : l'amikacine, l'amoxicilline-acide clavulanique, la ceftriaxone, la ciprofloxacine, la clarithromycine, l'imipénème, le linézolide, la minocycline, la moxifloxacine, le triméthoprim-sulfaméthoxazole (TMP-SMX) et la tobramycine. Dans un second temps, peuvent être ajoutés à ce panel : le céfépime, le céfotaxime et la doxycycline.

### 2) Méthode de référence

La méthode actuellement recommandée par la CLSI pour déterminer la sensibilité des actinomycètes aérobies aux antibiotiques, est la microdilution successive en milieu liquide (Bouillon de Muller Hinton II Broth, ajusté en cation) (12).

Tout comme pour les bactéries plus communément rencontrées en routine, la concentration initiale en microorganismes par puits doit être comprise entre  $1,0 \cdot 10^5$  et  $5,0 \cdot 10^5$  UFC/mL. En revanche, la lecture est effectuée après 72h d'incubation à  $35 \pm 2^\circ\text{C}$  en air ambiant. La croissance bactérienne se manifeste alors par la présence de dépôt au fond des puits et/ou par une augmentation de la turbidité visible à l'œil nu. La présence de puits ne contenant aucune substance anti-infectieuse sert de témoin positif. La CMI (concentration minimale inhibitrice) est indiquée par le puits qui contient la plus faible concentration d'antibiotique où aucune croissance n'est visible. Le triméthoprim-sulfaméthoxazole présente une exception à la règle ; la CMI de cet antibiotique correspond, elle, à la plus faible concentration permettant d'inhiber 80% de la pousse bactérienne. La catégorisation clinique des souches testées en « sensible », « résistante » ou « de sensibilité intermédiaire » se fait en comparant la valeur de CMI obtenue, aux valeurs critiques publiées par la CLSI (12).

Des plaques prêtes à l'emploi congelées ou contenant des antibiotiques sous forme lyophilisée sont maintenant disponibles sur le marché (ex : Sensititre<sup>®</sup>) et utilisées par de nombreux laboratoires (137–142).

Une étude visant à évaluer la reproductibilité inter et intra-laboratoire de cette méthode a été menée en 2012 par *Conville et al* (13). Elle a révélé des niveaux de reproductibilité variables selon les espèces et les agents anti-microbiens testés. Les déterminations des CMI de l'amikacine, de la ciprofloxacine, de la clarithromycine, de la moxifloxacine et dans une moindre mesure, de l'amoxicilline / acide clavulanique, du linézolide, de la minocycline et de la tobramycine semblaient reproductibles. En revanche il n'en a pas été de même pour la ceftriaxone, la tigécycline, l'imipénème et les sulfonamides. Les espèces les plus concernées par ces discordances de résultats étaient respectivement : *N.cyriacigeorgica* et *N. wallacei* pour la ceftriaxone, *N. brasiliensis* et *N. cyriacigeorgica* pour la tigécycline et *N. farcinica* et *N.wallacei* pour les sulfonamides.

Le CLSI a également alerté sur la possibilité de l'obtention de résultats faussement résistants à la ceftriaxone (en particulier avec les souches de *N. brasiliensis*) ou à l'imipénème (plus particulièrement avec les souches de *N. farcinica*) (12).

Suite à la publication de plusieurs travaux rapportant un taux de résistance in vitro aux TMP-SMX en augmentation (47,137,143), une étude multicentrique a été menée aux USA et a réfuté cette hypothèse (144). Parmi 552 souches de *Nocardia*, seuls 14 isolats (2,5%) ont été identifiés comme résistants au TMP-SMX et/ou au SMX. Ce résultat est en accord avec le faible nombre de cas de résistance in-vivo rapporté dans la littérature, mais souligne également un manque de fiabilité de cette technique d'antibiogramme.

L'origine du manque de reproductibilité de la méthode de microdilution successive en milieu liquide pour la détermination de la sensibilité aux antibiotiques des bactéries du genre *Nocardia* est probablement multifactorielle.

Pour commencer celle-ci pourrait avoir un lien avec la préparation de l'inoculum. En effet du fait de la présence de formes microbiennes agrégées, il est parfois difficile d'obtenir une suspension homogène permettant une standardisation de l'inoculum. Or une variation de la concentration en micro-organismes est susceptible d'impacter le résultat. Afin de palier au mieux à ce phénomène, le CLSI (12) recommande de préparer une suspension bactérienne lourde, à partir de colonies fraîches prélevées sur gélose au sang ou tryptone soja, puis placées dans un petit volume d'eau stérile ou de NaCl additionné de billes de verre de quelques millimètres de diamètre. Le mélange doit ensuite être vortexé, puis laissé au repos pendant environ 15 min, afin que les plus grosses particules en suspension se déposent au fond. Un inoculum homogène ajusté à 0,5 McFarland pourra ensuite être obtenu grâce à l'ajout progressif de gouttes de surnageant de suspension lourde dans un tube contenant du NaCl ou de l'eau stérile. La solution finale obtenue doit être vortexée et la turbidité vérifiée par néphélométrie. Des techniques similaires sont utilisées par de nombreux laboratoires (13,139,142,145). Une attention particulière devrait être accordée aux souches de *N. brasiliensis* et *N. wallacei*. *Conville et al* (13) ont remarqué que les agglomérats bactériens de ces deux espèces étaient plus difficiles à briser que ceux des espèces telles que *N. cyriacigeorgica*, *N. farcinica* ou *N. nova*, par conséquent la préparation des inoculums était plus délicate et pouvait conduire à des concentrations en micro-organismes dans les puits trop faibles et ainsi impacter la reproductibilité.

De plus, au sein du genre *Nocardia*, il existe une hétérogénéité des caractéristiques de croissance non négligeable. Bien que certaines espèces comme *N. farcinica* poussent relativement rapidement, ce n'est pas le cas de toutes. Afin de ne pas conclure à tort sur la sensibilité d'une souche, il est préférable de ne pas lire l'antibiogramme avant 72h d'incubation. Certaines espèces telles que *N. abscessus* ou *N. Nova* peuvent même nécessiter 24 à 48h d'incubation supplémentaires (13,17,146).

Enfin, l'interprétation des CMI peut être associée à de nombreux pièges techniques et d'interprétation. Il est recommandé que celle-ci soit réalisée par du personnel expérimenté et que des contrôles de qualité soient mis en place.

Il a été démontré que les CMI en TMP-SMX sont particulièrement concernées par ces difficultés de lecture. Il est d'ailleurs maintenant recommandé, pour cet antibiotique, de réaliser en parallèle de la technique de microdilution, une détermination de la sensibilité par diffusion sur milieu solide, à partir de disques. Cette seconde technique serait plus fiable et permettrait de confirmer ou préciser le résultat. Pour une bonne lecture (à 80% d'inhibition), les discrètes zones de croissance entourant le disque doivent être ignorées et la mesure du diamètre de la zone d'inhibition doit se baser sur la marge de croissance la plus évidente (12,13).

### 3) Méthodes alternatives

Toutes bactéries confondues, la diffusion sur gélose à partir de disques imprégnés d'anti-infectieux est la technique d'antibiogramme la plus couramment employée par les laboratoires de microbiologie. Son application au genre *Nocardia* est donc, tant concernant le matériel que la formation du personnel, plus pratique à mettre en place que la microdilution en milieu liquide. Elle est rapide d'exécution, peu coûteuse et permet de tester simultanément de larges panels d'antibiotiques. Néanmoins, la mesure des diamètres des zones d'inhibition autour des disques, mène uniquement à l'obtention qu'une estimation de la CMI. De plus, la Société Française de Microbiologie (SFM) ne fournit, pour la catégorisation clinique des souches, qu'un référentiel de valeurs critiques non spécifiques du genre *Nocardia* (147). La méthode E-TEST est une autre alternative. Réalisée sur gélose à l'aide de bandelettes imprégnées d'un gradient d'antibiotique prédéfini, elle combine les concepts des tests de dilution et de diffusion et permet une quantification des CMI. Ces deux techniques d'antibiogramme sur milieu solide facilitent également la mise en évidence de contamination ou de coexistence de sous populations présentant un profil de résistance différent (17,148). Cependant leur démocratisation est freinée par plusieurs facteurs.

Pour commencer, elles ne permettent pas de s'affranchir des inconvénients inhérents au genre *Nocardia* : tendance des colonies à s'agréger, croissance lente et variable selon les espèces. Les contraintes liées à la préparation de l'inoculum et au temps d'incubation restent donc les mêmes qu'avec la méthode de référence.

De plus, la microdilution en milieu liquide est, à l'heure actuelle, la seule méthode standardisée et approuvée. Les laboratoires employant des méthodes de diffusion sur géloses n'appliquent pas tous un protocole identique. La majorité d'entre eux utilisent des géloses Muller-Hinton et un inoculum homogène ajusté à 0,5 Mc Farland (3,13,14,148,149). Néanmoins, probablement dans le but de booster la croissance des *Nocardia*, d'autres ont recours à des géloses Muller-Hinton additionnées de sang et/ou à un inoculum de 1,0 Mc Farland (145,150,151). Malheureusement, à notre connaissance, aucune étude comparant gélose MH au sang et MH classique n'est actuellement disponible. Il est ainsi difficile de statuer sur l'intérêt de l'utilisation de ce milieu enrichie ainsi que de garantir que celui-ci n'impacte pas le résultat. *Biehle et al* (152) ont constaté que leurs inoculums de 0,5 Mc Farland correspondaient en réalité plus à une teneur de  $10^7$  UFC/mL qu'à la teneur théorique de  $10^8$  UFC/mL. Malgré tout, celle-ci s'est révélée, selon eux, être la plus adaptée. Cette problématique d'effet de taille de l'inoculum a également été soulevée par d'autres travaux et incite à réaliser de plus amples études (149). L'étape de lecture de l'antibiogramme peut également se révéler critique. En effet, la présence de petites colonies isolées au sein de la zone d'inhibition de l'imipénème, de la ciprofloxacine ou encore de l'érythromycine, la ceftriaxone ou l'amoxicilline-acide-clavulanique, a déjà à plusieurs reprises été rapportée, et il n'existe pas de consensus sur leur interprétation (13,148,152).

Enfin, peu d'études comparant technique de référence, méthode des disques et E-TEST ont à l'heure actuelle été menées et leurs résultats sont parfois contradictoires (148,149,152–155). A titre d'exemple, *Biehle et al* (152) et *Ambaye et al* (154) ont trouvé respectivement des accords globaux de 96,2% et 96,6% entre microdilution et E-TEST ; tandis que les travaux menés par *Lowman et al* (149) ont dévoilé la présence de discordances non négligeables entre ces deux méthodes. Les résultats de *Tomlin et al* (148), sont plus mitigés, la méthode E-TEST semblait bien corrélée aux deux autres, cependant des erreurs majeurs (« Very Major Error ») ont été observées pour certains traitements, principalement avec l'imipénème (22%) de même que des erreurs mineures (« minor error ») variant de 2,7% à 50% selon les molécules. Une étude portant plus particulièrement sur l'évaluation de la sensibilité aux carbapénèmes a



révélé des CMI mesurées par méthode en microdilution en milieu liquide supérieures à celles obtenues par E-TEST chez plus de 90% des isolats de *Nocardia* testés (155).

Au vu de ces éléments, tout résultat de sensibilité obtenu à l'aide de technique de diffusion sur gélose, ne correspondant pas au profil de sensibilité attendu (profils variables selon les espèces), devrait faire l'objet d'une vérification.

#### 4) Sensibilité attendue

Les profils de sensibilité *in-vitro* attendus diffèrent selon les espèces de *Nocardia*, ils sont résumés dans le Tableau 4.

Tableau 4: Profils de sensibilité aux antimicrobiens attendus pour les espèces les plus fréquemment isolées.

(Selon le CLSI <sup>(a)</sup> et une revue de la littérature réalisée par the American Society of Transplantation <sup>(b)</sup>)

Espèces	Amox - Clav	Ceftri	Imi	TMP-SMX	LNZ	AMK	Cipro	Moxi	Mino	Tigé	Clar
<i>N. abscessus</i>	S <sup>(a)</sup> (b)	S <sup>(a)</sup> (b)	R <sup>(a)</sup> V <sup>(b)</sup>	S <sup>(a)</sup> (b)	S <sup>(a)</sup> (b)	S <sup>(a)</sup> (b)	R <sup>(a)</sup> (b)	R <sup>(b)</sup>	V <sup>(a)</sup> (b)	S <sup>(b)</sup>	R <sup>(a)</sup> (b)
<b>Complexe <i>N. nova</i></b> <i>N. nova</i> , <i>N. veterana</i> , <i>N. africana</i> , <i>N. kruzakiae</i> , <i>N. elegans</i>	R <sup>(a)</sup> (b)	S <sup>(a)</sup> (b)	S <sup>(a)</sup> (b)	S <sup>(a)</sup> (b)	S <sup>(a)</sup> (b)	S <sup>(a)</sup> (b)	R <sup>(a)</sup> (b)	R <sup>(b)</sup>	V <sup>(a)</sup> (b)	V <sup>(b)</sup>	S <sup>(a)</sup> (b)
<b>Complexe <i>N. transvalensis</i></b> <i>N. transvalensis</i> , <i>N. wallacei</i> <i>N. blacklockiae</i>	V <sup>(a)</sup> (b)	S <sup>(a)</sup> (b)	V <sup>(a)</sup> S <sup>(b)</sup>	S <sup>(a)</sup> (b)	S <sup>(a)</sup> (b)	R <sup>(a)</sup> V <sup>(b)</sup>	S <sup>(a)</sup> (b)	S <sup>(b)</sup>	V <sup>(a)</sup> (b)	X	R <sup>(a)</sup> (b)
<i>N. farcinica</i>	S <sup>(a)</sup> V <sup>(b)</sup>	R <sup>(a)</sup> (b)	V <sup>(a)</sup> (b)	S <sup>(a)</sup> V <sup>(b)</sup>	S <sup>(a)</sup> (b)	S <sup>(a)</sup> (b)	S <sup>(a)</sup> V <sup>(b)</sup>	S <sup>(b)</sup>	V <sup>(a)</sup> (b)	R <sup>(b)</sup>	R <sup>(a)</sup> (b)
<i>N. cyriaci-georgica</i>	R <sup>(a)</sup> V <sup>(b)</sup>	S <sup>(a)</sup> (b)	S <sup>(a)</sup> V <sup>(b)</sup>	S <sup>(a)</sup> (b)	S <sup>(a)</sup> (b)	S <sup>(a)</sup> (b)	R <sup>(a)</sup> (b)	V <sup>(b)</sup>	V <sup>(a)</sup> (b)	V <sup>(b)</sup>	R <sup>(a)</sup> (b)
<i>N. brasiliensis</i>	S <sup>(a)</sup> (b)	V <sup>(a)</sup> (b)	R <sup>(a)</sup> (b)	S <sup>(a)</sup> (b)	S <sup>(a)</sup> (b)	S <sup>(a)</sup> (b)	R <sup>(a)</sup> (b)	V <sup>(b)</sup>	S <sup>(a)</sup> V <sup>(b)</sup>	S <sup>(b)</sup>	R <sup>(a)</sup> (b)
<i>N. pseudobrasiliensis</i>	R <sup>(a)</sup>	V <sup>(a)</sup>	R <sup>(a)</sup>	S <sup>(a)</sup>	S <sup>(a)</sup>	S <sup>(a)</sup>	S <sup>(a)</sup>	X	R <sup>(a)</sup>	X	S <sup>(a)</sup>
<i>N. otitidiscaviarum</i>	R <sup>(a)</sup> (b)	R <sup>(a)</sup> (b)	R <sup>(a)</sup> (b)	S <sup>(a)</sup> (b)	S <sup>(a)</sup> (b)	S <sup>(a)</sup> (b)	S <sup>(a)</sup> V <sup>(b)</sup>	V <sup>(b)</sup>	V <sup>(a)</sup> (b)	X	V <sup>(a)</sup> (b)

**Abréviations:** Amox – Clav : Amoxicilline-acide clavulanique ; Ceftri : Ceftriaxone ; Imi : Impipénème ; TMP-SMX : Triméthoprime-sulfaméthoxazole ; LNZ : Linézolide ; AMK : Amikacine ; Cipro : Ciprofloxacine ; Moxi : Moxifloxacine ; Mino : minocycline ; Tigé : Tigécycline  
Clar : Clarithromycine ; S : Sensible ; R : Résistant ; V : Variable ; X : indéterminée.

(a) Woods, GL et al 2011

(b) Restrepo, A et al 2019

## VII. Traitement

L'antibiothérapie est la composante principale du traitement de la nocardiose. En fonction de la situation, elle peut être associée à une prise en charge chirurgicale, notamment en cas de présence d'abcès profond de taille importante ou d'échec du traitement médicamenteux. Dans certains cas, une réduction de l'immunosuppression peut également être envisagée (4,5).

Le choix de l'antibiothérapie doit être réalisé en tenant compte de la gravité de la maladie, du ou des sites de l'infection, mais aussi du risque potentiel de survenue d'effets indésirables et d'interactions médicamenteuses. En raison de la variabilité interspécifique mais aussi intraspécifique de la sensibilité aux anti-infectieux des souches de *Nocardia*, il doit également être adapté au diagnostic d'espèce et aux résultats de l'antibiogramme. Cependant, au vu du délai souvent important nécessaire aux laboratoires pour obtenir des résultats fiables, et du taux de mortalité élevé pouvant être associé à cette pathologie, l'instauration d'un traitement probabiliste est fréquemment nécessaire (4,5).

La majorité des recommandations disponibles dans la littérature traitant de la prise en charge des nocardioses concernent les patients immunodéprimés, et plus particulièrement les patients ayant subi une transplantation d'organe (4,5). Selon les dernières recommandations publiées en 2019 par *the American Society of Transplantation* (5), seuls six antibiotiques possèdent un spectre d'action suffisant pour pouvoir être intégrés aux protocoles de traitement probabiliste. Il s'agit du cotrimoxazole, de l'imipénème, de l'amikacine, du linézolide, de la ceftriaxone et du céfotaxime (Tableau 5). Aucune étude clinique comparative n'a défini la classe d'antibiotique la plus appropriée, mais depuis les années 1940 les sulfamides sont les plus largement utilisés. L'association triméthoprime-sulfaméthoxazole s'est avérée présenter une synergie *in-vitro* sur la plupart des espèces de *Nocardia* et a démontré son efficacité clinique. Ce médicament atteint une concentration tissulaire élevée, y compris au niveau cérébrale, pulmonaire, cutané et osseux. Il peut être prescrit en monothérapie pour le traitement des nocardioses pulmonaires stables ou des nocardioses cutanées primaires (4,5). Cependant, il possède des propriétés bactériostatiques et non bactéricides, et des cas de résistances *in-vitro* ont

déjà à plusieurs reprises été décrits. Ainsi, en cas de forme grave ou instable de la maladie, d'atteinte disséminée, ou d'immunodépression importante il est préférable d'avoir recours à une combinaison d'antibiotiques (4,5). *The American Society of Transplantation* recommande dans ces cas l'utilisation d'une combinaison de trois antibiotiques parmi ceux précédemment cités, de manière à pouvoir diminuer rapidement la charge bactérienne et faire face à un maximum de profils de sensibilité différents. L'association imipénème / amikacine / cotrimoxazole est particulièrement recommandée. Les patients receveurs d'organes sont généralement poly-médiqués et les effets indésirables des traitements immunosuppresseurs et des antibiotiques peuvent se chevaucher. Par exemple, l'association d'un traitement par anti-calcineurine, à la prise de cotrimoxazole ou d'amikacine augmente le risque de néphrotoxicité (4,5). Le linézolide peut dans cette situation être une option thérapeutique à prendre en considération. Ce dernier présente *in-vitro* une excellente activité contre toutes les espèces de *Nocardia*. Différentes études rapportent également un taux de succès important *in-vivo*. Néanmoins son emploi est limité par la neurotoxicité et l'hématotoxicité dont il est fréquemment responsable en cas de traitement prolongé (4,5).

D'autres molécules antibiotiques peuvent également être utilisées. Cependant, en raison d'une part de la variabilité de leur activité *in-vitro*, sur les différentes espèces de *Nocardia* et d'autre part, d'une plus faible quantité de données étayant leur efficacité *in vivo*, il est préférable qu'elles ne soient administrées qu'après obtention des résultats de l'antibiogramme ou en cas d'échec des thérapies de première intention. Les plus citées dans la littérature sont : l'amoxicilline/Acide clavulanique, les fluoroquinolones (principalement la ciprofloxacine et la moxifloxacine), les macrolides, les tétracyclines (principalement la minocycline et la tigécycline) et le méropénème (5). *In-vitro*, ce dernier est généralement moins actif sur *N. farcinica* et le complexe *N.nova*, que l'imipénème, mais plus efficace sur des espèces telles que : *N. brasiliensis*, *N. abscessus*, *N. transvalensis* et *N. otitidiscaviarum*. Il doit être préféré à l'ertapénème, moins actif sur ce type de bactérie. Les traitements par minocycline sont à éviter chez la femme enceinte et l'enfant de moins de 8 ans en raison des toxicités osseuse et dentaire (4,5).

Tableau 5: Antibiotiques utilisables en probabliste lors de la prise en charge d'une nocardiose

	Posologie (a)	Diffusion dans le SNC	Principaux Effets indésirables	Espèces à risque de résistance (b)
<b>Triméthoprime Sulfaméthoxazole = Cotrimoxazole</b>	15 mg/kg/j, IV ou PO (En 3-4 doses fractionnées) <u>Taux sérique cible</u> : 100-150 µg/mL	OUI	- Troubles digestifs - Myélotoxicité - Néphrotoxicité - lithiase urinaire	- <i>N. farcinica</i> - <i>N. pseudobrasiliensis</i> - <i>N. otitidiscaviarum</i>
<b>Amikacine</b>	10-15 mg/kg/j	OUI	- Néphrotoxicité - Ototoxicité	- <i>N. transvalensis</i>
<b>Imipénème</b>	500 mg, IV, toutes les 6h	OUI	- Abaissement du seuil épileptogène	- <i>N. brasiliensis</i> - <i>N. abscessus</i> - <i>N. otitidiscaviarum</i>
<b>Ceftriaxone</b>	2g, IV, toutes les 12h	OUI	- Néphrotoxicité	- <i>N. farcinica</i> - <i>N. pseudobrasiliensis</i> - <i>N. otitidiscaviarum</i> - <i>N. transvalensis</i>
<b>Céfotaxime</b>	2g, IV, toutes les 8h			
<b>Linézolide</b>	600 mg, PO ou IV toutes les 12h	OUI	- Myélotoxicité - Neurotoxicité - Acidose lactique	Excellente activité contre toutes les espèces de <i>Nocardia</i>

Sources : (4,5)

(a) Posologies conseillées par *The American society of transplantation*. Une adaptation à la fonction rénale peut être nécessaire.

(b) Basée sur sensibilité *in-vitro*

Une amélioration clinique est généralement observable dès la première semaine de traitement. Néanmoins, compte tenu du risque important de récurrence des infections à *Nocardia*, l'antibiothérapie doit être prolongée. La durée optimale du traitement est inconnue, son choix est adapté au cas par cas et doit prendre en considération le type d'atteinte, le terrain du patient (notamment l'origine et le niveau de son immunodépression) et sa réponse au traitement (5). Une résolution des lésions radiographiques doit également être observée avant arrêt. *The American Society of Transplantation* recommande chez le patient receveur d'organe une antibiothérapie d'une durée minimum de : 6 mois en cas d'atteinte pulmonaire, 9 mois en cas de forme disséminée et 12 mois en cas de forme cérébrale. La voie parentérale est à privilégier au cours des deux premières semaines de traitement, puis un relai per os peut, en fonction de l'évolution clinique et des résultats microbiologiques, être envisagé (4).

En lien avec des difficultés liées à l'interprétation de la présence de *Nocardia* dans les prélèvements respiratoires des patients immunocompétents présentant une pathologie pulmonaire sous-jacente, ainsi qu'en raison de l'absence de recommandations officielles, il existe, concernant leur prise en charge clinique, une grande hétérogénéité des pratiques. Après étude rétrospective d'une série de cas, *Rodriguez-Nava et al* (75) ont proposé des lignes directrices pour la prise en charge des patients atteints de mucoviscidose. En l'absence de projet de transplantation pulmonaire ou d'instauration de traitement immunosuppresseur, le choix de la mise en place ou non d'une antibiothérapie adaptée doit se baser sur la clinique et la présence ou non de co-infection. La persistance dans le temps d'une colonisation respiratoire même asymptomatique, doit inciter à initier une antibiothérapie.

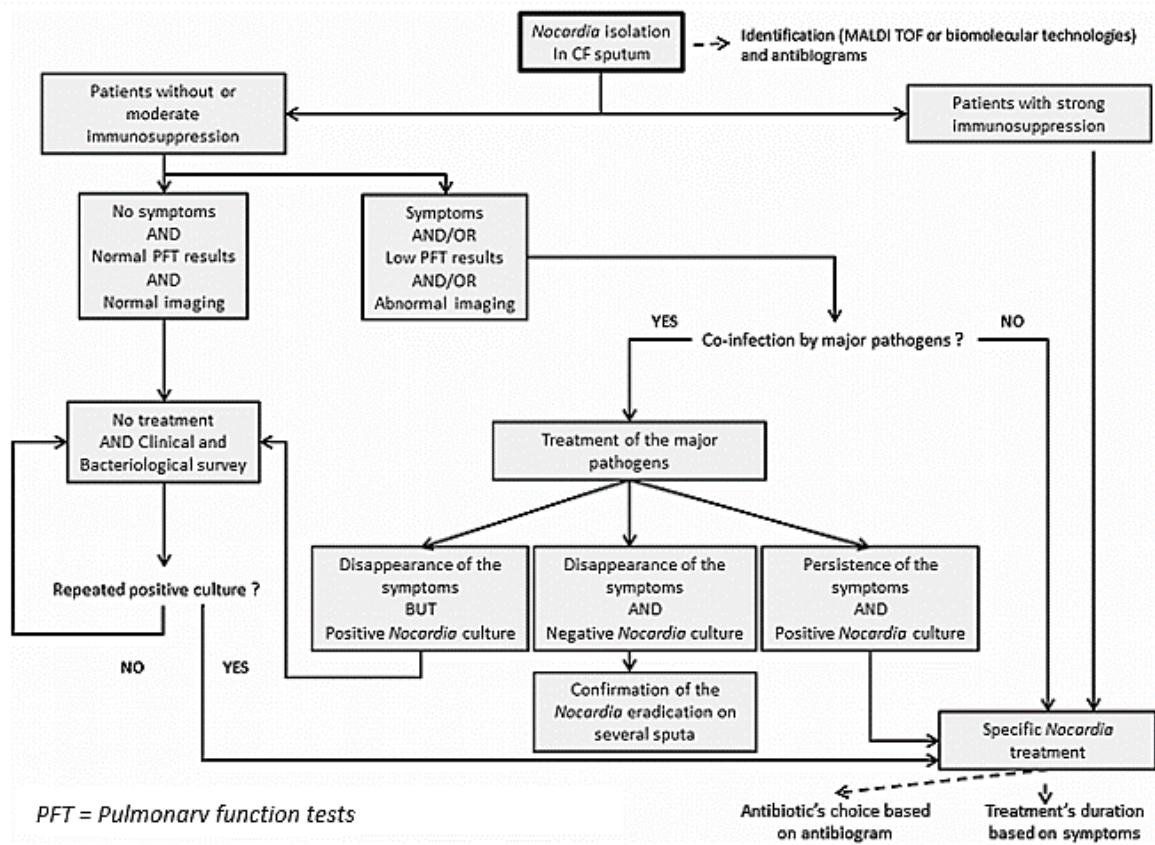


Figure 11 : Lignes directrices proposées pour la prise en charge des infections à *Nocardia* chez le patient atteint de mucoviscidose (75)

## PARTIE B

### I. Protocoles appliqués au laboratoire de microbiologie (IHU, AP-HM)

#### 1) Mise en évidence de *Nocardia* par culture bactérienne

La culture bactérienne est la principale méthode permettant la mise en évidence de la présence de *Nocardia* dans un échantillon clinique.

- Conditions de culture

Après réception au laboratoire, les prélèvements sont, en fonction de leur nature et de la prescription associée, ensemencés en parallèle sur différents milieux de culture, puis incubés dans des conditions prédéfinies. Parmi ces différentes conditions de culture, les plus adaptées à la mise en évidence de bactéries du genre *Nocardia* sont résumées dans la Figure 12. Les géloses « PVX » et « ANC » sont fréquemment utilisées en biologie médicale et sont propices à la croissance de ce type de germe. Elles correspondent respectivement à un milieu d'isolement non sélectif, enrichi ; et à un milieu rendu sélectif des bactéries à Gram positif. Les prélèvements dits « nobles » regroupent les biopsies (pulmonaires, cérébrales, cutanées ...), les liquides pleuraux, liquides péritonéaux ainsi que toutes autres catégories de prélèvements profonds. Ils sont de manière générale gardés en culture plus longtemps que les prélèvements superficiels. Les échantillons respiratoires (ECBC, aspirations bronchiques, LBA) sont par défaut incubés pendant 48h ; cependant en cas de pathologie pulmonaire chronique sous-jacente (mucoviscidose, BPCO ...), la durée d'incubation est prolongée à 5 jours.



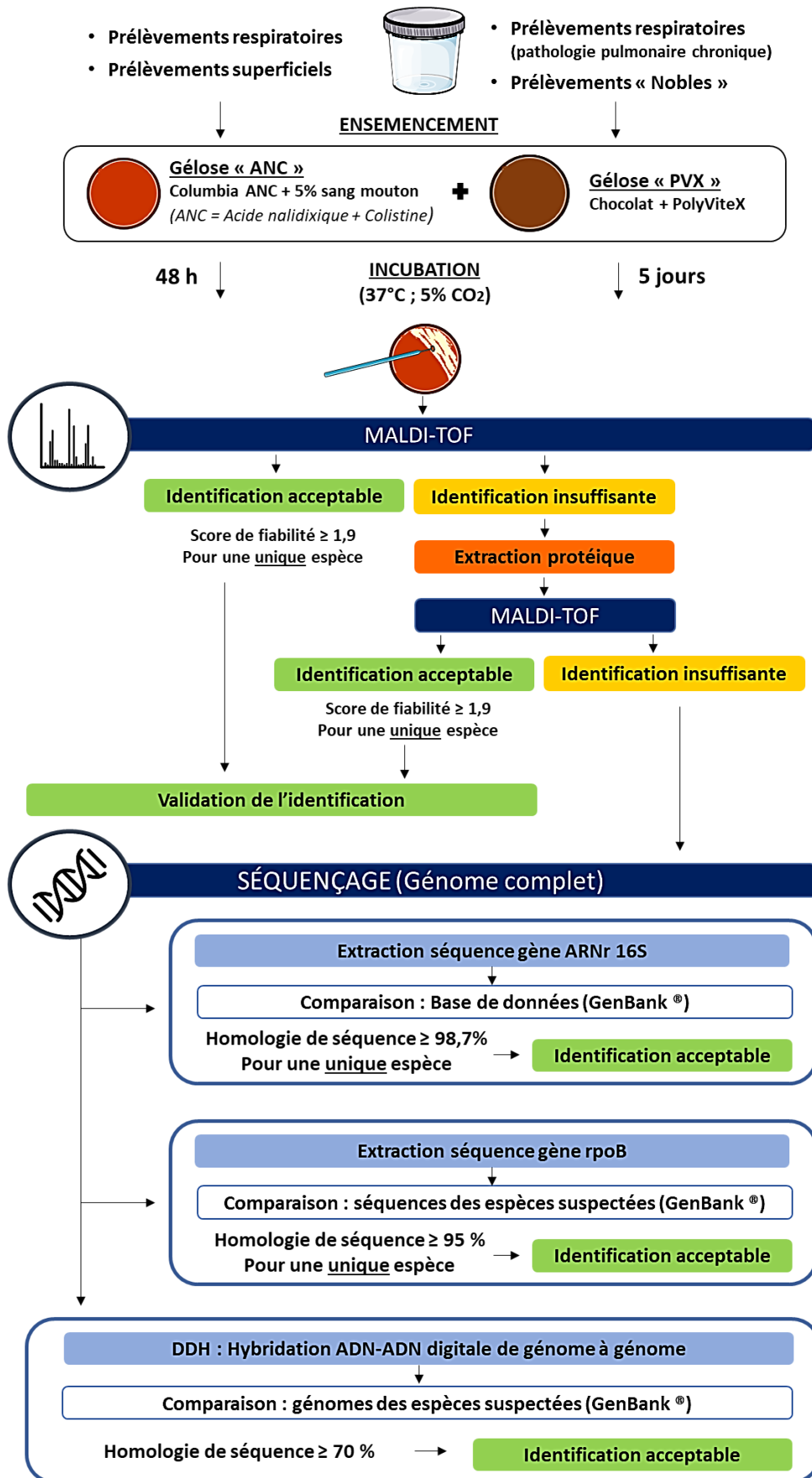


Figure 12: Conditions de culture et stratégie d'identification bactérienne

- Identification

La stratégie actuellement appliquée au laboratoire pour l'identification des isolats bactériens est résumée dans la Figure 12. La spectrométrie de masse (Système MALDI Biotyper<sup>®</sup>) est utilisée en première intention. Le mode de dépôt « en couche mince », aussi appelé « dépôt direct » en lien notamment avec sa rapidité d'exécution, est utilisé par défaut. Si malgré plusieurs essais aucune identification acceptable n'est obtenue, une étape d'extraction protéique peut être ajoutée au procédé. Deux protocoles d'extraction différents peuvent alors être appliqués (une extraction protéique rapide ou une autre plus complète), ils sont détaillés dans l'annexe N°1. La base de données MALDI-TOF de notre laboratoire est régulièrement incrémentée par des « mises à jour fabricant » ainsi que par les spectres de bactéries nouvellement décrites. Elle comporte actuellement un total de 129 spectres de *Nocardia* appartenant à 54 espèces différentes (Annexe 2). Grâce aux progrès des technologies de biologie moléculaire, le séquençage est aujourd'hui plus rapide, moins coûteux et ainsi plus adapté aux activités de routine des laboratoires que dans le passé. En cas d'échec répétés de l'identification d'une bactérie par MALDI-TOF, la stratégie actuelle appliquée à l'IHU est le séquençage du génome entier du germe. Sont ensuite réalisées en parallèle :

- une comparaison de la séquence du gène 16s à celles présentes dans la base de données GenBank<sup>®</sup> ;
- une comparaison de la séquence du gène rpoB à celles des espèces suspectées ;
- ainsi qu'une hybridation ADN-ADN *in silico* de génome à génome (<https://tygs.dsmz.de/>) garantissant la fiabilité du résultat final.

- Détermination de la sensibilité in vitro aux antibiotiques

En cas d'isolement de *Nocardia*, la réalisation d'un antibiogramme est systématique. Celui-ci est réalisé par méthode de diffusion sur gélose à partir de disques ou de bandelettes E-TEST. Un inoculum bactérien ajusté à 0,5 Mc Farland est préparé à partir des colonies fraîchement isolées, au moyen d'une petite quantité de NaCl, d'une oëse et d'un néphélomètre dont la calibration est vérifiée en amont. Puis des milieux de

culture solides, de type Muller-Hinton (MHE) ou Muller-Hinton additionnés de sang (MHF), sont ensemencés de manière uniforme par écouvillonnage en strie serré sur trois directions. La lecture est effectuée après 24h d'incubation (37°C ; 5% CO<sub>2</sub>). Cependant, si aucune croissance bactérienne n'est visible, les géloses sont replacées à l'étuve et de nouveau examinées toutes les 24h jusqu'à ce qu'une pousse bactérienne soit visible. Les valeurs seuils utilisées pour l'interprétation des diamètres d'inhibition et des CMI sont respectivement celles de la Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie (CASFM) 2013 et celles de la CLSI (12).

Le choix des molécules à tester en première intention ainsi que des géloses utilisées a évolué à plusieurs reprises au cours des dernières années. Les molécules actuellement testées en première intention sont listées dans le Tableau 6. Néanmoins, d'autres molécules peuvent, à l'initiative du biologiste ou à la demande du clinicien être ajoutées au panel.

*Tableau 6 : Panel d'antibiotiques actuellement testés en première intention*

Antibiotique	Milieu	Méthode
Amoxicilline	MHF	Disque
Amoxicilline + acide clavulanique	MHF	Disque
Imipénème	MHF	E-TEST
Ertapénème	MHF	Disque
Méropénème	MHF	Disque
Triméthoprim+ sulfaméthoxazole	MHE	Disque
Vancomycine	MHF	Disque
Linézolide	MHF	Disque
Amikacine	MHF	Disque
Doxycycline	MHF	Disque
Tigécycline	MHF	E-TEST
Minocycline	MHF	E-TEST
Ciprofloxacine	MHF	Disque
Métronidazole	MHF	Disque
Fosfomycine	MHF	Disque
Clindamycine	MHF	Disque

## 2) Mise en évidence de *Nocardia* par biologie moléculaire

La réalisation d'une PCR dite « universelle bactérienne » peut également, dans certaines conditions être proposée (ex : biopsie d'abcès cérébral avec culture conventionnelle négative). Elle est basée sur l'amplification par PCR du gène *16S* au moyen d'amorces ciblant des régions communes à toutes les bactéries. En cas de positivité, le gène est ensuite séquencé pour permettre une identification.

Une PCR ciblant spécifiquement *N. farcinica* est également disponible au laboratoire. Elle est réalisable sur demande.

## II. Epidémiologie des cas de nocardiose (2014-2020, AP-HM)

### 1) Matériels et méthodes

- Population étudiée et considérations éthiques

Nous avons réalisé une étude rétrospective de l'épidémiologie des cas nocardiose, ou de colonisation respiratoire par *Nocardia*, diagnostiqués au sein des hôpitaux universitaires de Marseille (AP-HM), entre janvier 2014 et juillet 2020.

Conformément à la réglementation portant sur les recherches n'impliquant pas la personne humaine (recherche sur données existantes), cette étude a été déclarée et enregistrée sous le numéro PADS20-293 par l'Assistance Publique des Hôpitaux de Marseille.

- Données microbiologiques

La liste des patients concernés et les données microbiologiques, ont été obtenues grâce au logiciel interne au laboratoire. Nous avons récupéré pour chaque patient : la date et la nature des prélèvements, leur âge au moment du diagnostic, leur sexe, l'espèce isolée, la méthode d'identification utilisée (MALDI-TOF +/- biologie moléculaire : 16S et/ou NGS), et les résultats de l'antibiogramme. Lorsque plusieurs antibiogrammes étaient disponibles, seul le premier a été pris en compte pour l'analyse.

- Facteurs de risques

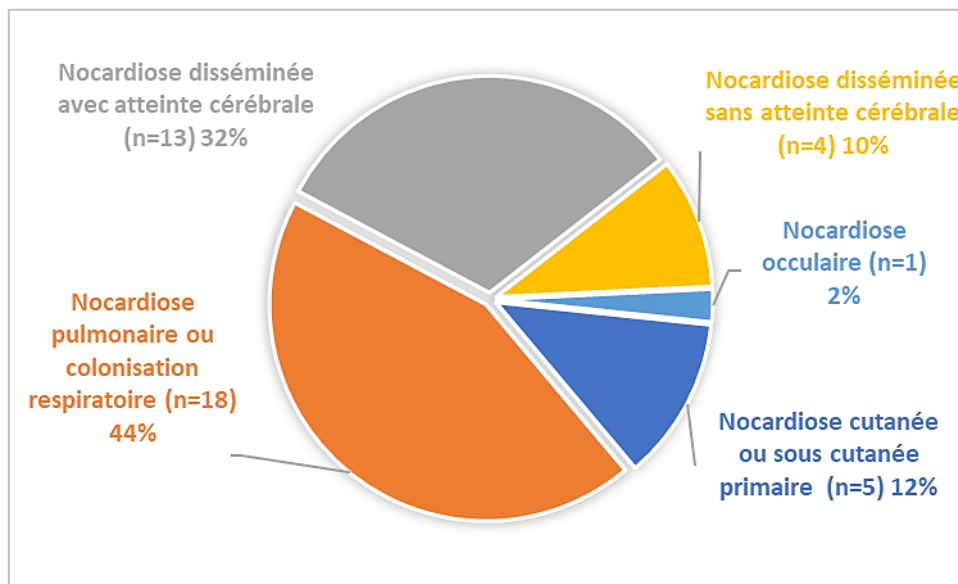
Les données cliniques et antécédents des patients ont été obtenus à partir de leurs dossiers médicaux informatisés. Nous nous sommes principalement concentrés sur la recherche de cause évidente d'immunodépression (transplantation d'organe solide, greffe de cellules souches hématopoïétique, présence de comorbidité impliquant la prise de traitements immunosuppresseurs, néoplasie, déficit immunitaire primitif, infection par le VIH ...) ainsi que sur la présence de pathologie pulmonaire sous-jacente. Lorsqu'aucun de ces deux facteurs de risque n'était présent, les dossiers médicaux ont été analysés de manière plus approfondies (recherche d'autres comorbidités, examen des bilans biologiques ...).

## 2) Résultats

Durant la période étudiée, 49 souches de *Nocardia* ont été isolées à partir de prélèvements cliniques dans notre laboratoire. 8 souches provenant de laboratoires extérieurs, adressées uniquement pour identification d'espèce et/ou réalisation d'antibiogramme ont été exclues. Les 41 souches restantes correspondaient à 41 patients ayant reçu un diagnostic de nocardiose ou de colonisation respiratoire par *Nocardia* au cours de leur prise en charge à l'AP-HM. Ces patients provenaient majoritairement des services de pneumologie (n=16), transplantés rénaux (n=5) et neurochirurgie (n=9).

- Répartition des espèces et types de nocardiose

Les présentations cliniques étaient dominées par des formes pulmonaires (18 patients, 44%) comprenant : nocardiose pulmonaire au sens strict et colonisation respiratoire ; puis par des formes disséminées (17 patients, 42%), dont plus de 75% avec atteinte cérébrale (13 patients) (Figure 13). Les formes cutanées ne représentaient que 5 patients, soit une fréquence plus de deux fois inférieure (12%). Enfin, un cas de nocardiose oculaire a été diagnostiqué, à la suite de l'isolement de *Nocardia* sur un prélèvement de cornée.



*Figure 13: Répartition des types de nocardiose (en %)*

Les diagnostics de nocardiose cutanée ont été obtenus grâce à des prélèvements de type : biopsie, prélèvements d'abcès, ou plus rarement d'écouvillonnage de plaie. La réalisation d'un bilan d'extension ne retrouvant pas d'autre atteinte était précisée dans deux dossiers médicaux. Les lésions étaient majoritairement localisées au niveau des membres supérieurs (4/5 patients) (mains, poignet, bras, épaules) ; un nouveau-né présentait des lésions au niveau du flanc. Deux patients rapportaient un lien temporel entre survenue de l'atteinte et piqure de rosier, ou irritation cutanée au contact de plantes grasses. La présence de *Nocardia* au niveau pulmonaire était majoritairement mise en évidence au moyen de prélèvements respiratoires (ECBC, LBA ...), et occasionnellement après réalisation de biopsie pulmonaire ou de ponction de liquide pleural. L'absence de localisation secondaire était précisée dans 3 cas sur 18. Les atteintes du système nerveux central (SNC) diagnostiquées par culture ont toutes été confirmées par isolement de la bactérie sur biopsie cérébrale. Pour l'un des patients, celle-ci a été mise en évidence dans les suites de la réalisation d'un bilan d'extension, après découverte d'une infection articulaire à *Nocardia*. Dans 5 cas sur 13, l'existence d'une imagerie thoracique compatible avec une atteinte pulmonaire concomitante était précisée dans le dossier médical. L'un de ces patients présentait aussi une lésion rénale visible à l'imagerie ainsi qu'une hémoculture positive. Les diagnostics de nocardiose disséminée sans atteinte cérébrale (4 patients) ont été

établis pour 3 patients (P-7, P-32 et P-33) en s'appuyant sur l'objectivation de la présence de *Nocardia* sur prélèvements cutanés ou sous cutanés, associée à une imagerie thoracique compatible avec une atteinte pulmonaire. Pour le dernier patient (P-5), le germe a été retrouvé à la fois sur prélèvement respiratoire et sur hémoculture.

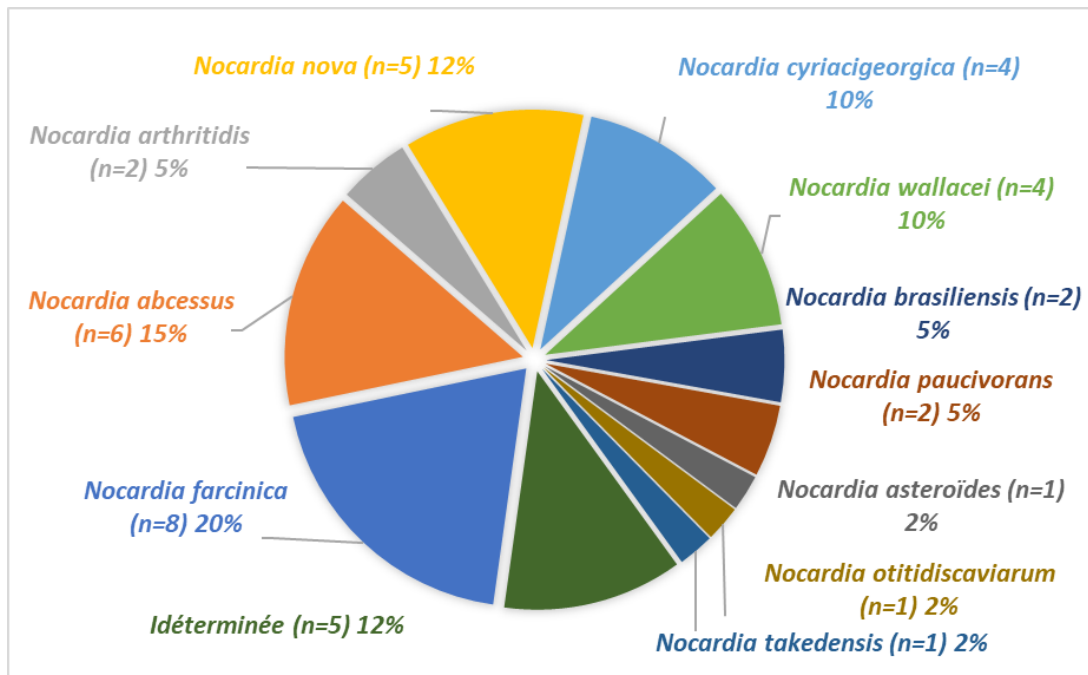


Figure 14: Répartition globale des espèces (en %)

Les espèces les plus fréquemment identifiées au cours de cette période sont *N. farcinica* (19,5%), les espèces appartenant au complexe *N. abscessus* (*N. abscessus* au sens stricte, *N. arthritis*) (19,5%), *N. nova* (12,2%), *N. cyriacigeorgica* (9,8%) et *N. wallacei* (9,8%), (Figure 14).

Pour 4/41 souches, l'identification d'espèce n'a pas été réalisée. Une souche n'avait pas pu être identifiée par MALDI-TOF et était en cours de séquençage au moment de la réalisation de notre recueil de données. Neuf des 36 souches restantes ont été identifiées par MALDI-TOF uniquement ; pour les 27 autres, l'espèce a été déterminée ou confirmée par biologie moléculaire (16S et/ou NGS).

La répartition des différentes espèces en fonction du type clinique de nocardiose est présentée dans le Tableau 7. *N. farcinica* (n=4/13) et *N. abscessus* (n=4/13) étaient les deux espèces les plus fréquemment associées aux formes cérébrales de la maladie. A

noter que *N. wallacei* n'a été retrouvée qu'à partir de prélèvements respiratoires et que tous provenaient de patients atteints de mucoviscidose.

Tableau 7: Répartition des espèces en fonction du type de nocardiose

	Cutanée (ou sous-cutanée) primaire	Pulmonaire ou colonisation respiratoire	Disséminée avec atteinte cérébrale	Disséminée sans atteinte cérébrale	Oculaire	total
<i>Nocardia farcinica</i>		2	4	1	1	8
<i>Nocardia abscessus</i>		2	4			6
<i>Nocardia arthritidis</i>			2			2
<i>Nocardia nova</i>	2	2	1			5
<i>Nocardia cyriacigeorgica</i>		3		1		4
<i>Nocardia wallacei</i>		4				4
<i>Nocardia brasiliensis</i>	1		1			2
<i>Nocardia paucivorans</i>	1		1			2
<i>Nocardia asteroides</i>				1		1
<i>Nocardia otitidiscaviarum</i>		1				1
<i>Nocardia takedensis</i>				1		1
Indéterminée	1	4				5
Total	5	18	13	4	1	41

- Etude des facteurs de risque

Au total, la présence d'au moins un facteur de risque de type immunodépression ou pathologie pulmonaire sous-jacente a été retrouvé chez 82,9% (34/41) des patients. Une ou plusieurs causes d'immunodépression étaient présentes chez près de la moitié d'entre eux (46,3%, 19/41). Onze présentaient un antécédent de transplantation d'organe solide : rénale (n=5), pulmonaire (n=3), cardiaque (n=2), cardio-pulmonaire (n=1). Ils recevaient un traitement par anti-calcineurine (tacrolimus, ciclosporine), associé la plupart du temps à des corticoïdes (10/11) ainsi qu'à des anti-métabolites (azathioprine, mycophénolate mofétil, mycophénolate de sodium) (9/11). La nocardiose est survenue au cours des 18 mois suivants le geste chirurgical chez 6 patients. Pour 4 autres, elle n'est apparue que plus de 4 ans plus tard. Pour le dernier patient, le délai était de 21 mois, cependant la notification dans son dossier médical d'un rejet aigue 13 mois auparavant peut expliquer ce délai intermédiaire. Plusieurs



autres pathologies impliquant également la prise de corticoïdes par voie orale ont pu être identifiées. Il s'agissait de polyarthrite rhumatoïde (dont une secondaire à un traitement par nivolumab, traitée également par méthotrexate), d'une maladie de Crohn, d'une anémie hémolytique auto-immune compliquant un lymphome, d'une pneumopathie cryptogénique et d'une insuffisance respiratoire chronique sur dilatation des bronches. Deux patients avaient reçu récemment une cure de chimiothérapie dans le cadre de la prise en charge, respectivement, d'un lymphome de la zone marginale et d'un carcinome épidermoïde avec métastases cérébrales. De façon intéressante, un cas d'infection cutanée est survenu chez un nourrisson d'un mois (P-29) traité par eculizumab pour un syndrome hémolytique et urémique atypique néonatal. Deux patients présentaient une immunodépression ne pouvant être reliée à la prise de traitement immunosuppresseur. L'un souffrait d'une récurrence d'hémopathie maligne, à l'origine d'une pancytopenie. L'autre était atteint depuis 17 ans par le VIH, en rupture de traitement depuis environ 4 ans, et présentait un taux de lymphocyte TCD4 à 332 CD4/mm<sup>3</sup> et une charge virale importante à 20 123 600 copies/mL. A noter que certains patients cumulaient plusieurs causes d'immunodépression. C'est le cas du patient P-25 présentant à la fois un antécédent de greffe pulmonaire, une agammaglobulinémie congénitale et une maladie de Crohn.

*Tableau 8: Etude des facteurs de risques*

<b><u>Caractéristiques générales (n= 41)</u></b>	
Age : moyenne ; médiane (années)	51,1 ; 55
Ecart-type (années)	22
Age : min ; max	1 mois ; 93 ans
Sexe ratio (H/F)	0,95 (20/21)
<b><u>Terrain à risque</u></b>	
Présence d'au moins un facteur de risque (Immunodépression et/ou pathologie pulmonaire sous-jacente et/ou lien un traumatisme <sup>(1)</sup> et/ou port de lentille de contact <sup>(2)</sup> )	<b>35</b>
Absence de facteur de risque évident	<b>6</b>
<b><u>Immunodépression</u></b>	<b>19</b>
<b><u>Prise de traitements immunosuppresseurs</u></b>	<b>17</b>
▪ Corticoïdes	<b>15</b>

▪ Anti-calcineurines	11
▪ Corticoïdes + anti-calcineurines	10
▪ Anti-métabolites	9
▪ Chimiothérapie anti-cancéreuse	2
▪ Autre	2
<b><u>Pathologies en lien avec la prise d'immunosuppresseurs</u></b>	<b>17</b>
▪ <b>Transplantation d'organe solide</b>	<b>11</b>
- Transplantation rénale	5
- Transplantation pulmonaire	4
- Transplantation cardiaque	3
<b>Délai : transplantation – diagnostic nocardiose</b>	<b>&lt;1 mois ; 18 ans</b>
- Délai ≤ 18 mois	6
- Délai ≥ 4 ans	4
▪ <b>Atteintes auto-immunes</b>	<b>4</b>
▪ <b>Néoplasie en cours de traitement</b>	<b>2</b>
▪ <b>Autre</b>	<b>3</b>
<b><u>Immunodépression non iatrogène</u></b>	<b>3</b>
▪ Néoplasie	1
▪ VIH	1
▪ Déficit immunitaire primaire	1
<b><u>Pathologie pulmonaire sous-jacente</u></b>	<b>23</b>
▪ Mucoviscidose	9
▪ Dilatation des bronches (DDB)	5
▪ Transplantation pulmonaire	4
▪ BPCO	2
▪ Autre	6

(1) Pour les formes (sous) cutanées primaires ou oculaires

(2) Pour les formes oculaires

La présence de pathologie pulmonaire sous-jacente était mentionnée dans 65% (23/35) des dossiers médicaux des patients souffrant de forme invasive de la maladie ou de colonisation respiratoire (exclusion des formes cutanées et oculaires primaires pour lesquelles la porte d'entrée du germe n'est pas respiratoire). Ce taux était proche

de 100% dans le groupe des patients atteints de formes localisées au niveau pulmonaire (17/18) (Tableau 9). Le seul patient non concerné était un homme d'origine géorgienne, dont la liste des antécédents rapportée au médecin pourrait ne pas être exhaustive, décédé avant même que le diagnostic de nocardiose ne soit connu.

Les pathologies citées (Tableau 8) étaient principalement la mucoviscidose (n=9), les dilatations des bronches (DDB) (n=5), la BPCO (n=2) ; mais aussi les bronchites chroniques, et les antécédents de tuberculose ou de néoplasie pulmonaire. Quatre patients présentaient des antécédents d'insuffisance respiratoire sévère ayant nécessité la réalisation de transplantations pulmonaires.

*Tableau 9: Répartition du type de nocardiose en fonction du statut immunitaire et de la présence ou non de pathologie pulmonaire sous-jacente*

Type d'atteinte	Immunodépression		Pathologie pulmonaire	
	NON	OUI	NON	OUI
<b>Non disséminée</b>	<b>15<sup>(1)</sup></b>	<b>8<sup>(1)</sup></b>		
Cutanée ou sous cutanée primaire (n=5)	1	4		
Oculaire (n=1)	(1)	(1)		
Pulmonaire ou colonisation respiratoire (n=18)	14	4	(2)	17 <sup>(2)</sup>
<b>Disséminée</b>	<b>6</b>	<b>11</b>	<b>11</b>	<b>6</b>
Avec atteinte cérébrale (n=13)	6	7	9	4
Sans atteinte cérébrale (n=4)	0	4	2	2
<b>Total</b>	<b>21<sup>(1)</sup></b>	<b>19<sup>(1)</sup></b>	<b>11<sup>(2)</sup></b>	<b>23<sup>(2)</sup></b>

(1) Le statut immunitaire de la patiente P-31 atteinte de nocardiose oculaire n'était pas précisé

(2) Le patient P-26 était immunodéprimé (tricytopenie) et présentait une nocardiose pulmonaire, cependant ses antécédents étaient inconnus.

Le Tableau 9 offre une vue d'ensemble sur la répartition des types de nocardiose en fonction des facteurs de risque présents. Ainsi 21 cas de nocardiose sont survenus chez des patients immunocompétents. Il s'agissait dans plus de 70% des cas (15/21) de formes non disséminées, plus précisément d'une infection cutanée primaire et de 14 atteintes pulmonaires, ces dernières étant toutes apparues chez des patients présentant une pathologie pulmonaire chronique. Cependant, six cas de nocardiose cérébrale sont survenus chez des patients ne présentant en apparence ni

immunodépression, ni pathologie pulmonaire sous-jacente. Tous présentaient une sérologie VIH négative. Une lipoprotéinose alvéolaire a été diagnostiquée lors de la réalisation du bilan d'extension chez l'un des patients (P-4). Parmi les comorbidités spécifiées dans les dossiers médicaux, l'alcoolisme chronique était partagé par deux des six patients : une femme de 45 ans, cirrhotique (Child C), atteinte d'hépatite C (P-24) ; et un homme de 50 ans épileptique (P-1). Un autre était âgé de 93 ans (P-6) et atteint de diabète, d'hypertension artérielle ainsi que d'hypothyroïdie frustre (cette dernière ayant été diagnostiquée au cours de son séjour). Les bilans biologiques des patients P-1, P-2 et P-24 réalisés au moment du diagnostic révélaient l'existence de lymphopénies, cependant celles-ci se sont avérées être fluctuantes et leurs interprétations dans ce contexte étaient complexes. L'hypothèse que celles-ci soient uniquement secondaire à l'infection en cours a été soulevée. Aucune découverte de pathologies immunosuppressives n'a par la suite été précisée dans leurs dossiers. Le patient P-30 âgé de 57 ans, ne présentait aucun argument en faveur d'une immunodépression ni aucune comorbidité notable.

- Etude de la sensibilité, *in vitro* aux antibiotiques

Un antibiogramme a été réalisé sur 40/41 souches (à l'exception de celle du patient P-32 car sa subculture était impossible). En raison de l'évolution, au cours de la période d'intérêt, des protocoles du laboratoire, et des demandes spécifiques ajoutées au cas par cas par les biologistes ou cliniciens, le panel d'antibiotique testé sur les différentes souches n'était pas constamment identique. Le Tableau 10 répertorie les différentes molécules testées ainsi que les résultats obtenus.

Les antibiotiques dont l'efficacité était la plus fréquemment évaluée (sur plus de 90% des souches) étaient : l'amoxicilline, l'amoxicilline/acide clavulanique, l'imipénème, la vancomycine, la clindamycine et le métronidazole ; et avec un pourcentage légèrement inférieur le triméthoprim-sulfaméthoxazole (82,9 %). La très grande majorité des souches testées étaient sensibles au linézolide (20/20), à l'imipénème (36/40), à l'ertapénème (12/13), à l'amikacine (18/19), à la minocycline (15/16) et à la doxycycline (20/22). Le pourcentage de sensibilité au TMP-SMX était similaire à celui de l'amoxicilline-acide clavulanique (71%). Toutes les souches testées étaient

résistantes au métronidazole. La sensibilité à la ciprofloxacine (8/22) et à la clindamycine (13/39) étaient peu fréquentes. Bien que le nombre de souche testé soit plus faible et ainsi moins représentatif, il en était de même pour la tobramycine (1/4), la gentamicine (3/10) et la fosfomycine (4/11). La ceftriaxone, molécule pouvant être utilisée en association en traitement probabiliste n'était que rarement testée mais présentait un taux de sensibilité encourageant (12/14).

Tableau 10 : Résultats de la sensibilité des souches de *Nocardia* spp. aux différents antibiotiques testés

	Anoxilline	Anoxilline + Acide clavulanique	Ceftazone	Imipénème	ertapénème	méropénème	Triméthoprim + sulfaméthoxazole	Vancomycine	linezolid	Amikacine	Tobramycine	Gentamicine	Ciprofloxacine	Mirocycline	Tigécycline	Doxycycline	Clindamycine	Métronidazole	Fosfomycine
<i>N. farcinica</i>	1/8	7/8	1/1	0/2	7/8	1/2	1/3	5/7	1/7	6/6	7/7	0/3	0/3	4/4	0/3	2/4	0/8	0/8	0/2
<i>N. abcessus</i>	6/6	6/6	1/1	1/1	6/6	4/4	1/1	5/6	3/6	4/4	2/2	0/0	0/5	3/3	3/3	5/5	1/6	0/6	3/3
<i>N. nova</i>	3/5	2/4	0/1	1/1	5/5	2/2	1/1	4/4	4/5	3/3	1/1	0/1	0/2	2/2	1/1	2/2	5/5	0/5	0/1
<i>N. cyriacigeorgica</i>	0/4	0/4	0/0	3/3	4/4	0/0	0/0	1/4	3/4	1/1	2/2	0/0	0/1	0/0	0/0	2/2	0/4	0/4	0/0
<i>N. wallacei</i>	2/4	4/4	0/0	1/1	2/4	0/0	2/2	2/2	1/4	0/0	2/3	0/2	3/3	2/2	1/1	1/1	1/4	0/4	0/0
<i>N. brasiliensis</i>	1/1	1/1	0/0	2/2	0/0	0/0	1/1	0/1	1/1	1/1	0/0	0/0	2/2	0/0	0/0	0/0	0/1	0/1	0/0
<i>N. otitidiscaviarum</i>	0/1	0/1	0/0	0/1	0/0	0/0	1/1	0/1	0/1	0/0	0/0	0/0	0/0	1/1	1/1	0/0	1/1	0/1	0/0
<b><i>Nocardia</i> spp</b>	19/38	27/38	3/4	12/14	36/40	12/13	6/9	24/34	20/38	20/20	18/19	3/10	8/22	15/16	8/12	20/22	13/39	0/38	4/11
<b>Sensibilité (%)</b>	50,0	71,1	75,0	85,7	90,0	92,3	66,7	70,6	52,6	100,0	94,7	30,0	36,4	93,8	66,7	90,9	33,3	0,0	36,4
<b>Souches testée (%)</b>	92,7	92,7	9,8	34,1	97,6	31,7	22,0	82,9	92,7	48,8	46,3	24,4	53,7	39,0	29,3	53,7	95,1	92,7	26,8

Nombre de souches sensibles / Nombre de souches testées

### 3) Discussion

Cette étude a permis de répertorier 41 cas de nocardiose pris en charge au sein des hôpitaux de Marseille durant la période d'intérêt, soit en moyenne 5 à 6 cas par an. Au vu de la rareté de cette pathologie, il s'agit d'un recueil de taille conséquente. Au cours d'une précédente étude menée à l'AP-HM entre janvier 2004 et décembre 2014, *Haussaire et al* (156) avaient dénombré 34 cas de nocardiose, soit environ 3 cas par an. Ainsi nos données suggèrent une augmentation de l'incidence de prise charge de cette pathologie dans notre établissement. Plusieurs facteurs pourraient être à l'origine de cette augmentation. Elle pourrait être liée à une amélioration de la stratégie diagnostique mais également à une augmentation de la fréquentation de notre hôpital par des patients à risque. En effet l'AP-HM est le 3<sup>ème</sup> centre hospitalier de France (15) et rassemble plusieurs services spécialisés dans la prise en charge de pathologies favorisant la survenue de nocardiose.

Notre recueil offre un aperçu de l'évolution de l'épidémiologie de la nocardiose dans le sud de la France, au cours de la dernière décennie.

- Répartition des espèces et type de nocardiose

Selon une récente revue de la littérature (5), *N. abscessus*, *N. cyriacigeorgica*, *N. farcinica* et *N. nova* causent plus de la moitié des cas de nocardiose humaine ; ce qui concorde avec nos résultats.

Cependant, tandis que des études de grande ampleur menées aux USA et en Espagne (58,138,145) rapportent une majorité d'infections causées par *N. cyriacigeorgica* et *N. nova* ; *N. farcinica* et les espèces appartenant au complexe de *N. abscessus* étaient dans notre étude, les plus fréquemment identifiées. Or, leur taux d'identification (20% chacune) étaient superposables à ceux retrouvés dans les études françaises menées par l'OFN (3) et par *Haussaire et al* (156) (Tableau 11). Ces différences pourraient s'expliquer par la variation géographique liée aux conditions climatiques de la répartition des espèces de *Nocardia* (1,5).

Tableau 11 : Comparaison des résultats obtenus à ceux de Haussaire et al (156) et Lebeaux et al (3)

	<b>AP-HM (2014-2020)</b>	<b>AP-HM (2004 – 2014)</b> Haussaire et al (156)	<b>OFN (2010 – 2015)</b> Lebeaux et al (3)
Nombre de souches / patients	41	34	743
<b><u>Caractéristiques générales</u></b>			
Age : moyenne	51,1 ans	55,4 ans	66 ans
Age : médiane	55 ans		
Age : min ; max	1 mois ; 93 ans	7 ans ; 94 ans	4 ans ; 90 ans
Sexe ratio (H/F)	0,95 (20/21)	2,4 (24/10)	1,4 (432/311)
	<i>N. farcinica</i> 8 (19,5%)	<i>N. farcinica</i> 9 (26,5%)	<i>N. farcinica</i> 160 (20,2%)
	<i>C<sup>x</sup> N. abscessus</i> 8 (19,5%)	<i>C<sup>x</sup> N. abscessus</i> 7 (20,6%)	<i>C<sup>x</sup> N. abscessus</i> 158 (19,9%)
	<i>N. nova</i> 5 (12,2%)	<i>N. cyricigeorgica</i> 7 (20,6%)	<i>N. nova</i> 155 (19,5%)
	<i>N. cyricigeorgica</i> 4 (9,8%)	<i>N. nova</i> 4 (11,7%)	<i>N. cyricigeorgica</i> 102 (12,9%)
	<i>C<sup>x</sup> N. transvalensis</i> 4 (9,8%)	<i>C<sup>x</sup> N. transvalensis</i> 3 (5,9%)	<i>N. brasiliensis</i> 55 (6,9%)
	<i>N. brasiliensis</i> 2 (4,9%)	<i>N. brasiliensis</i> 3 (5,9%)	<i>C<sup>x</sup> N. transvalensis</i> 51 (6,4%)
	Forme disséminée 17 (41,5%)	Forme disséminée 19 (55,9%)	<u>Type de prélèvement :</u>
	→ dont cérébrale 13 (76,5%)	→ dont cérébrale 9 (47,4%)	Cérébraux : 43 (5,8%)
	Forme pulmonaire 18 (43,9%)	Forme pulmonaire 12 (35%)	Pulmonaires : 427 (53,8%)
	Forme cutanée 5 (12,2%)	Forme cutanée 3 (8,8%)	(sous) cutanés : 156 (19,7%)
<b><u>Répartition des espèces</u></b>			
<b><u>Répartition des</u></b>			
<b><u>Types de nocardiose</u></b>			
<b><u>Ou de prélèvements</u></b>			

C<sup>x</sup> = Complexe



Différentes études ont également rapportées une proportion importante d'infection à *N. farcinica* chez le patient receveur de transplantation d'organe solide (33,48,50,157). Dans notre étude, 4 patients transplantés sur 11 étaient concernés, ce qui correspond à plus d'un tiers des souches de cette espèce. Le tropisme de *N. farcinica* pour le système nerveux central décrit dans plusieurs publications (58,145,158) était également perceptible (Tableau 7). A elles deux, *N. farcinica* et *N. abscessus* étaient responsables de plus de la moitié des atteintes cérébrales. Autre fait intéressant, *N. wallacei* était exclusivement retrouvée dans les prélèvements pulmonaires de patients atteints de mucoviscidose.

Dans notre recueil, comme dans celui de *Haussaire et al* (156), la proportion de nocardiose cutanée primaire était largement inférieure à celle des formes invasives ou colonisation respiratoire (Tableau 11). Il est possible que cette faible proportion d'atteinte cutanée soit en partie expliquée par le temps de culture réduit (48h) prévu par nos protocoles pour les prélèvements dits « superficiels » en l'absence de demande particulière de recherche de *Nocardia*.

La majorité des nocardioses disséminées impliquaient une atteinte du SNC, et ce en proportion encore plus importante dans notre étude que dans la précédente (76,5% vs 47,4%). Par comparaison aux données répertoriées par l'OFN (3), il semblerait que nous ayons isolé une proportion plus importante de *Nocardia* sur prélèvement cérébrale (32% vs 5%).

Au niveau microbiologique, nous avons observé une limite du MALDI-TOF pour l'identification correcte de l'espèce avec seulement (21,9%, 9/41) souches identifiées au niveau de l'espèce par cette méthode. Deux souches ont particulièrement attirées notre attention car elles illustrent bien les difficultés liées au diagnostic d'espèce de ce genre bactérien (souches des patients P-30 et P-36). Dans le premier cas, le score MALDI-TOF était toujours <1,4 et ne permettait pas d'obtenir une bonne identification malgré plusieurs essais. Le séquençage partiel du gène 16S orientait initialement vers *N. pneumoniae* (100% d'identité) or après séquençage du génome complet, l'analyse de l'ARNr 16S donnait *N. beijingensis* (100% d'identité) tandis que la DDH retrouvait *N. arthritidis* (score 99,4%). La seconde était identifiée comme *N. abscessus* avec un score

satisfaisant par MALDI-TOF, mais a tout de même été envoyée en biologie moléculaire. Le séquençage du gène 16S orientait vers *N. beijingensis* (99,7% d'identité) alors que la DDH a permis de conclure qu'il s'agissait en réalité également d'une souche de *N. arthritidis* (score 99,3%). *N. arthritidis*, *N. pneumoniae* et *N. beijingensis* sont trois espèces considérées comme appartenant au complexe *N. abscessus* (Tableau 3). En réalité cette appartenance au complexe est basée sur la grande similarité de leur profil MALDI-TOF et de leur séquence du gène de l'ARNr 16S, ce qui explique que leur distinction soit si complexe (10,11,116). Ainsi, dans ce genre de situation seule la DDH garantit un résultat fiable.

- Etude des facteurs de risque

La moyenne d'âge des patients inclus dans ce recueil est similaire à celle retrouvée au cours de la précédente étude menée à l'AP-HM (156). Toutes deux mettent en avant une prédominance d'adultes d'âge mûr associée à une grande dispersion autour de la moyenne (Tableau 8 Tableau 11). Une prépondérance masculine était retrouvée entre 2004 et 2014 mais plus entre 2014 et 2020. Ces observations sont en accord avec les données présentes dans la littérature, montrant une prédominance masculine inconstante (6,47).

Plus de 75% des patients inclus dans notre étude étaient immunodéprimés et/ou présentaient une pathologie pulmonaire sous-jacente (34/41) (Tableau 8). Les antécédents médicaux d'une jeune femme de 15 ans souffrant d'un abcès nocardique de l'œil n'étaient pas précisés dans son dossier médical. Néanmoins il était notifié qu'elle portait des lentilles de contact, or, il s'agit d'un facteur de risque notable de survenu d'infection oculaire à *Nocardia* précédemment rapporté dans la littérature (159–162). Au total, 46% des patients (19/41) étaient immunodéprimés, 56% (23/41) souffraient de comorbidité pulmonaire et 15% (6/41) ne présentaient aucune prédisposition évidente. Cette répartition semble en accord avec les données retrouvées dans la littérature (2,6,7).

Comme soulevé par *Lebeaux et al* (4), la transplantation d'organe solide est un facteur de risque majeur, qui concerne environ  $\frac{1}{4}$  des cas de nocardiose. La clinique est dominée chez ces patients par des formes invasives (> 80%) et notamment par des atteintes disséminées (dans notre étude 82% (9/11) formes invasives dont 78% (7/9) disséminées ) (4). La greffe pulmonaire (4/11) occupe, comme décrit dans les rapports les plus récents, une place importante, au même titre que les autres types de transplantation (5,48). Les infections à *Nocardia* peuvent survenir très tôt après le geste chirurgical, lorsque l'immunodépression est la plus intense, mais il faut rester vigilant car elles peuvent également apparaître des années après (33) (Tableau 8). La prise de traitement immunosuppresseurs tels que des anti-calcineurines, des antimétabolites et surtout des corticoïdes, était un facteur de risque partagés par tous les receveurs d'organes, mais également par des patients souffrant d'autres pathologies (maladies rhumatismales, maladies inflammatoires chroniques de l'intestin ...) (33,48,53,55). Nous avons également répertorié des cas de nocardiose chez des patients atteints de néoplasie, présentant une immunodépression secondaire à une chimiothérapie, où à la pathologie elle-même (58). Alors que d'autres études retrouvent une proportion importante de patients infectés par le VIH (55), nous n'avons répertorié dans notre établissement qu'un unique cas entre 2004 et aujourd'hui (156). La nocardiose touchant préférentiellement les patients présentant un faible taux de lymphocytes TCD4 (63), la considérable amélioration de la prise en charge de cette pathologie pourrait justifier ce faible taux. Cependant, à notre surprise, dans le cas de notre patient l'infection est apparue alors que son taux de lymphocytes TCD4 était supérieur à  $200/\text{mm}^3$ . Nous avons également décrit une infection cutanée survenue chez une enfant traitée par eculizumab, or, à notre connaissance, aucun cas de nocardiose associé à une dysfonction du système du complément n'a encore à ce jour été décrit. Ces éléments nous rappellent que tout type d'immunodépression doit jusqu'à preuve du contraire être considéré comme facteur de risque de survenue de nocardiose.

Nos résultats corroborent les informations que nous avons précédemment trouvées dans la littérature, décrivant la présence de maladie pulmonaire chronique sous-jacente comme un facteur de risque majeur de nocardiose invasive (principalement

pulmonaire) et ceux y compris en l'absence d'immunodépression (7,46,66–72). Elle était dans notre étude, notifiée dans 65% (23/35) des dossiers médicaux de patients atteints de nocardiose invasive ou de colonisation respiratoire et chez 75% (15/20) des immunocompétents de ce groupe. La mucoviscidose, au lieu de la BPCO, apparaissait comme la maladie pulmonaire sous-jacente la plus retrouvée dans notre étude. Ceci peut s'expliquer par un biais de sélection car notre établissement hospitalier héberge les centres de compétences régionaux labellisés pour la prise en charge de patients souffrant de mucoviscidose ou de maladies pulmonaires rares. Comme soulevé par Rodriguez-Nava *et al* (75), les patients atteints de mucoviscidose forment un petit sous-groupe aux caractéristiques générales différentes des autres. En effet la moyenne d'âge de ce groupe est nettement plus basse (25,4 ans *versus* 58,3 ans pour les autres) et tous présentent une atteinte localisée au poumon, dont la signification est parfois complexe à interpréter.

La présence de 6 cas de nocardiose cérébrale survenus chez des patients immunocompétents est un élément à prendre en considération, et supporte les précédents résultats retrouvés dans la littérature (6,7,36,79,83,84). D'autant que ces 6 patients ne présentaient par ailleurs pas de comorbidité pulmonaire non plus. Ainsi, il est important de garder à l'esprit que l'immunocompétence et l'absence de facteurs prédisposant évident ne suffisent pas à exclure le diagnostic de nocardiose.

- Etude de la sensibilité, *in-vitro* aux antibiotiques

Concernant le choix des panels d'antibiotique, nous avons remarqué que le triméthoprim-sulfaméthoxazole, molécule la plus fréquemment utilisée pour le traitement des nocardioses (5) n'a pas été testé sur tous les isolats. Il en était de même pour les autres molécules utilisables en traitement probabiliste, à l'exception de l'imipénème, constamment présente. En effet la sensibilité au linézolide, à l'amikacine et à la ceftriaxone n'était évaluée que sur moins de la moitié des souches.

Malgré tout, les souches testées étaient globalement sensibles à ces antibiotiques. Ainsi aucune résistance au linézolide n'a été observée (4,5,12). Les deux souches

résistantes à la ceftriaxone étaient des *N. farcinina*, espèce naturellement résistante à cet antibiotique (5,12). De même, l'unique isolat rendu résistant à l'amikacine était une *N. wallacei*, or l'amikacine présente une activité variable sur les espèces du complexe *N. transvalensis*. Le taux de sensibilité à l'imipenème était important (36/40) y compris sur des espèces telles que *N. brasiliensis*, habituellement résistantes selon la littérature (5,12).

En revanche, le taux de résistance au TMP-SMX (30,4%) est surprenant. Il est proche de celui précédemment retrouvé par *Haussaire et al* (156) (41,75%), mais diffère catégoriquement de celui obtenu par l'OFN (3) (5,4%). Cependant notre laboratoire n'est pas le seul à retrouver des taux élevés de résistance au TMP-SMX (145). Suite à la publication de plusieurs travaux rapportant un taux en augmentation (47,137,143), une étude multicentrique a été menée aux USA et a réfuté cette hypothèse car seule 2,5% des 552 souches testées étaient résistantes (144). Il a été suggéré que l'augmentation de la résistance *in vitro* aux sulfamides chez *Nocardia spp* pourrait en réalité être due à des difficultés d'interprétation en laboratoire de la sensibilité au TMP-SMX (12,13,138). Le degré élevé de résistance au TMP-SMX trouvé dans notre étude, pourrait être en partie lié à la technique : préparation de l'inoculum, milieux utilisés, lecture du diamètre d'inhibition à 80%.

Enfin, l'activité des autres antibiotiques dont l'évaluation de la sensibilité *in vitro* est recommandée par le CLSI était variable (12) : la doxycycline et la minocycline avaient une bonne activité sur les souches testées, en revanche la tigécycline et la tobramycine présentaient une activité variable. Les taux de sensibilité à la ciprofloxacine et à l'amoxicilline-acide clavulanique étaient impactés par la présence parmi les souches testées, d'espèces réputées pour leur résistance à ces molécules (5,12) (respectivement : *N. abscessus*, *N. nova* et *N. cyriacigeorgica* pour la ciprofloxacine ; et *N. nova*, *N. cyriacigeorgica* et *N. otitidiscaviarum* pour l'amoxicilline-acide clavulanique).

## CONCLUSIONS / PERSPECTIVES

Bien que la nocardiose soit une maladie rare, en moyenne 5 à 6 cas d'infection ou de colonisation à *Nocardia* sont diagnostiqués puis suivis au sein de l'AP-HM chaque année. S'agissant d'une pathologie potentiellement mortelle, il est important qu'une prise en charge adaptée soit mise en place dans les plus brefs délais. Néanmoins, les caractéristiques microbiologiques propres au genre *Nocardia*, et la symptomatologie aspécifique dont ces bactéries sont responsables, complexifient son diagnostic. L'objectif final de ce travail était d'évaluer la méthodologie appliquée dans notre laboratoire, au diagnostic microbiologique des nocardioses afin de déterminer de potentiels axes d'amélioration.

Nous avons réalisé une étude rétrospective des cas de nocardiose, ou de colonisation respiratoire par *Nocardia*, diagnostiqués à Marseille, entre janvier 2014 et juillet 2020. Celle-ci nous a permis de visualiser l'épidémiologie de cette pathologie au sein de notre hôpital et d'identifier les populations les plus à risque. Comme décrit dans la littérature les deux principaux facteurs de risque étaient l'immunodépression (tous types confondus) et la présence de pathologie pulmonaire chronique sous-jacente. Les receveurs d'organes solides et les patients atteints de mucoviscidose étaient les populations à risque les plus représentées. Néanmoins plusieurs cas de nocardiose disséminée avec atteinte cérébrale sont survenus chez des patients ne présentant pas de terrain à risque évident. Ces résultats confirment la nécessité pour les cliniciens de prévenir le laboratoire en cas de suspicion de nocardiose, notamment chez les patients immunocompétents, afin que les méthodes de culture soient adaptées à la recherche de *Nocardia*.

En effet, le diagnostic de cette pathologie repose sur le résultat des examens microbiologiques et la culture bactérienne est la principale méthode permettant la mise en évidence de *Nocardia* dans un échantillon clinique. Le principal facteur limitant de cette étape est la durée d'incubation. En effet les bactéries du genre *Nocardia* présentent une croissance relativement lente (1,5,9,17). Ainsi, les temps de culture réduits applicables à la grande majorité des bactéries usuellement recherchées en routine ne conviennent pas à leur recherche. En théorie, afin de diminuer le risque de faux négatif, il est recommandé de laisser en culture les

échantillons au moins 2 semaines avant de rendre un résultat définitif (1). Dans notre laboratoire les prélèvements superficiels sont incubés en aérobiose pendant 48h ; pour les prélèvements profonds cette durée est prolongée à 5 jours. Les prélèvements respiratoires entrent dans la première catégorie, cependant le protocole actuel prévoit que ceux provenant de patients atteints de pathologie pulmonaire chronique soient incubés comme les prélèvements profonds, sur un délai de 5 jours. Le nombre important de souche de *Nocardia* isolées depuis 2014 laisse supposer que cette durée de culture est généralement suffisante. Malgré tout, il reste probable que ce délai conduise à des cultures faussement négatives. Une optimisation de la stratégie de recherche de ces bactéries passerait donc par un allongement de ce délai pour les prélèvements de patients hospitalisés dans des services à risque de nocardiose (transplantation rénale, CRCM ...) ou sur demande spécifique du clinicien.

La détection directe du pathogène sur prélèvement par biologie moléculaire est une piste intéressante à explorer. A l'heure actuelle nous disposons uniquement d'une PCR ciblant *N. farcinica*, espèce la plus fréquemment identifiée dans notre laboratoire et régulièrement associée aux formes cérébrales de la maladie. La réalisation d'une PCR dite « universelle bactérienne », basée sur l'amplification par PCR du gène *16S* au moyen d'amorces ciblant des régions communes à toutes les bactéries, peut également être proposée aux services et permettre de mettre en évidence la présence de *Nocardia*. Cependant elle n'est applicable qu'aux prélèvements mono-microbiens et présente parfois une sensibilité plus faible.

Une PCR dite « pan-*Nocardia* », similaire à celle décrite par *Couble et al* (134) et basée sur les amorces découvertes par *Laurent et al* (109) est en cours d'étude au sein de l'OFN (135,136). Ce type de PCR représenterait un atout majeur pour le diagnostic des nocardioses. En effet, bien qu'elle ne puisse pas complètement remplacer la culture (antibiogramme indispensable), elle permettrait un gain de temps (affranchissement du temps de culture) ainsi qu'une importante augmentation de la sensibilité en rendant possible le diagnostic biologique même en cas de culture négative (antibiothérapie débutée avant le prélèvement, incubation trop courte ...). Ainsi nous pensons que son développement au sein de notre laboratoire est une piste à étudier. Elle pourrait à l'avenir être intégrée au panel de PCR réalisées en systématique sur les prélèvements d'abcès cérébraux. Son application aux prélèvements respiratoires est plus délicate car sa signification clinique a encore trop peu été étudiée. Cependant on pourrait imaginer qu'elle soit, de manière interne au laboratoire (résultats non visibles par le clinicien)

systématiquement réalisée sur les prélèvements respiratoires des patients à risque et qu'en cas de positivité la durée d'incubation de la culture correspondante soit prolongée.

La prise en charge des nocardioses implique généralement une antibiothérapie prolongée (5). Ainsi, les étapes d'identification d'espèces et d'étude de la sensibilité *in-vitro* des souches aux principaux antibiotiques d'intérêt, sont indispensables car elles ont un impact important sur le choix des molécules utilisées.

La stratégie d'identification bactérienne du laboratoire est en première intention basée sur la spectrométrie de masse (Système MALDI Biotyper<sup>®</sup>). Le mode de dépôt « en couche mince » utilisé par défaut, est peu adapté aux bactéries du genre *Nocardia* car leur épaisse paroi hydrophobe, riche en acide mycolique freine l'ionisation des protéines par la matrice. Cependant, la mise en place de pré-traitements tels que la rupture des parois bactériennes au moyen de billes de silice ou de verre, permettent d'en améliorer les performances (92,98–100). De la même manière, plusieurs études ont démontré que la mise en place d'une étape d'extraction protéique augmente l'efficacité de cette méthode (11,101). Cette étape peut consister en un simple ajout d'acide formique sur le dépôt de micro-organisme, avant apposition de la matrice (102,103), ou inclure l'utilisation successive d'éthanol, d'acide formique et d'acétonitrile (92,95,98–100,103,104). Au sein du laboratoire aucun protocole ayant pour but de broyer la paroi de ce type de bactérie n'est prévu. Néanmoins, en cas d'échec répété de l'identification par dépôt « en couche mince », une étape d'extraction protéique peut être ajoutée au procédé et les deux protocoles d'extraction applicables (ANNEXE 1 : Protocoles de dépôts et extraction protéique (IHU, AP-HM) sont similaires à ceux précédemment cités.

Le second facteur limitant l'identification d'espèce des *Nocardia* par spectrométrie de masse est directement lié au contenu de la base de données de l'automate. La base de données MALDI-TOF de notre laboratoire comporte actuellement un total de 129 spectres de *Nocardia* appartenant à 54 espèces différentes, ce qui est relativement conséquent (ANNEXE 2 : Spectres de *Nocardia*, base de données MALDI-TOF (IHU, AP-HM)). Néanmoins, selon *Blosser et al* (99), deux souches de la même espèce peuvent présenter des alignements structuraux différents, il est donc préférable que plusieurs spectres soient répertoriés par espèce. Bien que ceci soit le cas pour les espèces les plus fréquemment rencontrées telles que *N. farcinica*,



*N. abscessus*, *N. cyriacigeorgica* ou *N. nova*, 35 espèces de notre panel ne sont présentées que par un unique spectre et 9 autres, par seulement 2 spectres. Dans l'objectif d'optimiser l'identification des *Nocardia* par cette méthode, il serait souhaitable d'incrémenter notre base de données par de nouveaux spectres.

Il est également important de garder à l'esprit qu'en raison d'un manque de diversité moléculaire, il peut parfois être difficile de différencier les espèces appartenant à un même complexe (11,92,96,99,104). Dans ce cas, il est préférable que l'identification soit confirmée par biologie moléculaire.

En cas d'échecs répétés de l'identification par MALDI-TOF, la stratégie actuelle n'est plus basée sur le séquençage ciblé de certains gènes mais sur le séquençage du génome entier bactérien. Sont ensuite réalisées en parallèle : une comparaison de la séquence du gène *16s* à celles présentes dans la base de données GenBank®, une comparaison de la séquence du gène *rpoB* à celles des espèces suspectées, ainsi qu'une hybridation ADN-ADN *in silico* de génome à génome (<https://tygs.dsmz.de/>). Cette dernière méthode est généralement la plus discriminante et sa réalisation systématique garantit la fiabilité du résultat final.

L'étude de la sensibilité *in-vitro* des souches de *Nocardia* aux antibiotiques est réalisée, dans notre établissement, par diffusion sur gélose à partir de disques imprégnés d'anti-infectieux ou pour certaines molécules par E-TEST. Cependant, seule la méthode de microdilution en milieu liquide (méthode de référence), est à l'heure actuelle standardisée et approuvée, et les laboratoires employant comme nous, des méthodes de diffusion sur géloses n'appliquent pas tous un protocole identique. La majorité d'entre eux ont comme l'OFN (3), fait le choix d'utiliser des géloses de type MHE et un inoculum classique à 0,5 Mc Farland (3,13,14,148,149). Néanmoins, d'autres ont, comme notre laboratoire, opté pour l'utilisation de géloses enrichie de type MHF ou encore d'un inoculum à 1,0 Mc Farland (145,150,151). Malheureusement, à notre connaissance, aucune étude comparant ces différentes méthodes n'est actuellement disponible. Il est ainsi difficile de statuer sur l'intérêt de l'utilisation de milieu enrichis ainsi que de garantir que celle-ci n'a pas de conséquence sur le résultat. Nous proposons la réalisation d'une étude comparant l'utilisation de MHE vs MHF, d'un inoculum à 1,0 McFarland vs 0,5, et de disques vs E-TEST, afin de mieux comprendre l'impact de ces différents paramètres sur les résultats des antibiogrammes.

En parallèle, une revue de la littérature sur le sujet nous a permis d'identifier deux étapes critiques dans la réalisation de nos antibiogrammes de *Nocardia* qui seraient facilement améliorables.

La première étape concerne la préparation de l'inoculum. En effet, du fait de la présence de formes microbiennes agrégées il est parfois difficile d'obtenir une suspension homogène permettant une standardisation de l'inoculum. Or, une variation de la concentration en micro-organisme est susceptible d'impacter le résultat. Afin de palier au mieux à ce phénomène, le CLSI (12) recommande de préparer une suspension bactérienne lourde, à partir de colonies fraîches prélevées sur gélose au sang ou tryptone soja, puis placées dans un petit volume d'eau stérile ou de NaCl additionné de billes de verre de quelques millimètres de diamètre. Le mélange doit ensuite être vortexé, puis laissé au repos pendant environ 15 min, afin que les plus grosses particules en suspension se déposent au fond. Un inoculum homogène ajusté à 0,5 McFarland pourra ensuite être obtenu grâce à l'ajout progressif de gouttes de surnageant de suspension lourde dans un tube contenant du NaCl ou de l'eau stérile. La solution finale obtenue doit être vortexée et la turbidité vérifiée par néphélométrie. La mise en application de ce type de protocole nous permettrait d'obtenir une meilleure reproductibilité et ainsi d'augmenter la fiabilité de nos résultats.

La seconde étape concerne la durée d'incubation des géloses avant lecture. Il existe au sein du genre *Nocardia*, une hétérogénéité des caractéristiques de croissance non négligeable. Bien que certaines espèces comme *N. farcinica* poussent relativement rapidement, ce n'est pas le cas de toutes les espèces. Afin de ne pas conclure à tort sur la sensibilité d'une souche, il est préférable de ne pas lire l'antibiogramme avant 72h d'incubation. Certaines espèces telles que *N. abscessus* ou *N. nova* peuvent même nécessiter 24 à 48h d'incubation supplémentaires (13,17,146).

Pour finir, le recueil des résultats d'antibiogrammes des souches de *Nocardia* réalisés au cours de notre étude épidémiologique a attiré notre attention sur le fait que certains antibiotiques de première ligne n'étaient pas systématiquement testés. Ainsi des molécules telles que l'amikacine, le linézolide ou la ceftriaxone, appartenant pourtant au groupe des quelques molécules utilisables en probabiliste, n'étaient testées que sur 30-50% des souches. La sensibilité au TMP-SMX, traitement de première intention n'était, elle, investiguée que dans 80% des cas. Néanmoins, le panel des antibiotiques à tester a évolué au cours de notre période

d'étude et la majorité des molécules d'intérêt y figurent maintenant. Exception faite pour la ceftriaxone qu'il pourrait être intéressant d'ajouter.

Enfin, nous avons remarqué que des taux importants de résistance *in-vitro* au TMP-SMX ont été retrouvés dans notre établissement, ce qui incite à porter une attention particulière sur les résultats à venir. A noter que pour une bonne lecture (à 80% d'inhibition pour le TMP-SMX), les discrètes zones de croissance entourant le disque doivent être ignorées et la mesure du diamètre de la zone d'inhibition doit se baser sur la marge de croissance la plus évidente (12,13).

Notre étude nous a permis de mieux cibler les personnes à risque de développer des nocardioses, de faire un état des lieux des pratiques utilisées dans notre laboratoires et de proposer des axes d'amélioration pour le diagnostic et l'évaluation de la sensibilité aux antibiotiques des *Nocardia*. Des tests futurs seront réalisés pour répondre à ces axes d'amélioration.

## **BIBLIOGRAPHIE**

1. Brown-Elliott BA, Brown JM, Conville PS, Wallace RJ. Clinical and laboratory features of the *Nocardia* spp. based on current molecular taxonomy. *Clin Microbiol Rev.* avr 2006;19(2):259-82.
2. Wilson JW. Nocardiosis: Updates and Clinical Overview. *Mayo Clin Proc.* 1 avr 2012;87(4):403-7.
3. Lebeaux D, Bergeron E, Berthet J, Djadi-Prat J, Mouni e D, Boiron P, et al. Antibiotic susceptibility testing and species identification of *Nocardia* isolates: a retrospective analysis of data from a French expert laboratory, 2010–2015. *Clin Microbiol Infect.* 1 avr 2019;25(4):489-95.
4. Lebeaux D, Morelon E, Suarez F, Lanternier F, Scemla A, Frange P, et al. Nocardiosis in transplant recipients. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis Off Publ Eur Soc Clin Microbiol.* mai 2014;33(5):689-702.
5. Restrepo A, Clark NM, Infectious Diseases Community of Practice of the American Society of Transplantation. *Nocardia* infections in solid organ transplantation: Guidelines from the Infectious Diseases Community of Practice of the American Society of Transplantation. *Clin Transplant.* sept 2019;33(9):e13509.
6. Steinbrink J, Leavens J, Kauffman CA, Miceli MH. Manifestations and outcomes of nocardia infections: Comparison of immunocompromised and nonimmunocompromised adult patients. *Medicine (Baltimore).* oct 2018;97(40):e12436.
7. Kim YK, Sung H, Jung J, Yu SN, Lee JY, Kim S-H, et al. Impact of immune status on the clinical characteristics and treatment outcomes of nocardiosis. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 1 ao t 2016;85(4):482-7.
8. Ott SR, Meier N, Kolditz M, Bauer TT, Rohde G, Presterl E, et al. Pulmonary nocardiosis in Western Europe-Clinical evaluation of 43 patients and population-based estimates of hospitalization rates. *Int J Infect Dis IJID Off Publ Int Soc Infect Dis.* avr 2019;81:140-8.
9. Saubolle MA, Sussland D. Nocardiosis: review of clinical and laboratory experience. *J Clin Microbiol.* oct 2003;41(10):4497-501.
10. Brown-Elliott BA, Conville P, Wallace RJ. Current Status of *Nocardia* Taxonomy and Recommended Identification Methods. *Clin Microbiol Newsl.* 15 f vr 2015;37(4):25-32.
11. Conville PS, Brown-Elliott BA, Smith T, Zelazny AM. The Complexities of *Nocardia* Taxonomy and Identification. *J Clin Microbiol [Internet].* 1 janv 2018 [cité 19 janv 2020];56(1). Disponible sur: <https://jcm.asm.org/content/56/1/e01419-17>
12. Woods GL, Brown-Elliott BA, Conville PS, Desmond EP, Hall GS, Lin G, et al. Susceptibility Testing of Mycobacteria, Nocardiae, and Other Aerobic Actinomycetes [Internet]. 2nd  d. Wayne (PA): Clinical and Laboratory Standards Institute; 2011 [cité 11 juill 2020]. (CLSI

Standards: Guidelines for Health Care Excellence). Disponible sur: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK544374/>

13. Conville PS, Brown-Elliott BA, Wallace RJ, Witebsky FG, Koziol D, Hall GS, et al. Multisite Reproducibility of the Broth Microdilution Method for Susceptibility Testing of *Nocardia* Species. *J Clin Microbiol*. 1 avr 2012;50(4):1270-80.
14. Glupczynski Y, Berhin C, Janssens M, Wauters G. Determination of antimicrobial susceptibility patterns of *Nocardia* spp. from clinical specimens by Etest. *Clin Microbiol Infect*. 1 sept 2006;12(9):905-12.
15. AP-HM | Assistance Publique - Hôpitaux de Marseille / Centre Hospitalier Universitaire [Internet]. [cité 6 sept 2020]. Disponible sur: <http://fr.ap-hm.fr/>
16. RODRIGUEZ-NAVA V. *Nocardia* et actinomycètes aérobie apprautés. *Actual Perm En Microbiol Clin*. 2015;14(01).
17. Mimouni Y. Description des profils de sensibilités aux antibiotiques des espèces du genre *Nocardia* identifiées par séquençage des gènes de l'ARNr 16S et hsp65 à travers l'évaluation multicentrique de la plaque Sensititre® comme méthode d'antibiogramme. UNIVERSITE CLAUDE BERNARD - LYON 1 FACULTE DE PHARMACIE INSTITUT DES SCIENCES PHARMACEUTIQUES ET BIOLOGIQUES; 2015.
18. Fatahi-Bafghi M. Nocardiosis from 1888 to 2017. *Microb Pathog*. janv 2018;114:369-84.
19. Wallace RJ, Steele LC, Sumter G, Smith JM. Antimicrobial susceptibility patterns of *Nocardia asteroides*. *Antimicrob Agents Chemother*. 1 déc 1988;32(12):1776-9.
20. McTaggart L, Richardson S, Witkowska M, Zhang S. Phylogeny and identification of *Nocardia* species on the basis of multilocus sequence analysis. *J Clin Microbiol*. 15 sept 2010;48(12):4525-33.
21. Lerner PI. Nocardiosis. *Clin Infect Dis*. 1 juin 1996;22(6):891-905.
22. Fergie JE, Purcell K. Nocardiosis in South Texas children. *Pediatr Infect Dis J*. juill 2001;20(7):711-4.
23. Sahathevan M, Harvey FA, Forbes G, O'Grady J, Gimson A, Bragman S, et al. Epidemiology, bacteriology and control of an outbreak of *Nocardia asteroides* infection on a liver unit. *J Hosp Infect*. juin 1991;18 Suppl A:473-80.
24. Blümel J, Blümel E, Yassin AF, Schmidt-Rotte H, Schaal KP. Typing of *Nocardia farcinica* by pulsed-field gel electrophoresis reveals an endemic strain as source of hospital infections. *J Clin Microbiol*. janv 1998;36(1):118-22.
25. Wenger PN, Brown JM, McNeil MM, Jarvis WR. *Nocardia farcinica* sternotomy site infections in patients following open heart surgery. *J Infect Dis*. nov 1998;178(5):1539-43.

26. Vuotto F, Faure K, Queyre V, Dessein R, Pasquet A, Lambert M, et al. Vascular nosocomial *Nocardia farcinica* infection after arterial stenting in an immunocompetent patient. *Can J Infect Dis Med Microbiol.* 2011;22(1):e10-1.
27. Mrozek N, Hamizi S, Gourdon F, Laurichesse H, Beytout J, Lesens O. Nocardiose disséminée nosocomiale probable après chirurgie prothétique ostéoarticulaire chez un patient immunocompétent. *Rev Médecine Interne.* 1 déc 2008;29(12):1034-7.
28. Exmelin L, Malbruny B, Vergnaud M, Prosvost F, Boiron P, Morel C. Molecular study of nosocomial nocardiosis outbreak involving heart transplant recipients. *J Clin Microbiol.* avr 1996;34(4):1014-6.
29. Kachi S, Okazaki M, Takeda H, Igarashi H, Kobayashi O, Watanabe H, et al. Outbreak of *Nocardia farcinica* infection with the same pattern in randomly amplified polymorphic DNA analysis. *J Hosp Infect.* avr 2006;62(4):502-6.
30. Li S, Xu X, Wu M, Zhu J, Cen P, Ding J, et al. Lymphocutaneous nocardiosis caused by *Nocardia brasiliensis* in an immunocompetent patient: a case report. *J Int Med Res.* 1 janv 2020;48(1):0300060519897690.
31. Reis CMS, Reis-Filho EG de M. Mycetomas: an epidemiological, etiological, clinical, laboratory and therapeutic review. *An Bras Dermatol.* févr 2018;93(1):8-18.
32. Chen J, Zhou H, Xu P, Zhang P, Ma S, Zhou J. Clinical and Radiographic Characteristics of Pulmonary Nocardiosis: Clues to Earlier Diagnosis. *PLOS ONE.* 3 mars 2014;9(3):e90724.
33. Coussement J, Lebeaux D, van Delden C, Guillot H, Freund R, Marbus S, et al. Nocardia Infection in Solid Organ Transplant Recipients: A Multicenter European Case-control Study. *Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am.* 01 2016;63(3):338-45.
34. Castellana G, Grimaldi A, Castellana M, Farina C, Castellana G. Pulmonary nocardiosis in Chronic Obstructive Pulmonary Disease: A new clinical challenge. *Respir Med Case Rep.* 2016;18:14-21.
35. Menkü A, Kurtsoy A, Tucer B, Yıldız O, Akdemir H. Nocardia brain abscess mimicking brain tumour in immunocompetent patients: report of two cases and review of the literature. *Acta Neurochir (Wien).* 1 avr 2004;146(4):411-4.
36. Iannotti CA, Hall GS, Procop GW, Tuohy MJ, Staugaitis SM, Weil RJ. Solitary *Nocardia farcinica* brain abscess in an immunocompetent adult mimicking metastatic brain tumor: rapid diagnosis by pyrosequencing and successful treatment. *Surg Neurol.* 1 juill 2009;72(1):74-9.
37. Uneda A, Suzuki K, Okubo S, Hirashita K, Yunoki M, Yoshino K. Brain abscess caused by *Nocardia asiatica*. *Surg Neurol Int [Internet].* 18 juill 2016 [cité 4 févr 2020];7. Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4977971/>
38. Lalitha P, Tiwari M, Prajna NV, Gilpin C, Prakash K, Srinivasan M. *Nocardia keratitis*: species, drug sensitivities, and clinical correlation. *Cornea.* avr 2007;26(3):255-9.

39. Garg P. Fungal, Mycobacterial, and Nocardia infections and the eye: an update. *Eye Lond Engl.* févr 2012;26(2):245-51.
40. Al Akhrass F, Hachem R, Mohamed JA, Tarrand J, Kontoyiannis DP, Chandra J, et al. Central venous catheter-associated Nocardia bacteremia in cancer patients. *Emerg Infect Dis.* sept 2011;17(9):1651-8.
41. Kontoyiannis DP, Jacobson KL, Whimbey EE, Rolston KV, Raad II. Central venous catheter-associated Nocardia bacteremia: an unusual manifestation of nocardiosis. *Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am.* août 2000;31(2):617-8.
42. El-Naggari M, El Nour I, Al-Nabhani D, Al Muharrmi Z, Gaafar H, Abdelmogheth AAW. Nocardia asteroides peritoneal dialysis-related peritonitis: First case in pediatrics, treated with protracted linezolid. *J Infect Public Health.* avr 2016;9(2):192-7.
43. Kendrick-Jones J, Ratanjee SK, Taylor SL, Marshall MR. Nocardia asteroides peritoneal dialysis-related peritonitis: a case of successful treatment and return to peritoneal dialysis. *Nephrol Dial Transplant.* 1 août 2008;23(8):2693-4.
44. Prasad N, Gupta A, Sharma R, Suresh J, Prasad K. Nocardia asteroides peritonitis in peritoneal dialysis patients: Case report and review of the literature. *Indian J Nephrol.* 2011;21(4):276.
45. Muñoz J, Mirelis B, Aragón LM, Gutiérrez N, Sánchez F, Español M, et al. Clinical and microbiological features of nocardiosis 1997–2003. *J Med Microbiol.* 2007;56(4):545-50.
46. Kurahara Y, Tachibana K, Tsuyuguchi K, Akira M, Suzuki K, Hayashi S. Pulmonary nocardiosis: a clinical analysis of 59 cases. *Respir Investig.* mai 2014;52(3):160-6.
47. Tremblay J, Thibert L, Alarie I, Valiquette L, Pépin J. Nocardiosis in Quebec, Canada, 1988-2008. *Clin Microbiol Infect Off Publ Eur Soc Clin Microbiol Infect Dis.* mai 2011;17(5):690-6.
48. Peleg AY, Husain S, Qureshi ZA, Silveira FP, Sarumi M, Shutt KA, et al. Risk Factors, Clinical Characteristics, and Outcome of Nocardia Infection in Organ Transplant Recipients: A Matched Case-Control Study. *Clin Infect Dis.* 15 mai 2007;44(10):1307-14.
49. Beaman BL, Beaman L. Nocardia species: host-parasite relationships. *Clin Microbiol Rev.* avr 1994;7(2):213-64.
50. Majeed A, Beatty N, Iftikhar A, Mushtaq A, Fisher J, Gaynor P, et al. A 20-year experience with nocardiosis in solid organ transplant (SOT) recipients in the Southwestern United States: A single-center study. *Transpl Infect Dis Off J Transplant Soc.* août 2018;20(4):e12904.
51. L'Huillier AG, Ferreira VH, Ku T, Bahinskaya I, Kumar D, Humar A. Improving our mechanistic understanding of the indirect effects of CMV infection in transplant recipients. *Am J Transplant Off J Am Soc Transplant Am Soc Transpl Surg.* sept 2019;19(9):2495-504.

52. Shannon K, Pasikhova Y, Ibekweh Q, Ludlow S, Baluch A. Nocardiosis following hematopoietic stem cell transplantation. *Transpl Infect Dis.* 1 avr 2016;18(2):169-75.
53. Abreu C, Rocha-Pereira N, Sarmento A, Magro F. Nocardia infections among immunomodulated inflammatory bowel disease patients: A review. *World J Gastroenterol.* 7 juin 2015;21(21):6491-8.
54. Yamagata M, Hirose K, Ikeda K, Nakajima H. Clinical characteristics of Nocardia infection in patients with rheumatic diseases. *Clin Dev Immunol.* 2013;2013:818654.
55. Minero MV, Marín M, Cercenado E, Rabadán PM, Bouza E, Muñoz P. Nocardiosis at the turn of the century. *Medicine (Baltimore).* juill 2009;88(4):250-61.
56. Doraiswamy VA. Nocardia infection with adalimumab in rheumatoid arthritis. *J Rheumatol.* mars 2008;35(3):542-3.
57. Peleg AY, Husain S, Kwak EJ, Silveira FP, Ndirangu M, Tran J, et al. Opportunistic infections in 547 organ transplant recipients receiving alemtuzumab, a humanized monoclonal CD-52 antibody. *Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am.* 15 janv 2007;44(2):204-12.
58. Wang H-L, Seo Y-H, LaSala PR, Tarrand JJ, Han XY. Nocardiosis in 132 Patients With Cancer: Microbiological and Clinical Analyses. *Am J Clin Pathol.* 1 oct 2014;142(4):513-23.
59. Beaman BL, Gershwin ME, Ahmed A, Scates SM, Deem R. Response of CBA/N x DBA2/F1 mice to Nocardia asteroides. *Infect Immun.* janv 1982;35(1):111-6.
60. Kundranda MN, Spiro TP, Muslimani A, Gopalakrishna KV, Melaragno MJ, Daw HA. Cerebral nocardiosis in a patient with NHL treated with rituximab. *Am J Hematol.* nov 2007;82(11):1033-4.
61. Aydingöz IE, Candan I, Dervent B, Hitit G. Primary cutaneous nocardiosis associated with intra-articular corticosteroid injection. *Int J Dermatol.* mars 2001;40(3):196-8.
62. Baek JO, Kim JS, Lee SK, Jeong JH, Lee MJ, Seo IH. Two cases of primary cutaneous nocardiosis caused by intralesional injection. *Dermatol Ther.* 2019;32(1):e12775.
63. Uttamchandani RB, Daikos GL, Reyes RR, Fischl MA, Dickinson GM, Yamaguchi E, et al. Nocardiosis in 30 Patients with Advanced Human Immunodeficiency Virus Infection: Clinical Features and Outcome. *Clin Infect Dis.* 1 mars 1994;18(3):348-53.
64. Martínez R, Reyes S, Menéndez R. Pulmonary nocardiosis: risk factors, clinical features, diagnosis and prognosis. *Curr Opin Pulm Med.* mai 2008;14(3):219–227.
65. Lafont E, Mahlaoui N, Rodriguez-nava V, Neven B, Moshous D, Bustamante J, et al. Nocardiose et déficit immunitaire primitif. *Médecine Mal Infect. (Supplement):*S1.
66. Rivière F, Billhot M, Soler C, Vaylet F, Margery J. Pulmonary nocardiosis in immunocompetent patients: can COPD be the only risk factor? *Eur Respir Rev Off J Eur Respir Soc.* 1 sept 2011;20(121):210-2.



67. Ercibengoa M, Càmara J, Tubau F, García-Somoza D, Galar A, Martín-Rabadán P, et al. A multicentre analysis of *Nocardia pneumonia* in Spain: 2010–2016. *Int J Infect Dis.* 1 janv 2020;90:161-6.
68. Ambrosioni J, Lew D, Garbino J. Nocardiosis: updated clinical review and experience at a tertiary center. *Infection.* avr 2010;38(2):89-97.
69. Woodworth MH, Saullo JL, Lantos PM, Cox GM, Stout JE. Increasing *Nocardia* Incidence Associated with Bronchiectasis at a Tertiary Care Center. *Ann Am Thorac Soc.* 23 févr 2017;14(3):347-54.
70. Punatar AD, Kusne S, Blair JE, Seville MT, Vikram HR. Opportunistic infections in patients with pulmonary alveolar proteinosis. *J Infect.* 1 août 2012;65(2):173-9.
71. Shirani K, Poulsen AN, Hakamifard A. Nocardial brain abscess in a patient with pulmonary alveolar proteinosis. *Adv Biomed Res.* 2015;4:185.
72. Jouneau S, Ménard C, Lederlin M. Pulmonary alveolar proteinosis. *Respirol Carlton Vic.* 3 mai 2020;
73. Garcia-Bellmunt L, Sibila O, Solanes I, Sanchez-Reus F, Plaza V. Pulmonary Nocardiosis in Patients With COPD: Characteristics and Prognostic Factors. *Arch Bronconeumol Engl Ed.* 1 août 2012;48(8):280-5.
74. Margalit I, Muhsen K, Ben Ari Y, Ben-Zvi H, Shostak Y, Krause I, et al. *Nocardia* colonization in contrast to nocardiosis: a comparison of patients' clinical characteristics. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis Off Publ Eur Soc Clin Microbiol.* 20 déc 2019;
75. Rodriguez-Nava V, Durupt S, Chyderiotis S, Freydière A-M, Karsenty J, de Montclos M, et al. A French multicentric study and review of pulmonary *Nocardia* spp. in cystic fibrosis patients. *Med Microbiol Immunol (Berl).* août 2015;204(4):493-504.
76. Yang M, Xu M, Wei W, Gao H, Zhang X, Zhao H, et al. Clinical findings of 40 patients with nocardiosis: A retrospective analysis in a tertiary hospital. *Exp Ther Med.* juill 2014;8(1):25-30.
77. Shah PM, Raut I, Bindroo SK, Dhakre VW. Unmasking of poorly controlled diabetes mellitus by pulmonary nocardiosis. *Case Rep [Internet].* 18 mai 2018 [cité 6 févr 2020];2018. Disponible sur: <https://casereports-bmj-com.lama.univ-amu.fr/content/2018/bcr-2018-224911>
78. Khorshidi M, Navid S, Azadi D, Shokri D, Shojaei H. A case report of brain abscess caused by *Nocardia cyriacigeorgica* in a diabetic patient. *JMM Case Rep.* sept 2018;5(9):e005133.
79. Chaudhari DM, Renjen PN, Sardana R, Butta H. *Nocardia Farcinica* Brain Abscess in an Immunocompetent Old Patient: A Case Report and Review of Literature. *Ann Indian Acad Neurol.* 2017;20(4):399-402.
80. Faircloth EL, Troy P. A Rare Presentation of *Nocardia pericarditis* Leading to Cardiac Tamponade in an Immunocompetent Patient. *Cureus.* 26 févr 2019;11(2):e4140.

81. Rhofir Y, Zahraoui R, Tiress N, Naji-Amrani H, Soualhi M, Bourkadi JE. [Pulmonary nocardiosis in immunocompetent patients: about 2 cases]. *Pan Afr Med J.* 2017;27:149.
82. Maraki S, Chochlidakis S, Nioti E, Tselentis Y. Primary lymphocutaneous nocardiosis in an immunocompetent patient. *Ann Clin Microbiol Antimicrob.* 15 nov 2004;3(1):24.
83. Malincarne L, Marroni M, Farina C, Camanni G, Valente M, Belfiori B, et al. Primary brain abscess with *Nocardia farcinica* in an immunocompetent patient. *Clin Neurol Neurosurg.* 1 mai 2002;104(2):132-5.
84. Fleetwood IG, Embil JM, C FRCP, Ross IB, C FRCS. *Nocardia asteroides* cerebral abscess in immunocompetent hosts: report of three cases and review of surgical recommendations. *Surg Neurol.* 1 juin 2000;53(6):605-10.
85. Baraboutis IG, Argyropoulou A, Papastamopoulos V, Psaroudaki Z, Paniara O, Skoutelis AT. Primary sternal osteomyelitis caused by *Nocardia nova*: case report and literature review. *Braz J Infect Dis Off Publ Braz Soc Infect Dis.* juin 2008;12(3):257-9.
86. Kontogiorgi M, Opsimoulis P, Kopterides P, Savva A, Kalodimou VE, Belesiotou E, et al. Pulmonary nocardiosis in an immunocompetent patient with COPD: The role of defective innate response. *Heart Lung.* 1 juill 2013;42(4):247-50.
87. Rosen LB, Rocha Pereira N, Figueiredo C, Fiske LC, Ressler RA, Hong JC, et al. *Nocardia*-Induced Granulocyte Macrophage Colony-Stimulating Factor Is Neutralized by Autoantibodies in Disseminated/Extrapulmonary Nocardiosis. *Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am.* 1 avr 2015;60(7):1017-25.
88. A B, Mc V, A R, J P, Mj R, V R-N. Clinical significance, antimicrobial susceptibility and molecular identification of *Nocardia* species isolated from children with cystic fibrosis. *Braz J Microbiol Publ Braz Soc Microbiol.* 19 avr 2016;47(3):531-5.
89. Thorn ST, Brown MA, Yanes JJ, Sherrill DL, Pugmire J, Anderson KA, et al. Pulmonary nocardiosis in cystic fibrosis. *J Cyst Fibros.* 1 sept 2009;8(5):316-20.
90. Dagan A, Keller N, Vilozni D, Ramon-Saraf R, Bar B-E, Sarouk I, et al. *Nocardia* Colonization: A Risk Factor for Lung Deterioration in Cystic Fibrosis Patients? *Med Sci Monit Int Med J Exp Clin Res.* 30 juin 2015;21:1889-94.
91. Eyüboğlu TŞ, Aslan AT, Gursoy TR, Onay ZR, Kocak U, Tapısız AA. Macrophage activation syndrome due to *Nocardia* spp in a pediatric patient with cystic fibrosis. *Pediatr Pulmonol.* 2019;54(4):E10-2.
92. Girard V, Mailler S, Polsinelli S, Jacob D, Saccomani MC, Celliere B, et al. Routine identification of *Nocardia* species by MALDI-TOF mass spectrometry. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 1 janv 2017;87(1):7-10.
93. Suarez S, Nassif X, Ferroni A. Applications de la technologie MALDI-TOF en microbiologie clinique. *Pathol Biol.* 1 févr 2015;63(1):43-52.

94. Carbonnelle É, Nassif X. Utilisation en routine du MALDI-TOF-MS pour l'identification des pathogènes en microbiologie médicale. *médecine/sciences*. oct 2011;27(10):882-8.
95. Khot PD, Bird BA, Durrant RJ, Fisher MA. Identification of *Nocardia* Species by Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization–Time of Flight Mass Spectrometry. *J Clin Microbiol*. 1 oct 2015;53(10):3366-9.
96. McTaggart LR, Chen Y, Poopalarajah R, Kus JV. Incubation time and culture media impact success of identification of *Nocardia* spp. by MALDI-ToF mass spectrometry. *Diagn Microbiol Infect Dis*. déc 2018;92(4):270-4.
97. Verroken A, Janssens M, Berhin C, Bogaerts P, Huang T-D, Wauters G, et al. Evaluation of Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization–Time of Flight Mass Spectrometry for Identification of *Nocardia* Species. *J Clin Microbiol*. 1 nov 2010;48(11):4015-21.
98. Segawa S, Nishimura M, Sogawa K, Tsuchida S, Murata S, Watanabe M, et al. Identification of *Nocardia* species using matrix-assisted laser desorption/ionization–time-of-flight mass spectrometry. *Clin Proteomics*. 7 mars 2015;12(1):6.
99. Blosser SJ, Drake SK, Andrasko JL, Henderson CM, Kamboj K, Antonara S, et al. Multicenter Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization–Time of Flight Mass Spectrometry Study for Identification of Clinically Relevant *Nocardia* spp. *J Clin Microbiol*. 1 mai 2016;54(5):1251-8.
100. Sp B, Sl O, Bj C, Bc L, Aa R, Rc W, et al. Evaluation of Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization–Time of Flight Mass Spectrometry for Identification of *Mycobacterium* species, *Nocardia* species, and Other Aerobic Actinomycetes. *J Clin Microbiol*. 4 déc 2015;54(2):376-84.
101. Durand T, Vautrin F, Bergeron E, Girard V, Polsinelli S, Monnin V, et al. Assessment of VITEK® MS IVD database V3.0 for identification of *Nocardia* spp. using two culture media and comparing direct smear and protein extraction procedures. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 1 mars 2020;39(3):559-67.
102. Marín M, Ruiz A, Iglesias C, Quiroga L, Cercenado E, Martín-Rabadán P, et al. Identification of *Nocardia* species from clinical isolates using MALDI-TOF mass spectrometry. *Clin Microbiol Infect*. 1 déc 2018;24(12):1342.e5-1342.e8.
103. Forero Morales MP, Hopprich R, Wise R, Shephard L, Weldhagen GF. Cost-effective implementation of a custom MALDI-TOF library for the identification of South Australian *Nocardia* isolates. *Pathology (Phila)*. 1 déc 2018;50(7):753-7.
104. Ba B, Ma B, Es S, Ke H, Ap B, Ne B, et al. Evaluation of the Vitek MS v3.0 Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization–Time of Flight Mass Spectrometry System for Identification of *Mycobacterium* and *Nocardia* Species. *J Clin Microbiol* [Internet]. 25 mai 2018 [cité 21 mars 2020];56(6). Disponible sur: <http://europepmc.org/article/MED/29643203?singleResult=true>

105. Carrasco G, de Dios Caballero J, Garrido N, Valdezate S, Cantón R, Sáez-Nieto JA. Shortcomings of the Commercial MALDI-TOF MS Database and Use of MLSA as an Arbiter in the Identification of *Nocardia* Species. *Front Microbiol* [Internet]. 2016 [cité 22 mars 2020];7. Disponible sur: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2016.00542/full>
106. Xiao M, Pang L, Chen SC-A, Fan X, Zhang L, Li H-X, et al. Accurate Identification of Common Pathogenic *Nocardia* Species: Evaluation of a Multilocus Sequence Analysis Platform and Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry. *PLoS ONE* [Internet]. 25 janv 2016 [cité 22 mars 2020];11(1). Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4726625/>
107. Saleeb PG, Drake SK, Murray PR, Zelazny AM. Identification of Mycobacteria in Solid-Culture Media by Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry. *J Clin Microbiol*. 1 mai 2011;49(5):1790-4.
108. Wilen CB, McMullen AR, Burnham C-AD. Comparison of Sample Preparation Methods, Instrumentation Platforms, and Contemporary Commercial Databases for Identification of Clinically Relevant Mycobacteria by Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization–Time of Flight Mass Spectrometry. Land GA, éditeur. *J Clin Microbiol*. juill 2015;53(7):2308-15.
109. Laurent F, Provost F, Boiron P. Rapid identification of clinically relevant *Nocardia* species to genus level by 16S rRNA gene PCR. *J Clin Microbiol*. 1 janv 1999;37(1):99-102.
110. Brown J, Pham K, McNeil M, Lasker B. Rapid identification of *Nocardia farcinica* clinical isolates by a PCR assay targeting a 314-base-pair species-specific DNA fragment. *J Clin Microbiol*. 1 août 2004;42(8):3655-60.
111. Conville PS, Witebsky FG. Current issues pertaining to the *Nocardia* species. *Clin Microbiol Newsl*. 15 avr 2004;26(8):57-62.
112. Steingrube V, Wilson R, Ba B, Jost KC J, Blacklock Z, Gibson J, et al. Rapid identification of clinically significant species and taxa of aerobic actinomycetes, including *Actinomadura*, *Gordona*, *Nocardia*, *Rhodococcus*, *Streptomyces*, and *Tsukamurella* isolates, by DNA amplification and restriction endonuclease analysis. *J Clin Microbiol*. 1 avr 1997;35(4):817-22.
113. Rodriguez-Nava V, Couble A, Devulder G, Flandrois J-P, Boiron P, Laurent F. Use of PCR-Restriction Enzyme Pattern Analysis and Sequencing Database for hsp65 Gene-Based Identification of *Nocardia* Species. *J Clin Microbiol*. 1 févr 2006;44(2):536-46.
114. Petti CA. Interpretive criteria for identification of bacteria and fungi by DNA target sequencing [Internet]. Clinical and Laboratory Standards Institute; 2008 [cité 1 mai 2020]. Disponible sur: <https://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=US201300126984>
115. Clarridge JE. Impact of 16S rRNA Gene Sequence Analysis for Identification of Bacteria on Clinical Microbiology and Infectious Diseases. *Clin Microbiol Rev*. oct 2004;17(4):840-62.

116. Cloud J, Conville PS, Croft A, Harmsen D, Witebsky F, Carroll K. Evaluation of partial 16S ribosomal DNA sequencing for identification of nocardia species by using the MicroSeq 500 system with an expanded database. *J Clin Microbiol.* 1 févr 2004;42(2):578-84.
117. Roth A, Andrees S, Kroppenstedt RM, Harmsen D, Mauch H. Phylogeny of the Genus *Nocardia* Based on Reassessed 16S rRNA Gene Sequences Reveals Underspeciation and Division of Strains Classified as *Nocardia asteroides* into Three Established Species and Two Unnamed Taxons. *J Clin Microbiol.* 1 févr 2003;41(2):851-6.
118. Conville PS, Brown JM, Steigerwalt AG, Lee JW, Anderson VL, Fishbain JT, et al. *Nocardia kruczakiae* sp. nov., a Pathogen in Immunocompromised Patients and a Member of the « *N. nova* Complex ». *J Clin Microbiol.* 1 nov 2004;42(11):5139-45.
119. Conville PS, Witebsky FG. Multiple copies of the 16S rRNA gene in *Nocardia nova* isolates and implications for sequence-based identification procedures. *J Clin Microbiol.* juin 2005;43(6):2881-5.
120. Conville P, Witebsky F. Analysis of multiple differing copies of the 16S rRNA gene in five clinical isolates and three type strains of *Nocardia* species and implications for species assignment. *J Clin Microbiol.* 14 févr 2007;45(4):1146-51.
121. Yin X, Liang S, Sun X, Luo S, Wang Z, Li R. Ocular nocardiosis: HSP65 gene sequencing for species identification of *Nocardia* spp. *Am J Ophthalmol.* oct 2007;144(4):570-3.
122. Conville C, Zelazny A, Witebsky F. Analysis of *secA1* gene sequences for identification of *Nocardia* species. *J Clin Microbiol.* 1 août 2006;44(8):2760-6.
123. Kong F, Wang H, Zhang E, Sintchenko V, Xiao X, Sorrell T, et al. *secA1* gene sequence polymorphisms for species identification of *Nocardia* species and recognition of intraspecies genetic diversity. *J Clin Microbiol.* 1 sept 2010;48(11):3928-34.
124. Takeda K, Kang Y, Yazawa K, Gonoï T, Mikami Y. Phylogenetic studies of *Nocardia* species based on *gyrB* gene analyses. *J Med Microbiol.* 2010;59(2):165-71.
125. Adékambi T, Drancourt M, Raoult D. The *rpoB* gene as a tool for clinical microbiologists. *Trends Microbiol.* 1 janv 2009;17(1):37-45.
126. Case R, Boucher Y, Dahllöf I, Holmström C, Doolittle W, Kjelleberg S. Use of 16S rRNA and *rpoB* genes as molecular markers for microbial ecology studies. *Appl Environ Microbiol.* 27 oct 2006;73(1):278-88.
127. Sánchez-Herrera K, Sandoval H, Mouniee D, Ramírez-Durán N, Bergeron E, Boiron P, et al. Molecular identification of *Nocardia* species using the *sodA* gene. *New Microbes New Infect.* sept 2017;19:96-116.
128. Carrasco G, Valdezate S, Garrido N, Villalón, Medina-Pascual M, Sáez-Nieto J. Identification, typing, and phylogenetic relationships of the main clinical *Nocardia* species in Spain according to their *gyrB* and *rpoB* genes. *J Clin Microbiol.* 21 août 2013;51(11):3602-8.

129. Baio PVP, Ramos JN, dos Santos LS, Soriano MF, Ladeira EM, Souza MC, et al. Molecular Identification of *Nocardia* Isolates from Clinical Samples and an Overview of Human Nocardiosis in Brazil. *PLoS Negl Trop Dis* [Internet]. 5 déc 2013 [cité 19 avr 2020];7(12). Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3854972/>
130. Tamura T, Matsuzawa T, Oji S, Ichikawa N, Hosoyama A, Katsumata H, et al. A genome sequence-based approach to taxonomy of the genus *Nocardia*. *Antonie Van Leeuwenhoek*. 1 oct 2012;102(3):481-91.
131. Wei M, Wang P, Yang C, Gu L. Molecular identification and phylogenetic relationships of clinical *Nocardia* isolates. *Antonie Van Leeuwenhoek*. déc 2019;112(12):1755-66.
132. Auch AF, von Jan M, Klenk H-P, Göker M. Digital DNA-DNA hybridization for microbial species delineation by means of genome-to-genome sequence comparison. *Stand Genomic Sci*. 28 janv 2010;2(1):117-34.
133. Woo PCY, Lau SKP, Teng JLL, Tse H, Yuen K-Y. Then and now: use of 16S rDNA gene sequencing for bacterial identification and discovery of novel bacteria in clinical microbiology laboratories. *Clin Microbiol Infect*. 1 oct 2008;14(10):908-34.
134. Couble A, Rodríguez-Nava V, Montclos MP de, Boiron P, Laurent F. Direct Detection of *Nocardia* spp. in Clinical Samples by a Rapid Molecular Method. *J Clin Microbiol*. 1 avr 2005;43(4):1921-4.
135. Rouzaud C, Rodriguez-Nava V, Catherinot E, Méchaï F, Bergeron E, Farfour E, et al. Clinical Assessment of a *Nocardia* PCR-Based Assay for Diagnosis of Nocardiosis. *Forbes BA, éditeur. J Clin Microbiol*. 21 mars 2018;56(6):e00002-18, /jcm/56/6/e00002-18.atom.
136. Coussement J, Lebeaux D, El Bizri N, Claes V, Kohnen M, Steensels D, et al. *Nocardia* polymerase chain reaction (PCR)-based assay performed on bronchoalveolar lavage fluid after lung transplantation: A prospective pilot study. *PloS One*. 2019;14(2):e0211989.
137. Larruskain J, Idigoras P, Marimón JM, Pérez-Trallero E. Susceptibility of 186 *Nocardia* sp. Isolates to 20 Antimicrobial Agents. *Antimicrob Agents Chemother*. 1 juin 2011;55(6):2995-8.
138. Schlaberg R, Fisher MA, Hanson KE. Susceptibility profiles of *Nocardia* isolates based on current taxonomy. *Antimicrob Agents Chemother*. 2014;58(2):795-800.
139. Tan YE, Chen SC-A, Halliday CL. Antimicrobial susceptibility profiles and species distribution of medically relevant *Nocardia* species: Results from a large tertiary laboratory in Australia. *J Glob Antimicrob Resist*. 1 mars 2020;20:110-7.
140. Farooqui F, Irfan S, Shakoor S, Zafar A. Antimicrobial susceptibility and clinical characteristics of *Nocardia* isolates from a tertiary care centre diagnostic laboratory in Pakistan. *J Glob Antimicrob Resist*. 1 déc 2018;15:219-21.

141. McTaggart LR, Doucet J, Witkowska M, Richardson SE. Antimicrobial susceptibility among clinical *Nocardia* species identified by multilocus sequence analysis. *Antimicrob Agents Chemother.* janv 2015;59(1):269-75.
142. Yi M, Wang L, Xu W, Sheng L, Jiang L, Yang F, et al. Species Distribution And Antibiotic Susceptibility Of *Nocardia* Isolates From Yantai, China. *Infect Drug Resist.* 2019;12:3653-61.
143. Uhde KB, Pathak S, McCullum I, Jannat-Khah DP, Shadomy SV, Dykewicz CA, et al. Antimicrobial-resistant nocardia isolates, United States, 1995-2004. *Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am.* 15 déc 2010;51(12):1445-8.
144. Brown-Elliott BA, Biehle J, Conville PS, Cohen S, Saubolle M, Sussland D, et al. Sulfonamide resistance in isolates of *Nocardia* spp. from a US multicenter survey. *J Clin Microbiol.* mars 2012;50(3):670-2.
145. Valdezate S, Garrido N, Carrasco G, Medina-Pascual MJ, Villalón P, Navarro AM, et al. Epidemiology and susceptibility to antimicrobial agents of the main *Nocardia* species in Spain. *J Antimicrob Chemother.* 01 2017;72(3):754-61.
146. Wei M, Wang P, Qu J, Li R, Liu Y, Gu L, et al. Identification and antimicrobial susceptibility of clinical *Nocardia* species in a tertiary hospital in China. *J Glob Antimicrob Resist.* 1 déc 2017;11:183-7.
147. Comité de l'antibiogramme de la Société Française de Microbiologie - recommandations [Internet]. 2020. Disponible sur: [https://www.sfm-microbiologie.org/wp-content/uploads/2020/04/CASFM2020\\_Avril2020\\_V1.1.pdf](https://www.sfm-microbiologie.org/wp-content/uploads/2020/04/CASFM2020_Avril2020_V1.1.pdf)
148. Tomlin P, Sand C, Rennie RP. Evaluation of E Test, disk diffusion and broth microdilution to establish tentative quality control limits and review susceptibility breakpoints for two aerobic actinomycetes. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 1 août 2001;40(4):179-86.
149. Lowman W, Aithma N. Antimicrobial susceptibility testing and profiling of *Nocardia* species and other aerobic actinomycetes from South Africa: comparative evaluation of broth microdilution versus the Etest. *J Clin Microbiol.* 27 oct 2010;48(12):4534-40.
150. Huang L, Chen X, Xu H, Sun L, Li C, Guo W, et al. Clinical features, identification, antimicrobial resistance patterns of *Nocardia* species in China: 2009-2017. *Diagn Microbiol Infect Dis.* juin 2019;94(2):165-72.
151. Gomez-Flores A, Welsh O, Said-Fernández S, Lozano-Garza G, Tavares-Alejandro R, Vera-Cabrera L. In vitro and in vivo activities of antimicrobials against *Nocardia brasiliensis*. *Antimicrob Agents Chemother.* 1 mars 2004;48(3):832-7.
152. Biehle JR, Cavalieri SJ, Saubolle MA, Getsinger LJ. Comparative evaluation of the E test for susceptibility testing of *Nocardia* species. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 1 juin 1994;19(2):101-10.

153. Perçin D, Sümerkan B, Inci R. [Comparative evaluation of e-test and disk diffusion methods for susceptibility testing of *Nocardia* species]. *Mikrobiyol Bul.* avr 2011;45(2):274-9.
154. Ambaye A, Kohner PC, Wollan PC, Roberts KL, Roberts GD, Cockerill FR. Comparison of agar dilution, broth microdilution, disk diffusion, E-test, and BACTEC radiometric methods for antimicrobial susceptibility testing of clinical isolates of the *Nocardia asteroides* complex. *J Clin Microbiol.* avr 1997;35(4):847-52.
155. Brown-Elliott BA, Killingley J, Vasireddy S, Bridge L, Wallace RJ. In Vitro Comparison of Ertapenem, Meropenem, and Imipenem against Isolates of Rapidly Growing Mycobacteria and *Nocardia* by Use of Broth Microdilution and Etest. *J Clin Microbiol.* juin 2016;54(6):1586-92.
156. Haussaire D, Fournier P-E, Djiguiba K, Moal V, Legris T, Purgus R, et al. Nocardiosis in the south of France over a 10-years period, 2004-2014. *Int J Infect Dis IJID Off Publ Int Soc Infect Dis.* avr 2017;57:13-20.
157. Lebeaux D, Freund R, van Delden C, Guillot H, Marbus SD, Matignon M, et al. Outcome and Treatment of Nocardiosis After Solid Organ Transplantation: New Insights From a European Study. *Clin Infect Dis.* 15 mai 2017;64(10):1396-405.
158. Galacho-Harriero A, Delgado-López PD, Ortega-Lafont MP, Martín-Alonso J, Castilla-Díez JM, Sánchez-Borge B. *Nocardia farcinica* Brain Abscess: Report of 3 Cases. *World Neurosurg.* 1 oct 2017;106:1053.e15-1053.e24.
159. Gieger A, Waller S, Pasternak J. *Nocardia* Arthritis Keratitis: Case Report and Review of the Literature. *Nepal J Ophthalmol Biannu Peer-Rev Acad J Nepal Ophthalmic Soc NEPJOPH.* 2017;9(18):91-4.
160. Sharma N, O'Hagan S. The role of oral co-trimoxazole in treating *Nocardia farcinica* keratitis-a case report. *J Ophthalmic Inflamm Infect.* déc 2016;6(1):23.
161. Verner A, Durrani A, Kowalski RP, Jhanji V. A Case of *Nocardia farcinica* Keratitis in a Pediatric Contact Lens Wearer. *Eye Contact Lens.* mars 2020;46(2):e11-2.
162. Rush RB. Contact lens-associated nocardial necrotizing scleritis. *Korean J Ophthalmol KJO.* août 2013;27(4):291-3.



## ANNEXES

### ANNEXE 1 : Protocoles de dépôts et extraction protéique (IHU, AP-HM)

<p style="text-align: center;"><b><u>Méthode</u></b> <b><u>classique</u></b> <b>« Dépôt direct »</b></p>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Faire un frottis de matériel biologique (colonie isolée) en un film très fin et homogène, directement sur la cible MALDI.</li> <li>2. Recouvrir dans un laps de temps de 30 minutes maximum, la position de l'échantillon avec 1µL de solution de matrice HCCA.</li> <li>3. Laisser sécher à température ambiante.</li> <li>4. Procéder à l'analyse dans les 24h maximum.</li> </ol>
<p style="text-align: center;"><b><u>Méthode</u></b> <b><u>alternative 1</u></b> <b>« Extraction rapide »</b></p>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Faire un frottis de matériel biologique (colonie isolée) en un film très fin et homogène, directement sur la cible MALDI.</li> <li>2. Laisser sécher.</li> <li>3. A jouter 1µL d'acide formique (70%) sur le dépôt, dans un laps de temps de 30 min maximum.</li> <li>4. Laisser sécher.</li> <li>5. Recouvrir dans un laps de temps de 30 minutes maximum, la position de l'échantillon avec 1µL de solution de matrice HCCA.</li> <li>6. Laisser sécher.</li> <li>7. Procéder à l'analyse dans les 24h maximum.</li> </ol>
<p style="text-align: center;"><b><u>Méthode</u></b> <b><u>alternative 2</u></b> <b>« Extraction »</b></p>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Transférer le matériel biologique (une à plusieurs colonies) à l'aide d'une oëse stérile (de 1 ou 10µL) dans un tube Eppendorf contenant 300µL d'eau qualité HPLC.</li> <li>2. Mélanger jusqu'à obtention d'une solution trouble.</li> <li>3. Ajouter 900µL d'éthanol absolu. Mélanger.</li> <li>4. Centrifuger 2 min à 13 000 – 15 000 rpm.</li> <li>5. Retirer la totalité du surnageant à l'aide d'une pipette.</li> <li>6. Répéter les étapes 4 e 5.</li> <li>7. Laisser sécher en air ambiant le culot pendant 5 minutes.</li> <li>8. Ajouter 25µL d'acide formique (70%) et mélanger à l'aide d'une pipette jusqu'à ce que le culot soit dissout.</li> <li>9. A jouter 25µL d'acétonitrile (100%) en mélangeant le tout 2 à 3 fois par aspiration-refoulement.</li> <li>10. Centrifuger 2 min à 13 000 – 15 000 rpm.</li> <li>11. Déposer 1µL du surnageant sur la cible MALDI.</li> <li>12. Laisser sécher.</li> <li>13. Procéder à l'analyse dans les 24h maximum.</li> </ol>

ANNEXE 2 : Spectres de *Nocardia*, base de données MALDI-TOF (IHU, AP-HM)

Espèce	Nombre de spectre	Espèce	Nombre de spectre
<i>Nocardia cyriacigeorgica</i>	19	<i>Nocardia brevicatena</i>	1
<i>Nocardia farcinica</i>	13	<i>Nocardia concava</i>	1
<i>Nocardia carya</i>	8	<i>Nocardia elegans</i>	1
<i>Nocardia nova</i>	8	<i>Nocardia exalbida</i>	1
<i>Nocardia otitidiscaviarum</i>	8	<i>Nocardia higoensis</i>	1
<i>Nocardia abscessus</i>	5	<i>Nocardia ignorata</i>	1
<i>Nocardia veterana</i>	5	<i>Nocardia inohanensis</i>	1
<i>Nocardia sp</i>	4	<i>Nocardia kruczakiae</i>	1
<i>Nocardia asteroides</i>	3	<i>Nocardia mexicana</i>	1
<i>Nocardia paucivorans</i>	3	<i>Nocardia ninae</i>	1
<i>Nocardia araoensis</i>	2	<i>Nocardia niwae</i>	1
<i>Nocardia niigatensis</i>	2	<i>Nocardia salmonicida</i>	1
<i>Nocardia pneumoniae</i>	2	<i>Nocardia serialae</i>	1
<i>Nocardia pseudobrasiliensis</i>	2	<i>Nocardia sienota</i>	1
<i>Nocardia puris</i>	2	<i>Nocardia sungurluensis</i>	1
<i>Nocardia thailandica</i>	2	<i>Nocardia testacea</i>	1
<i>Nocardia transvalensis</i>	2	<i>Nocardia thraciensis</i>	1
<i>Nocardia vermiculata</i>	2	<i>Nocardia yamanashiensis</i>	1
<i>Nocardia wallacei</i>	2	<i>Nocardioides dubius</i>	1
<i>Nocardia africana</i>	1	<i>Nocardioides jensenii</i>	1
<i>Nocardia amikacinitolerans</i>	1	<i>Nocardioides massiliensis</i>	1
<i>Nocardia anaemiae</i>	1	<i>Nocardioides simplex</i>	1
<i>Nocardia aobensis</i>	1	<i>Nocardioides zeicola</i>	1
<i>Nocardia arthritidis</i>	1	<i>Nocardioopsis alba</i>	1
<i>Nocardia asiatica</i>	1	<i>Nocardioopsis baichengensis</i>	1
<i>Nocardia blacklockiae</i>	1	<i>Nocardioopsis dassonvillei</i>	1
<i>Nocardia brasiliensis</i>	1	<i>Nocardioopsis gilva</i>	1

**Nombre de spectres : 129**

**Nombre d'espèces différentes : 54**

## SERMENT DE GALIEN

*Je jure, en présence de mes maîtres de la Faculté, des conseillers de l'Ordre des pharmaciens et de mes condisciples :*

- ❖ *D'honorer ceux qui m'ont instruit dans les préceptes de mon art et de leur témoigner ma reconnaissance en restant fidèle à leur enseignement.*
- ❖ *D'exercer, dans l'intérêt de la santé publique, ma profession avec conscience et de respecter non seulement la législation en vigueur, mais aussi les règles de l'honneur, de la probité et du désintéressement.*
- ❖ *De ne jamais oublier ma responsabilité et mes devoirs envers le malade et sa dignité humaine, de respecter le secret professionnel.*
- ❖ *En aucun cas, je ne consentirai à utiliser mes connaissances et mon état pour corrompre les mœurs et favoriser des actes criminels.*

*Que les hommes m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses.*

*Que je sois couvert d'opprobre, méprisé de mes confrères, si j'y manque.*



## Résumé

Bien que la nocardiose soit une maladie rare, en moyenne 5 à 6 cas d'infection ou de colonisation à *Nocardia* sont diagnostiqués puis suivis au sein de l'Assistance Publique des Hôpitaux de Marseille (AP-HM) chaque année. S'agissant d'une pathologie potentiellement mortelle, il est important qu'une prise en charge adaptée soit mise en place dans les plus brefs délais. Néanmoins, les caractéristiques microbiologiques propres au genre *Nocardia*, et la symptomatologie aspécifique dont ces bactéries sont responsables, complexifient son diagnostic. L'évaluation de la sensibilité *in-vitro* des souches aux antibiotiques, bien que nécessaire aux cliniciens pour l'adaptation de l'antibiothérapie souvent prolongée qu'implique cette pathologie, est également une étape critique. Dans ce travail, nous avons réalisé une revue de la littérature sur les méthodes de diagnostic clinico-biologique des nocardioses ainsi qu'une étude de l'épidémiologie des nocardioses diagnostiquées à l'AP-HM entre janvier 2014 et juillet 2020. Au total, 41 patients ont été inclus dans ce travail. Les patients présentaient dans 83% des cas une immunodépression ou une pathologie pulmonaire sous-jacente. Ils étaient majoritairement pris en charge dans les services de pneumologie (n=16), transplantation rénale (n=5) et neurochirurgie (n=9). Les formes pulmonaires (n=18) étaient les formes majoritaires suivies des formes disséminées avec atteinte cérébrale (n=10). Au niveau microbiologique, nous avons observé une limite du MALDI-TOF pour l'identification correcte de l'espèce (seul 21,9% d'identification ; 9/41). Le panel des antibiotiques testés était cohérent avec les recommandations de traitements actuels mais la méthode de réalisation de l'antibiogramme pourrait être améliorée et le panel standardisé. Cette étude nous a permis de mieux cibler les personnes à risque, de faire un état des lieux des pratiques utilisées dans notre laboratoire et de proposer des axes d'amélioration pour le diagnostic et l'évaluation de la sensibilité aux antibiotiques des *Nocardia*.