



**HAL**  
open science

# Évaluation d'un changement de techniques de laboratoire pour la recherche de mycobactéries non tuberculeuses chez des patients atteints de mucoviscidose

Adeline Letrouit

## ► To cite this version:

Adeline Letrouit. Évaluation d'un changement de techniques de laboratoire pour la recherche de mycobactéries non tuberculeuses chez des patients atteints de mucoviscidose. Sciences pharmaceutiques. 2020. dumas-03103433

**HAL Id: dumas-03103433**

<https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-03103433v1>

Submitted on 8 Jan 2021

**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.



## THESE (Spécialité DES Biologie Médicale)

Conformément aux dispositions de l'arrêté du 4 octobre 2019

Conditionne l'entrée en phase 3 « dite de consolidation » sous réserve de la validation de la phase 2 de la maquette du DES suivi

Préparée au sein de l'Université de Caen Normandie

**Evaluation d'un changement de techniques de laboratoire pour la recherche de mycobactéries non tuberculeuses chez des patients atteints de mucoviscidose.**

Présentée par  
**Adeline LETROUIT**

**Soutenue publiquement le mardi 22 Septembre 2020  
devant le jury composé de**

Monsieur Jean-Christophe GIARD	Professeur des Universités / CHU Caen	Président du jury
Madame Claire DAUREL	Praticien Hospitalier / CHU Caen	Directeur de thèse
Madame Damasie MALANDAIN	Praticien Hospitalier / CHU Caen	Membre du jury
Madame Geneviève HERY ARNAUD	Professeur des Universités / Praticien Hospitalier / CHU Brest	Membre du jury

**Thèse dirigée par Claire DAUREL**

## LISTE DES ENSEIGNANTS-CHERCHEURS

**Directeur de la Faculté des Sciences Pharmaceutiques**  
Professeur Michel BOULOUARD

### **Assesseurs**

Professeur Pascale SCHUMANN-BARD  
Professeur Anne-Sophie VOISIN-CHIRET

**Directrice administrative**  
Madame Sarah CHEMTOB

**Directrice administrative adjointe**  
Madame Emmanuelle BOURDON

### PROFESSEURS DES UNIVERSITES

<b>BOULOUARD Michel</b> .....	Physiologie, Pharmacologie
<b>BUREAU Ronan</b> .....	Biophysique, Chémoinformatique
<b>COLLOT Valérie</b> .....	Pharmacognosie
<b>DALLEMAGNE Patrick</b> .....	Chimie médicinale
<b>DAUPHIN François</b> .....	Physiologie, Pharmacologie
<b>DELEPEE Raphaël</b> .....	Chimie analytique
<b>FABIS Frédéric</b> .....	Chimie organique
<b>FRERET Thomas</b> .....	Physiologie, Pharmacologie
<b>GARON David</b> .....	Botanique, Mycologie, Biotechnologies
<b>GIARD Jean-Christophe</b> .....	Bactériologie, Virologie
<b>MALZERT-FREON Aurélie</b> .....	Pharmacie galénique
<b>ROCHAIIS Christophe</b> .....	Chimie organique
<b>SCHUMANN-BARD Pascale</b> .....	Physiologie, Pharmacologie
<b>SICHEL François</b> .....	Toxicologie
<b>SOPKOVA Jana</b> .....	Biophysique, Drug design
<b>VOISIN-CHIRET Anne-Sophie</b> .....	Chimie médicinale

### MAITRES DE CONFERENCES DES UNIVERSITES

<b>ANDRE Véronique – HDR</b> .....	Biochimie, Toxicologie
<b>BOUET Valentine – HDR</b> .....	Physiologie, Pharmacologie
<b>CAILLY Thomas – HDR</b> .....	Chimie bio-inorganique, Chimie organique
<b>DENOYELLE Christophe – HDR</b> .....	Biologie cellulaire et moléculaire, Biochimie, Cancérologie
<b>DHALLUIN Anne</b> .....	Bactériologie, Virologie, Immunologie
<b>ELDIN de PECOULAS Philippe – HDR</b> .....	Parasitologie, Mycologie médicale
<b>GROO Anne-Claire</b> .....	Pharmacie galénique
<b>KIEFFER Charline</b> .....	Chimie médicinale

<b>KRIEGER Sophie</b> (Praticien hospitalier) – HDR	Biologie clinique
<b>LAPORTE-WOJCIK Catherine</b>	Chimie bio-inorganique
<b>LEBAILLY Pierre</b> – HDR	Santé publique
<b>LECHEVREL Mathilde</b> – HDR	Toxicologie
<b>LEGER Marianne</b>	Physiologie, Pharmacologie
<b>LEPAILLEUR Alban</b> – HDR	Modélisation moléculaire
<b>N'DIAYE Monique</b>	Parasitologie, Mycologie médicale, Biochimie clinique
<b>PAIZANIS Eleni</b>	Physiologie, Pharmacologie
<b>PEREIRA-ROSENFELD Maria de Fatima</b>	Chimie organique et thérapeutique
<b>POTTIER Ivannah</b>	Chimie et toxicologie analytiques
<b>PREVOST Virginie</b> – HDR	Chimie analytique, Nutrition, Education thérapeutique du patient
<b>QUINTIN Jérôme</b>	Pharmacognosie
<b>RIOULT Jean-Philippe</b>	Botanique, Mycologie, Biotechnologies
<b>SINCE Marc</b>	Chimie analytique
<b>VILLEDIEU Marie</b> – HDR	Biologie et thérapies innovantes des cancers

#### **PROFESSEUR AGREGE (PRAG)**

<b>PRICOT Sophie</b>	Anglais
----------------------	---------

#### **PERSONNEL ASSOCIE A TEMPS PARTIEL (PAST)**

<b>SAINT-LORANT Guillaume</b>	Pharmacie clinique
<b>SEDILLO Patrick</b>	Pharmacie officinale
<b>RICHARD Estelle</b>	Pharmacie officinale

#### **ASSISTANT HOSPITALO-UNIVERSITAIRE**

<b>JOURDAN Jean-Pierre</b>
----------------------------

**Enseignants titulaires du Diplôme d'Etat de Docteur en Pharmacie**

# Remerciements

## **Au président du Jury,**

Merci au Docteur Jean-Christophe Giard de m'avoir fait l'honneur d'accepter de présider ce jury.

## **A ma directrice de thèse, Docteur Claire Daurel,**

Merci de m'avoir proposé ce sujet très intéressant et de m'avoir encadrée dans ce travail. Merci d'avoir été disponible et de m'avoir permis de réaliser ma thèse dans les meilleures conditions.

## **Aux membres du jury,**

Merci d'avoir accepté de faire partie de mon jury de thèse et le temps consacré à sa lecture. Et merci particulièrement à Madame Docteur Geneviève HERY ARNAUD d'avoir accepté avec beaucoup d'enthousiasme de venir de si loin, Brest pour assister à cette soutenance.

## **Aux techniciens du laboratoire de Microbiologie,**

Merci d'avoir contribué à l'élaboration technique de cette thèse.

## **A ma famille,**

Merci à mes parents de m'avoir toujours épaulée dans mes études et la vie de tous les jours. Merci de m'avoir soutenue dans mes choix professionnels et de toujours croire en moi.

Merci à mes sœurs d'avoir été là, de votre soutien constant et de vos précieux conseils.

Merci à tous les membres de ma famille d'avoir fait la personne que je suis aujourd'hui et de l'amour que vous me portez.

## **A mes amis,**

A Léonie, merci d'avoir été mon binôme de TP pendant toutes ces années de pharmacie et d'avoir été à mes côtés lors de cette dure épreuve de concours.

Merci à tous mes amis de faculté et de longue date pour ces années passées ensemble.

## **Alan,**

Merci d'avoir toujours cru en moi, même dans les moments les plus durs. Merci de ta patience, de ton écoute et de me soutenir au quotidien. Merci pour tout et ton amour.

# Sommaire

<b>LISTE DES ABREVIATIONS .....</b>	<b>1</b>
<b>LISTE DES FIGURES.....</b>	<b>3</b>
<b>LISTE DES TABLEAUX .....</b>	<b>4</b>
<b>INTRODUCTION.....</b>	<b>5</b>
<b>PARTIE I : LA MUCOVISCIDOSE.....</b>	<b>7</b>
<b>I. EPIDEMIOLOGIE.....</b>	<b>7</b>
1. GENERALITES.....	7
2. PREVALENCE.....	8
3. MORTALITE ET ESPERANCE DE VIE .....	9
<b>II. GENETIQUE .....</b>	<b>9</b>
1. TRANSMISSION .....	9
2. GENE.....	10
3. PROTEINE .....	10
4. MUTATIONS.....	10
5. CORRELATION GENOTYPE-PHENOTYPE.....	12
<b>III. DEPISTAGE ET DIAGNOSTIC .....</b>	<b>13</b>
1. DEPISTAGE NEONATAL .....	13
1. <i>TIR</i> .....	13
2. <i>Etudes génétiques</i> .....	14
3. <i>Test à la sueur</i> .....	14
4. <i>Organigramme</i> .....	15
2. DEPISTAGE PRENATAL.....	16
3. DIAGNOSTIC .....	16
<b>IV. SYMPTOMES .....</b>	<b>16</b>
1. ATTEINTE DIGESTIVE.....	17
2. ATTEINTE RESPIRATOIRE.....	18
1. <i>Infections bactériennes</i> .....	19
1. <i>Staphylococcus aureus</i> .....	19
2. <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	20
3. <i>Haemophilus influenzae</i> .....	21
4. <i>Stenotrophomonas maltophilia</i> .....	21
5. <i>Achromobacter xylosoxidans</i> .....	22
6. <i>Burkholderia cepacia complex</i> .....	22
7. <i>Streptococcus pneumoniae</i> .....	23
8. <i>MNT</i> .....	24
2. <i>Infections fongiques</i> .....	24
3. <i>Infections virales</i> .....	25
<b>V. PRISE EN CHARGE THERAPEUTIQUE.....</b>	<b>25</b>
1. SYMPTOMATIQUE .....	25
2. TRANSPLANTATION .....	26
3. NOUVELLES THERAPIES.....	26
<b>PARTIE II : LES MYCOBACTERIES NON TUBERCULEUSES CHEZ LES PATIENTS AYANT LA MUCOVISCIDOSE.....</b>	<b>27</b>

<b>I. GENERALITES.....</b>	<b>27</b>
1. CLASSIFICATION.....	28
2. CARACTERISTIQUES .....	29
<b>II. EPIDEMIOLOGIE.....</b>	<b>29</b>
<b>III. MYCOBACTERIES NON TUBERCULEUSES PATHOGENES .....</b>	<b>31</b>
1. MYCOBACTERIES DU COMPLEXE AVIAIRE .....	31
2. MYCOBACTERIES DU COMPLEXE ABSCESSUS.....	32
3. TRANSMISSION .....	33
<b>IV. DIAGNOSTIC .....</b>	<b>33</b>
<b>V. FACTEURS DE RISQUE .....</b>	<b>36</b>
<b>VI. TRAITEMENTS .....</b>	<b>37</b>
1. TRAITEMENTS MEDICAMENTEUX.....	37
2. TRANSPLANTATION PULMONAIRE .....	39
<b>VII. RESISTANCES .....</b>	<b>40</b>
1. MACROLIDES.....	40
1. <i>MABSC</i> .....	40
2. <i>Résistance acquise</i> .....	42
2. AMINOSIDES.....	43
<b>VIII. IDENTIFICATION AU LABORATOIRE.....</b>	<b>43</b>
1. DECONTAMINATION .....	43
2. MICROSCOPE.....	44
3. CULTURES .....	46
1. <i>Milieux de culture solide</i> .....	46
2. <i>Milieux de culture liquide</i> .....	47
3. <i>Nouveaux milieux de culture</i> .....	48
1. <i>Gélose pour la recherche de Burkholderia cepacia</i> .....	48
2. <i>Gélose RGM</i> .....	48
4. <i>Conditions de culture</i> .....	50
4. IDENTIFICATION .....	51
1. <i>Tests phénotypiques</i> .....	51
2. <i>Test chromatographique</i> .....	51
3. <i>Séquençage de gènes de ménage</i> .....	51
4. <i>PCR avec hybridation sur support solide (Kit commercial)</i> .....	52
5. <i>PCR couplée à une restriction enzymatique</i> .....	53
6. <i>Sondes spécifiques</i> .....	54
7. <i>Spectrométrie de masse</i> .....	54
<b>PARTIE III : NOTRE ETUDE.....</b>	<b>55</b>
<b>I. OBJECTIF DE L'ETUDE .....</b>	<b>55</b>
<b>II. MATERIELS ET METHODES .....</b>	<b>55</b>
1. ÉCHANTILLONS .....	55
2. PROTOCOLE DE DIAGNOSTIC DES MNT AU LABORATOIRE.....	56
1. <i>Méthodes de cultures</i> .....	56
2. <i>Identification</i> .....	57
3. <i>Sensibilité aux antibiotiques</i> .....	59
3. ETHIQUE.....	60

<b>III. RESULTATS.....</b>	<b>60</b>
1. CARACTERISTIQUES DES PATIENTS .....	60
1. <i>Epidémiologie</i> .....	60
2. <i>Mutations</i> .....	61
3. <i>Diagnostic de la mucoviscidose</i> .....	61
4. <i>Infections bactériennes</i> .....	62
5. <i>ECBC</i> .....	63
2. CONTAMINATION DES MILIEUX DE CULTURES .....	63
3. PATIENTS POSITIFS .....	65
1. <i>Cas n°1</i> .....	65
2. <i>Cas n°2</i> .....	67
3. <i>Cas n°3</i> .....	70
4. <i>Cas n°4</i> .....	73
5. <i>Temps de pousse des cultures positives</i> .....	74
4. GELOSE <i>BURKHOLDERIA CEPACIA</i> .....	75
<b>IV. DISCUSSIONS.....</b>	<b>78</b>
<b>CONCLUSION.....</b>	<b>83</b>
<b>BIBLIOGRAPHIES.....</b>	<b>85</b>

# Liste des abréviations

ABC : ATP-Binding Cassette

ABPA : Aspergillose BronchoPulmonaire Allergique

AFB : Acid Fast Bacillus

AMM : Autorisation de Mise sur le Marché

AS : Additional Species

ATP : Adénosine triphosphate

ATS/IDSA : American Thoracic Society/Infectious Diseases Society of America

ATU : Autorisation Temporaire d'Utilisation

BAAR : Bacille Acido Alcolo Résistant

BGN : Bacille à Gram Négatif

Bp : paire de base

BSCA : *Burkholderia cepacia* selective agar

CAMHB : Cation Adjusted Mueller-Hinton Broth

CASFM : Comité de l'antibiogramme de la Société Française de Microbiologie

CF : Cystic Fibrosis

CFTR : Cystic Fibrosis Transmembrane conductance Regulator

CLHP : Chromatographie Liquide de Haute Performance

CM : Common Mycobacteria

CMI : Concentration Minimale Inhibitrice

CRCM : Centre de Ressources et de Compétences pour la Mucoviscidose

CT-scan : Computed Tomography scan

D1 : Simple décontamination

D2 : Double décontamination

DNN : Dépistage Néonatal

DPNI : Dépistage Prénatal Non Invasif

ECBC : Examen CytoBactériologique des Crachats

ECG : électrocardiogramme

FEV<sub>1</sub> : Forced Expiratory Volume in 1 second

ISHLT : International Society for Heart and Lung Transplantations

ITS : Internal Transcribed Spacer

LBA : Lavage Broncho-Alvéolaire

LJ : Löwenstein-Jensen

MABSC : *Mycobacteroides abscessus complex*

MAC : *Mycobacterium avium complex*

MALDI-TOF : Matrix Assisted Laser Desorption Ionization Time Of Flight

MGIT : Mycobacterial Growth Indicator Tube

MGIT<sub>1</sub> : MGIT ayant eu une simple décontamination

MGIT<sub>2</sub> : MGIT ayant eu une double décontamination

MNT : Mycobactéries Non Tuberculeuse

NALC : N-acétyl L-cystéine

NTM PD : NonTuberculous Mycobacteria Pulmonary Disease

OADC : Acide oléique, Albumine de bovin, Dextrose, Chlorure de sodium et Catalase

PANTA : Polymyxine B, Amphotéricine, acide Nalidixique, Triméthoprim et Azlocilline

PCR : Polymerase Chain Reaction

PRA : PCR-Restriction enzyme Analysis

RGM : Rapidly Growing Mycobacteria

SARM : Staphylococcus aureus Résistant à la Méricilline

SASM : Staphylococcus aureus Sensible à la Méricilline

SCVs : Small Colony Variants

SGM : Slow Growing Mycobacteria

SODI : Syndrome d'Occlusion Distale de l'Intestin

TIR : Trypsine Immuno Reaction

VEMS : Volume Expiratoire Maximal par Seconde

VGS : Viridans Group Streptococci

# Liste des figures

FIGURE 1 : DONNEES EPIDEMIOLOGIQUES SUR L'INCIDENCE DE LA MUCOVISCIDOSE EN FONCTION L'ORIGINE ETHNIQUE DES PATIENTS (10).....	7
FIGURE 2 : EVOLUTION DU NOMBRE DE PATIENTS AYANT LA MUCOVISCIDOSE DEPUIS 1992 (11). .....	7
FIGURE 3 : PREVALENCE DE LA MUCOVISCIDOSE PAR DEPARTEMENT (NOMBRE DE PATIENTS POUR 100 000 HABITANTS)(11).....	8
FIGURE 4 : NOMBRE DE DECES DANS L'ANNEE, EVOLUTION DEPUIS 1992 (11). .....	9
FIGURE 5 : CLASSIFICATION DES MUTATIONS DU GENE CFTR (23). .....	11
FIGURE 6 : ORGANIGRAMME DU DEPISTAGE NEONATAL DE LA MUCOVISCIDOSE (42). .....	15
FIGURE 7 : MECANISME PHYSIOPATHOLOGIQUE DE L'ATTEINTE PULMONAIRE CHEZ LES PATIENT AYANT LA MUCOVISCIDOSE (52). .....	18
FIGURE 8 : GELOSE SANG AVEC DES COLONIES DE STAPHYLOCOCCUS AUREUS NORMALES A GAUCHE ET DES SCVS A DROITE (64). .....	20
FIGURE 9 : SOUCHE MUCOÏDE DE PSEUDOMONAS AERUGINOSA A GAUCHE DE LA GELOSE ET NON MUCOÏDE A DROITE (58) .....	21
FIGURE 10 : REPARTITION DES BACTERIES CLINIQUEMENT IMPORTANTES CHEZ LES PATIENTS AYANT LA MUCOVISCIDOSE EN FONCTION DE LEUR AGE (11). .....	24
FIGURE 11 : CLASSIFICATION DES MYCOBACTERIES ATYPIQUES SELON RUNYON EN FONCTION DE LA PIGMENTATION DE LA COLONIE ET DU TEMPS DE CROISSANCE (150,151). .....	28
FIGURE 12 : CLASSIFICATION DES MYCOBACTERIES (152).....	28
FIGURE 13 : COMPOSITION DE LA PAROI DES MYCOBACTERIES (153). .....	29
FIGURE 14 : AUGMENTATION DE LA PREVALENCE DES MNT EN ISRAËL (159). .....	30
FIGURE 15 : PREVALENCE DE DIFFERENTS ESPECES DE MNT CHEZ LES PATIENTS AYANT LA MUCOVISCIDOSE DANS DIFFERENTES REGIONS DU MONDE (165). .....	31
FIGURE 16 : DISTRIBUTION DES MNT : MAC ET MABSC EN FONCTION DE L'AGE DE DIAGNOSTIC DE LA MUCOVISCIDOSE (170). .....	33
FIGURE 17 : IMAGE DE CT-SCAN D'UNE INFECTION PULMONAIRE A MAC. A. IMAGE CAVITAIRE. B. AGGRAVATION RADIOLOGIQUE SOUS TRAITEMENT. C. AMELIORATION RADIOLOGIQUE (179).....	34
FIGURE 18 : ALGORITHME POUR L'INVESTIGATION D'UNE SUSPICION DE NTM-PD (171) AFB : ACID FACT BACILLI, CF : CYSTIC FIBROSIS, FEV1 : FORCED EXPIRATORY VOLUME IN 1S, HRCT : HIGH RESOLUTION CT. .....	35
FIGURE 19 : SCHEMA DE PRISE EN CHARGE THERAPEUTIQUE DES MABSC ET MAC (171). .....	38
FIGURE 20 : INDUCTION DU GENE ERM(41) EN FONCTION DE LA MOLECULE INCUBEE PENDANT 24H SUR UNE SOUCHE MC879 DE MYCOBACTEROIDES ABSCESSUS. CLR : CLARITHROMYCINE (INDUCTION X 172), HMR : KETOLIDE (INDUCTION X 52), TEL : TELITHROMYCINE (INDUCTION X 250), CLN : CLINDAMYCINE (INDUCTION X 60), Q : QUINUPRISTINE (INDUCTION X 23) ET M : MEDIUM ALONE (200).....	41
FIGURE 21 : PRESENCE DE BAAR A LA COLORATION DE ZIEHL NEELSEN.....	45
FIGURE 22 : PRESENCE DE BAAR A LA COLORATION A L'AURAMINE. ....	45
FIGURE 23 : MILIEUX DE CULTURE SOLIDE : LÖWENSTEIN-JENSEN EN HAUT ET COLESTOS EN BAS. ....	47
FIGURE 24 : TEMPS DE DETECTION DES MNT SUR RGM VERSUS SUR BCSA SUR DES PRELEVEMENTS RESPIRATOIRES DE PATIENTS AYANT LA MUCOVISCIDOSE (231). .....	49
FIGURE 25 : CORRELATION ENTRE LE NOMBRE DE COLONIES ISOLEES SUR GELOSE RGM A 30°C ET TYPE DE CULTURE POSITIVE. BLEU : GELOSES RGM POSITIVE ET AFB NEGATIVE. ROUGE : GELOSES RGM POSITIVE ET AFB POSITIVE (236).....	50
FIGURE 26 : LES TROIS SOUS-ESPECES DE MYCOBACTEROIDES ABSCESSUS SONT IDENTIFIEES GRACE A LA PRESENCE (+) OU L'ABSENCE (-) DE CINQ PICS CARACTERISTIQUES. (307). ....	54
FIGURE 27 : PRISE EN CHARGE DES EXPECTORATIONS DE PATIENTS ATTEINT DE LA MUCOVISCIDOSE AU CHU DE CAEN. ....	57
FIGURE 28 : PRISE EN CHARGE DES PRELEVEMENTS POSITIFS. ....	58
FIGURE 29 : AGE DE DIAGNOSTIC DE LA MUCOVISCIDOSE DANS NOTRE POPULATION. ....	62
FIGURE 30 : ORGANIGRAMME REPRESENTANT LES PRELEVEMENTS DE NOTRE ETUDE.....	65
PHOTO 31 : EXAMEN DIRECT AURAMINE POSITIF 3+ POUR LE PATIENT NUMERO 1. ....	66
PHOTO 32 : MILIEU COLETSOS INCUBE A 30°C POSITIF A M. ABSCESSUS POUR LE PATIENT NUMERO 1. ....	67

PHOTO 33 : MILIEU COLETSOS INCUBE A 37°C POSITIF A M. ABSCESSUS POUR LA PATIENT NUMERO 1. ....	67
FIGURE 34 : FRISE CHRONOLOGIQUE DES PRELEVEMENTS DE LA PATIENT NUMERO 2. CHAQUE RECTANGLE CORRESPOND AUX 6 SEMAINES D'INCUBATION DES MGIT. AU-DESSUS FIGURE LES DATES DE PRELEVEMENTS ET EN DESSOUS LES DELAIS DE CROISSANCE DES MGIT POSITIFS. MGIT <sub>1</sub> = MGIT AYANT EU UNE SEULE DECONTAMINATION ET MGIT <sub>2</sub> = MGIT AYANT EU DEUX DECONTAMINATIONS. ....	68
PHOTO 35 : COLORATION A L'AURAMINE DE LA CULTURE POSITIVE POUR LA PATIENTE NUMERO 2. ....	69
FIGURE 36 : MILIEU COLETSOS INCUBE A 30°C POSITIF A M. LENTIFLAVUM POUR LA PATIENTE NUMERO 2. ....	69
FIGURE 37 : MILIEU COLETSOS INCUBE A 37°C POSITIF A M. LENTIFLAVUM POUR LA PATIENTE NUMERO 2. ....	69
FIGURE 38 : PRISE EN CHARGE THERAPEUTIQUE DE L'INFECTION A M. ABSCESSUS SUBSP MASSILIENSE CHEZ LA PATIENTE NUMERO 3. TRAITEMENT IV : AMIKACINE, IMIPENEME, TIGECYCLINE ET AZITHROMYCINE. TRAITEMENT D'ENTRETIEN : AMIKACINE EN AEROSOL, CLOFAZIMINE ET AZITHROMYCINE. ....	71
FIGURE 39 : FRISE CHRONOLOGIQUE DES PRELEVEMENTS DE LA PATIENTE NUMERO 3. CHAQUE RECTANGLE CORRESPOND AUX 6 SEMAINES D'INCUBATION DES MGIT. AU-DESSUS FIGURE LES DATES DE PRELEVEMENTS ET EN DESSOUS LES DELAIS DE CROISSANCE DES MGIT POSITIFS. MGIT <sub>1</sub> = MGIT AYANT EU UNE SEULE DECONTAMINATION ET MGIT <sub>2</sub> = MGIT AYANT EU DEUX DECONTAMINATIONS. ....	72
FIGURE 40 : MILIEU COLETSOS INCUBE A 37°C POSITIF A M. ABSCESSUS SUBSP MASSILIENSE POUR LA PATIENTE NUMERO 3. ....	72
FIGURE 41 : MILIEU COLETSOS INCUBE A 30°C POSITIF A M. ABSCESSUS SUBSP MASSILIENSE POUR LA PATIENTE NUMERO 3. ....	72
PHOTO 42 : EXAMEN DIRECT AURAMINE POSITIF 2+ POUR LA PATIENTE NUMERO 3. ....	73
PHOTO 43 : GELOSE "CEPACIA" POSITIVE A M. ABSCESSUS POUR LE PATIENT NUMERO 1. ....	76
FIGURE 44 : TABLEAU RECAPITULATIF DES GELOSES "CEPACIA" CONTAMINEES, STERILES ET POSITIVES. ....	77

## Liste des tableaux

TABLEAU 1 : REPARTITION DES GERMES RESPIRATOIRES SELON LE REGISTRE FRANÇAIS DE LA MUCOVISCIDOSE 2017 (11). ....	19
TABLEAU 2 : CLASSIFICATION DU COMPLEXE BURKHOLDERIA CEPACIA (58,97,101,102). ....	23
TABLEAU 3: REPARTITION DES VGS DANS LES EXPECTORATIONS DES PATIENTS AYANT LA MUCOVISCIDOSE (120). ....	24
TABLEAU 4 : TABLEAU RECAPITULATIF DE L'ASSOCIATION DU FEV <sub>1</sub> ET DE L'INFECTION A MNT. FEV <sub>1</sub> : FORCED EXPIRATORY VOLUME = VEMS EN FRANCE : VOLUME EXPIRATOIRE MAXIMAL EN 1 SECONDE. ....	36
TABLEAU 5 : PROFIL DE RESISTANCE DES MABSC A LA CLARITHROMYCINE (202,203,205,207). ....	42
TABLEAU 6 : CARACTERISTIQUES EPIDEMIOLOGIQUES DES PATIENTS. ....	60
TABLEAU 7 : REPARTITION DE LA MUTATION DELTA F508 DANS NOTRE POPULATION. ....	61
TABLEAU 8 : COLONISATION OU INFECTION AUX PRINCIPALES BACTERIES RESPONSABLES D'INFECTIONS RESPIRATOIRE. ....	63
TABLEAU 9 : TABLEAU RECAPITULATIF DU NOMBRE DE PRELEVEMENTS PAR PATIENTS ..... 63	63
TABLEAU 10 : TAUX DE CONTAMINATION DES GELOSES ..... 64	64
TABLEAU 11 : PRIX UNITAIRE DES MILIEUX DE CULTURE MGIT ET COLETSOS ET POUR UNE DECONTAMINATION. 180 ETANT LE NOMBRE MOYEN DE PRELEVEMENTS PAS AN AU CHU DE CAEN POUR LA RECHERCHE DE MNT. TAUX DE GELOSE CONTAMINEES LORS D'UNE SIMPLE DECONTAMINATION : 29% ..... 81	81

# Introduction

La mucoviscidose est une maladie génétique potentiellement grave, la plus fréquente dans la population caucasienne. Cette maladie touche entre 90 000 et 100 000 personnes dans le monde (1). L'incidence moyenne en Europe et en Amérique du Nord est de une naissance sur 3500 (2).

Connue depuis le Moyen-âge, les médecins de l'époque observent déjà que les enfants ayant une peau « salée » ne survivent pas longtemps. « Malheur à l'enfant qui le baisé sur le front a un goût salé, il est envouté et bientôt doit mourir » (3). Ce n'est qu'en 1936 qu'un pédiatre Suisse Guido Fanconi, met un nom sur cette maladie : la fibrose kystique du pancréas et bronchectasie. Le nom de mucoviscidose est apparu une dizaine d'années plus tard grâce à l'observation d'une diffusion générale de mucus visqueux dans l'organisme. Mais il faudra attendre de nombreuses années avant de trouver la cause de cette maladie. En effet, c'est en 1989 que le gène CFTR est identifié (4).

Cette maladie touche de nombreux organes : poumons, pancréas, voies biliaires et tube digestif. L'atteinte pulmonaire diffère des autres atteintes viscérales, car elle est la principale cause de décès prématuré et le siège de complications infectieuses chroniques. Les patients ayant la mucoviscidose vont présenter des infections pulmonaires aiguës et chronique provoquées par des bactéries, les plus communes étant *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* et *Stenotrophomonas maltophilia*. Ils peuvent aussi présenter des infections pulmonaires à mycobactéries non tuberculeuses (MNT).

Les infections à MNT chez les patients atteints de mucoviscidose ont été découvertes dans les années 1980 (5,6) mais étaient considérées comme rares. C'est après les années 1990 que le nombre de cas de patients infectés a commencé à augmenter fortement avec des prévalences variant de 2 à 28% en fonction des régions étudiées (7). Les MNT les plus fréquentes en France et dans la plupart du monde sont *Mycobacteroides abscessus complex* et *Mycobacterium avium complex*. Ces infections sont difficiles à traiter et requièrent des traitements antibiotiques de longue durée. Les MNT sont des germes de l'environnement dont la transmission interhumaine est très controversée de nos jours. La croissance microbiologique des MNT est complexe et longue nécessitant une technique d'ensemencement particulière des prélèvements.

De nos jours, il n'existe pas de traitement curatif de la mucoviscidose, seulement des traitements symptomatiques. La greffe pulmonaire est le traitement de dernier recours. Cependant, des thérapies innovantes modulant le gène CFTR Semblent prometteuses.

Depuis la création des CRCM (Centre de Ressources et de Compétences pour la mucoviscidose) et du dépistage néonatal obligatoire en 2002, la prise en charge de la mucoviscidose est plus précoce et mieux suivie permettant l'augmentation de l'espérance de vie et l'amélioration de la qualité de vie des patients.

La première partie de cette thèse fait une mise au point épidémiologique sur la mucoviscidose et parle de la prise en charge de cette maladie de nos jours.

La deuxième partie traite des mycobactéries non tuberculeuses chez les patients ayant la mucoviscidose. Elle intègre l'épidémiologie, la transmission, le diagnostic microbiologique avec une partie consacrée à l'identification au laboratoire ainsi que le traitement des MNT.

Enfin la troisième partie expose l'objectif de cette thèse : l'évaluation d'un changement de méthodes de décontamination des expectorations de patients atteints de mucoviscidose pour la recherche de mycobactéries non tuberculeuses avec une exposition et analyse des résultats obtenus.

Cette étude a été inspirée par à la mise en place du protocole national nommé CIMeNT (Epidémiologie et Caractéristiques Cliniques des Infections à Mycobactéries Non Tuberculeuses chez les patients atteints de mucoviscidose) en décembre 2019 au CHU de Caen. Ce protocole a pour but principal de déterminer la prévalence des MNT en France chez les patients ayant la mucoviscidose.

# Partie I : La mucoviscidose

## I. Epidémiologie

### 1. Généralités

La mucoviscidose est une maladie génétique potentiellement grave la plus répandue dans la population d'origine caucasienne. Elle concerne 1 naissance sur 3500 en Europe (2). En France, il y a un gradient Nord-Sud avec une plus forte incidence dans le Nord (8). Cette maladie est présente dans tout le monde mais avec des incidences variables selon les régions. On la retrouve rarement en Afrique et en Asie (9) (figure1).

Incidence à la naissance	
Caucasiens	1/2 500 (1/1 800 à 1/3 500)
Moyen-Orient	1/4 400
Hispaniques	1/8 500
Noirs américains / Africains	1/20 000
Asiatiques	1/32 400

Figure 1 : Données épidémiologiques sur l'incidence de la mucoviscidose en fonction l'origine ethnique des patients (10).

Selon le registre français de la mucoviscidose de 2017 (11), 7114 patients ont été recensés (figure 2). Ce nombre était d'environ 1500 cas en 1992, ce qui signe une augmentation importante du nombre de malades.

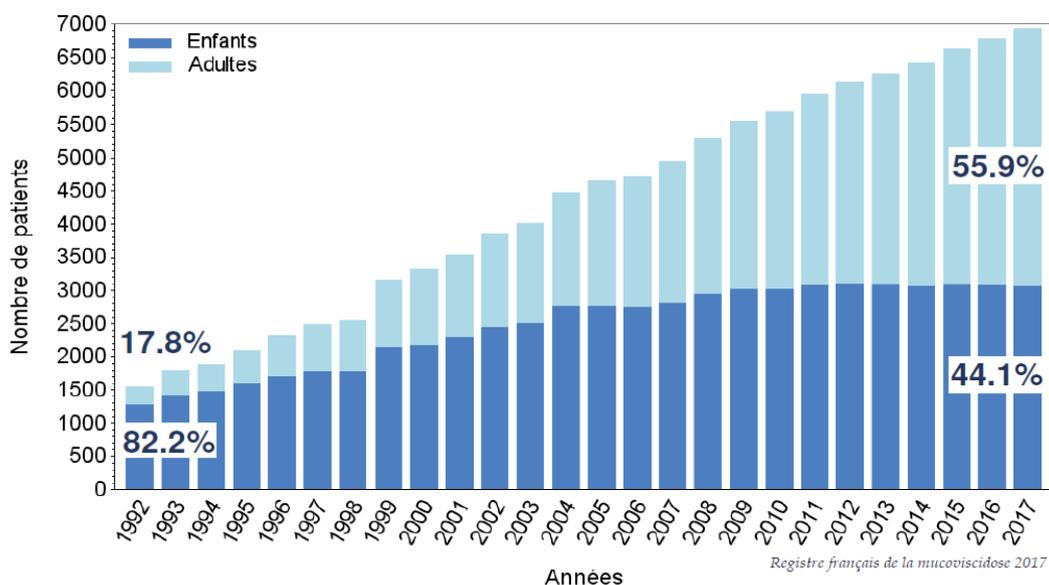


Figure 2 : Evolution du nombre de patients ayant la mucoviscidose depuis 1992 (11).

Initialement désignée comme une maladie infantile (82,2% des sujets malades en 1992 étaient des enfants), la mucoviscidose de nos jours atteint aussi bien les patients adultes qu'enfants. En effet, en 2017 les adultes représentent 55,9% des sujets malades et les enfants 44,1% comme nous le montre la figure 2.

On peut trouver plusieurs explications à cette augmentation du nombre de cas totaux et du nombre d'adultes :

- la réalisation du diagnostic néonatal permet une prise en charge précoce des patients atteints de la mucoviscidose.
- le développement de thérapies innovantes et l'accès à la transplantation pulmonaire améliorent le pronostic des patients.
- le nombre de patients diagnostiqués tardivement à l'âge adulte (forme clinique modérée de la mucoviscidose) a augmenté (12).

Le nombre de patients âgés de plus de 40 ans est sans cesse en augmentation avec un taux à 11,9% en 2017. L'âge moyen de cette pathologie est de 22,3 ans en 2017 (11).

## 2. Prévalence

La prévalence de la maladie diffère selon les régions comme on peut le voir sur la carte ci-dessous. Le Bretagne possède un taux de prévalence élevé à la différence de la zone Parisienne ou du Sud-Ouest de la France (figure 3). Pour la Basse-Normandie, la prévalence est très hétérogène : elle est élevée dans le Calvados, modérée dans l'Orne et faible dans la Manche (11) (figure 3).

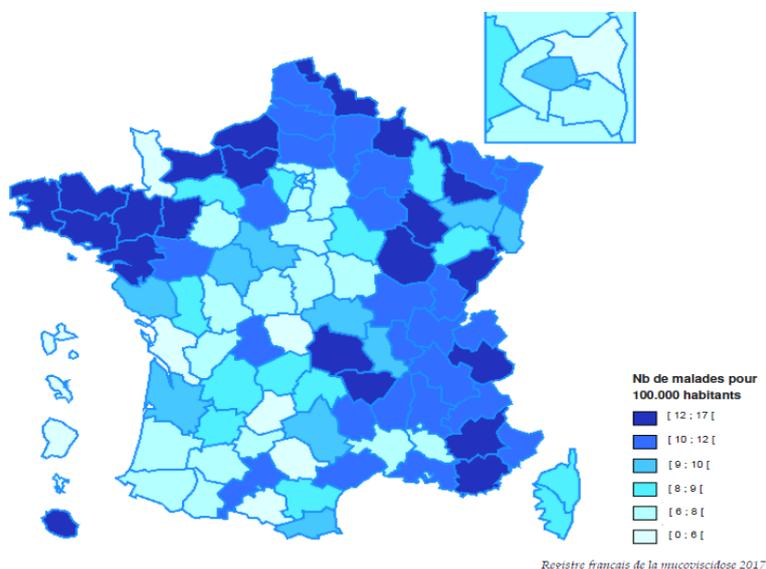


Figure 3 : Prévalence de la mucoviscidose par département (nombre de patients pour 100 000 habitants)(11).

### 3. Mortalité et espérance de vie

Une meilleure prise en charge des patients malades grâce à un dépistage néonatal précoce systématique depuis 2002 ainsi que l'apparition de nouvelle thérapeutique a fait baisser le nombre de décès dû à la mucoviscidose. Comme on peut le voir sur la figure 4, le taux brut de mortalité atteint son maximum à 19 pour 1000 patients en 2001 puis baisse jusqu'à 8,1 pour 1000 patients en 2017. Cette année-là, il y a eu 56 décès répertoriés pour un âge moyen de 35 ans (en 2009, âge moyen de décès était de 23,5 ans) (11).

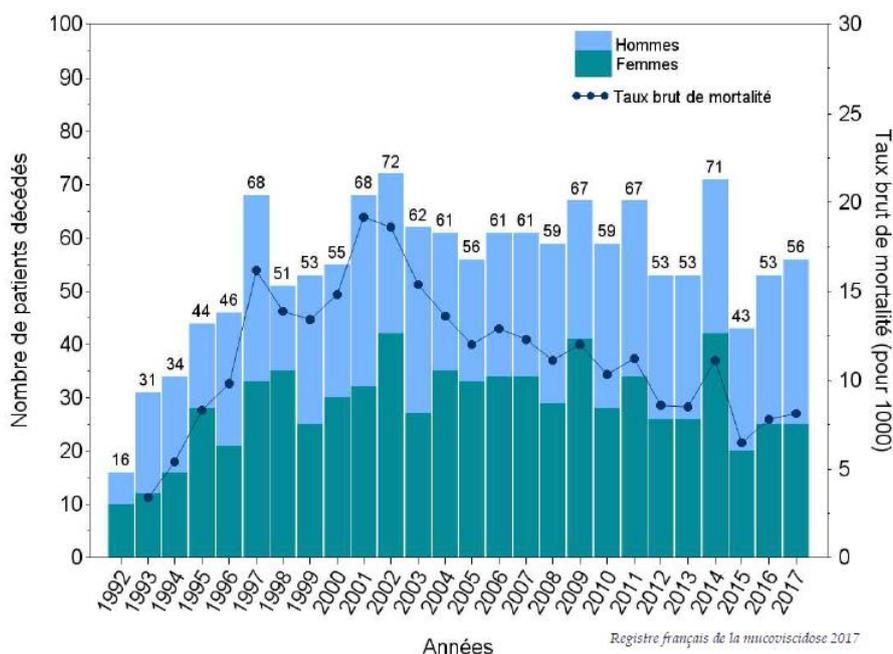


Figure 4 : Nombre de décès dans l'année, évolution depuis 1992 (11).

En parallèle, l'espérance de vie de ces patients a beaucoup augmenté. En effet, en 1965, elle est de seulement 7 ans alors que depuis 2014, elle est passée à plus de 50 ans (13).

## II. Génétique

### 1. Transmission

La mucoviscidose est une maladie génétique à transmission autosomique récessive. Il faut donc hériter de deux allèles mutés pour être malade. Il existe donc des porteurs sains hétérozygotes, qui représente 4% de la population générale occidentale (13). Pour un couple sain hétérozygote à chaque grossesse le risque statistique est :

- $\frac{1}{4}$  enfant malade
- $\frac{1}{4}$  enfant indemne non hétérozygote
- $\frac{1}{2}$  enfant hétérozygote sain

## 2. Gène

La mucoviscidose est due à une mutation dans le gène CFTR (*Cystic Fibrosis Transmembrane conductance Regulator*) qui se trouve sur le bras long du chromosome 7, plus précisément dans la région 7q31. Ce gène a une taille de 250 kilobases avec 27 exons (14). Il code pour une protéine transmembranaire CFTR qui a pour fonction principale le transport du chlore et du sodium à travers la membrane cellulaire (4).

## 3. Protéine

La protéine CFTR se trouve sur la membrane apicale de l'ensemble des cellules épithéliales de l'organisme : intestin, pancréas, vésicule biliaire, bronches, glandes sudoripares et appareil génital. C'est un transporteur ATP-Binding Cassette (ABC) qui a de nombreuses fonctions (15).

Sa fonction principale est le transport actif vers l'extérieur de la cellule du chlore et du sodium grâce à l'ATP (adénosine triphosphate) comme source d'énergie, en échange d'ion bicarbonate. Lors de la fixation de la molécule d'ATP sur un domaine de la protéine, un changement de sa conformation se produit, le canal s'ouvre et laisse sortir les ions chlore.

La mutation de cette protéine chez les patients atteints de la mucoviscidose provoque un excès de chlore dans les cellules ce qui empêche la sortie passive d'eau. Chez ces patients, les sécrétions et le mucus se déshydratent, leurs viscosités augmentent et s'accumulent alors dans les bronches, le pancréas et le foie. Il faut noter que dans les glandes sudoripares, le mécanisme de transport des ions est inversé. Ainsi, chez les patients malades, le chlore reste à l'extérieur de la cellule car le transport est défectueux (10). La concentration en chlore dans la sueur chez les patients atteints est plus élevée que chez les sujets sains. C'est pourquoi on parle depuis le Moyen-âge de baisé salé et que de nos jours, le test à la sueur est réalisé pour confirmer une mucoviscidose.

Cette protéine CFTR possède aussi d'autres fonctions comme la régulation du pH intracellulaire avec le transport d'ions bicarbonates, la stimulation de l'endocytose et de l'exocytose, la régulation de la sécrétion de glycoprotéines et de mucines, le transport de l'ATP et du glutathion et enfin la régulation de certaines cytokines pro ou anti-inflammatoires (16).

## 4. Mutations

De nos jours, on dénombre plus de 2000 mutations du gène CFTR dans le monde (17). La mutation la plus fréquemment retrouvée est la F508del retrouvée chez 83,4% des patients

malades en France, la moitié étant des mutations homozygotes, c'est-à-dire présentes sur les deux allèles des patients (11). C'est aussi la mutation la plus présente dans les pays européens avec un pourcentage de 85% dont 46% d'homozygote et 39% d'hétérozygote (18). Cette mutation correspond à la délétion d'un acide aminé, la phénylalanine, en position 508 de la protéine. Elle a été décrite pour la première fois en 1989 (4).

Selon la zone géographique, il y a une hétérogénéité dans la répartition des mutations en France et entre les pays. On retrouve la mutation deltaF508 plus souvent dans le Nord que dans le Sud de la France. Par contre, les mutations G542X, N1303K, R334W, 711+1G>T et 1717-1G>A sont le plus retrouvées dans la région Sud de la France (8,9). Une étude américaine et une étude européenne ont montré que certaines mutations génétiques du gène CFTR sont propres à certaines ethnies ou zones géographiques (ex : p.S1255X : Africain-Américain, p.G178R : Caucasien et p.Q890X : Hispanique, R1162X : en Algérie, R1066C au Portugal et 1078delT en Angleterre) (19,20).

Il existe une classification des principales mutations du gène CFTR étudiées dans de nombreuses études et représentées dans le figure 5 ci-dessous (cette figure est non exhaustive) (10,21–26). Ainsi, les mutations sont divisées en six classes en fonction des impacts sur la synthèse ou sur la fonctionnalité de la protéine.

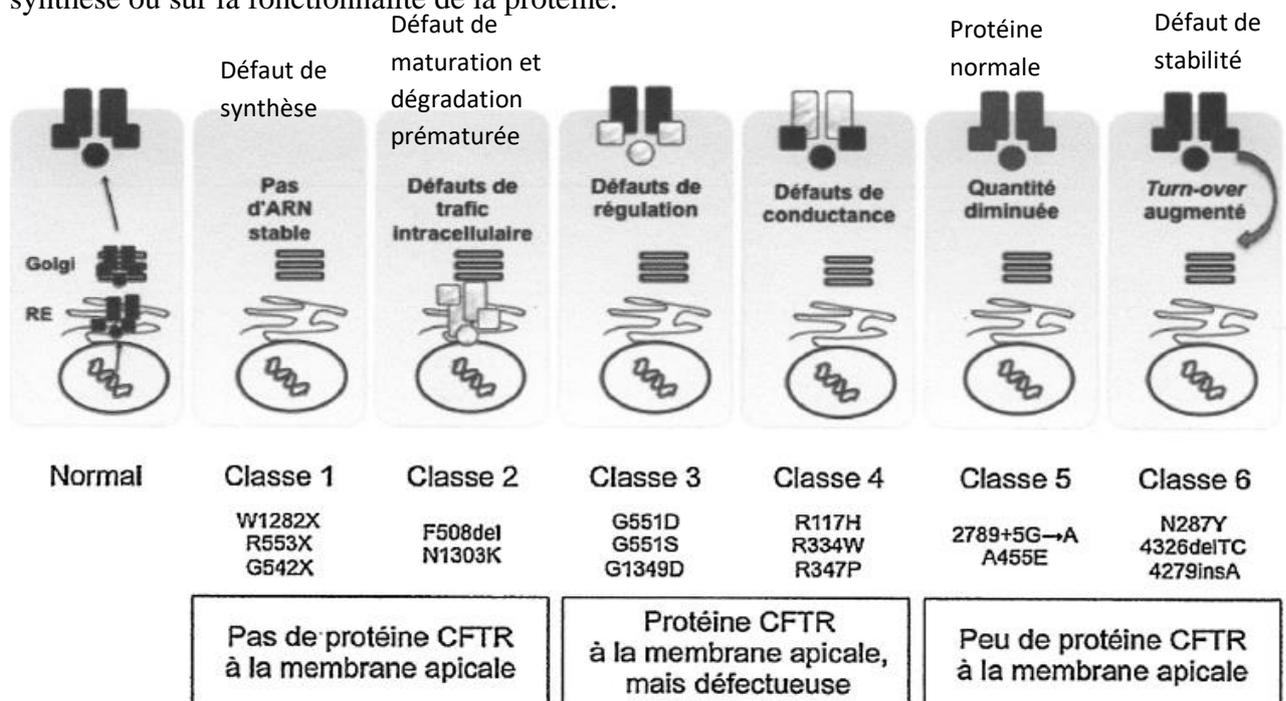


Figure 5 : Classification des mutations du gène CFTR (23).

Les classes 1, 2 et 3 sont constituées de mutations sévères c'est-à-dire qui provoquent des signes cliniques sévères car l'activité de la protéine CFTR est totalement absente ou très

faible. Les classes 4, 5 et 6 présentent des mutations ayant un effet plutôt modéré sur le phénotype des patients (10,27).

## 5. Corrélation génotype-phénotype

Il existe différentes formes cliniques de la mucoviscidose corrélées avec le type de mutations présentes chez les patients (28,29).

- Mucoviscidose dite « classique » : l'insuffisance pancréatique et l'atteinte pulmonaire sont sévères. Le diagnostic se fait sur la présence d'au moins un signe clinique et une concentration en chlore lors du test à la sueur  $\geq 60$  mmol/L. Les signes digestifs sont marqués avec un retard staturo-pondéral et une infertilité chez les hommes. Généralement une mutation sévère est présente sur chaque allèle. La maladie est découverte précoce car le plus souvent ces patients possèdent des mutations homozygotes (souvent deltaF508del) (30).
- Mucoviscidose dite « modérée » : la fonction pancréatique est conservée et l'atteinte respiratoire est moins marquée. Le test à la sueur est normal ou intermédiaire avec une concentration en chlore  $< 30$  mmol/L ou entre 30 et 60 mmol/L. Soit une mutation sévère et modérée est présente sur chaque allèle soit on retrouve deux mutations modérées. La maladie se révèle plus tardivement.

La corrélation entre génotype et phénotype est montrée dans certaines études. Elles montrent que les patients homozygotes pour la mutation delta F508del ont des diagnostics plus précoces, souvent une atteinte pancréatique, une augmentation de la concentration en chlore pour le test à la sueur et une atteinte respiratoire prédominante à la différence des sujets hétérozygotes pour la mutation deltaF508 (31).

Parfois selon le génotype, le phénotype est influencé. Certaines mutations semblent avoir plus de conséquences sur l'atteinte de la fonction pancréatique et respiratoire, la durée de survie, l'âge de diagnostic et la concentration en chlore lors du test à la sueur (32,33). Deux études de McKone montrent que les génotypes à haut risque (1,2 et 3) décèdent beaucoup plus tôt que ceux à faible risque (4 et 5) : 24,2 ans de moyenne contre 37,6 ans ( $p < 0,001$ ) (34,35). Cette différence semble expliquée par une diminution de la fonction respiratoire et une insuffisance pancréatique précoce, un plus mauvais statut nutritionnel et une colonisation respiratoire plus fréquente à *Pseudomonas aeruginosa* (34).

Cependant, la littérature suggère que l'expression clinique peut être influencée par d'autres facteurs comme l'environnement et les traitements. Il reste difficile de prédire la

gravité de la maladie uniquement à partir de mutations retrouvées à cause d'une grande variabilité clinique de la maladie (25,33,36,37).

### III. Dépistage et diagnostic

#### 1. Dépistage néonatal

Le dépistage néonatal (DNN) existe depuis les années 1960 mais permettait de diagnostiquer une seule maladie : la phénylcétonurie. Ce n'est que depuis 2002 qu'il permet aussi le diagnostic de la mucoviscidose. Il est systématiquement pratiqué chez les nouveau-nés de nos jours. Les cinq maladies génétiques recherchées sont : la mucoviscidose, la phénylcétonurie, la drépanocytose, l'hyperplasie des surrénales et l'hypothyroïdie congénitale. Cette recherche s'effectue au troisième jour de vie de l'enfant grâce à l'utilisation d'une goutte de sang prise au talon du nouveau-né et apposée sur buvard Guthrie. Le consentement parental pour la recherche de mutations génétiques est aussi demandé lors de ce test pour pouvoir réaliser une recherche plus approfondie si le dosage sanguin de trypsine immuno-réactive se révèle augmenté (28).

#### 1. TIR

Le dosage de la Trypsine Immuno-Réactive (TIR) est réalisé en première intention pour la recherche de la mucoviscidose lors du DNN. La TIR est un ensemble de molécules apparentées à une enzyme pancréatique. C'est en 1979 que son élévation a été remarquée chez les patients atteints de la mucoviscidose (38). Ce dosage peut se faire grâce à deux techniques : soit par technique radio-immunologique (RIA-gnost® Trypsin Neonatal, CIS bio International, France), soit par technique immuno-fluorimétrique (AutoDelfia® Neonatal IRT kit, PerkinElmer, Finland). L'augmentation de la TIR est due à une obstruction *in utero* de canaux pancréatiques par amas de protéines qui génère un relargage d'enzymes dans le sang.

Cependant cette molécule n'est pas spécifique de la mucoviscidose. Elle est augmentée aussi dans les anomalies pancréatiques durant la vie fœtale et ainsi que dans les premiers mois de vie chez les prématurés. C'est pourquoi il est nécessaire de réaliser une étude génétique si le dosage est augmenté.

Si le dosage est  $\geq 55 \mu\text{g/L}$ , un second dosage est réalisé sur le même buvard Guthrie du troisième jour. Si la moyenne des deux dosages est  $\geq 65 \mu\text{g/L}$ , une recherche des mutations du gène CFTR sera réalisée.

## 2. Etudes génétiques

L'étude génétique permet de mettre en évidence 29 mutations du gène CFTR les plus communes (suppression de la mutation R117H en 2015 en France car elle est souvent associée à un variant d'épissage normal T7). Elle nécessite le consentement éclairé signé des parents. Ce génotypage est réalisé grâce par le kit CF30v2 Elucigene® CF30 Orchid ARMS (39).

Si le patient présente une ou deux mutations du gène CFTR, il sera envoyé au CRCM (Centre de Ressources et de Compétences pour la Mucoviscidose) où un test à la sueur sera réalisé pour confirmer ou infirmer le diagnostic.

Si aucune mutation n'est retrouvée mais que le taux de TIR initial était élevé ( $\geq 100$   $\mu\text{g/L}$  à J3), un nouveau dosage de TIR sera réalisé à 21 jours de vie. A J21, si le taux est  $\geq 40$   $\mu\text{g/L}$ , un test à la sueur sera effectué.

Si aucune mutation n'est retrouvée alors que le dosage initial de la TIR était entre 65 et 100  $\mu\text{g/L}$ , on arrête les investigations car le patient est considéré comme non malade. L'augmentation modérée de la TIR peut s'expliquer par une immaturité pancréatique à la naissance, résolutive spontanément par la suite.

## 3. Test à la sueur

Le test à la sueur est une technique qui permet de connaître la production de sueur donc de chlore chez les patients. Ce test se déroule en trois phases : la stimulation des glandes sudoripares par iontophorèse à la pilocarpine, le recueil de la sueur et le dosage de la concentration en chlore (39). Ce test permet en France de confirmer si un patient est bien atteint de mucoviscidose.

Ce test est à faire minimum deux semaines après la naissance (quantité minimale de sueur : 15  $\mu\text{L}$ ). L'étude de Richard *et al.* a montré que la concentration en chlore était plus forte si le patient présente deux mutations que s'il présente une mutation ou pas de mutation. (40)

On parle d'une augmentation anormale de la production de chlore lorsque la concentration en chlore est  $\geq 60$   $\text{mmol/L}$  (40).

Si le patient a initialement à J3 une augmentation du taux de TIR, une ou 2 mutations du gène CFTR et un test à la sueur positif, le diagnostic de mucoviscidose est confirmé (29).

Si le dosage de chlore est  $< 30$   $\text{mmol/L}$ , le patient n'est pas atteint de la mucoviscidose même s'il présente une mutation.

En revanche, si le patient présente deux mutations, il est considéré comme atteints : il existe de très rares cas où le dosage peut être normal même si le patient possède deux allèles mutés.

Il existe une zone grise entre 30 et 59 mmol/L, celle-ci nécessite des examens complémentaires :

- 2<sup>ème</sup> test à la sueur (6 à 24 mois plus tard)
- recherche d'autres mutations moins communes (39)
- exploration pulmonaire et gastro-intestinale (36,41).

La valeur seuil est de 30 mmol/l chez le nourrisson mais de 40 mmol/L chez les enfants.

#### 4. Organigramme

Cette figure 6 représente schématiquement le déroulement du dépistage de la mucoviscidose au laboratoire.

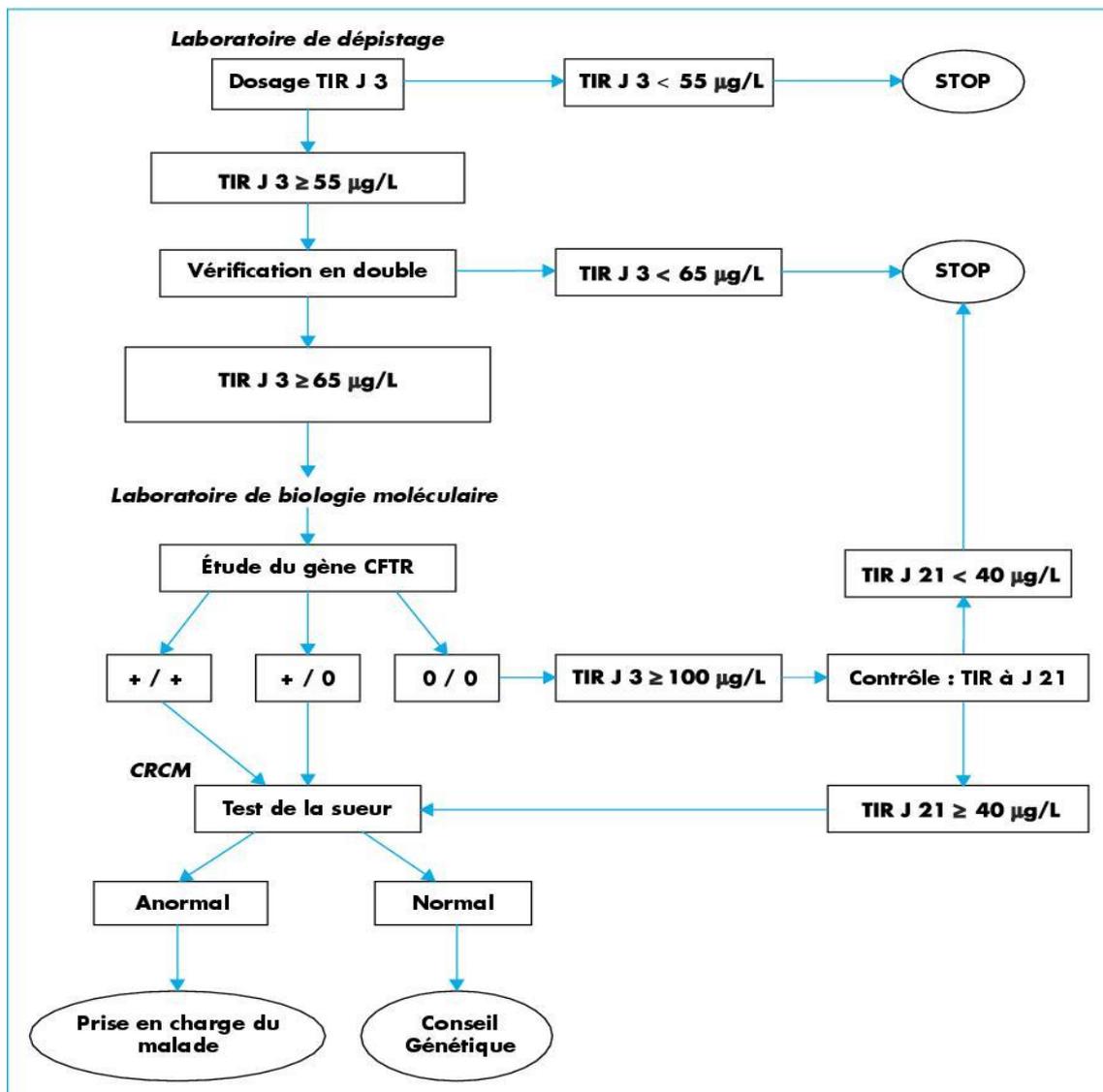


Figure 6 : Organigramme du dépistage néonatal de la mucoviscidose (42).

## 2. Dépistage prénatal

Ce dépistage est utile pour les familles ayant déjà eu un enfant atteint de la mucoviscidose ou pour des parents connaissant leur hétérozygotie pour la mucoviscidose ou encore lorsque la maladie est suspectée lors d'une échographie : intestin hyperéchogène ou aspect de péritonite méconiale. On peut ainsi faire le diagnostic par une biopsie des villosités choriales par voie transabdominale à partir de 12 semaines d'aménorrhée. Il est aussi possible de faire un dosage des isoenzymes de la phosphatase alcaline dans le liquide amniotique par amniocentèse à partir de 16 semaines d'aménorrhée. Si les résultats sont en faveur d'un fœtus porteur de la mucoviscidose, les parents peuvent demander une interruption médicale de grossesse (28).

Le DPNI (Dépistage Prénatal Non Invasif) est une alternative aux deux techniques précédentes présentant un risque de fausse-couche. Cette technique permet d'étudier l'ADN fœtal à partir du sang maternel.

## 3. Diagnostic

Avant l'arrivée du diagnostic néonatal, c'est la clinique qui permettait de poser le diagnostic de mucoviscidose. Les principaux symptômes de découverte sont les diarrhées chroniques, iléus méconial, le retard de croissance ou encore les symptômes respiratoires (rares en début de vie).

Le diagnostic néonatal (avant 6 semaines de vie) est la principale cause de découverte de la maladie de nos jours (11). La plupart des diagnostics sont posés avant l'âge de 1 an mais il peut y avoir des diagnostics tardifs après 20 ans. Ces diagnostics tardifs concernent principalement les patients ayant une forme modérée de la maladie et peuvent être découverts au cours par exemple d'un bilan d'infertilité.

## IV. Symptômes

C'est une maladie qui touche de nombreux organes mais la mortalité est principalement due à l'atteinte respiratoire avec des toux chroniques et épuisantes évoluant vers une insuffisance respiratoire chronique. Les enfants ayant la mucoviscidose ont souvent un retard de croissance. Ces patients présentent également des troubles digestifs avec une occlusion intestinale précoce nommée iléus méconial et des stéatorrhées.

# 1. Atteinte digestive

L'iléus méconial est un symptôme fréquent chez les nouveau-nés atteints de mucoviscidose. C'est le signe le plus précoce de la mucoviscidose. Il est présent chez 12,1% des nouveau-nés lors du diagnostic de la maladie (11). Il peut être diagnostiqué lors d'une échographie anténatale (image hyperéchogène) ou par radiographie de l'abdomen en néonatal. Un iléus méconial est une occlusion intestinale mécanique. Le méconium (premières matières fécales liées à l'ingestion de liquide amniotique) est plus visqueux chez les nouveau-nés ayant la mucoviscidose ce qui entraîne un arrêt de celui-ci dans l'iléon terminal. Il n'est donc pas éliminé correctement au cours des premières 24h comme attendu (43). L'étude de Padoan *et al.* en Italie montre que 82% des iléus méconiaux sont présents chez des patients ayant au moins une mutation F508del et que les mutations qui provoquent cette atteinte digestive sont de classes 1, 2 ou 3 (44). Le risque de l'avoir est d'autant plus significatif lors que la mutation F508del est présente à l'état homozygote (45). Les patients auraient aussi un taux de TIR plus élevé initialement. Ce symptôme ne semble pas avoir d'effets péjoratifs sur le devenir du patient (46–49).

L'insuffisance pancréatique exocrine est présente chez 80,3% des patients ayant la mucoviscidose (11). Elle s'explique par l'obstruction des canaux excréteurs par les sécrétions pancréatiques acineuses riches en protéines due à des sucs pancréatiques appauvris en eau et bicarbonate. Cela entraîne par la suite une baisse des enzymes pancréatiques et un syndrome de malabsorption des graisses. Les aliments ne sont plus absorbés correctement par l'intestin grêle : perte des calories et des aliments nutritifs. Les patients présenteront alors des stéatorrhées (diarrhées graisseuses) associées à une carence en vitamines liposolubles A, D, E et K entraînant un retard staturo-pondéral (50).

Certains patients (28,9%) vont développer par la suite une insuffisance pancréatique endocrine avec un défaut de production d'insuline conduisant au diabète (11). Ainsi des contrôles glycémiques réguliers sont instaurés chez les patients atteints de la mucoviscidose pour instaurer un traitement rapidement (51).

D'autres atteintes digestives moins fréquentes peuvent aussi affecter les patients comme le syndrome d'occlusion distale de l'intestin (SODI) qui se manifeste chez 3,6% des patients. C'est une accumulation de matière muco-fécale chez l'iléus terminal, ce qui entraîne son obstruction. Les pancréatites aiguës plus rares, chez 1,3% des patients, et surviennent plutôt à l'âge adulte, surtout chez les phénotypes modérés (11,50). Elles sont dues à la précipitation des

sécrétions acineuses qui provoque des poussées de pancréatites aiguës et répétées (taux de récurrence de 75%) (50).

## 2. Atteinte respiratoire

Cette atteinte est présente dès le plus jeune âge et persiste à l'âge adulte. Elle est la cause de la majorité des décès dans la mucoviscidose. Les mécanismes physiopathologiques de cette atteinte sont exposés dans la figure 7. Ils s'expliquent par une rétention intracellulaire de chlore entraînant une réabsorption de sodium et d'eau dans la cellule (numéros 3 et 4 dans la figure 7). Ceci a pour effet de provoquer une déshydratation extracellulaire, plus précisément une déshydratation du liquide de surface bronchique et par conséquent une augmentation de la viscosité de ce liquide. C'est cette accumulation de mucus épais dans les voies respiratoires qui explique la symptomatologie respiratoire (numéro 5 dans la figure 7).

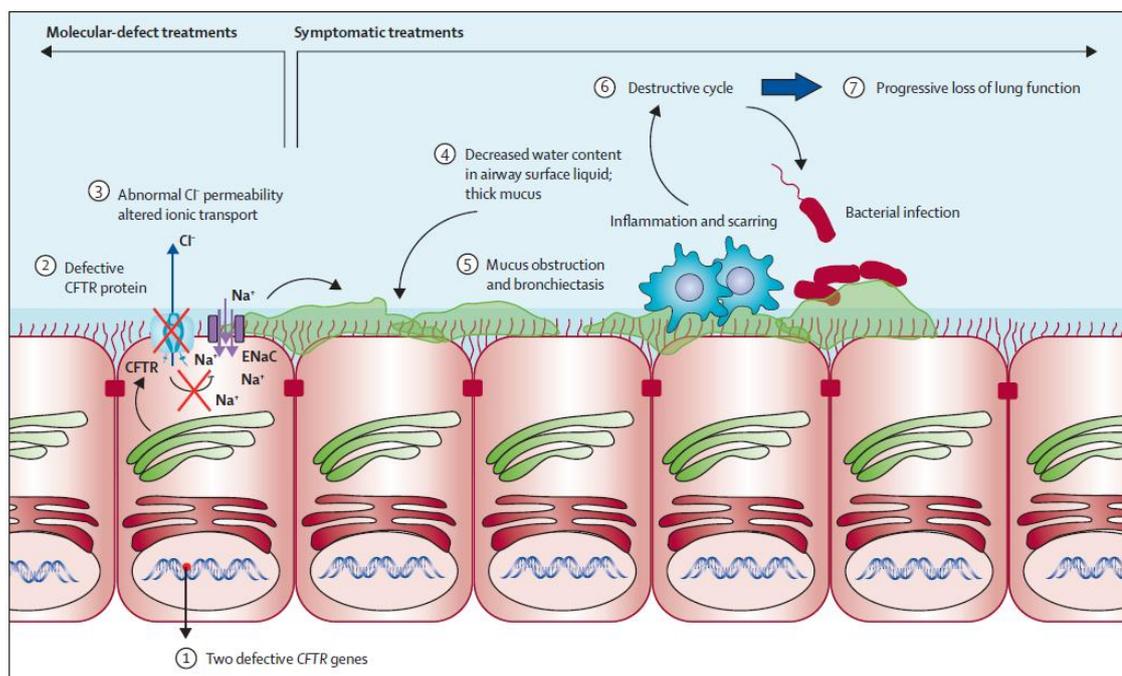


Figure 7 : Mécanisme physiopathologique de l'atteinte pulmonaire chez les patient ayant la mucoviscidose (52).

Ce mucus est le substrat qui va favoriser l'apparition d'infections respiratoires opportunistes par des bactéries comme *Staphylococcus aureus* et *Pseudomonas aeruginosa*, mais aussi des infections par des mycobactéries non tuberculeuses. Associée à ces infections, une inflammation chronique bronchique va s'installer avec le temps. Elle va conduire le patient vers une bronchopneumopathie chronique obstructive évoluant défavorablement vers une insuffisance respiratoire chronique puis un décès en l'absence de greffe pulmonaire (16). Les symptômes respiratoires se présentent par des poussées d'exacerbations/surinfections bronchiques accompagnées d'altération de l'état général.

## 1. Infections bactériennes

Les infections bactériennes chez les patients ayant la mucoviscidose sont recherchées environ tous les quatre mois grâce à un ECBC (examen cyto bactériologique des crachats) (53)

Il existe des infections transitoires ou dites intermittentes lorsque la durée d'éradication est variable mais supérieur à 6 mois ou que la bactérie est présente sur moins de 50% des prélèvements annuels.

L'infection chronique se définit soit :

- lorsque plus de 50% des prélèvements annuels sont positifs à une espèce
- lorsqu'il y a une impossibilité d'éliminer le germe pendant plus de six mois avec au moins 3 prélèvements positifs à 1 mois d'intervalle
- lorsque les anticorps de *Pseudomonas aeruginosa* ou d'*Aspergillus fumigatus* sont présents à un taux significatif (11,53).

Les principales bactéries pathogènes sont représentées dans le tableau 1 ci dessous :

Tableau 1 : Répartition des germes respiratoires selon le registre français de la mucoviscidose 2017 (11).

Micro-organismes	% de patients infectés	Remarques
<i>Staphylococcus aureus</i>	61,6%	6,3% de SARM
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	36,8%	20,5% chronique
<i>Haemophilus influenzae</i>	16,6%	
<i>Stenotromonas maltophilia</i>	10,6%	
<i>Achromobacter xylosoxidans</i>	6,6%	
<i>Burkholderia cepacia complex</i>	2,3%	1,3% chronique
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	2,6%	
<b>MNT</b>	2,6%	

### 1. *Staphylococcus aureus*

*Staphylococcus aureus* est présent dans l'environnement, sur la peau, les fosses nasales et l'oropharynx. C'est la bactérie qui provoque le plus d'infections pulmonaires chez les patients ayant la mucoviscidose. Cependant le taux de SARM (*Staphylococcus aureus* résistant à la méticilline) reste faible, 6,3% en France. Ce n'est pas le cas aux Etats-Unis où le taux de SARM avoisine les 30% et ne cesse d'augmenter depuis les années 2000 (54,55). La tranche d'âge des 10-14 ans est la plus infectée avec un taux d'environ 75% puis ce taux baisse avec l'âge (voir figure 10). La virulence de ce germe est élevée car il possède une forte capacité à se

fixer à l'épithélium cellulaire et à échapper au système immunitaire (56,57). Les infections chroniques sont possibles et fréquentes.

Des variants à petites colonies (*Small Colony Variants* : SCVs) peuvent apparaître sur les géloses lors d'infections à *Staphylococcus aureus* persistantes. Ce sont des colonies non hémolytiques, plus petites et non pigmentées avec un temps de pousse ralenti (55,58) (figure 8). Ces variants sont présents chez des patients significativement plus âgés et ayant un FEV<sub>1</sub> (forced expiratory volume in one second = VEMS volume expiratoire maximal par seconde, en français) plus faible que les patients ayant des *S. aureus* à morphotype normal (59–61). Ils sont plus résistants aux antibiotiques et au système immunitaire (61,62). Il est donc nécessaire de traiter rapidement et efficacement l'infection initiale à Staphylocoque afin d'éviter la survenue de ce nouveau phénotype plus résistant. L'utilisation prolongée de certains antibiotiques comme le cotrimoxazole ou la gentamicine sont des facteurs de risque d'apparition de ce phénotype (59–63).

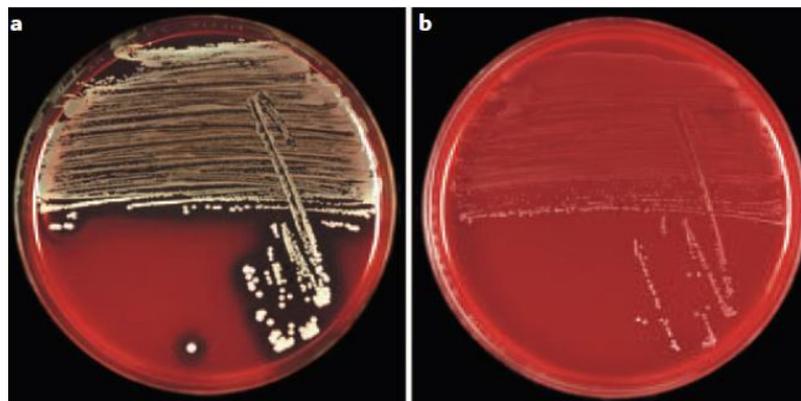


Figure 8 : Gélose sang avec des colonies de *Staphylococcus aureus* normales à gauche et des SCVs à droite (64).

## 2. *Pseudomonas aeruginosa*

A l'âge adulte, *Pseudomonas aeruginosa* est le germe qui colonise et provoque de graves infections pulmonaires (11). Il est présent dans les sols et les milieux humides et est fréquemment retrouvé dans le milieu hospitalier. La primo infection se produit dans la plupart des cas avant l'âge de 10 ans. Au début, la bactérie est retrouvée de façon intermittente puis les patients évoluent très souvent vers une infection chronique (57). En effet, le taux d'infection respiratoire à *Pseudomonas aeruginosa* augmente avec l'âge des patients et semble inéluctable chez les patients ayant la mucoviscidose. La particularité de cette bactérie est son excellente adaptation dans les milieux hostiles principalement grâce à la formation de biofilm.

Initialement les souches cultivées sur gélose sont non mucoïdes. Avec la chronicité de l'infection, des souches mucoïdes apparaissent (figure 9). Ce phénotype est dû à une mutation

du gène *mucA* (65–67). Dans l'étude de Li *et al.*, l'âge médian de la première culture positive représentant un phénotype mucoïde est de 13 ans alors que les souches non mucoïdes sont présentes en moyenne à l'âge d'un an (68). Ce morphotype mucoïde est dû à un excès de production d'un exopolysaccharide, l'alginate, qui est le constituant principal de la capsule bactérienne (58). Ainsi, la formation d'un biofilm hétérogène crée une barrière physique et chimique aux agents exogènes comme les antibiotiques (ex : Tobramycine) et permet à la bactérie de résister à la phagocytose (68–70). Ce phénotype est corrélé à une détérioration de la fonction respiratoire des patients. Le FEV<sub>1</sub> (VEMS) est significativement plus faible pour les patients ayant un phénotype mucoïde par rapport aux patients ayant un phénotype non mucoïde ou non infecté par cette espèce (68,71,72). Le phénotype mucoïde est un facteur pronostic défavorable avec un taux de mortalité significativement plus élevé dans ce groupe (68,71). L'éradication de ce type de souche est difficile. Il est donc nécessaire d'essayer d'éradiquer les souches non mucoïdes initialement (68,73).



Figure 9 : Souche mucoïde de *Pseudomonas aeruginosa* à gauche de la gélose et non mucoïde à droite (58).

### 3. *Haemophilus influenzae*

*Haemophilus influenzae* est une bactérie commensale de la flore rhinopharyngée dont la pathogénicité semble controversée. Elle peut être responsable d'infection respiratoire surtout chez les patients jeunes ayant la mucoviscidose. En effet, il présente 30% des infections bactériennes des patients à l'âge de 5-9 ans (figure 10) (74). Ce sont pour la plupart des cas des souches non typables, non encapsulées et donc non couvert par le vaccin Hib (74). L'étude de Hauser *et al.* a observé qu'*Haemophilus influenzae* aurait un rôle dans les exacerbations aiguës (58).

### 4. *Stenotrophomonas maltophilia*

*Stenotrophomonas maltophilia* est responsable d'infection pulmonaire surtout chez les personnes immunodéprimées ou les patients ayant la mucoviscidose. C'est une bactérie

ubiquitaire présente dans l'environnement : sol, milieu humide, plantes et aussi à l'hôpital (75). Cette espèce possède de multiples résistances naturelles aux antibiotiques :  $\beta$  lactamines (par production d'une métallob $\beta$  lactamase et d'une pénicillinase) dont les carbapénèmes, aminosides, aztréonam et quinolones. Les molécules sensibles sont le cotrimoxazole, ceftazidime et le ticarcilline-acide clavulanique (76). Les patients semblent avoir un VEMS (FEV<sub>1</sub>) plus faible significativement avant leur primo-infection à *Stenotrophomonas maltophilia* par rapport aux patients n'étant pas infectés par cette espèce. L'altération de la fonction respiratoire faciliterait donc l'implantation de cette bactérie (77,78). L'étude de Waters *et al.* montre que les infections chroniques dues à cette espèce provoquent trois fois plus de décès ou de nécessité de greffe pulmonaire que chez les patients non infectés (79). Cependant, plusieurs études montrent que cette infection semble avoir un faible impact sur la fonction respiratoire (77,80–83).

### 5. *Achromobacter xylosoxidans*

*Achromobacter xylosoxidans* est une bactérie probablement pathogène chez les patients ayant la mucoviscidose (53) qui peut provoquer des infections intermittentes ou chroniques (84). C'est aussi une bactérie naturellement multirésistante (85,86). Elle reste sensible à la pipéracilline et tazobactam, amoxicilline-acide clavulanique, ceftazidime, imipénème et méropénème, cotrimoxazole, ciprofloxacine et colistine (87). Plusieurs études montrent un déclin de la fonction respiratoire lors de l'infection par cette espèce (88–91) mais d'autres études ne trouvent pas de différences significatives (84,85). Selon les études, la transmission peut être interhumaine ou liée à l'environnement (85,86,88,92–94).

### 6. *Burkholderia cepacia complex*

*Burkholderia cepacia complex* est un ensemble de bactéries qui peuvent provoquer des exacerbations pulmonaires chez les patients ayant la mucoviscidose. Ce sont des bactéries pathogènes opportunistes responsables d'infections nosocomiales (57,95–99). Holmes *et al.* montre une association significative positive entre le nombre d'hospitalisation et le risque d'être infecté (100). C'est un complexe qui comprend 9 génomovars (même phénotype mais génotype différent), cités ci-dessous dans le tableau 2 :

Tableau 2 : Classification du complexe *Burkholderia cepacia* (58,97,101,102).

<i>Burkholderia cepacia</i> complexe	Génomovar
<i>Burkholderia cepacia</i>	I
<i>Burkholderia multivorans</i>	II
<i>Burkholderia cenocepacia</i>	III
<i>Burkholderia stabilis</i>	IV
<i>Burkholderia vietnamiensis</i>	V
<i>Burkholderia dolosa</i>	VI
<i>Burkholderia ambifaria</i>	VII
<i>Burkholderia anthina</i>	VIII
<i>Burkholderia pyrrocinia</i>	IX

*B. cenocepacia* et *B. multivorans* sont les espèces les plus fréquemment rencontrées. La gravité de cette bactérie est due au « syndrome cepacia ». Ce syndrome provoque une pneumonie nécrosante accompagnée d'une septicémie qui peut être fatale. La transmission interhumaine directe est possible mais cela a surtout été prouvé pour l'espèce *B. cenocepacia* (96,97,100,103–107). Cette dernière possède un plus grand effet néfaste pour la fonction respiratoire que les autres sous espèces (108–110). Elle a aussi un impact pour les patients greffés pulmonaires avec un taux de survie à 5 ans, selon les études, de 33% à 42,6% pour des patients préalablement infectés contre 70% à 73,7% pour patients non infectés (différence significative) (111,112). Cela a donc un impact important sur la mortalité post-greffe avec une baisse de la médiane de survie post-greffe à 3,3 ans contre 12,4 ans pour les patients non infectés dans l'étude de Stephenson *et al.* (111,113–118). Ainsi en fonction du génomovar, la transmission et la pathogénicité n'est pas la même. Le taux d'infection par ce complexe est faible mais son problème est lié à sa résistance à beaucoup d'antibiotiques : aminopénicillines, ticarcilline, céphalosporines de 1<sup>ère</sup> et 2<sup>ème</sup> génération, cotrimoxazole, aminosides, aztréonam, imipénème. Les molécules restantes pour le traitement sont la pipéracilline avec ou non l'ajout de tazobactam, la ceftazidime, le méropème et la témocilline (58,98–100,119).

## 7. *Streptococcus pneumoniae*

Les streptocoques du groupe viridans (VGS) et le *Streptococcus pneumoniae* sont des commensaux de l'oropharynx et du tractus gastro-intestinal. Initialement, ce groupe n'était pas considéré comme pathogène mais il semblerait qu'il soit important dans l'écologie pulmonaire des patients ayant la mucoviscidose (tableau 3) (120). Environ 20% des enfants ayant la mucoviscidose ont un portage nasal de *Streptococcus pneumoniae* (taux similaire chez les enfants n'ayant pas la mucoviscidose). Ce taux semble baisser avec l'âge (121). L'étude de Maeda *et al.* montre que 91% des patients ayant la mucoviscidose a un membre du groupe VGS

dans ses expectorations (120). Le *Streptococcus pneumoniae* est potentiellement pathogène chez les enfants (53). Généralement, les sérotypes retrouvés chez les patients ayant la mucoviscidose, ne sont pas ceux retrouvés dans le vaccin avec 23 valences (122,123).

Tableau 3: Répartition des VGS dans les expectorations des patients ayant la mucoviscidose (120).

Espèces du groupes VGS	Proportion (%)
<i>Streptococcus salivarius</i>	24,7%
<i>Streptococcus mitis</i>	19%
<i>Streptococcus sanguinis</i>	13,2%
<i>Streptococcus oralis</i>	11%
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	10%
<i>Streptococcus parasanguinis</i>	8,4%
<i>Streptococcus infantis</i>	5,8%

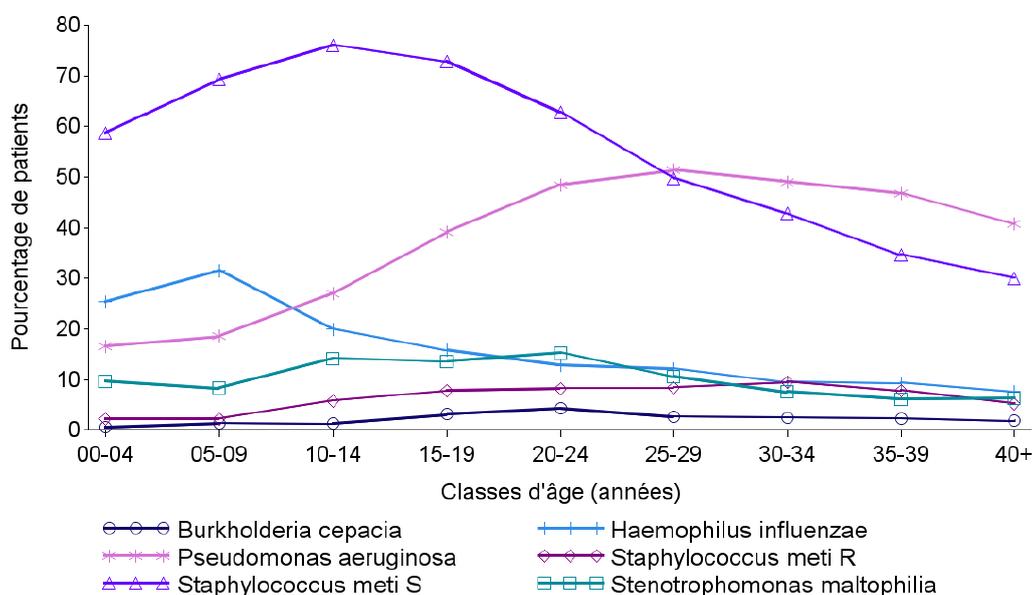


Figure 10 : Répartition des bactéries cliniquement importantes chez les patients ayant la mucoviscidose en fonction de leur âge (11).

## 8. MNT

Enfin les patients atteints de la mucoviscidose peuvent aussi avoir des infections pulmonaires chroniques ou intermittentes à une mycobactérie non tuberculeuse. Cela sera plus amplement détaillé dans la partie II de cette thèse.

## 2. Infections fongiques

Les infections pulmonaires fongiques chez les patients ayant la mucoviscidose sont principalement dues à la moisissure : *Aspergillus fulmigatus*. Selon le registre français de la

mucoviscidose, 28,7% des patients ayant la mucoviscidose ont une infection à *Aspergillus spp* (11). C'est un champignon ubiquitaire, qui sporule. Ses spores sont présentes partout dans l'air et colonisent facilement les voies respiratoires. Elles provoquent des infections chez les personnes immunodéprimées ou ayant des pathologies de l'arbre bronchique. Pour ne pas passer à côté d'une infection fongique, une recherche microbiologique est réalisée au moins 4 fois par an (53).

La principale conséquence clinique de cette infection est l'ABPA (Aspergillose Broncho-Pulmonaire Allergique). C'est une réaction d'hypersensibilisation aux antigènes aspergillaires (124). La prévalence chez les patients ayant la mucoviscidose est estimée entre 6 et 25% avec un taux à 7,4% en France identifié dans l'étude Européenne de Mastella *et al.* (124,125).

L'altération des tissus respiratoires par les bactéries et l'inflammation favorise l'implantation des *Aspergillus* (126). Les infections pulmonaires fongiques sont donc plus tardives que les bactériennes. Elles sont rares avant l'âge de 8 ans. Après 10 ans, les infections chroniques apparaissent (124,127,128). Une altération de la fonction respiratoire est un facteur de risque aux infections pulmonaires à *Aspergillus* qui à son tour l'altère encore plus (124,129).

Les levures du genre *Candida* sont aussi très présentes dans les expectorations des patients ayant la mucoviscidose mais ne semblent pas avoir d'effet sur la fonction respiratoire (130,131).

### 3. Infections virales

Les patients ayant la mucoviscidose sont autant susceptibles et de manière aussi fréquente d'avoir une infection pulmonaire virale que la population générale. Par contre, les complications sont plus importantes : hospitalisation nécessaire, exacerbations, co-infection bactérienne. Ces infections sont tout de même moins fréquentes que les infections bactériennes.

## V. Prise en charge thérapeutique

### 1. Symptomatique

Il n'y a pas de traitement curatif pour la mucoviscidose à l'heure actuelle. Le traitement est donc principalement symptomatique avec la prise en charge des symptômes pulmonaires par de la kinésithérapie respiratoire, des antibiotiques, de l'oxygénothérapie ou des traitements inhalés (corticoïdes, bronchodilatateurs ou antibiotiques). C'est une prise en charge multidisciplinaire et très contraignante.

## 2. Transplantation

La première transplantation pulmonaire chez un patient ayant la mucoviscidose s'est produite en 1983 (132). La mucoviscidose est la troisième cause de double greffe pulmonaire dans le monde (133). Elle est proposée aux patients ayant une insuffisance respiratoire chronique sévère et irréversible. Les deux études de Liou *et al.* montrent que la greffe pulmonaire chez les patients ayant la mucoviscidose est bénéfique seulement si le FEV<sub>1</sub> est inférieur à 30%. Si le FEV<sub>1</sub> est supérieur à 50%, la greffe a un effet néfaste sur la survie du patient (118,134).

On observe une augmentation assez importante du nombre de patients transplantés pulmonaires avec environ 100 transplantations par an en France en 2017 contre seulement une vingtaine dans les années 90 (11). Elle est rarement réalisée avant l'âge de 18 ans et après 50 ans (112). Le nombre de patient ayant la mucoviscidose et étant transplanté pulmonaire est d'environ 12% selon registre français de la mucoviscidose (11).

Cependant la transplantation reste le traitement de dernière intention. Selon différentes études, la survie à 10 ans d'une greffe pulmonaire chez un patient ayant la mucoviscidose est de 45% à 73% (111,112,115,135,136). Mais la survie est plus faible si la greffe a lieu avant l'âge de 18 ans, de 33% à 40% à 10 ans (111,114).

## 3. Nouvelles thérapies

Des thérapies innovantes sont arrivées depuis peu dans l'arsenal de la prise en charge curative de la mucoviscidose. Ces nouveaux médicaments sont des modulateurs du gène CFTR qui permettraient de corriger ses « dysfonctionnements » (137). Il existe des potentialisateurs, qui permettent d'augmenter l'activité de la protéine CFTR et les correcteurs qui permet d'augmenter la présence de la protéine au niveau de la membrane cellulaire (22).

En 2012 le premier médicament de ce type est mis sur le marché en France, l'Ivacaftor (Kalydeco®). C'est un potentialisateur de CFTR pour les patients porteurs de la mutation G551D (classe 3). Il augmente la probabilité d'ouverture du canal (22). Il est indiqué chez les plus de 6 ans et contre-indiqué chez les immunodéprimés (2% des patients malades) (23). A noter qu'en 2019, l'AMM a été étendue aux enfants de plus de 12 mois et plus de 7 kg avec un panel plus large de mutations de classe 3 : G551D, G1244E, G1349D, G178R, G551S, S1251N, S1255P, S549N ou S549R (138).

Un second médicament voit le jour en 2015, l'Orkambi®, qui est l'association de l'Ivacaftor et du Lumacaftor, ce dernier étant un correcteur de CFTR. Il est très intéressant car

cible la mutation la plus commune F508del. Il est indiqué pour les patients homozygotes F508del étant âgés de plus de 2 ans depuis 2019 (initialement plus de 12 ans puis 6 ans en 2018) (139–141).

Il existe aussi une autre bi-association avec l’Ivacaftor et le Tezacaftor (Symkevi® ou Symdeko® aux USA), ce dernier étant un correcteur. Il est utilisé pour les patients de plus de 12 ans, homozygotes pour la mutation F508del ou hétérozygote pour cette mutation et une des 14 mutations spécifiées dans l’AMM (142,143).

Une triple association récente a été mise sur le marché américain en 2019, le Trikafta® : Elexacaftor (correcteur) et Tezacaftor et Ivacaftor (1). En France, la demande d’AMM est en cours mais une ATU nominative est possible. Ce médicament est indiqué pour les patients de plus de 12 ans ayant au moins une mutation F508del (144).

Ces médicaments améliorent la fonction respiratoire des patients d’une façon plus ou moins importante selon la molécule en améliorant la VEMS et en diminuant le nombre d’exacerbations respiratoires (145–147). Le retard staturo-pondéral, le nombre d’hospitalisations et les colonisations à *Pseudomonas aeruginosa* semblent diminués (23,52,147,148). En conclusion, ces médicaments permettent d’améliorer la qualité de vie et d’augmenter l’espérance de vie des patients.

Ces nouveaux traitements permettent de faire une médecine personnalisée en fonction des mutations présentes chez les patients.

## **Partie II : Les mycobactéries non tuberculeuses chez les patients ayant la mucoviscidose**

### **I. Généralités**

Les mycobactéries ont été découvertes en 1882 par Robert Koch avec la mise en évidence de l’agent responsable de la tuberculose (*Mycobacterium tuberculosis*). Une quarantaine d’années plus tard, en 1920, Calmette met en évidence les mycobactéries « atypiques ». En 1954, Timpe et Runyon découvrent que certaines mycobactéries atypiques ont un pouvoir pathogène (149). Runyon crée alors une classification en 4 groupes (figure 11) basée sur la pigmentation des colonies et la vitesse de croissance des mycobactéries non tuberculeuses : MNT (anciennement appelées Mycobactéries atypiques) (150).

Groupe I	Groupe II	Groupe III	Groupe IV
Photochromogènes	Scotochromogènes	Non Photochromogènes <sup>a</sup>	A croissance rapide
			Complexe <i>aurum</i>
<i>M. kansasii</i> <i>M. marinum</i> <i>M. simiae</i>	<i>M. gordonae</i> <i>M. szulgai</i> <i>M. flavescens</i> <i>M. xenopi</i>	<i>M. malmoëense</i> <i>M. ulcerans</i> <i>M. haemophilum</i> <i>M. avium intracellulare complexe terrae</i>	<i>M. fortuitum</i> <i>M. peregrinum</i> <i>M. chelonae</i> <i>M. abscessus</i>

<sup>a</sup> Photochromogènes: se pigmentent à la lumière ; schotochromogènes: se pigmentent à la lumière et à l'obscurité.

Figure 11 : Classification des mycobactéries atypiques selon Runyon en fonction de la pigmentation de la colonie et du temps de croissance (150,151).

## 1. Classification

Les mycobactéries appartiennent à l'ordre des Actinomycetales, famille des *Mycobacteriaceae* et genre des *Mycobacterium* (figure 12). Les espèces de mycobactéries se divisent en trois groupes selon les espèces :

- Les espèces du complexe tuberculosis : *Mycobacterium tuberculosis*, *M. bovis*, *M. africanum*, *M. microti*, *M. caprae*, *M. canettii* et *M. pinnipedii*
- Les mycobactéries non tuberculeuses : *Mycobacterium avium complex* (MAC), *M. kansasii*, *M. xenopi*, *Mycobacteroides abscessus complex* (MABSC), *M. fortuitum*, *Mycobacteroides chelonae* *M. lentiflavium*....
- *Mycobacterium leprae* : agent de la lèpre

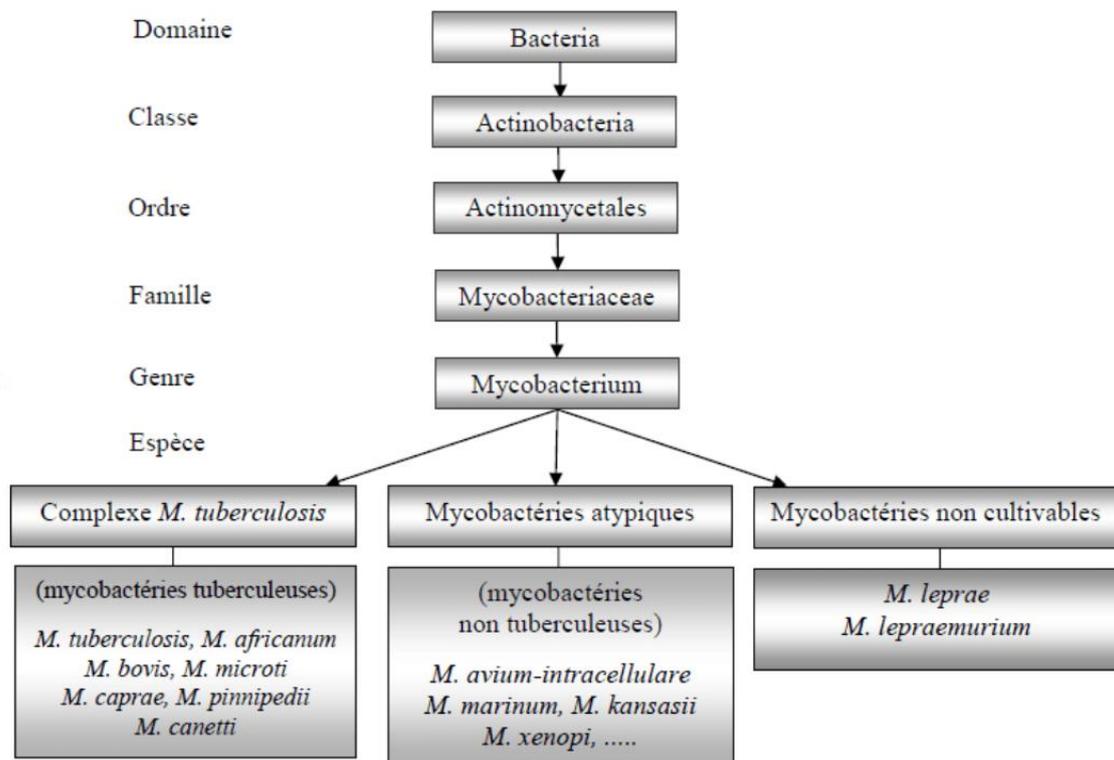


Figure 12 : Classification des mycobactéries (152).

## 2. Caractéristiques

Les mycobactéries sont des Bacilles Acido-Alcool Résistant (BAAR) car elles possèdent une paroi épaisse et riche en acides gras à chaînes longues carbonées (figure 13), ce qui les rend imperméables aux colorants (acide et alcool) usuels. Par contre cette paroi fixe fortement les colorants alcalins comme la fuchsine basique. Ces acides gras sont nommés acides mycoliques et sont la cible de certains traitements antituberculeux. Ils représentent une grande partie de la membrane des mycobactéries et confèrent des propriétés spécifiques aux mycobactéries comme l'augmentation de la résistance au stress chimique (antibiotiques, détergents) et physique (température). Les MNT sont des micro-organismes aérophiles.

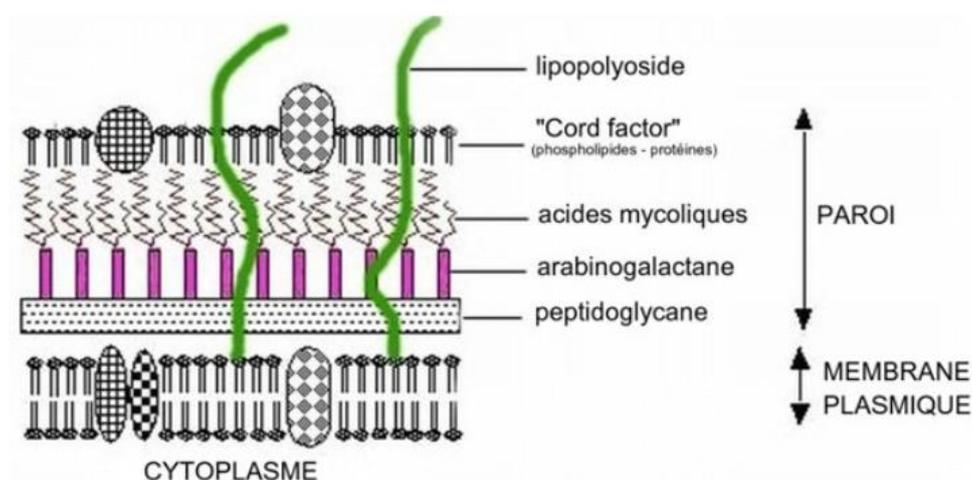


Figure 13 : Composition de la paroi des mycobactéries (153).

## II. Epidémiologie

Les Mycobactéries Non Tuberculeuses (MNT) sont constituées de mycobactéries saprophytes sans pouvoir pathogène et des mycobactéries opportunistes. Contrairement aux mycobactéries du complexe *tuberculosis*, les MNT ne sont pas des pathogènes strictes de l'homme. Du fait d'une augmentation de leur prévalence, elles sont devenues des pathogènes émergents (154). De nos jours, il y a environ 200 espèces répertoriées (155). Ces mycobactéries se retrouvent fréquemment chez les patients immunodéprimés ou ayant des anomalies de l'arbre respiratoire comme les patients atteints de la mucoviscidose.

Ce sont des espèces ubiquitaires provenant de l'environnement : le sol, l'eau, les plantes, les poussières ou les aérosols. En 1993, Fordham von Reyn *et al.* publient une étude sur l'isolement des mycobactéries du complexe avium dans 4 sites géographiques différents (USA, Finland, Zaire et Kenya) et montrent que l'exposition à ces espèces est significativement plus

élevée dans les pays industrialisés qu'en Afrique sub-saharienne. Cette exposition passe essentiellement par le système d'eaux des hôpitaux (32).

L'incidence d'infection à MNT est estimée à environ 1 à 1,8 cas pour 100 000 habitants par an dans le monde. Elle aurait tendance à être en augmentation comme la prévalence qui varie de 4 à 20% en fonction des zones géographiques (157,158). Différents éléments indirects contribuent à l'augmentation de cette prévalence : la recherche plus fréquente des MNT par les cliniciens, l'amélioration des outils diagnostics avec la biologie moléculaire et les techniques d'isolement plus spécifiques. D'autre part, l'augmentation à l'exposition environnementale, l'usage d'antibiotique au long court ou de médicaments modulateurs du système immunitaire prennent part aussi à cette augmentation (158). Avec l'augmentation de l'espérance de vie des patients ayant la mucoviscidose, cette incidence va certainement continuer à augmenter.

La prévalence des MNT chez ce type de patients est en augmentation comme nous le montrent de nombreuses études à travers le monde. En Israël, l'étude de Bar-On *et al.* publiée en 2014 montre une augmentation de la prévalence qui passe de 5% en 2003 à 14,5% en 2011 ( $p=0,05$ ) (159) (figure 14). En France, Roux *et al.* montrent une prévalence de 6,6% d'infection à NTM en 2009 (160) alors qu'en 2014 la prévalence indiquée dans l'étude de Cavalli *et al.* au centre hospitalier de Lyon est de 12% (161). Dans les pays scandinaves, étudiés dans l'étude de Qvist *et al.* en 2015, la prévalence est de 11% (162). Aux Royaume-Unis, dans l'étude de Gardner *et al.* publiée en 2019 sur une population de 5333 patients ayant la mucoviscidose, on observe aussi une augmentation de la prévalence de 1,3% en 2010 à 3,8% en 2015 (163). Et enfin, Olivier *et al.* indiquent une prévalence aux USA de 13% en 2002 (7). Quelques années plus tard, en 2014 l'étude de Adjemian *et al.* signale une augmentation de cette prévalence à 20% (164).

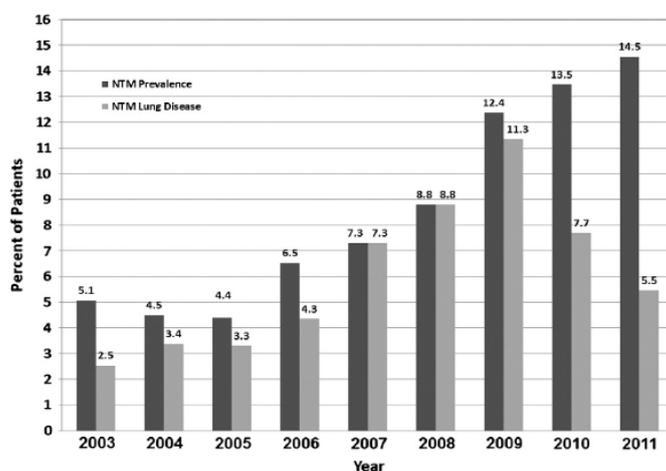


Figure 14 : Augmentation de la prévalence des MNT en Israël (159).

La prévalence semble variable selon les régions dans un même pays ou entre pays étudiés comme le montre la figure 15 ci-dessous (165). Par exemple, en France, dans l'étude de Roux *et al.*, on trouve une prévalence plus faible dans l'est de la France (3,7%) que dans la région parisienne (9,6%) (160). La même variation semble se dégager sur le territoire américain (7,164,166), dans d'autres pays d'Europe (162,167) et du monde (168).

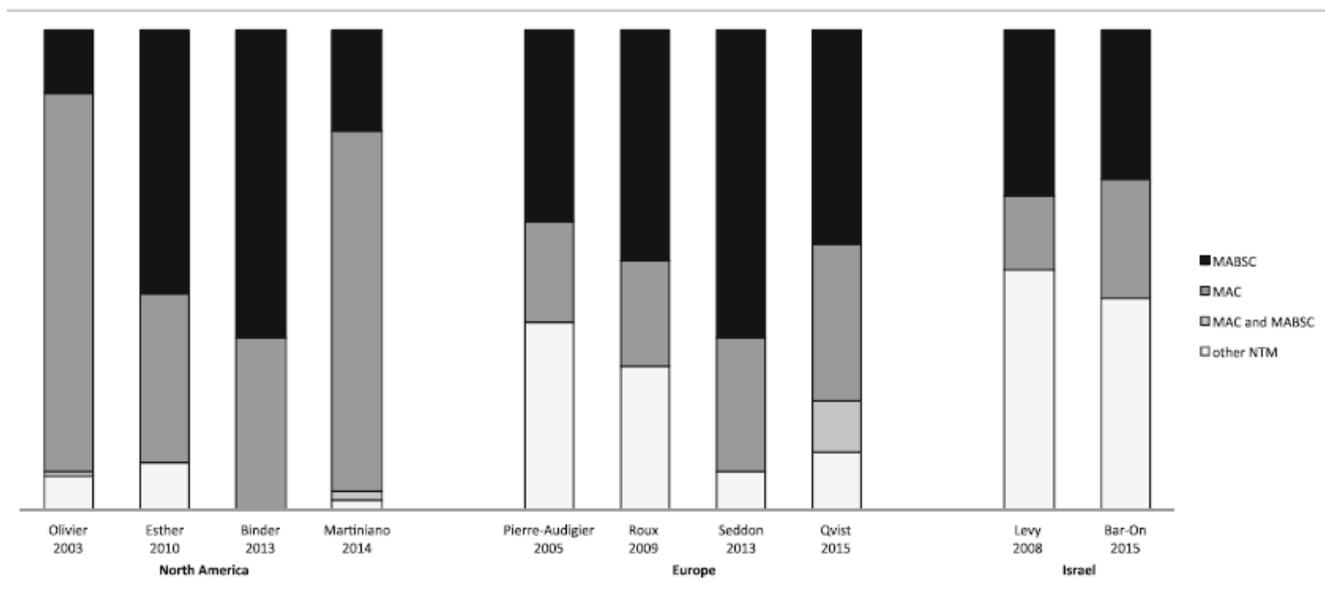


Figure 15 : Prévalence de différents espèces de MNT chez les patients ayant la mucoviscidose dans différentes régions du monde (165).

### III. Mycobactéries non tuberculeuses pathogènes

Ces MNT pathogènes peuvent avoir un effet catastrophique chez les personnes fragiles. Elles peuvent parfois conduire à une transplantation pulmonaire. Les MNT pathogènes les plus communes chez les patients ayant la mucoviscidose font parties du complexe aviaire ou du complexe abscessus (157). Ce sont les MNT les plus retrouvées en France pour ce groupe de patients selon l'étude Roux *et al.* (160).

#### 1. Mycobactéries du complexe aviaire

*Mycobacterium avium complex* (MAC) contient plusieurs souches phylogénétiquement proches les unes des autres : *M. avium subsp avium*, *M. avium subsp paratuberculosis*, *M. avium subsp hominisuis*, *M. avium subsp silvaticum*, *M. intracellulare* *M. chimarea*...

Les MAC sont des mycobactéries dites à croissance lente (SGM : Slow growing mycobacteria) qui sont plus fréquentes aux USA qu'en Europe, comme le montre l'étude de Adjemian *et al.* avec 61% de MAC (164) et l'étude multicentrique de Olivier *et al.* avec 72% de MAC (7). En Europe, selon les études le taux de MAC s'élève de 22% à 40% (160,169). Ce

groupe est retrouvé surtout chez les adultes et rarement isolé chez les enfants ayant la mucoviscidose (169). Catherinot *et al.* ont publié une étude en 2013 montrant que, pour les prélèvements positifs à MAC, les patients sont significativement plus âgés que pour les prélèvements positifs à MABSC (23,1 ans versus 17,4 ans  $p=0,013$ )(170). De même, l'étude Roux *et al.* montre qu'il y a 0,3% de cas de MAC avant l'âge de 9 ans mais que la plus forte prévalence (2,2%) se trouve après l'âge de 25 ans (160). A noter que ces deux dernières études ont été faites en France.

## 2. Mycobactéries du complexe abscessus

*Mycobacteroides abscessus complex* (MABSC) comprend trois sous-espèces : *M. abscessus subsp abscessus*, *M. abscessus subsp massiliense*, *M. abscessus subsp bolletii*, différenciables les unes des autres grâce à certaines techniques moléculaires (157).

A la différence des MAC, les MABSC sont des mycobactéries à croissance rapide (RGM : Rapidly growing mycobacteria) car elles poussent en culture en moins de 7 jours. Les MABSC seraient plus fréquemment associés à une infection pulmonaire contrairement aux autres MNT. Les infections à MABSC semblent également durer beaucoup plus longtemps, de 1 mois à 118 mois (médiane de 10,5 mois) contre 1 à 70 mois (médiane de 1 mois) chez les autres MNT pour les patients ayant la mucoviscidose (159). Ces mycobactéries sont retrouvées à tous les âges chez les personnes atteintes de la mucoviscidose avec un pic entre 11 et 15 ans comme nous l'indique l'étude Roux *et al.* citée précédemment (160,169,171). Elles sont plus fréquentes en Europe avec un pourcentage de 39% à 48% selon les études (160,169) et en 2<sup>ème</sup> position aux USA après les MAC (39% ou 16% selon les études) (7,164). Les infections pulmonaires dues à ces espèces semblent avoir un effet plus néfaste sur la fonction respiratoire que les autres MNT (172). En effet, il y aurait plus de décès ou de nécessité de transplantation pulmonaire pour les patients infectés à MABSC malgré un traitement bien suivi.

Il existe une corrélation entre les infections à MNT et l'âge de diagnostic de la mucoviscidose. Dans l'étude de Catherinot *et al.* publiée en 2013, 90% des MABSC sont diagnostiqués chez des patients dont le diagnostic de mucoviscidose a été fait avant leur 10 ans et 5% seulement après 19 ans. Les patients ayant eu un diagnostic précoce de la maladie (dans leur première année de vie) ont un taux d'infection plus important que les personnes ayant été diagnostiquées tardivement. Dans cette même étude, il est montré que les patients adultes diagnostiqués tardivement ont plus d'infection à MAC que les patients diagnostiqués précocement infectés majoritairement par des souches MABSC comme indiqué dans la figure 16 (170).

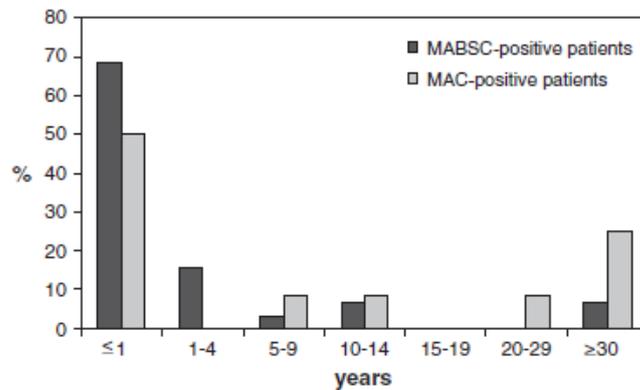


Figure 16 : Distribution des MNT : MAC et MABSC en fonction de l'âge de diagnostic de la mucoviscidose (170).

Enfin, il existe aussi d'autres espèces moins communes qui peuvent infecter les patients ayant la mucoviscidose comme *M. kansasii*, *M. chelonae*, *M xenopi*, *M. lentiflavum*.

### 3. Transmission

Concernant la transmission de ces MNT, le débat est de nos jours très controversé. Certains scientifiques montrent que les deux transmissions, directe ou indirecte sont possibles entre les hommes. D'autres affirment le contraire (173,174). Quelques études ont été réalisées sur le sujet mais les conclusions semblent contradictoires.

Pendant de nombreuses années, les scientifiques étaient certains que la transmission n'était qu'environnementale. Depuis l'émergence des techniques de biologie moléculaire avec le séquençage complet du génome, les scientifiques ont essayé de mieux la comprendre. Les partisans de la transmission interhumaine insistent sur le fait que cette transmission n'est certainement pas directe mais indirecte via des objets infectés ou des aérosols. Cette transmission ne concernerait que l'espèce *M. abscessus* (75,175–178). Il faut noter que la transmission est facilitée par le fait que les MNT sont très résistantes dans le milieu extérieur, résistantes au stress physique, à de nombreux désinfectants et à la dessiccation. La transmission indirecte ne peut être exclue. La question d'instaurer des mesures de prévention dans les centres de référence de la mucoviscidose peut donc se poser.

## IV. Diagnostic

Les MNT provoquent principalement des infections pulmonaires chez les patients ayant des maladies chroniques respiratoires comme la mucoviscidose mais peuvent aussi se manifester par des atteintes cutanées, lymphatiques ou disséminées.

Le réservoir des MNT étant environnemental, le diagnostic d'infection ne peut être affirmé seulement sur la présence d'une MNT dans un prélèvement respiratoire. Il faut différencier la colonisation à MNT et l'infection.

Selon les recommandations de ATS/IDSA (American Thoracic Society/Infectious Diseases Society of America) parues en 2007, la réunion de plusieurs critères est nécessaire pour confirmer le diagnostic d'infection pulmonaire à une mycobactérie non tuberculeuse : NTM PD (non tuberculous mycobacteria pulmonary disease) (157) :

- Critères microbiologiques : au moins 2 cultures d'expectoration de 2 jours différents positives ou 1 culture positive pour un LBA (lavage broncho-alvéolaire) ou présence d'une inflammation granulomateuse sur la biopsie pulmonaire couplée avec une culture d'expectoration positive. Il est recommandé de suspendre les traitements d'antibiotiques avant le prélèvement car ils peuvent inhiber la pousse des mycobactéries sur les milieux de culture (157).
- Critères cliniques : toux chronique productive, fièvre, perte de poids, douleur thoracique, asthénie, dyspnée, hémoptysie et exclusion des autres causes possibles de symptômes respiratoires.
- Critères radiologiques : nodules, cavités opacifiées (figure 17), symptômes pulmonaires (la tomodensitométrie haute résolution est préférée à la radio).

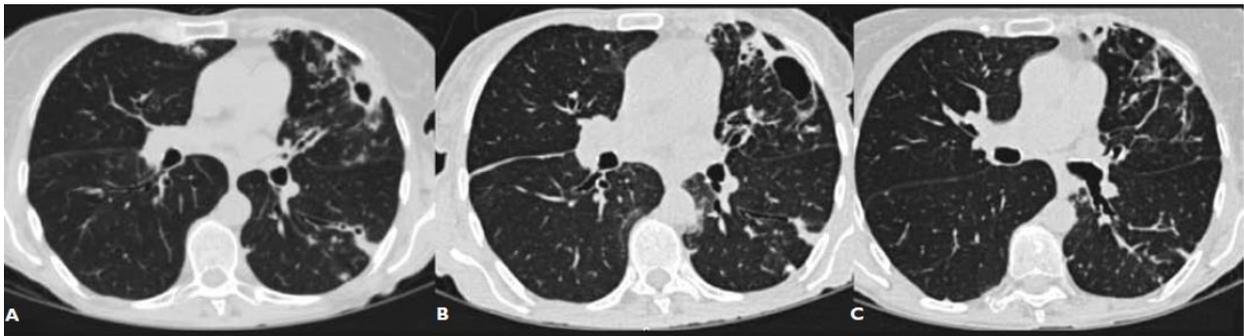


Figure 17 : Image de CT-scan d'une infection pulmonaire à MAC. A. Image cavitaire. B. Aggravation radiologique sous traitement. C. Amélioration radiologique (179).

C'est une définition difficilement applicable aux patients ayant la mucoviscidose car ils présentent de nombreux symptômes respiratoires : toux productive chronique, souffle court, perte de poids. Il est donc difficile de faire la part des choses entre une infection pulmonaire à MNT et l'évolution de la mucoviscidose. Le risque est alors de diagnostiquer en excès des infections à MNT chez ce groupe de patient et de les exposer à une consommation d'antibiotiques non nécessaire (165).

Pour améliorer la sensibilité du diagnostic, la recherche de MNT doit se faire sur un prélèvement respiratoire par expectoration spontanée, réalisé le matin et renouvelé 3 jours de suite (171). C'est une opération délicate à mettre en place pour les patients non hospitalisés. Les écouvillonnages oropharyngées ou les biopsies sont à proscrire. Si les prélèvements reviennent négatifs alors que la suspicion clinique et/ou radiologique est importante, on peut avoir recours à un prélèvement plus profond : le LBA (157,171).

La figure 18 qui suit représente l'algorithme de prise en charge d'une recherche d'infection à une mycobactérie non tuberculeuse chez un patient atteint de la mucoviscidose.

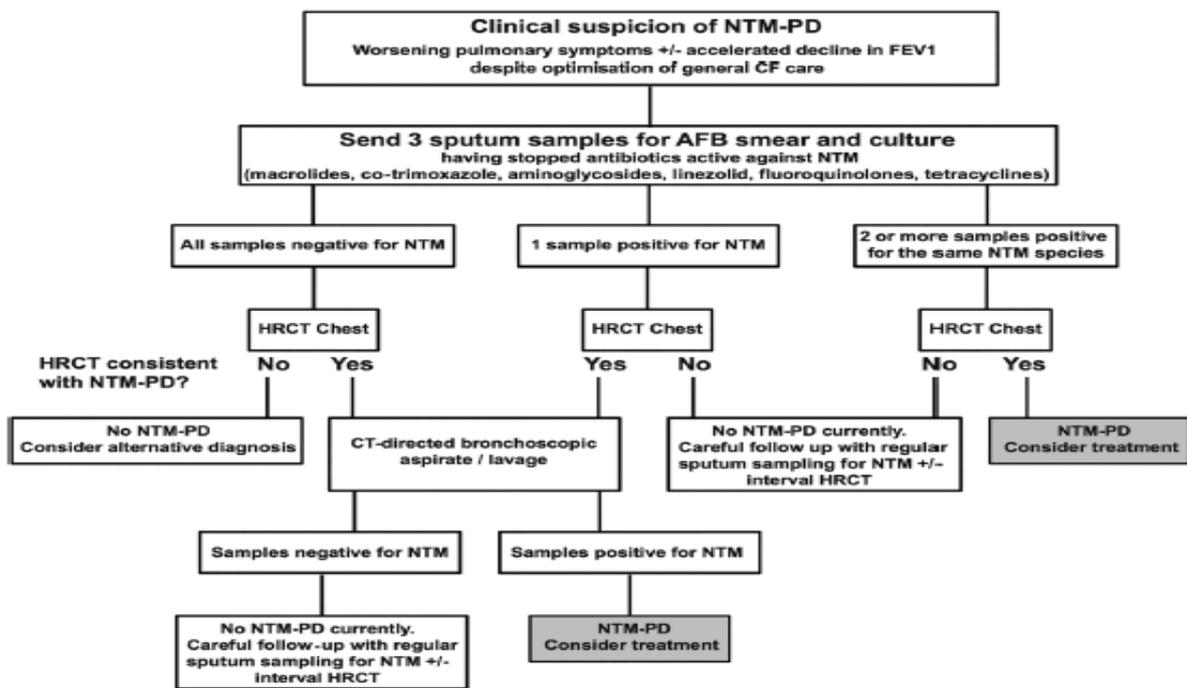


Figure 18 : Algorithme pour l'investigation d'une suspicion de NTM-PD (171) AFB : acid fact bacilli, CF : cystic fibrosis, FEV1 : forced expiratory volume in 1s, HRCT : high resolution CT.

Chez les patients (enfants et adultes) atteints de la mucoviscidose, une recherche annuelle de MNT minimum sur une expectoration spontanée est conseillée. A l'adolescence cette analyse doit se faire deux fois par an. Elle peut être également augmentée si le patient présente des signes respiratoires ou une altération de l'état général (53,171). La recherche est également recommandée avant une greffe pulmonaire pour pouvoir instaurer un traitement pré-greffe.

Le suivi de la réponse microbiologique d'un patient atteint de la mucoviscidose, infecté par une MNT pulmonaire s'effectue par la réalisation d'expectoration tous les 4 à 8 semaines. La négativité des cultures pouvant être longue, l'efficacité thérapeutique est à évaluer par rapport à la régression des symptômes cliniques et radiographiques. Pour considérer un patient

comme étant en conversion microbiologique, il faut 3 cultures négatives consécutives avec un intervalle de plusieurs semaines entre chaque prélèvement (171).

## V. Facteurs de risque

Certains facteurs de risque chez les patients atteints de la mucoviscidose favorisant l'apparition d'infections à MNT ont été recherchés dans différentes études. Les résultats de ces études peuvent être contradictoires.

On parlera d'association positive lorsque la présence d'une bactérie est corrélée à un risque plus important d'infection à MNT et d'association négative dans le cas inverse.

Les études s'intéressant aux co-infections avec des bactéries ou des levures et une infection à MNT, montrent que seule les infections à *Aspergillus* ou les ABPA sont souvent présentes chez les patients atteints de MNT avec des associations positives dans de très nombreuses études (159,161,163,164,170,172,180–184).

Pour les autres espèces comme *Stenotrophomonas maltophilia* (161,164,172,180–182,185), *Pseudomonas aeruginosa* (7,159,161,163,164,172,183) et *Staphylococcus aureus* (7,161,163,172,183,186), les résultats sont contradictoires d'une étude à une autre.

La fonction respiratoire, l'insuffisance pancréatique (159,161,162,183,184,187) et l'âge (7,159,161,163,180,183,185) ne semblent pas entrer en jeu dans les infections à MNT. Le tableau 4 ci-dessous nous montre que les données sont très contradictoires les unes des autres pour la fonction respiratoire.

Tableau 4 : Tableau récapitulatif de l'association du FEV1 et de l'infection à MNT. FEV<sub>1</sub> : Forced Expiratory Volume = VEMS en France : Volume expiratoire maximal en 1 seconde.

FEV1	Taux infection MNT	Etudes
<b>Diminution</b>	Augmenté	Verregghen <i>et al.</i> Esther <i>et al.</i> Levy <i>et al.</i> et Martiniano <i>et al.</i> (172,182,183,185)
<b>Diminution</b>	Diminué pour MABSC	Catherinot <i>et al.</i> (170)
<b>Augmentation</b>	Augmenté	Olivier <i>et al.</i> et Adjemian <i>et al.</i> (7,164)
<b>Augmentation</b>	Diminué	Viviani <i>et al.</i> (180)

Enfin, le type de mutation du gène CFTR de la mucoviscidose n'a pas de lien avec l'infection à MNT car beaucoup d'études ne montrent pas d'association significative (7,160,163,164,170,180,183,185) hormis l'étude de Bar-on *et al.* (159).

## VI. Traitements

### 1. Traitements médicamenteux

Le traitement des infections pulmonaires à MNT est long : au moins 12 mois après la négativation des cultures. Selon les recommandations ATS/IDSA, le traitement des MNT diffère d'une espèce à une autre en fonction du profil de résistance intrinsèque de chacune (157). Les MNT sont des bactéries multirésistantes d'où l'utilisation de plusieurs molécules pour le traitement (188). En général, la polymédication contient au moins un macrolide (azithromycine ou clarithromycine) si la MNT est sensible. L'azithromycine est utilisée de préférence car elle est bien tolérée, a peu d'interactions médicamenteuses et possède un effet anti-inflammatoire efficace sur les poumons.

L'association la plus prometteuse pour les infections pulmonaires à MAC est la clarithromycine ou azithromycine associée à la rifampicine et l'éthambutol. L'amikacine ou la streptomycine peuvent être aussi ajoutées selon la gravité de l'infection initialement (157).

Le traitement des *M. kansasii* repose sur l'association d'isoniazide, de rifampicine et d'éthambutol (157).

Le traitement pour les infections à MABSC est lui constitué de deux phases : la phase d'induction suivie par une phase de maintenance. Cette prise en charge est détaillée dans la figure 19.

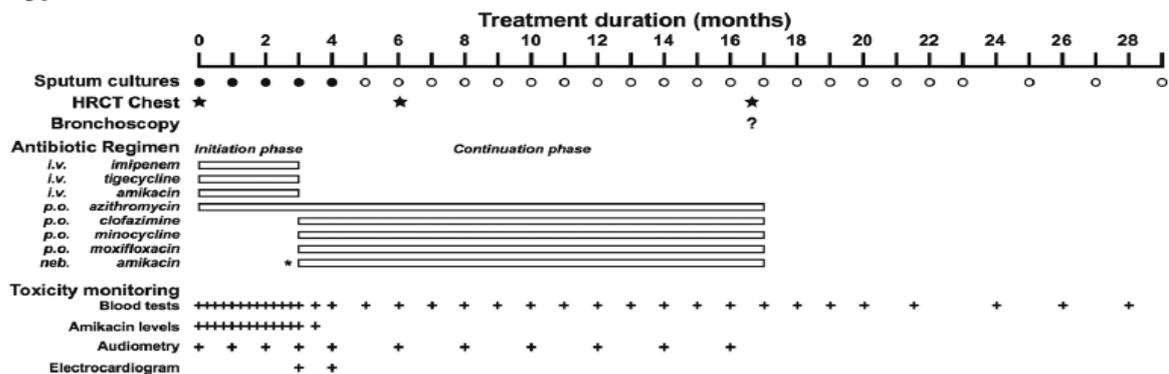
La phase d'induction est composée d'azithromycine par voie orale en association avec de l'amikacine en intraveineuse (en l'absence de résistance et contre-indication) et d'une ou plusieurs de molécules suivantes : tigécycline, imipénème ou céfoxitine pendant 3 à 12 semaines (157). La durée de cette phase est fonction de la sévérité de l'infection, de la tolérance au traitement et de sa réponse.

La phase suivante de maintenance inclut l'administration de macrolide en voie orale et d'amikacine en forme inhalée en association avec 2 ou 3 des molécules suivante par voie orale : minocycline, clofazimine, moxifloxacine ou linézolide et moins fréquemment éthambutol et cotrimoxazole (171). La clofazimine est la molécule qui possède la meilleure sensibilité et un effet synergique lorsqu'elle est utilisée en association avec de l'amikacine ou de la clarithromycine. Cela peut être utile lorsque la souche est multirésistante pouvant permettre de traiter certain patient en seconde ligne de traitement (188–190).

L'étude de *Roux et al.* montre qu'au sein du complexe abscessus, la réponse au traitement est différente suivant l'espèce impliquée. Si le traitement de base repose sur la clarithromycine, on observe une éradication totale des espèces *M. abscessus subsp massiliense* alors que seulement 3 infections sur 11 à *M. abscessus subsp abscessus* sont guéries après ce traitement. Cela peut s'expliquer par un profil de résistance différent entre ces espèces (ce thème sera abordé dans le chapitre VII.1.1) (191).

Malgré ce traitement intensif, le taux de conversion microbiologique reste assez faible pour une infection à MABSC chez les patients ayant la mucoviscidose. Il existe de nombreux cas de rechute et la guérison complète est rare. C'est pourquoi les infections pulmonaires à MABSC peuvent être considérées comme des infections chroniques incurables.

### A Typical *M. abscessus* treatment schedule



### B Typical MAC treatment schedule

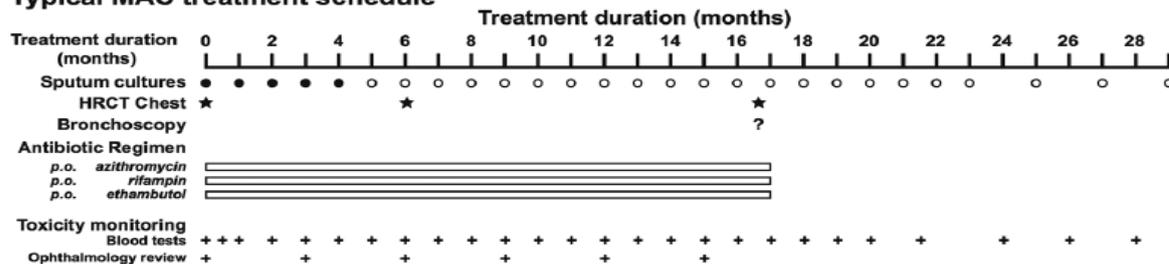


Figure 19 : Schéma de prise en charge thérapeutique des MABSC et MAC (171).

Le problème de ces traitements polymoléculaires est l'augmentation d'effets indésirables non négligeables et d'interactions possibles avec les traitements chroniques de la mucoviscidose. Il est donc nécessaire de surveiller régulièrement les patients avec des bilans ophtalmiques (éthambutol et rifabutine), la fonction rénale (amikacine), la numération sanguine (rifabutine), l'ECG (moxifloxacine), la fonction hépatique (macrolides, rifabutine, rifampicine, isoniazide, moxifloxacine) et l'audition (streptomycine, macrolides, amikacine).

L'adaptation de l'antibiothérapie chez les patients ayant la mucoviscidose est un challenge car le volume de distribution est plus grand, la clairance rénale est augmentée et l'absorption gastro-intestinale peut-être diminuée (192).

Sous traitement, les patients sont suivis mensuellement. La négativation des cultures doit se faire dans les 12 mois suivant son introduction. Autrement, on parle d'échec thérapeutique (157).

Cet échec peut être dû à différentes causes comme :

- une résistance aux macrolides,
- une re-infestation par une autre souche que l'initiale (193),
- une mauvaise observance du patient,
- un sous dosage des molécules (augmentation de la clairance rénale, baisse de l'absorption digestive chez les patients ayant la mucoviscidose),
- une diminution de l'accès de la molécule au site d'action (mucus, biofilm).

Après la fin du traitement, le patient doit être suivi pour s'assurer de l'absence de rechute. Un patient est considéré comme guéri quand toutes les cultures sont négatives trois ans après l'arrêt du traitement.

## 2. Transplantation pulmonaire

Dans le passé une infection pulmonaire à MNT était une contre-indication absolue à la greffe dans certains centres. Cependant, selon les recommandations actuelles, il n'y a plus de contre-indication absolue mais un traitement doit être entrepris avant la greffe. Il a été montré que le risque de complications et de mortalité post greffe par réinfection à MNT est plus important si la mycobactérie impliquée est *Mycobacteroides abscessus* (194–196). Il est donc recommandé de rechercher dans des prélèvements d'expectorations les MNT avant la greffe et d'instaurer un traitement pré-greffe si les cultures reviennent positives (157,171).

D'après l'étude de Chalermkulrat *et al.*, sur 18 patients ayant eu au moins une culture positive à MNT et ayant bénéficiés d'une transplantation pulmonaire, 7 (39%) ont eu une culture positive à MNT post greffe dont 5 à la même espèce présente avant la greffe. Parmi ces 7 patients, 4 ont déclaré une maladie due à MNT d'après les critères de ATS/IDSA. En comparaison, sur 89 patients avec une culture négative initialement à MNT et transplanté, 10 (11%) ont eu par la suite des cultures positives à MNT mais sans déclarer la maladie. Ces résultats montrent que les patients ayant des cultures positives avant la transplantation ont 5 fois plus de risque d'avoir des cultures positives post greffe par rapport aux patients avec des cultures initialement négatives ( $p=0,003$ ). Ils montrent également que le risque est 7 fois plus important ( $p=0,005$ ) si la culture initiale est à *Mycobacteroides abscessus* (186). Cependant

dans cette étude, la survie des patients post-greffe n'est pas influencée par la présence ou non d'une MNT avant la greffe (186,197). Ils en concluent que l'infection ou la colonisation à MNT ne doit pas être une contre-indication absolue à la transplantation pulmonaire. Cette conclusion peut être appuyée par une autre étude (Lobo *et al.*) qui retrouve ces mêmes résultats (197).

L'étude de Tissot *et al.* publiée en 2018 a été mise en œuvre pour faire le point sur les différentes pratiques concernant la transplantation pulmonaire chez les patients ayant la mucoviscidose dans 37 centres en Europe, Amérique du Nord et Australie. Une grande hétérogénéité des pratiques exercées a pu être observée. Tous les centres recherchent une infection à MNT avant transplantation mais peu ont des directives claires concernant la conduite à tenir suite aux résultats. Il ne semble pas y avoir de consensus : la majorité des centres ne considère pas cette infection comme une contre-indication absolue sauf pour certains cas particuliers où la transplantation peut être considérée comme une contre-indication relative (198).

Selon les recommandations de la société internationale de transplantation cardiaque et pulmonaire (ISHLT International Society for Heart and Lung Transplantation) « les infections chroniques avec une forte virulence et/ou des microorganismes résistants qui sont peu contrôlés avant la transplantation sont une contre-indication relative à la transplantation » (199). De même pour la fondation de la mucoviscidose et la société européenne de la mucoviscidose « la présence de MAC et MABSC persistante malgré un traitement optimal n'est pas une contre-indication absolue pour la transplantation pulmonaire. » (171).

Cela semble être encore de nos jours un débat courant pour l'acceptation ou non de la greffe pulmonaire chez les patients ayant la mucoviscidose et étant infecté par une souche de MNT, tout en sachant qu'idéalement, il est conseillé d'arriver à éradiquer la MNT avant la transplantation.

## VII. Résistances

### 1. Macrolides

#### 1. MABSC

L'un des gènes de résistance le plus fréquemment retrouvé est le gène *erm(41)* qui code pour une érythromycine méthylase entraînant une résistance naturelle aux macrolides lorsqu'elle est exprimée de manière constitutive. Selon les travaux de Nash *et al.* publiés en 2009 sur ce gène de résistance, tous les MABCS possèdent ce gène. Cependant ce gène peut être exprimé de manière inductible. Les molécules inductrices sont : la clarithromycine, les

kétolides, la télithromycine, la clindamycine et les quinupristines comme nous le montre la figure 20. Ainsi une exposition antérieure à une de ces molécules induit le gène et procure une résistance dans les 24h. La présence de ce gène peut expliquer les faibles réponses thérapeutiques obtenues pour cette espèce (200).

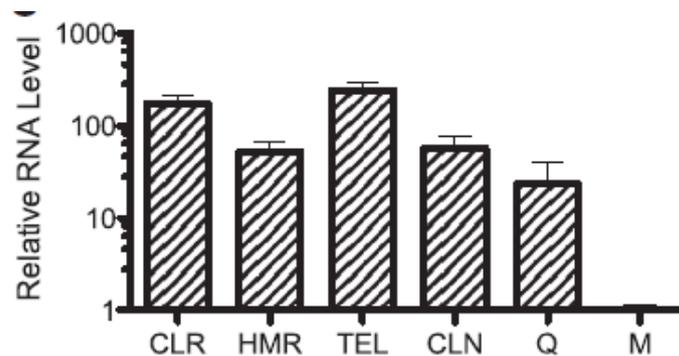


Figure 20 : Induction du gène *erm(41)* en fonction de la molécule incubée pendant 24h sur une souche MC879 de *Mycobacteroides abscessus*. CLR : Clarithromycine (induction x 172), HMR : Kétolide (induction x 52), TEL : Télithromycine (induction x 250), CLN : clindamycine (induction x 60), Q : quinupristine (induction x 23) et M : medium alone (200).

Au sein du complexe *abscessus*, *Mycobacterium abscessus subsp massiliense* se distingue de *Mycobacteroides abscessus subsp abscessus* et *subsp bolletii* car il possède un gène *erm(41)* délété (397 paires de base contre 673 paires de base). Cette délétion ne lui confère pas de résistance aux macrolides car sa méthylase est non fonctionnelle. *M. abscessus* et *M. bolletii* possèdent une résistance inductible (201–204). Cette distinction de taille peut être utilisée pour faire la différence entre les sous espèces. De plus, *Mycobacteroides abscessus subsp abscessus* possède sur son gène *erm(41)* un polymorphisme en position 28 (200). Naturellement en cette position se trouve le nucléotide T (Tryptophane) mais le C (Arginine) peut prendre sa place. Le polymorphisme C28 restaure une sensibilité aux macrolides (CMI  $\leq$  2  $\mu$ g/ml à la clarithromycine) à la différence de T28 (202,205). Le tableau 5 résume les profils de résistance aux macrolides chez ces trois sous-espèces. L'étude de Bastian *et al.* annonce que 77% des *M. abscessus* sont résistants à la clarithromycine (inductible *erm(41)* ou acquise : *rrl*), 100% des *M. bolletii* et 13% des *M. massiliense* (mutation acquise). Cette résistance est significativement plus fréquente chez les patients ayant la mucoviscidose (p=0,04) (202).

Les souches sauvages appartenant à ce complexe sont sensibles à la tigécycline, de sensibilité modérée à la céfoxitine et l'amikacine et résistantes à la tobramycine (206).

Tableau 5 : Profil de résistance des MABSC à la clarithromycine (202,203,205,207).

	Séquevar	Profil de résistance aux macrolides
<i>M. abscessus</i>	<i>erm(41)</i> T28	R inductible clarithromycine
<i>M. abscessus</i>	<i>erm(41)</i> C28	S naturelle clarithromycine
<i>M. massiliense</i>	<i>erm(41)</i> délété	S naturelle clarithromycine
<i>M. bolletii</i>	<i>erm(41)</i>	R inductible clarithromycine

## 2. Résistance acquise

Il existe un autre gène de résistance aux macrolides : le gène *rrl*. Ce gène code pour le domaine peptidyltransférase de l'ARN ribosomal 23S et ses mutations en position 2058 et 2059 provoquent une résistance acquise aux macrolides (202,204,205,208–210). Dans l'étude de Wallace *et al.*, cette résistance est présente chez 2,3% des prélèvements et tous les patients ont eu initialement un traitement par clarithromycine en monothérapie (210). On la retrouve aussi bien chez les MAC que les MABSC (211).

La monothérapie par un macrolide est fortement déconseillée contre les MNT car il y a un risque d'émergence de résistance. Pour MAC, le risque est estimé entre 10 et 15% (171,207). Dans une étude portant sur la résistance chez les MAC, Griffith *et al.* montre que l'apparition de résistance aux macrolides apparaît dans 20,3% des cas après 4 mois de traitement en monothérapie contre 4,25% lorsque cette molécule est associée à deux autres antibiotiques (éthambutol et rifabutine à forte dose) (212). Par conséquent, les sujets à risque d'échec thérapeutique pour le traitement de leur infection à MNT sont ceux qui bénéficient d'un traitement de fond par macrolides. Ce traitement peut être instauré pour ses propriétés immunomodulatrices afin d'améliorer la fonction respiratoire et réduire la fréquence des exacerbations.

A l'inverse, des études montrent des associations bénéfiques entre l'utilisation chronique d'azithromycine et les infections à MNT car cela permettrait de baisser le nombre d'infection à MNT (181,184). Par exemple, Binder *et al.* indiquent un effet dose car plus l'usage des macrolides est prolongé dans le temps, moins il y a de risque d'infection à MNT ( $p < 0,01$ ). Mais Catherinot *et al.* ne trouvent pas d'association significative entre l'usage d'azithromycine et les infections à MABSC (213). Ce résultat suggère que l'azithromycine peut être utilisée dans le traitement prophylactique au risque d'avoir des résistances induites.

## 2. Aminosides

Le mécanisme de résistance acquise aux aminoglycosides (amikacine, kanamycine, gentamicine et tobramycine) le plus commun est la mutation A1408G du gène *rrs* qui se trouve sur l'ARN ribosomal 16S (214–216). Cette mutation est présente à faible taux chez les MNT, autour de 4% et est souvent associée à la mutation *rrl* (205,211). L'étude de Renvoisé *et al.* montre qu'initialement sur 186 souches MAC, aucune n'était résistante à l'amikacine. Après traitement par cette molécule, 5 souches sont devenues résistantes dont 4 ayant la mutation *rrs* (217).

## VIII. Identification au laboratoire

### 1. Décontamination

Une décontamination des échantillons pour la recherche de mycobactéries est nécessaire pour les prélèvements considérés comme non stérile. Elle est basée sur le fait que les mycobactéries sont plus résistantes à certains antiseptiques que les bactéries. Cela permet d'éliminer soit une flore commensale lorsque le prélèvement n'est pas considéré comme stérile, soit les bactéries pathogènes présentes dans un prélèvement supposé stérile. Les bactéries ou levures poussent plus vite que les MNT et donc interfèrent avec la croissance de ces dernières. Par contre, les prélèvements provenant de sites fermés comme liquide céphalo-rachidien, liquide pleural, moelle osseuse, sang, biopsie de ganglion, sont considérés comme stérile donc directement ensemencés sur les milieux de culture sauf si l'examen direct (coloration de Gram) est positif.

Il existe différentes méthodes de décontamination des échantillons. Les trois principales sont :

- La méthode de Petroff : NaOH 4% (218). La soude va agir en tant qu'agent homogénéisant et décontaminant.
- La méthode de Tacquet-Tison : Cette méthode utilise le lauryl sulfate de sodium. Cependant cette méthode possède deux inconvénients : inhiber l'amplification génique et avoir un effet bactériostatique sur les mycobactéries (219,220).
- La méthode de Kubica : NaOH 2% + N-acétyl L-cystéine (NALC). Le NALC est un agent mucolytique/fluidifiant qui permet une digestion rapide des prélèvements d'expectoration des patients ayant la mucoviscidose libérant ainsi les micro-organismes présents dans le mucus et cellules pulmonaires (221).

Pour les patients étant susceptibles d'avoir une flore résistante comme les patients atteints de mucoviscidose, on peut faire soit la méthode de Kubica suivi d'une seconde décontamination par acide oxalique 5% soit utiliser de la chlorhexidine selon les recommandations (171). En terme de viabilité des MNT, cette dernière décontamination (chlorhexidine) a prouvé qu'elle est meilleure que l'acide oxalique (222,223). Malheureusement, la décontamination par la chlorhexidine n'est pas compatible avec les cultures en milieu liquide MGIT.

L'ajout de l'acide oxalique à la première décontamination par NALC-NaOH permet de récupérer plus de MNT positives en culture en baissant le taux de contamination (224–227). Cependant cette méthode peut avoir des faux négatifs lorsque l'inoculum initial est faible car elle est agressive et peut interférer sur la viabilité des MNT (157,225,228).

Il existe d'autres méthodes de décontaminations possibles. L'acide sulfurique à 4%, le chlorure de benzalkonium, le chlorure de sodium et le chlorure de cétyl pyridinium. Elles sont moins utilisés mais peuvent être préférées pour les prélèvements considérés comme très contaminés comme les urines ou les biopsies colique (220).

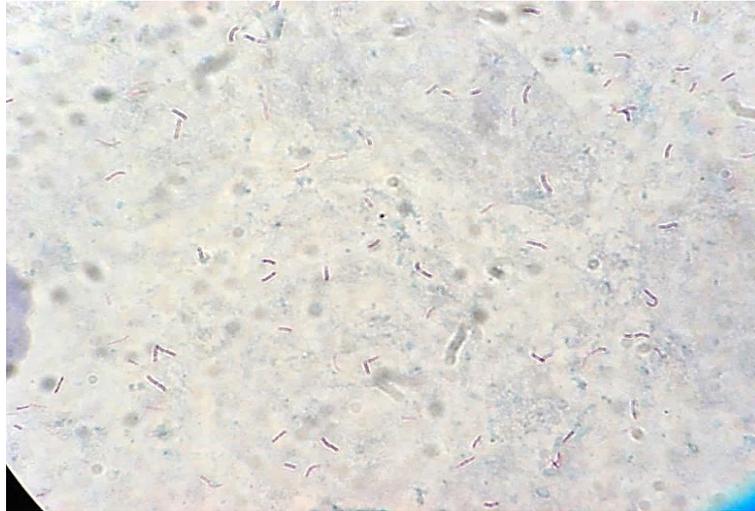
La décontamination par NaOH- NALC a été comparée à l'acide sulfurique dans l'étude de Buijels *et al.* et montre que l'acide sulfurique est plus efficace significativement pour la détection des MNT. Il y a moins de contaminations et plus de cultures positives à MNT sur MGIT avec l'acide sulfurique (228).

Il est important de bien choisir sa méthode de décontamination en essayant d'avoir la plus performante possible afin de supprimer les micro-organismes sans tuer les mycobactéries et nuire à leur croissance.

## 2. Microscope

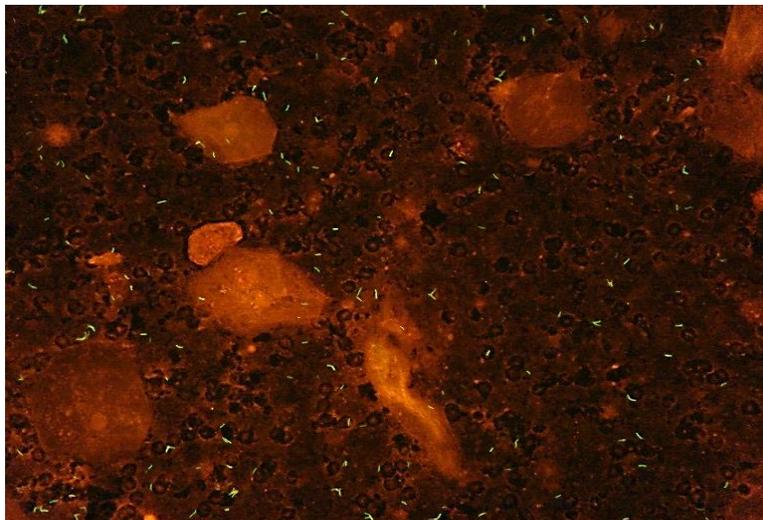
Les mycobactéries sont des BAAR. Leur membrane est imperméable aux colorants standards. Il faut donc utiliser des colorants concentrés comme la coloration de Zielh-Neelsen ou l'auramine.

La coloration de Ziehl-Neelsen est la coloration de référence. Les mycobactéries apparaissent sous forme de bâtonnet rose-rouge sur fond bleu sur la lame (figure 21) grâce à un microscope optique à l'objectif 100 en immersion avec un oculaire de 10 (grossissement 1000).



*Figure 21 : Présence de BAAR à la coloration de Ziehl Neelsen.*

De nos jours, la coloration à l'auramine est la plus souvent utilisée en première intention car elle est plus sensible et plus rapide que la précédente. Cette coloration est nommée méthode de Degommier, elle permet la visualisation de bacille vert jaune sur fond jaune orangé (figure 22) grâce à un microscope à fluorescence à l'objectif 25 puis au 40.



*Figure 22 : Présence de BAAR à la coloration à l'auramine.*

Si le frottis est positif à la coloration à l'auramine, il doit être confirmé par la réalisation d'une coloration de Ziehl-Neelsen. Les BAAR sont droits ou légèrement incurvés, pouvant être en groupés en amas pour certaines espèces.

La coloration peut être faite directement à partir du prélèvement (examen direct) ou sur les cultures positives liquides ou solides.

L'inconvénient de cet examen microscopique direct est qu'il nécessite 5 000 à 10 000 bacilles par mL pour visualiser au moins un BAAR. Cette technique est peu sensible. Dans

l'étude d'Olivier *et al.*, seulement 18% des cultures positives pour MAC sont positives sur le frottis (ED) (7). Dans l'étude de Levy *et al.*, 48% des frottis sont positifs si la culture retrouve un *M. intracellulare* et 26% pour toutes les autres espèces de MNT (183). D'autre part, ces colorations ne sont pas 100% spécifique des MNT car certaines bactéries prennent la coloration comme *Nocardia*, *Actinomycetes* et quelques corynébactéries.

A l'examen direct on rend la présence de BAAR de manière semi-quantitative. Un système de croix est appliqué selon les recommandations REMIC 2017 :

Nombre de BAAR	Interprétation
<b>0 sur la lame</b>	Négatif
<b>1-9 sur la lame</b>	1+
<b>4-36 par 10 champs</b>	2+
<b>4-36 par champs</b>	3+
<b>&gt;36 par champs</b>	4+

Pour rendre un examen négatif il faut avoir passé tout le spot au microscope au moins pendant 20 minutes.

### 3. Cultures

La culture est essentielle pour identifier l'espèce de mycobactérie et réaliser l'antibiogramme. Il existe différents types de culture : soit sur milieu liquide, soit sur milieu solide. Les recommandations préconisent de réaliser les deux types de cultures en parallèle (157,171). Les milieux liquides permettent une croissance plus rapide mais les milieux solides permettent une analyse semi-quantitative et qualitative, permettant d'analyser l'aspect des colonies.

#### 1. Milieux de culture solide

Les milieux Coletsos et Löwenstein-Jensen (LJ) sont les milieux de culture solide les plus utilisés en routine (figure 23). Le milieu Coletsos permet une croissance plus rapide et plus abondante que le milieu Löwenstein-Jensen. Les milieux solides permettent de visualiser le nombre de colonies et donc la charge « bactérienne ».

Ces deux milieux sont très riches, à base d'œuf, permettant la croissance des mycobactéries qui sont très exigeantes. Leur composition est assez similaire (féculé de pomme de terre, glycérol, œuf entier, phosphate monopotassique, sulfate et citrate de magnésium et L-

asparagine). Le milieu Coletsos est un peu plus enrichi (ajout d'oligoéléments, de jaune d'œuf, de poudre d'antracite, de pyruvate et de glutamate de sodium). Ils contiennent tous les deux du vert de malachite qui permet l'inhibition de la croissance de nombreuses bactéries.

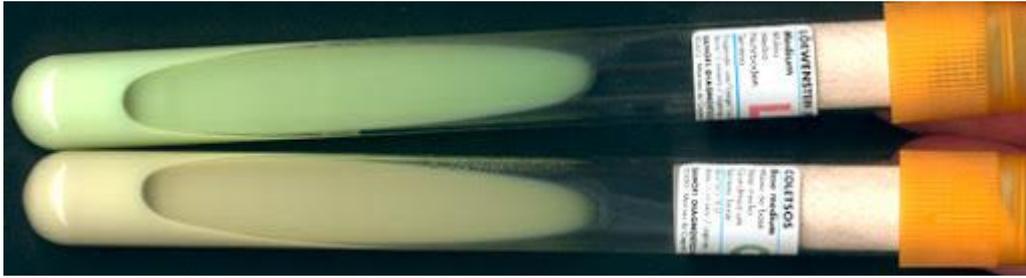


Figure 23 : Milieux de culture solide : Löwenstein-Jensen en haut et Coletsos en bas.

D'autres milieux existent comme les milieux gélosés Middlebrook 7H10 et 7H11 qui sont des milieux semi-synthétiques. Ils doivent être enrichis avec l'acide oléique, de l'albumine de bovin, du dextrose, du chlorure de sodium et de catalase nommé mélange OADC.

## 2. Milieux de culture liquide

Les milieux de culture liquide permettent une croissance plus rapide que sur milieu solide notamment pour les mycobactéries à croissance lente. Ces milieux sont utilisés dans le cadre de méthode automatisée. Le principe de détection est basé sur la consommation de l'oxygène dans ce milieu par les mycobactéries lors de leur croissance. Ce sont des systèmes qui permettent une lecture en continue de la fluorescence.

Le système Bactec™ MGIT 960 (Mycobacteria Growth Indicator Tube) de Becton Dickinson utilise un système de fluorescence qui peut incuber les tubes à une température de 37°C. Ces tubes contiennent un bouillon de Middlebrook 7H9 avec des sels de ruthénium dans du silicone au fond du tube. La mesure de cette fluorescence correspond à la quantité d'oxygène utilisée lors de la croissance bactérienne. Lors de cette croissance, la pression partielle en O<sub>2</sub> diminue. Ainsi les sels de ruthénium se réduisent et émettent une fluorescence orangée sous UV à 365 nm. On ajoute un mélange de supplément OADC, d'antibiotiques et d'antifongiques pour éviter la pousse de contaminants ; le PANTA (polymyxine B, amphotéricine, acide nalidixique, triméthoprime et azlocilline). La vancomycine peut être ajoutée en plus. Avant 2019, il existait un autre système automatisé qui était lui basé sur le dégagement de CO<sub>2</sub> dans le milieu (Bact/ALERT de Biomérieux).

Comme annoncé précédemment, la croissance est plus rapide sur milieu liquide que solide. Cependant, certaines espèces ne poussent pas en milieu liquide et ce milieu se contamine

plus facilement. Il est donc nécessaire d'ensemencer les deux types de milieux de culture pour améliorer la sensibilité de détection (157,171,229).

### 3. Nouveaux milieux de culture

D'une part, la gélose sélective pour l'identification de *Burkholderia cepacia* peut être utilisée pour l'identification de MNT en optimisant le temps d'incubation de celle-ci.

D'autre part, face au problème de baisse de viabilité des MNT du au processus de décontamination, de nouvelles géloses, les géloses RGM ont été mises en place. Ces géloses ne nécessitent pas de décontamination préalable des prélèvements.

#### 1. Gélose pour la recherche de *Burkholderia cepacia*

La gélose communément nommée « cepacia » ou BSCA (*Burkholderia cepacia* selective agar) est utilisée initialement pour la recherche de cette bactérie avec une durée d'incubation de 5 jours. Pour la recherche de MNT, la durée d'incubation doit être augmentée. En effet, le fait de passer d'une incubation de 5 jours à 14 jours augmente significativement le taux de détection des MNT (230). Mais une incubation plus longue de cette gélose ne semble pas nécessaire. L'étude de Plonga *et al.* montre que toutes les MNT ont poussé sur la gélose à J14 (voir figure 24) (231). Ce milieu doit rester un complément des géloses usuelles car elle ne permet pas la croissance des MAC (culture à croissance lente). Les milieux de cultures traditionnels (MGIT + LJ ou Coletsos) ont une meilleure sensibilité pour cette recherche que la gélose BCSA seule (83% vs 75,3%) (230).

#### 2. Gélose RGM

Depuis peu, un nouveau type de gélose nommée RGM (Rapidly Growth Mycobacterium) a été mis sur le marché pour la culture des MNT chez les patients atteints de mucoviscidose. C'est une gélose sélective qui ne nécessite pas de décontamination préalable des prélèvements (232). De nombreuses études récentes ont été mises en œuvre pour comparer l'usage de cette gélose avec les milieux utilisés traditionnellement (LJ et MGIT).

La sensibilité de la gélose RGM semble très satisfaisante et équivalente à celle du MGIT (82% vs 86%) pour la culture des MNT avec un temps moyen de positivité des deux méthodes similaire (5,7 jours vs 6 jours) (233–235).

Initialement, la gélose RGM a été conçue pour la mise en évidence de mycobactéries à croissance rapide. Il a été démontré qu'une incubation de 28 jours (au lieu de 10 jours) pouvait permettre la culture de mycobactérie à croissance plus lente (231,235). Cet allongement

d'incubation à un impact significatif sur la détection car seulement 61,2% des MNT sont reconnues à J10 alors que 96,9% le sont à J28 (p=0,001) (figure 24).

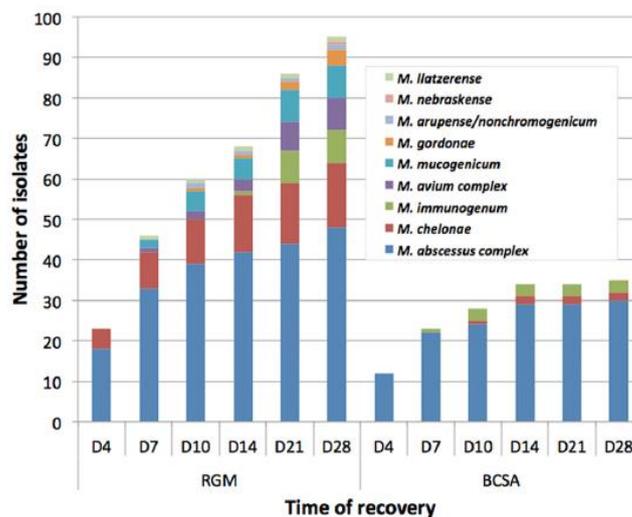


Figure 24 : Temps de détection des MNT sur RGM versus sur BCSA sur des prélèvements respiratoires de patients ayant la mucoviscidose (231).

La gélose RGM offre l'avantage d'être très sélective des MNT. Elle est plus sélective significativement que la méthode traditionnelle AFB (Acid Fast Bacillus : LJ + MGIT), Middlebrook et les géloses BCSA (231,232,235,236).

La sensibilité des géloses RGM est meilleure pour la recherche de MABSC que pour les MAC. Pour les MAC, il n'y a pas de différence significative entre ce milieu et les milieux AFB ou Middlebrook (231,235,236). Les MABSC étant les mycobactéries les plus souvent retrouvées chez les patients ayant la mucoviscidose en Europe, la gélose RGM semble intéressante pour la recherche de MNT chez ces patients.

L'inhibition de la pousse de la plupart des micro-organismes (bactéries gram positive, *Pseudomonas aeruginosa*, levures...) est un autre avantage de la gélose RGM. Les études ont montré que ce milieu est significativement moins contaminant que la gélose BCSA (231,232,237). Le même résultat a été observé pour la comparaison avec le milieu liquide MGIT (233–235).

Dans plusieurs études, la croissance des MNT, sur gélose RGM est favorisée significativement par une température d'incubation des géloses à 30°C au lieu de 35°C (235,236). En effet certaines espèces ne poussent pas à 35°C : *M. gordonae*, *M. llatzerense*, *M. mucogenicum*, *M. chelonae* par exemple (235,236). L'étude de Stephenson *et al.* démontre que lorsque l'inoculum présent dans le prélèvement est élevé, la sensibilité de détection d'une MNT est égale entre les milieux de gélose RGM et les milieux conventionnels (MGIT+LJ) (figure

25). A l'inverse lorsque l'inoculum est faible, seules les MNT arrivent à pousser sur les géloses RGM comme nous le montre la figure si dessous (236).

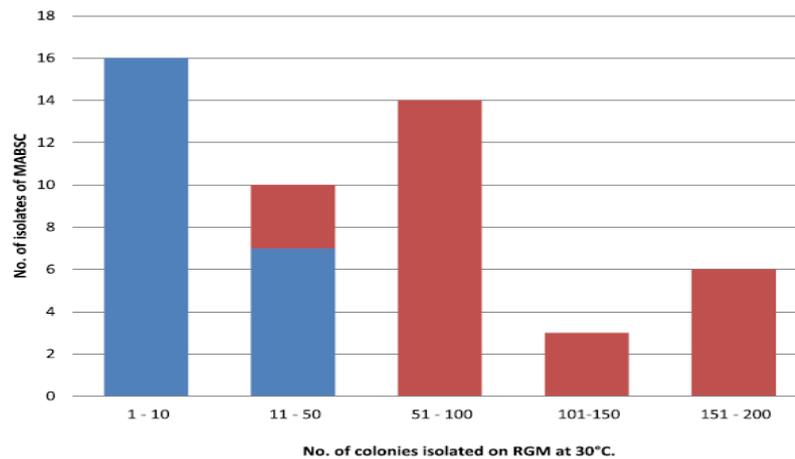


Figure 25 : Corrélation entre le nombre de colonies isolées sur gélose RGM à 30°C et type de culture positive. Bleu : géloses RGM positive et AFB négative. Rouge : géloses RGM positive et AFB positive (236).

Ces géloses RGM semblent avoir beaucoup d'avantages : pas de décontamination préalable, meilleure détection des MNT surtout pour les mycobactéries à croissance rapide, taux de contamination faible et dénombrement des colonies de manière semi quantitative. Le fait de ne pas décontamination les prélèvements a pour avantage principal de ne pas toucher à la viabilité des mycobactéries.

Jusqu'à peu de temps, il n'y avait pas de gélose suffisamment sélective pour la détection de MNT, ce qui nécessitait l'utilisation de plusieurs types de géloses pour couvrir un grand nombre de MNT. Avec l'apparition de la gélose RGM, cela va peut-être évoluer. L'utilisation des géloses RGM et BCSA pour la recherche de MNT n'est pas encore inscrite dans les recommandations.

#### 4. Conditions de culture

Il existe différentes températures d'incubation optimales et de temps d'incubation en fonction de l'espèce recherchée et du site de prélèvement.

Généralement on utilise une culture incubée à 30°C et une autre à 37°C pour les patients ayant la mucoviscidose. La croissance des MNT est optimale entre 28 et 37°C (157). Mais certaines espèces moins communes poussent à des températures inférieures ou supérieures à celle-ci. Par exemple, *M. xenopi* pousse à 42°C et *M. ulcerans*, *M. haemophilium* et *M. marinum* poussent entre 28°C et 30°C. Les mycobactéries à tropisme cutané poussent mieux à 30°C.

Le temps d'incubation des souches est aussi important car il existe des RGM et des SGM. Les recommandations exigent un minimum d'incubation de 6 semaines pour le milieu liquide et solide (171). Ce temps peut être allongé jusqu'à 6 mois si l'examen direct présente des BAAR et si les cultures à 6 semaines sont négatives.

## 4. Identification

Il est recommandé de faire une identification jusqu'à l'espèce voire la sous espèce pour certaines MNT. Pour *M. intracellulare*, *M. avium* et *M. chimaera*, l'identification peut s'arrêter au complexe avium mais pour les MABSC, l'identification de la sous espèce est nécessaire car elles possèdent des virulences et des résistances aux antibiotiques différentes (171).

### 1. Tests phénotypiques

Initialement les tests phénotypiques étaient utilisés pour identifier les MNT grâce à la classification de Runyon. Celle-ci permettait de déterminer le groupe d'appartenance en fonction de l'apparence des colonies, du temps de pousse et de la réponse à certains tests : accumulation de niacine, réduction du nitrate, catalase, utilisation du citrate, croissance en présence de NaCl... (238). Ces méthodes sont longues, difficiles à interpréter et ne sont parfois pas suffisantes pour une bonne identification. Des techniques complémentaires doivent y être ajoutées (157).

### 2. Test chromatographique

La chromatographie liquide de haute performance (CLHP) permet quant à elle l'analyse des acides mycoliques de la paroi des MNT. Elle est utilisée dans certains laboratoires de référence mais très peu en routine car le coût est élevé. Cependant, l'identification de certaines espèces n'est pas possible. Par exemple, *M. abscessus* et *M. chelonae* ne sont pas distinguables (157) et toutes les mycobactéries du complexe tuberculosis possèdent le même chromatogramme (239).

### 3. Séquençage de gènes de ménage

Les méthodes génotypiques peuvent aussi permettre une identification correcte des MNT. Le séquençage des gènes *rpoB*, *hsp65*, *recA*, *sodA*, *secA* et l'ARN ribosomal 16S sont les plus utilisés de nos jours (240,241). Ce sont des gènes très conservés chez les mycobactéries mais ayant des zones hypervariables permettant l'identification de celle-ci (242).

Initialement c'est l'ARN ribosomal 16S qui était le plus utilisé car plus précis que les tests phénotypiques mais certaines espèces proches génétiquement possèdent le même ARN

16S comme au sein du complexe abscessus ou au sein du complexe tuberculosis (243–246). L'étude de Chen *et al.* montre que l'ARN 16S peut séparer *M. avium* de *M. intracellulare* (247).

Le gène *rpoB* (sous unité  $\beta$  de ARN polymérase) possède 342 bp et semble plus discriminant que l'ARN 16S (248–250). Par exemple *M. kansasii* et *M. gastri* possèdent le même ARN 16S mais un *rpoB* différent. Par contre le complexe tuberculeux possède le même ARN16S et *rpoB* (251,252).

Enfin le gène *hsp65* (heat shock protein de 65 kD), est un gène de 441 bp. Ce gène permet d'identifier un grand nombre de mycobactéries (253). Avec *hsp65*, on peut voir plus de polymorphisme que par ARN 16S. Cela permet de séparer certaines espèces comme, par exemple, *M. chelonae* et *M. abscessus*, ou les espèces dans le complexe MAC qui sont difficiles à différencier par ARN 16S (254–257).

Il a été montré dans différentes études que le séquençage d'un seul gène menait à des erreurs d'identification. L'utilisation de plusieurs gènes à la fois est recommandée (243,258–262). Dans l'étude de Kim *et al.*, 71,13% des isolats sont identifiés grâce au séquençage de l'ARN 16S, 86,8% avec *hsp65* et 81,6% par *rpoB*. Cependant si on utilise les 3 gènes ensemble, 97,25% de mycobactéries sont identifiées. La publication de Zelazny *et al.* nous montre que le séquençage des gènes *hsp65*, *rpoB*, *secA* et de l'ARN 16S ensemble permet de distinguer *Mycobacteroides abscessus subsp abscessus* de *Mycobacteroides abscessus subsp massiliense* et de *Mycobacteroides abscessus subsp bolletii* (259). Ces trois gènes semblent plus variables que l'ARN 16S et permettent donc de faire la différence intra-espèces (258,260). Comme annoncé précédemment, *M. abscessus massiliense* peut être différencié des deux autres espèces du complexe abscessus par le séquençage du gène *erm(41)* qui est plus court (201).

#### 4. PCR avec hybridation sur support solide (Kit commercial)

Une autre méthode qui couple la PCR (polymerase chain reaction) à une hybridation inverse sur support solide existe. Deux kits commerciaux existent : INNO-LiPA Mycobacteria (Line probe assay) et GenoType® Mycobacterium assay (HAIN, Lifescience, Bruker, Germany).

Le principe de la première technique est d'amplifier par PCR la zone intergénique entre les gènes ribosomiaux de l'ADN 16S et 23S. Elle permet d'identifier 16 mycobactéries différentes (263–267). Cette zone intergénique nommée ITS (Internal transcribed Spacer) permet de séparer certaines espèces proches génétiquement (268). La technique LiPA montre de très bons résultats avec une sensibilité de 100% et possède l'avantage de différencier 3

groupes des *M. kansasii* : génotype I, génotype II et les autres génotypes III à V (264–267,269,270). Il existe VII génotypes au total de cette espèce. Le I et II sont des pathogènes, le I étant le plus souvent isolé chez l’homme, les autres sont considérés comme des contaminants de l’environnement (271).

La technique GenoType cible l’ADNr 23S et permet identifier une vingtaine de MNT ainsi que les mycobactéries du complexe tuberculosis (266,272,273). Pour les MNT, cette technique est composée de deux kits, le kit CM (Common Mycobacteria) pour l’identification de 15 espèces les plus fréquentes et le kit AS (Additional Species) pour 16 espèces moins communes (274–276). Le kit AS permet aussi de différencier l’espèce *M. marinum* de *M. ulcerans*, ce qui n’est pas possible sur le kit CM (277). La sensibilité pour l’identification d’espèce est pour le kit CM de 88% - 97,9% et augmente à 96% - 99,3% lorsque l’on ajoute le kit AS, selon les études (275,276,278).

Ces deux kits ne permettent pas de différencier les membres du complexe tuberculeux et du complexe abscessus (266,270,279–281). Pour différencier les trois sous espèces du complexe abscessus, il existe le GenoType NTM-DR® qui est aussi un test d’hybridation sur bandelette. Il permet de mettre en évidence les résistances aux macrolides naturelles aux macrolides : *erm(41)* ou acquises aux macrolides ou aminoglycosides, respectivement *rrl* ou *rrs*, pour MAC, MABSC et *M. chelonae* (207,208,211,282).

## 5. PCR couplée à une restriction enzymatique

La PCR-Restriction enzyme Analysis (PRA) qui est une PCR couplée à une restriction enzymatique est aussi pratiquée. Cette méthode utilise généralement le séquençage du gène *hsp65* qui sera ensuite digéré par deux enzymes *BstEII* et *HaeIII*. La taille du fragment identifié sur un gel d’agarose est spécifique de l’espèce (157,263,283–291). L’étude de Wu *et al.* montre que plus l’examen direct possède un nombre de BAAR important, plus l’identification par la technique PRA-*hps65* est correcte (292). Le gène *rpoB* ou l’ARN 16S peuvent aussi être utilisés avec d’autres enzymes de restriction (293–297). Elle permet ainsi de séparer distinctement la plupart des mycobactéries. Grâce à cette technique *M. kansasii* et *M. gastri*, ou *M. abscessus* et *M. chelonae*, non différenciables par le séquençage de l’ARN 16S, le deviennent grâce à la PRA (287,289).

Par contre, cette technique ne permet pas de différencier les mycobactéries du complexe tuberculeux qui possèdent le même profil PRA (288,289).

## 6. Sondes spécifiques

Les sondes nucléiques spécifiques sans amplification, Gen-Probe® AccuProbe® (Hologic) sont de moins en moins utilisées. La cible de cette technique est l'ARN ribosomal 16S. En effet, peu de mycobactéries sont identifiables : MAC, *Mycobacterium avium*, *Mycobacterium gordonae*, *M. intracellulare*, *M. kansasii* et *M. tuberculosis* complex (266,298).

## 7. Spectrométrie de masse

Enfin le MALDI-TOF MS (Matrix Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometer) est depuis quelques années mis en place pour l'identification des MNT à partir des milieux de culture (171,299–301). C'est un outil très utilisé pour l'identification des souches bactériennes. Il a prouvé aussi son efficacité dans l'identification des MNT avec une spécificité de 100% et une sensibilité de 82 à 100% selon les espèces (302,303). Le résultat est obtenu rapidement, il y a peu de coût de réactifs et est utilisable en routine (302–305). Cependant, pour les MNT très proche génétiquement, certaines sous espèce comme *M. abscessus subsp. abscessus* et *M. abscessus subsp. massiliense* et *M. abscessus subsp. bolletii* ne peuvent être différencier directement (299,306). L'étude de Fangous *et al.* publiée en 2014 montre que grâce à l'utilisation d'un algorithme basé sur cinq pics caractéristiques du complexe abscessus, les trois sous espèces sont identifiables à 94% (figure 26). A noter que le faible taux d'erreur de 6% ne concerne que la sous espèce *M. massiliense* (307).

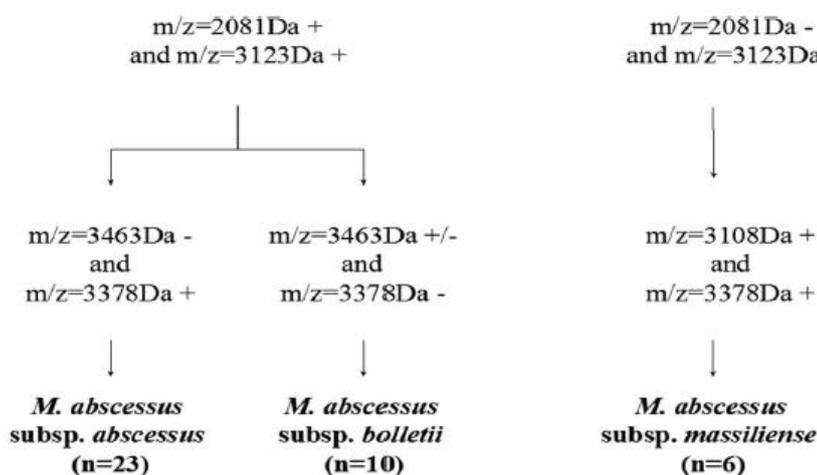


Figure 26 : Les trois sous-espèces de *Mycobacteroides abscessus* sont identifiées grâce à la présence (+) ou l'absence (-) de cinq pics caractéristiques. (307).

La biologie moléculaire peut se révéler alors utile pour compléter l'identification.

# Partie III : Notre étude

## I. Objectif de l'étude

L'objectif de cette étude est d'évaluer la méthode de décontamination des expectorations, chez les patients atteints de mucoviscidose, dans le diagnostic des MNT. Pour cela nous avons comparé la méthode de simple décontamination par NaOH NALC avec la méthode de double décontamination utilisée en routine au laboratoire du CHU de Caen (NaOH NALC puis acide oxalique, selon les recommandations (171)). L'incubation prolongée à 28 jours de la gélose Oxoid (initialementensemencée pour la recherche de la bactérie *Burkholderia cepacia*) a été également étudiée.

Cette étude a été inspirée par la mise en place du protocole national nommé CIMeNT (Epidémiologie et Caractéristiques Cliniques des Infections à Mycobactéries Non Tuberculeuses chez les patients atteints de mucoviscidose) en décembre 2019 au CHU de Caen.

Différents points ont été analysés lors de cette étude :

- le délai de croissance des MNT en fonction du mode de décontamination utilisé
- le taux de contamination présente pour chaque mode de décontamination
- la sensibilité de la gélose Oxoid pour la recherche de MNT (nommée communément gélose « cepacia » par la suite)

## II. Matériels et méthodes

### 1. Échantillons

Nous avons inclus dans notre étude toutes les expectorations prélevées chez des enfants et des adultes ayant la mucoviscidose du 27 décembre 2019 au 21 juillet 2020 au CHU de Caen. Durant cette période, 91 prélèvements ont été sélectionnés mais 15 ont été exclus pour une quantité insuffisante. Ainsi, 76 échantillons ont été recueillis sur cette période (figure 30). Pour la majorité des cas, les prélèvements étaient effectués lors d'une consultation de suivi. Quelques patients étaient hospitalisés (9 hospitalisations).

Les données collectées à partir des dossiers médicaux des patients sont : sexe, date de naissance, génotype CFTR, date du diagnostic de la mucoviscidose, clinique (iléus méconial, insuffisance pancréatique exocrine, diabète), VEMS, colonisation bactérienne et fongique,

traitement de la mucoviscidose ou greffe pulmonaire et antécédent de colonisation/infection à une MNT.

## 2. Protocole de diagnostic des MNT au laboratoire

Suite au protocole CIMeNT, nous avons décidé d'effectuer au CHU de Caen les deux types de décontaminations (simple et double) en parallèle sur toutes les expectorations de patients ayant la mucoviscidose. Cela nous a permis de faire une révision des bonnes pratiques de laboratoire en analysant la viabilité des MNT sur une simple et sur une double décontamination et l'utilité des géloses « cepacia ».

### 1. Méthodes de cultures

La décontamination de l'expectoration consiste en premier lieu à l'ajout d'agents mucolytiques le NAC-PAC Red (Alpha Tec référence 0004303) avec du NALC puis un décontaminant, la soude NaOH à 5%. Un agent neutralisant le NPC 67 (AlphaTec référence 0003940) est ensuite ajouté au mélange jusqu'à neutralisation de la soude (virage du rose à incolore). Ce mélange est ensuite centrifugé à 3600 tours/min pendant 20 minutes. Un examen direct par la coloration de l'auramine sera réalisé à partir du culot provenant de cette centrifugation. Le culot est ensuite remis en suspension grâce à l'ajout de PRB™ (pellet resuspension buffer Alphatec référence 0004510) : c'est la première décontamination (D1).

Deux milieux solides : Coletsos ossein (Bio Rad Référence 53164) et deux milieux liquides : MGIT (BBL™ MGIT™ Becton Dickinson référence 245122) sont ensemencés avec la première décontamination. Un milieu de chaque type sera incubé à 37°C et les autres à 30°C. A noter que les milieux liquides sont enrichis par l'ajoute d'un mélange d'antibiotiques nommé PANTA (BBL™ MGIT™ PANTA™ Becton Dickinson référence 245124), d'un supplément de croissance OADC (Becton Dickinson BACTEC™ MGIT™ Growth supplement référence 245124) et de la vancomycine, pour limiter les contaminations bactériennes et fongiques.

Pour la seconde décontamination (D2) on ajoute 1 mL d'eau et 1 mL d'acide oxalique laissé en contact avec le mélange de la première décontamination pendant 30 minutes. On ajoute ensuite l'agent neutralisant NPC 67, on centrifuge le mélange et puis le surnageant est enlevé. Les mêmes milieux sont ensemencés comme pour la première décontamination grâce à la remise en suspension du culot par du PRB™.

La figure 27 résume la prise en charge des expectorations de patients ayant la mucoviscidose au CHU de Caen.

En plus des deux milieux de cultures conventionnels utilisés pour la recherche de MNT, la gélose *Burkholderia cepacia* (Oxoid P00938) était observée sur une période prolongée de 28 jours au lieu de 5 jours. Cette gélose a été initialementensemencée avec du prélèvement pur non décontaminé, en même temps que les géloses pour la recherche de bactéries.

Les milieux liquides sont incubés pendant 6 semaines, les solides pendant 12 semaines. Une prolongation de l'incubation est possible en cas d'examen direct positif à BAAR et de cultures négatives aux délais cités.

Les MGIT à 37°C sont placés dans l'automate de Becton Dickinson MGIT 960 avec une surveillance continue. Les MGIT à 30°C sont incubés dans une étuve dédiée et observés une fois par semaine. Les milieux solides sont aussi examinés et placés dans des étuves à température dédiée.

Toute culture positive est manipulée dans un laboratoire P3.

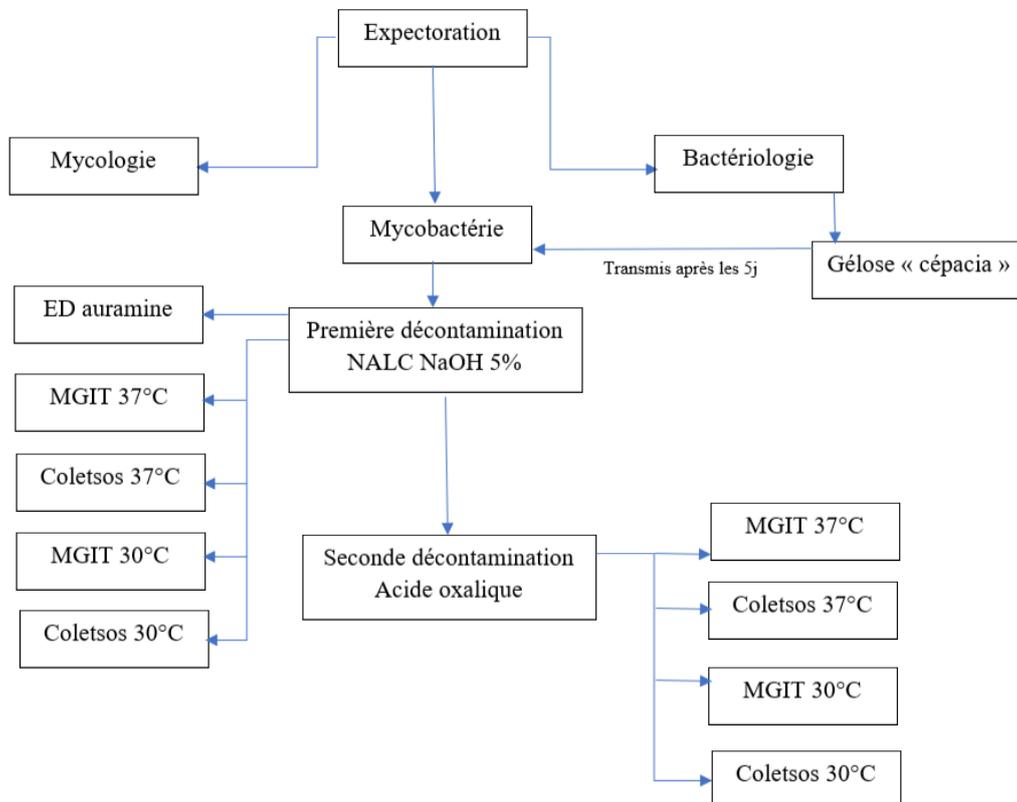


Figure 27 : Prise en charge des expectorations de patients atteint de la mucoviscidose au CHU de Caen.

## 2. Identification

Au laboratoire P3, l'inactivation est possible à partir du milieu de culture liquide ou solide. Cette inactivation est réalisée grâce à un choc thermique avec de l'éthanol pur conservé à -18°C (extraction protéique plus facile). Les tubes sont centrifugés à 13000 tr/min pendant 5 minutes et le surnageant enlevé.

Une coloration de Ziehl-Armand (Kit QuickTB RAL) est réalisée sur une lame pour la recherche de BAAR. Si cette coloration est négative, une coloration à l'auramine est faite sur une seconde lame disponible. Si celle-ci est négative, une coloration au GRAM est effectuée sur cette même lame, pour voir une potentielle contamination des tubes par des bactéries ou des levures.

En second lieu, le test MPT64 (SD BIOLINE TB Ag MPT64 Rapid référence 08FK50) est réalisé. C'est un test rapide immunochromatographique qui permet de détecter les mycobactéries du complexe tuberculosis. La MPT64 est une protéine spécifique du complexe tuberculosis et est incriminée dans sa virulence.

La figure 28, représente schématiquement la prise en charge des prélèvements positifs sur milieux solides et/ou liquide au CHU de Caen.

Au P2, l'identification sur MALDI-TOF (Bruker) de la souche inactivée est réalisée grâce à un protocole d'extraction MycoEX par acétonitrile et acide formique en quantité équivalente et bile de zirconium (299). La banque de donnée spécifique des mycobactéries sur le logiciel du MALDI-TOF est utilisée (MBT Mycobacteria Library version 6.0 #18507766).

L'identification est considérée comme excellente lorsque le score est  $> 2$ , correcte si  $> 1,8$  et non correcte si elle est  $< 1,8$ . Lorsque le score est  $< 1,8$ , soit un HAIN NTM-DR est réalisé au CHU de Caen soit un séquençage du gène *hsp65*.

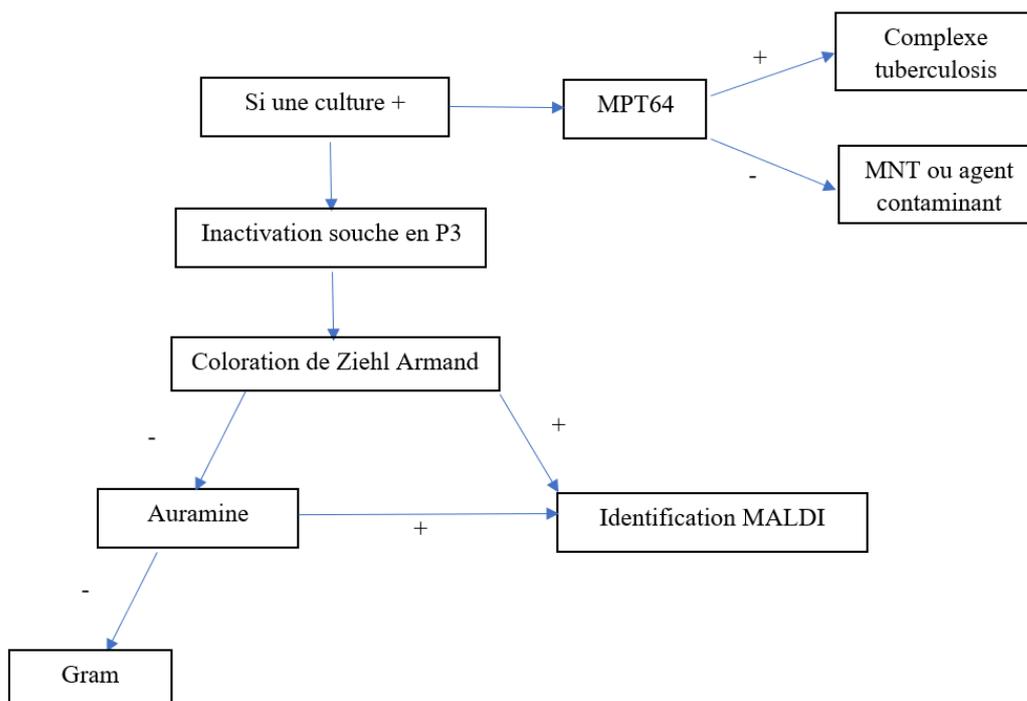


Figure 28 : Prise en charge des prélèvements positifs.

### 3. Sensibilité aux antibiotiques

La sensibilité aux antibiotiques est testée au CHU de Caen par génotypage grâce au test nommé GenoType® Mycobacterium NTM-DR (HAIN Lifescence). Ce kit permet de déterminer seulement la sensibilité à certains antibiotiques pour les espèces suivantes : *M. avium*, *M. chimeara*, *M. intracellulare*, *M. abscessus subsp abscessus*, *M. abscessus subsp bolletii*, *M. abscessus subsp massiliense* et pour *M. chelonae*. Il étudie la sensibilité aux macrolides (clarithromycine et azithromycine) par la recherche des gènes *erm(41)* et *rrl* et la sensibilité aux aminosides (kanamycine, amikacine et gentamicine) par le gène *rrs*. Si les souches sont résistantes à un antibiotique, elles sont envoyées au CNR.

Les antibiogrammes en milieu liquide (test phénotypique) ne sont pas faits au CHU de Caen mais envoyés au CNR de la Pitié Salpêtrière. Il en est de même pour les souches non incluses dans le kit GenoType® Mycobacterium NTM-DR (HAIN Lifescence) comme par exemple *M. kansasii*, *M. marinum* ou *M. xenopi*.

Selon les recommandations du CASFM, la détermination des CMI (concentration minimal inhibitrice) pour les MNT est réalisée grâce à une méthode de microdilution en plaque de 96 puits (206). Les indications de réalisation d'un antibiogramme en milieu liquides sont les suivantes :

- patient ayant un antécédent de traitement aux macrolides ou aminosides
- les cultures restant positives après 6 mois de traitement
- certains terrains à risque comme la mucoviscidose, l'immunodépression sévère ou la transplantation d'organe solide

Pour les MAC, l'antibiogramme se fait sur un milieu liquide Mueller-Hinton avec l'ajout d'OADC. La clarithromycine est testée initialement. L'amikacine sera testée s'il existe une résistance à la clarithromycine. L'incubation se fait à 35°C pendant 7 jours. Lorsque la croissance est insuffisante à 7 jours, la lecture peut se faire entre 10 et 14 jours. L'antibiogramme est Si la souche est sensible à la clarithromycine, elle sera rendue par interprétation sensible à l'azithromycine. La rifampicine et l'éthambutol ne sont pas testés pour les souches appartenant à ce complexe car il n'existe pas de corrélation entre le succès thérapeutique et la sensibilité *in vitro* de ces deux molécules (206).

Pour les MABSC, l'antibiogramme est réalisé sur un milieu de culture liquide CAMHB (Cation Adjusted Mueller Hinton Broth). C'est un milieu de culture Mueller-Hinton ajusté en cations  $\text{Ca}^{2+}$  et  $\text{Mg}^{2+}$ . Il est incubé à 30°C pendant 3 à 5 jours. L'antibiogramme est à relire à

J14 pour la détermination de la CMI de la clarithromycine pour vérifier la présence ou l'absence de résistance inductible. L'amikacine, la céfoxitine, la clarithromycine et la tigécycline sont testés sur cet antibiogramme. Le linézolide peut aussi être testé en complément. La détermination de la sous-espèce du séquevar *erm(41)* est indispensable en l'absence d'antécédent de traitement et en l'absence de terrain à risque (206).

### 3. Ethique

Nous n'avons pas eu besoin de consentement des patients lors de cette étude car les prélèvements utilisés étaient ceux prescrit par le médecin, en accord avec la Loi n°2004-800 relative à la bioéthique et publiée dans le Journal Officiel de la République Française en août 2004.

## III. Résultats

### 1. Caractéristiques des patients

#### 1. Epidémiologie

Dans notre étude 42 patients ont été inclus dont 15 enfants (<18 ans) et 27 adultes (≥18 ans). La répartition homme/femme est presque équilibrée avec 22 hommes (52,4%) et 20 femmes (47,6%) (tableau 6), ce qui est représentatif de la population Française de patients atteints de la mucoviscidose en 2017 (11). Cette population est composée à majoritairement d'adulte à 64,3% (légèrement supérieur aux chiffres recensés dans le registre 2017 : 55,9%). Notre moyenne d'âge est donc plus élevée (27 ans au lieu de 22,3 ans dans la population française).

Tableau 6 : Caractéristiques épidémiologiques des patients.

	Total n=42	Chiffres 2017 (11)
<i>Homme</i>	52,4% (n=22)	52,1%
<i>Femme</i>	47,6% (n=20)	47,9%
<i>Enfants</i>	35,7% (n=15)	44,1%
<i>Adultes</i>	64,3% (n=27)	55,9%
<i>Age (moyenne)</i>	26,8 ans	22,3 ans
<i>Grefte pulmonaire</i>	4,8% (n=2)	12%

L'âge de la population de cette étude s'étend de 8 ans à 71 ans avec une moyenne de 26,8 ans (médiane de 23,5 ans). La moyenne d'âge des patients ayant le génotype homozygote

pour la mutation delta F508 est de 24,5 ans et de 29,4 ans pour les patients hétérozygotes, sans différence significative entre ces deux groupes.

## 2. Mutations

88,1% de notre population possède une mutation delta F508del que ce soit à l'état homozygote ou hétérozygote (83,4% selon le registre Français de la mucoviscidose 2017) (tableau 7). Dix-neuf patients possèdent un génotype homozygote F508del/F508del, dix-huit ont un génotype hétérozygote pour FF508del et cinq ont d'autres génotypes dont deux avec des mutations non connues (c'est-à-dire non répertoriées dans leur dossier clinique informatique).

Tableau 7 : Répartition de la mutation delta F508 dans notre population.

	Chiffres 2017(11)	
<i>Génotype Homozygote delta F508</i>	46,3% (n=19)	
<i>Hétérozygote delta F508</i>	42,8 % (n=18)	
<i>Total mutation delta F508</i>	88,1% (n=37)	83,4%
<i>Autres</i>	12,2% (n=5)	

Sur les 19 patients homozygotes, 17 patients bénéficient du traitement Orkambi®. Les deux autres patients homozygotes sont des patients greffés. L'un est greffé pulmonaire et l'autre est greffé hépatique, en attente d'une greffe pulmonaire. L'usage du traitement Orkambi® n'est pas recommandé chez les patients greffés.

Lors de notre étude, seulement deux patients greffés bi-pulmonaire ont eu un ECBC, la patiente homozygote pour la mutation F508del sus citée, greffée à l'âge de 12 ans et un patient hétérozygote greffé à 26 ans.

Notre population semble représentative de la population française de patients ayant la mucoviscidose selon les chiffres de 2017 du registre national de la mucoviscidose. Cependant notre population est un peu plus âgée avec une moyenne de 5 ans supérieure au registre français.

## 3. Diagnostic de la mucoviscidose

Selon la figure 29, la majorité des patients soit trois quart (n=32) ont eu un diagnostic précoce néonatal. Trois patients ont eu un diagnostic tardif dans la petite enfance entre l'âge de 2 et 4 ans. Quatre autres patients ont eu un diagnostic très tardif c'est-à-dire après 20 ans. Pour les trois patients restants, l'information sur la date de leur diagnostic n'était pas connue dans leur dossier médical.

Pour les diagnostics très tardifs :

- Deux hommes âgés de 55 ans et 57 ans lors de notre étude ont eu leur diagnostic lors d'un bilan d'infertilité où une azoospermie par agénésie des canaux déférents a été retrouvée.
- Deux femmes de 55 ans et 71 ans, ont eu leur diagnostic face à des troubles respiratoires (exacerbations des signes cliniques respiratoire ou dilatation des bronches).

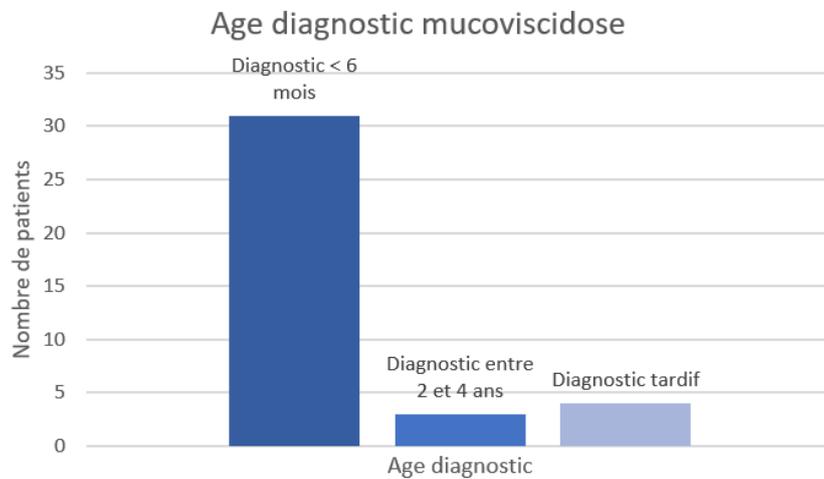


Figure 29 : Age de diagnostic de la mucoviscidose dans notre population.

#### 4. Infections bactériennes

Dans notre étude, tous les patients étaient positifs à une ou plusieurs bactéries en culture. Quasiment la moitié était colonisé à *Aspergillus fumigatus*. Comme on peut le voir dans le tableau 8 :

- 80,9% de nos patients ont eu un *Staphylococcus aureus* sur leur culture d'ECBC dont trois patients à SARM.
- 42,9% à *Pseudomonas aeruginosa*
- 45,2% à *Aspergillus fumigatus*
- 16,7% à *Haemophilus influenzae*
- 9,5% à *Stenotrophomonas maltophilia*

Seulement deux patients (homozygote pour la mutation F508del) dans notre étude possèdent une culture positive à *Achromobacter xylosoxidans*. Un patient était positif à *Burkholderia cepacia* complexe et un autre à *Streptocoque pneumoniae*.

Sur le plan bactériologique en comparaison au rapport 2017 du registre de la mucoviscidose (11), notre population possède plus de colonisation à *Staphylococcus aureus* et à *Aspergillus fumigatus*.

Tableau 8 : Colonisation ou infection aux principales bactéries responsables d'infections respiratoire.

	Chiffres 2017 (11)	
<i>Staphylococcus aureus</i>	<b>80,9%</b> (n=33)	61,6%
SARM	7,1% (n= 3)	6,3%
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	42,9% (n=18)	36,8%
<i>Aspergillus fumigatus</i>	<b>45,2%</b> (n=18)	28,7%
<i>Haemophilus influenzae</i>	16,7% (n=7)	16,6%
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	9,5% (n=4)	10,6%
<i>Burkholderia cepacia</i>	2,4% (n=1)	2,3%
<i>Achromobacter xylosoxidans</i>	4,8% (n=2)	6,6%
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	2,4% (n=1)	2,6%
MNT	9,5% (n=4)	2,6%

## 5. ECBC

76 expectorations ont été analysées pendant notre étude. 26 patients ont eu un seul prélèvement réalisé et les 16 restants ont eu deux à cinq prélèvements à intervalles de temps plus ou moins rapprochés.

Le tableau 9 récapitule le nombre de prélèvements qu'il y a eu pour chaque patient. On peut noter que 6 patients ont eu deux prélèvements, 4 autres en ont eu trois, 4 patients ont eu quatre prélèvements et 2 patientes ont eu cinq prélèvements. Ces deux patientes ont eu des cultures positives à une MNT lors de notre étude : ChiLo et GosKe.

Tableau 9 : Tableau récapitulatif du nombre de prélèvements par patients

Nombre de prélèvements	1	2	3	4	5
Nombre de patients	26	6	4	4	2

## 2. Contamination des milieux de cultures

Sur les 76 prélèvementsensemencés, 25 (32,4%) ont été contaminés par des bactéries ou des levures. Sachant qu'il y a deux types de décontaminations (D1 et D2) par prélèvements, 29 décontaminations ont été contaminées. 22 décontaminations ont été contaminées sur la D1 et 7 sur la D2. A noter que 4 décontaminations ont été contaminées sur les deux types de

décontamination. Comme nous le montre le tableau 10, le taux de contamination est plus élevé après une seule décontamination qu'après une seconde décontamination avec l'acide oxalique, 29% contre 9,2% respectivement.

Tableau 10 : Taux de contamination des géloses

<b>Contamination 1<sup>ère</sup> décontamination (D1)</b>	29% (22)
<b>Contamination 2<sup>ème</sup> décontamination (D2)</b>	9,2% (7)
<b>Contamination globale de contamination des ECBC</b>	32,9% (25)

Pour les 25 prélèvements contaminés, 23 soit 92% sont en rapport avec la flore retrouvée dans l'examen bactériologique. Les BGN sont les principales bactéries en cause dans la contamination des géloses, puis viennent les cocci à gram positifs.

Nous avons aussi regardé si les prélèvements contaminés provenaient toujours des mêmes patients. Ces 25 prélèvements contaminés proviennent de 16 patients. 10 patients avaient uniquement un prélèvement pendant cette période et 6 patients ont eu plusieurs prélèvements contaminés sur cette période d'étude.

Sur ces 6 derniers patients :

- Une patiente (BazVa) a eu 3/4 prélèvements contaminés : 2 uniquement sur la D1 et 1 sur les deux types de décontaminations.

- Un patient (CheRo) a eu 2/2 prélèvements contaminés : 1 sur la D1 et l'autre sur les deux types de décontaminations.

- Une patiente (ColMa) a eu 3/3 prélèvements contaminés uniquement sur la D1.

- Une patiente (DubCh) a eu 2/4 prélèvements contaminés uniquement sur la D1.

- Une patiente (GosKe) a eu 2/4 prélèvements contaminés uniquement sur la D1.

- Un patient (HenFr) a eu 2/2 prélèvements contaminés par des BGN sur tous les milieux de cultures que ce soit pour la simple ou la double décontamination.

Donc trois patients ont eu 100% de leurs prélèvements contaminés lors de la première décontamination (sur 2 ou 3 prélèvements analysés lors de notre étude). Une patiente a eu 75% de ses prélèvements contaminés lors de la première décontamination. Et deux patients ont eu 50% de leurs prélèvements contaminés lors de la première décontamination.

Il sera donc toujours nécessaire de faire directement une double décontamination pour éviter les contaminations bactériennes pour les trois patients ayant eu 100% de leurs prélèvements contaminés lors de la première décontamination.

Enfin nous nous avons analysés le délai moyen de positivité des cultures contaminées. Ce calcul comprend les 22 prélèvements contaminés sur la D1. Il révèle une moyenne de temps de contamination des géloses lors d'une D1 de 10,6 jours (intervalle de 2 à 28 jours).

### 3. Patients positifs

Lors de cette étude neuf prélèvements de quatre patients se sont relevés positifs à une MNT (figure 30). Trois d'entre eux ont un antécédent de colonisation ancienne ou toujours contemporaine à *M. abscessus*.

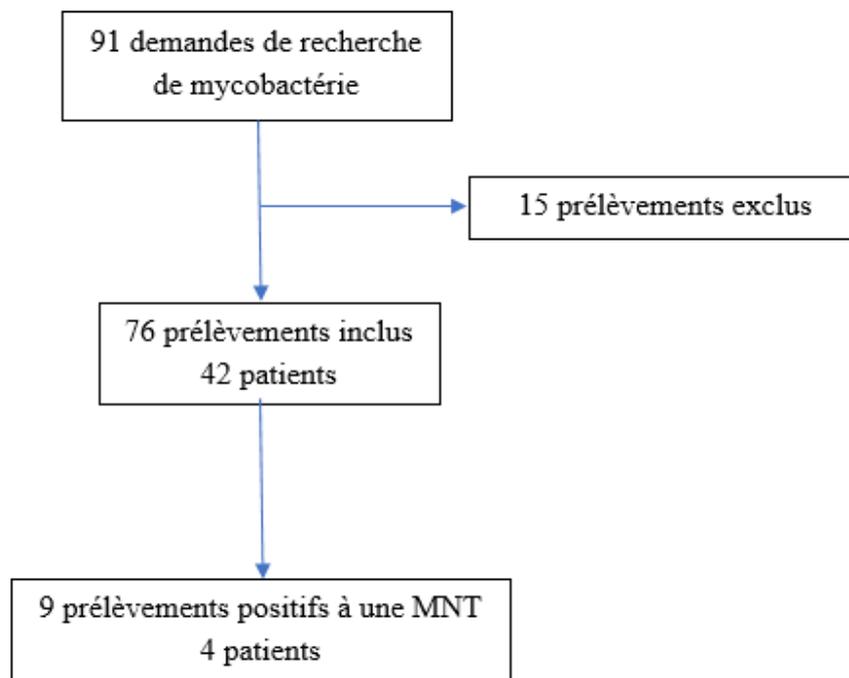


Figure 30 : Organigramme représentant les prélèvements de notre étude.

#### 1. Cas n°1

Le cas numéro 1 (BeaEd) est un patient de 24 ans étant homozygote deltaF508/F508. Le diagnostic de mucoviscidose a été fait dans le mois suivant la naissance devant la présence d'un iléus méconial. Le dosage de la TIR à 3 jours de vie était très élevé avec une valeur de 1770 µg/L et une valeur à 22 jours de 2045 µg/L pour une valeur de référence inférieure à 65 µg/L. Par la suite, le test à la sueur c'est aussi révélé positif avec une valeur de 110 mmol/L (valeur de référence < 60 mmol/L). Ce patient a une insuffisance pancréatique exocrine mais pas de diabète associé. Il a été opéré d'un syndrome d'occlusion distale de l'intestinal (SODI)

à l'âge de 17 ans. Depuis 2016, il est traité par Orkambi® (Ivacaftor/Lumacaftor). Son dernier VEMS était à 41%.

Sur le plan microbiologique, ce patient est suivi très régulièrement avec des ECBC tous les 1 à 4 mois. Il est colonisé chroniquement à *Pseudomonas aeruginosa* depuis l'âge de 9 ans avec une primo-infection à 4 ans, à *Aspergillus fumigatus* et de façon intermittente à *Stenotrophomonas maltophilia*. A noter qu'avant 2013 il était aussi colonisé à *Staphylococcus aureus*.

Il est connu à *M. abscessus sequevar erm(41) abscessus T28* acquis à l'âge de 16 ans. Il a été traité huit mois après la première expectoration positive, devant des épisodes fébriles, une aggravation du scanner thoracique et du VEMS (passe de 90% à 50%). Le traitement d'induction était composé de tigécycline, tobramycine et imipémène pendant trois semaines. Par la suite, il a eu deux ans de traitement d'entretien par ciprofloxacine, doxycycline et clarithromycine. Le patient étant stable cliniquement, n'étant pas très observant sur son traitement et ayant une souche multirésistante, il a été décidé de ne mettre un traitement antibiotique que si l'état du patient se dégradait. La souche possède une résistance aux macrolides avec la mutation A2058G du gène *rml* et une résistance inductible à la clarithromycine (T28). Elle possède aussi une résistance aux aminosides avec la mutation A1408G du gène *rrs*. La souche reste sensible à la tigécycline et de sensibilité diminuée à la céfoxitine et l'imipémène.

Lors de notre étude, le patient a présenté un premier ECBC avec un examen direct positif avec 3+ (4 à 36 BAAR sur 1 champ) pour la recherche de BAAR (photo 31). Tous les milieux (solides, liquides, D1 et D2) ont été positifs en 4 jours (photos 32 et 33). Il n'y avait pas de différence de temps de pousse entre les deux types de décontamination. L'identification par MALDI-TOF révélera l'espèce *M. abscessus*.



Photo 31 : Examen direct auramine positif 3+ pour le patient numéro 1.

Vers la fin de notre étude, ce patient a eu un second prélèvement avec un examen direct négatif mais des cultures positives rapidement (5 jours) à *M. abscessus* identifié par MALDI-TOF. Cette souche a poussé sur les milieux de culture incubés à 37°C sans différence de temps de pousse entre les deux types de décontamination.



*Photo 33 : Milieu coletsos incubé à 37°C positif à M. abscessus pour la patient numéro 1.*



*Photo 32 : Milieu coletsos incubé à 30°C positif à M. abscessus pour le patient numéro 1.*

Seulement pour ce patient, la gélose Oxoid de ses deux prélèvements respiratoires a poussé à *M. abscessus* en moins de 5 jours (photo 43).

Au total pour ce patient, les deux types de décontamination n'ont pas d'impact sur la viabilité de la souche.

## 2. Cas n°2

Le cas numéro 2 (ChiLo) est une patiente de 14 ans, qui est hétérozygote pour la mutation deltaF508 avec G542X pour seconde mutation. Le diagnostic de mucoviscidose a été fait grâce au dépistage néonatal et des antécédents familiaux (sans plus de précision). Son dosage de TIR à trois jours était de 134 µg/L et son test à la sueur à 112 mmol/L. Cette patiente possède une insuffisance pancréatique exocrine et aussi un retard staturo-pondéral. Elle ne suit pas de traitement curatif par Orkambi® car elle possède une mutation hétérozygote deltaF508.

Son VEMS s'est dégradé à partir du mois de janvier puisqu'il est passé de 62% à 48% au mois de juin 2020.

Dans ces antécédents microbiologiques, elle a été infectée par une souche de *M. abscessus sequevar erm(41) abscessus* T28 de mars 2016 à novembre 2018, présente de façon intermittente dans ses ECBC. Sur cette période de temps, la patiente a réalisé 28 ECBC, sur lesquels on a retrouvé 12 fois la MNT (42,9 %). Seulement 5 des 12 prélèvements positifs en cultures avaient un examen direct positif avec 1+. Le test HAIN NTM-DR a permis d'identifier une résistance naturelle aux macrolides par le polymorphisme T28 sur le gène *erm(41)* combiné à une résistance acquise aux macrolides avec la mutation du gène *rml* et une sensibilité aux aminosides (*rrs* sauvage). Après novembre 2018 aucun de ses ECBC n'est revenu positif à cette espèce malgré un manque de traitement anti-mycobactérien instauré.

Elle est colonisée également de façon chronique à *Pseudomonas aeruginosa* et *Staphylococcus aureus* sensible à la méticilline (SASM) avec des primo-infections lors de sa première année de vie. Il existe une colonisation pulmonaire à SARM de façon intermittente.

Cette patiente a eu cinq ECBC avec recherche de mycobactéries lors de la période de notre étude soit environ une recherche par mois, comme nous le montre la frise chronologique sur la figure 34 ci-dessous.

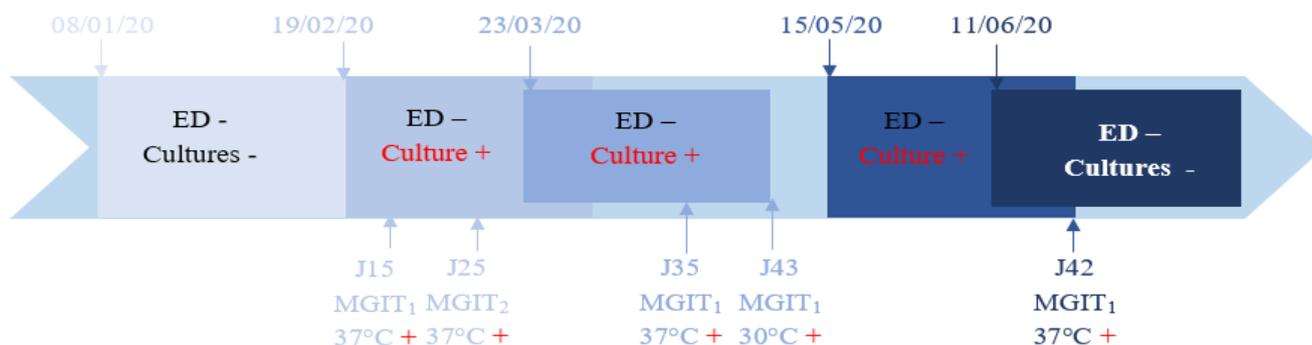


Figure 34 : Frise chronologique des prélèvements de la patiente numéro 2. Chaque rectangle correspond aux 6 semaines d'incubation des MGIT. Au-dessus figure les dates de prélèvements et en dessous les délais de croissance des MGIT positifs. MGIT<sub>1</sub> = MGIT ayant eu une seule décontamination et MGIT<sub>2</sub> = MGIT ayant eu deux décontaminations.

Les cultures du 08/01/2020, étaient négatives et il n'y avait pas de contamination bactérienne des géloses sur la D1 ni sur la D2.

Le 19/02/2020, un second ECBC est réalisé. L'examen direct à l'auramine est négatif pour la recherche de BAAR. A quinze jours de culture, le MGIT à 37°C 1<sup>ère</sup> décontamination est rendu positif par l'automate (photo 35). Puis à J25, le MGIT 37°C 2<sup>ème</sup> décontamination se positive aussi à la même mycobactérie. L'identification par MALDI-TOF identifiera une espèce SGM, *M. lentiflavum*. La souche a été envoyée au CNR pour la réalisation d'un antibiogramme

(CMI) en milieu liquide. La souche est résistante à la rifampicine, intermédiaire à l'amikacine et sensible à la rifabutine, clarithromycine et moxifloxacine. Ces résultats sont ceux observés habituellement pour une souche sauvage de cette espèce.



*Photo 35 : Coloration à l'auramine de la culture positive pour la patiente numéro 2.*

Le troisième prélèvement datant du 23/03/2020, s'est révélé positif à *M. lentiflavium* en culture avec un examen direct du prélèvement négatif. Il est important de noter que pour ce prélèvement, seule la D1 a permis de mettre en évidence cette MNT. Elle n'a pas poussé sur les milieux ensemencés avec une D2. La souche a également poussé plus rapidement sur les cultures à 37°C (J35) qu'à 30°C (J43 : dernier jour d'incubation des milieux) (photos 36 et 37).



*Figure 37 : Milieu coletsos incubé à 37°C positif à M.lentiflavum pour la patiente numéro 2.*



*Figure 36 : Milieu coletsos incubé à 30°C positif à M.lentiflavum pour la patiente numéro 2.*

Pour le quatrième ECBC du 15/05/2020 l'examen direct était négatif. Le milieu de culture décontaminé une seule fois, à 30°C s'est révélé contaminé par des bacilles à gram négatif (BGN). Les cultures faites en parallèle en bactériologie étaient positives à *Pseudomonas aeruginosa* (colonisation chronique chez cette patiente). Finalement, à J42 (dernier jour d'incubation des milieux), le MGIT ayant eu une D1 et incubé à 37°C c'est révélé positif à *M. lentiflavum*. Rien n'a poussé sur le milieu ayant eu une D2

Et enfin son cinquième ECBC (datant du 11/06/2020) a été rendu négatif après six semaines d'incubation.

Pour l'instant la patiente n'a pas encore reçu de traitement pour cette colonisation mais cliniquement son état se dégrade depuis le début de l'année. Un contrôle rapproché de sa fonction respiratoire est instauré à domicile et si la patiente présente une fièvre prolongée, un traitement antibiotique anti mycobactérien sera instauré.

En conclusion, cette patiente a eu cinq prélèvements dont trois positifs à *M. lentiflavium*. Dans ce cas, on peut noter que la croissance est plus rapide sur les cultures n'ayant subi qu'une D1 et que la D2 peut inhiber la croissance des MNT. En effet un des prélèvement pousse avec une différence de dix jours entre la D1 et la D2 et deux prélèvements ne poussent qu'uniquement sur la D1 pour cette patiente.

### 3. Cas n°3

Patiente numéro 3 (TroEl) est âgée de 14 ans et est homozygote deltaF508/F508 pour la mucoviscidose. La découverte de la mucoviscidose a été faite précocement grâce au dépistage néonatal systématique. Cette patiente possède aussi une insuffisance pancréatique exocrine. Elle suit le traitement par Orkambi®. Son dernier VEMS était à 84%

D'un point de vue bactériologique, elle est colonisée à SASM, *Aspergillus fumigatus* (sans ABPA), *Pseudomonas aeruginosa* et de façon intermittente mais très fréquente (2 à 5 fois par an) à *Stenotrophomonas maltophilia*. Elle est connue à *M. abscessus subsp massiliense* depuis avril 2018. L'antibiogramme a été fait en 2018 et 2019 et montre que cette souche ne possède pas de mutation du gène *rrs* ni du gène *rml*, elle est donc sensible à l'amikacine, la clarithromycine et le linézolide, possède une sensibilité diminuée au céfoxitine et l'imipénème et est résistant à la ciprofloxacine, le moxifloxacine, la doxycycline, la tobramycine et le cotrimoxazole.

Un traitement est instauré (en avril 2019) (1 an après la première culture positive (10 ECBC positifs)) est devant une fièvre persistante depuis 6 semaines (figure 38). Ce traitement d'induction était constitué d'amikacine par voie orale pendant 7 jours puis en aérosol associé à de la tigécycline, de l'imipénème et de l'azithromycine pendant 3 semaines. Cela n'a pas permis l'éradication de cette souche. Un traitement d'entretien constitué d'amikacine en aérosol, d'azithromycine et de clofazimine a été instauré un mois après. De nouveau, devant une fièvre persistante de 10 jours un second traitement d'induction a été initié en décembre 2019. Depuis la patiente suit un traitement d'entretien. Le suivi microbiologique est réalisé environ tous les deux mois.

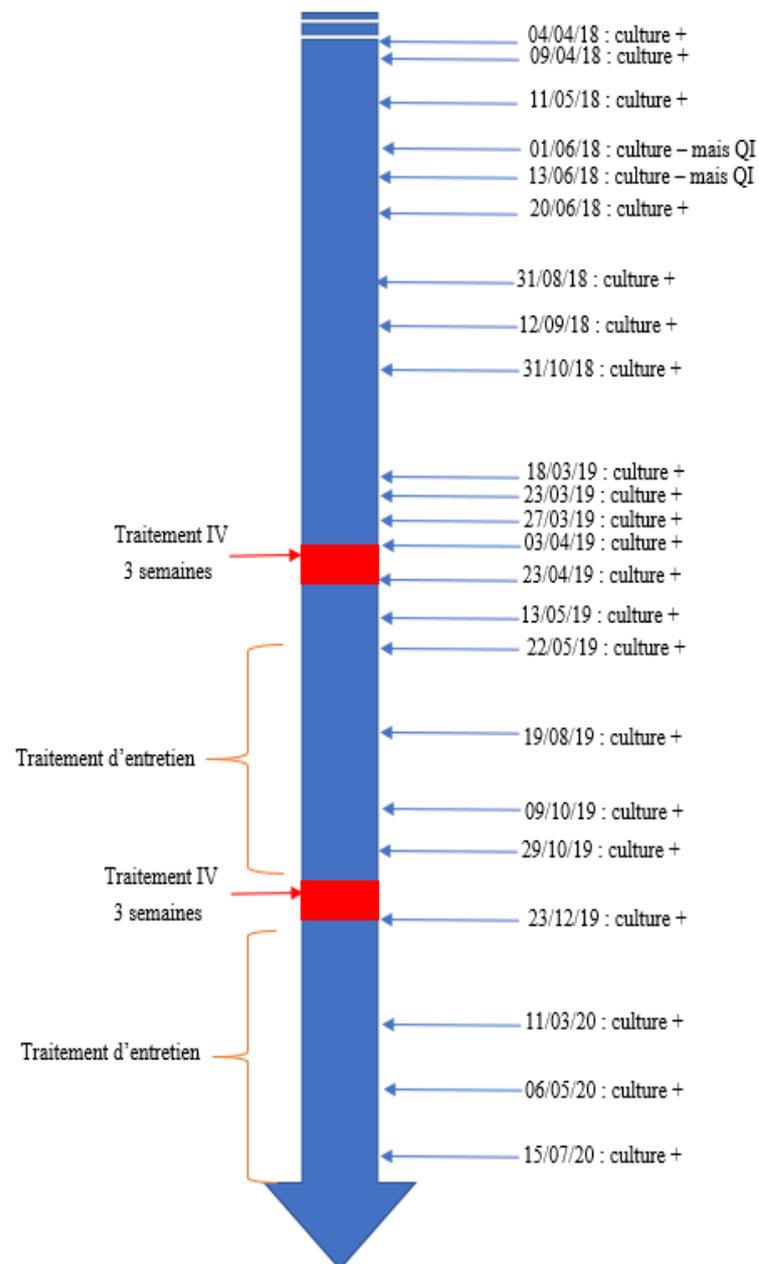


Figure 38 : Prise en charge thérapeutique de l'infection à *M. abscessus subsp massiliense* chez la patiente numéro 3. Traitement IV : amikacine, imipénème, tigécycline et azithromycine. Traitement d'entretien : amikacine en aérosol, clofazimine et azithromycine.

Lors de cette étude, trois ECBC seront analysés (figure 39). Le premier ECBC du 11/03/2020, révèle un examen direct négatif pour la recherche de BAAR. Le MGIT 1<sup>ère</sup> décontamination à 37°C sort positif à J10 d’incubation et le MGIT 2<sup>ème</sup> décontamination à 37°C sort positif à J24. La technique d’identification par MALDI-TOF au CHU de Caen révèle la présence de *M. abscessus*. L’identification par PCR de la sous espèce indique la sous espèce *massiliense*.

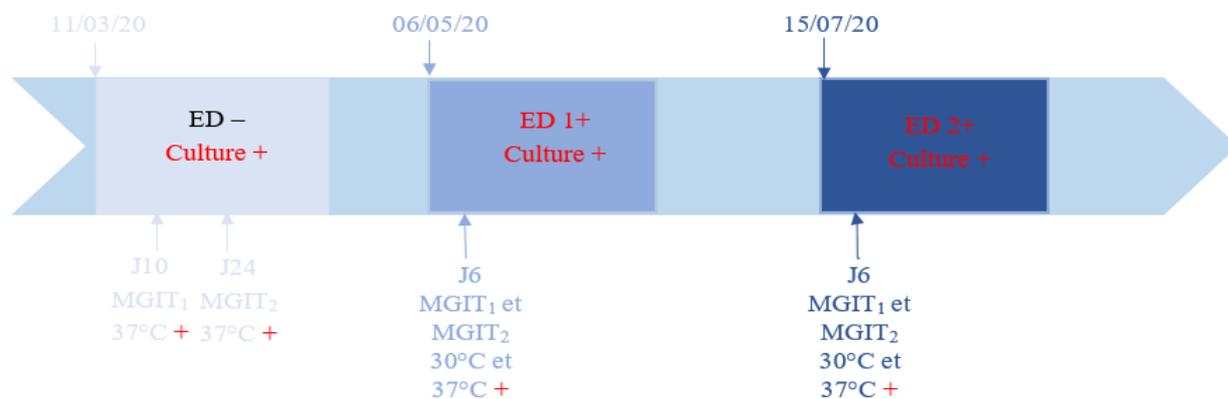


Figure 39 : Frise chronologique des prélèvements de la patiente numéro 3. Chaque rectangle correspond aux 6 semaines d'incubation des MGIT. Au-dessus figure les dates de prélèvements et en dessous les délais de croissance des MGIT positifs. MGIT<sub>1</sub> = MGIT ayant eu une seule décontamination et MGIT<sub>2</sub> = MGIT ayant eu deux décontaminations.

Le second ECBC du 06/05/2020, lui se révèle positif à l’examen direct avec 1+ BAAR (1 à 9 BAAR sur la lame). Les milieux de culture, que ce soit pour la D1 et la D2, ont révélé la présence de cette même MNT sans différence de temps de pousse entre les deux types de décontamination (photos 40 et 41).



Figure 40 : Milieu coletsos incubé à 37°C positif à *M. abscessus subsp massiliense* pour la patiente numéro 3.



Figure 41 : Milieu coletsos incubé à 30°C positif à *M. abscessus subsp massiliense* pour la patiente numéro 3.

Le troisième ECBC du 15/07/2020 dont l'examen direct était positif avec 2+ BAAR (4 à 36 BAAR sur 10 champs) et rendu positif à *M. abscessus* (photo 42). Ce prélèvement n'a pas montré non plus de différence de temps de pousse pour les deux types de décontaminations.



Photo 42 : Examen direct auramine positif 2+ pour la patiente numéro 3.

On voit ici que pour le premier ECBC il y a une différence de 14 jours entre le temps de pousse sur la D1 et la D2 (figure 39). Là encore cela montre que la D2 par acide oxalique affecte bien la viabilité de la souche en inhibant sa pousse. *M. abscessus* est une mycobactérie de croissance rapide et peut pousser en moins de 7 jours. Avec une décontamination par NaOH-NALC puis acide oxalique, la pousse est plus longue et apparaît plus tard au bout de 24 jours. On voit donc un retard de croissance lors de la D2.

#### 4. Cas n°4

Patiente de 17 ans (GosKe) qui a un génotype homozygote pour la mutation deltaF508. Cette patiente présentait un iléus méconial à la naissance avec une insuffisance pancréatique exocrine, le DNN a permis de confirmer le diagnostic de mucoviscidose. Elle suit le traitement curatif par Orkambi®.

Cette patiente est colonisée chroniquement à *SASM*, à *Aspergillus fumigatus* et de façon intermittente à *Pseudomonas aeruginosa*. Elle n'était pas connue à MNT avant cette étude.

Durant la période étudiée, la patiente a eu quatre ECBC réalisés le :

- 30/12/2020
- 28/01/2020
- 07/04/2020
- 19/05/2020

Le premier du 30/12/2020 était contaminé par de la flore bactérienne sur la D1.

Sur le second du 28/01/2020 aucune croissance n'a été observée.

Le troisième du 07/04/2020 c'est révélé contaminé par des BGN sur les cultures ayant eu une D1 et positif à MNT sur le MGIT à 30°C ayant eu une D2. Sur ce troisième prélèvement, l'ED à l'auramine initial était négatif. Les cultures contaminées (sur D1) ont poussé en moins d'une semaine (3 à 7 jours) alors que la culture positive (sur D2) à MNT a poussé en 16 jours. L'identification par spectrométrie de masse a permis d'identifier une espèce contaminante : *M. gordonae*.

Enfin son quatrième prélèvement prélevé le 19/05/2020 s'est révélé négatif à l'examen direct et à la culture.

## 5. Temps de pousse des cultures positives

Lors de notre étude le patient numéro 1 (BeaEd) a eu deux ECBC de réalisés. Ces deux prélèvements étaient positifs à MABSC. Le délai de croissance moyenne des MGIT pour ce patient est de 4,5 jours (de 4 à 5 jours). Il n'y avait pas de différence de temps de croissance entre les MGIT ayant eu une D1 et ceux ayant eu D2.

La patiente numéro 2 (ChiLo) a eu cinq ECBC lors de cette période dont trois positifs à *M. lentiflavum*. Le temps moyen de croissance des MGIT ayant eu une seule décontamination (MGIT<sub>1</sub>) est de 34 jours (15 jours à 43 jours). Pour les MGIT ayant eu deux décontamination (MGIT<sub>2</sub>), le calcul n'a pu être réalisé car cette patiente n'a eu d'une seule MGIT<sub>2</sub> positif lors de notre étude, sur le premier prélèvement positif. Ce MGIT<sub>2</sub> avait un temps de croissance de dix jours plus long que le MGIT<sub>1</sub> du même prélèvement.

Pour le troisième patient (TroEl), trois ECBC ont été analysés lors de notre étude. Ces trois prélèvements étaient tous positifs à MABSC. Le temps de croissance moyen des MGIT<sub>1</sub> est de 7 jours (de 6 à 10 jours) contre 12 jours (de 6 à 24 jours) pour les MGIT<sub>2</sub>. Pour ce patient seulement le premier prélèvement montrait une différence de temps de croissance de quatorze jours entre les MGIT<sub>1</sub> et les MGIT<sub>2</sub>. Pour les deux autres prélèvements, le temps de croissance des MGIT<sub>1</sub> et des MGIT<sub>2</sub> étaient les mêmes.

Le prélèvement de la patiente numéro 4 (GosKe) n'est pas pris en compte dans le calcul du temps de croissance des MGIT car *M. gordonae* est considéré comme un contaminant probable.

Pour les RGM (MABSC : patients numéro 1 et 3), le temps moyen de croissance des MGIT<sub>1</sub> est de 5,5 jours (de 4 à 6 jours) et de 6,4 jours (de 4 à 24 jours) pour les MGIT<sub>2</sub>.

Pour le SGM (*M. lentiflavum* : patiente numéro 2), le temps de croissance moyenne pour les MGIT<sub>1</sub> est d'un peu moins de 34 jours (de 15 à 43 jours).

Le calcul le plus intéressant à faire est celui qui compare le temps de croissance des MGIT<sub>1</sub> à celui des MGIT<sub>2</sub> pour les prélèvements ayant eu les deux types de décontaminations positives à MNT avec ou sans différence de temps de croissance. Ainsi le temps moyen de croissance des MGIT<sub>1</sub> est de 6,7 jours (intervalle de 4 à 15 jours) contre 9,1 jours (intervalle de 4 à 25 jours) pour les MGIT<sub>2</sub>. Ce qui peut montrer une action de l'acide oxalique sur la croissance des MNT.

Cependant ce calcul ne prend pas en compte les prélèvements de la patiente numéro 2 qui ont poussé uniquement sur MGIT<sub>1</sub>. Sur ces prélèvements pour les MGIT<sub>2</sub>, la viabilité de la souche a été fortement atteinte par le traitement par acide oxalique. Les souches n'ont donc pas poussé sur les MGIT<sub>2</sub> au bout de 42 jours d'incubation ni au bout de 90 jours d'incubation des milieux de cultures solide. Si on considère un temps de croissance supérieure à 90 jours pour ces prélèvements, le temps moyen de croissance pour les MGIT<sub>1</sub> serait de 14,4 jours (intervalle de 4 à 43 jours) et supérieur à 27,8 jours pour les MGIT<sub>2</sub> (intervalle de 4 à > 90 jours).

#### **4. Gélose *Burkholderia cepacia***

Lors de notre étude, sur les géloses « cepacia » étudiées, seulement deux sont revenues positives à une MNT, malgré l'allongement de l'incubation de la gélose à 28 jours au lieu de 5 jours (photo 43). Cela représente 2,6% de nos prélèvements et 22,2% des prélèvements positifs à une MNT.

Ces deux prélèvements appartenaient au patient numéro 1 (BeaEd) connu à *M. abscessus*. Pour les autres patients positifs à une MNT, aucune n'a pu être identifiée grâce à cette gélose. Ce résultat semble tout de même assez faible.



Photo 43 : Gélose "cepacia" positive à *M. abscessus* pour le patient numéro 1.

Le type de gélose utilisée au laboratoire du CHU de Caen pour la recherche conventionnelle de *Burkholderia cepacia* chez les patients atteints de mucoviscidose est l'Oxoid de référence P0093A. Ce type de gélose ne semble pas optimal pour l'identification de MNT.

Une étude de Preece *et al.* a comparé différents types de géloses utilisées pour l'isolement de *Burkholderia cepacia* (Biomérieux, Oxoid, BD) et montre qu'il existe des différences minimales pour les sensibilités pour l'isolement de MNT, allant de 100% à 93,2%. C'est ce type de gélose Oxoid qui possède la moins bonne sensibilité de 93,2%.

Il faut noter aussi que quatre géloses Oxoid ont été perdues (figure 44). Cela est dû à un problème organisationnel. En effet, ces géloses sontensemencées en même temps que les géloses pour la recherche de bactéries et suivent ensuite l'organisation de la bactériologie. En bactériologie, les géloses sont jetées à 5 jours d'incubation. Pour cette étude, la prolongation à 28 jours nécessitait de ne pas oublier de donner les géloses aux techniciens qui s'occupent des cultures de mycobactéries (qui ne se fait pas dans la même pièce).

Enfin, ces géloses ont aussi eu un taux de contamination par des bactéries assez importantes : 48,5%. Plus précisément, 20 géloses ont été contaminées lors de l'incubation de 5 jours (en bactériologie) et les 13 autres ont été contaminées lors de l'allongement d'incubation jusqu'à 28 jours (figure 44). Les contaminations survenant après les 5 jours d'incubation standard sont toutes dues à *Candida* ou *Aspergillus*. Pour 9/13 de ces patients, la contamination fongique de la gélose « cépacia » est en accord avec leur colonisation pulmonaire fongique retrouvée au laboratoire de mycologie (*Candida* ou *Aspergillus*). Cependant, les 4 patients restants ne possèdent pas de colonisation pulmonaire fongique. Cela peut souligner un problème

de conservations des géloses ou de perméabilité des boîtes. A noter que les géloses de ces patients ont étéensemencées le même jour et ont donc été conservées ensemble.

Ce taux de contamination important peut être expliqué aussi par le fait que ces géloses sontensemencées par des prélèvements purs non décontaminés.

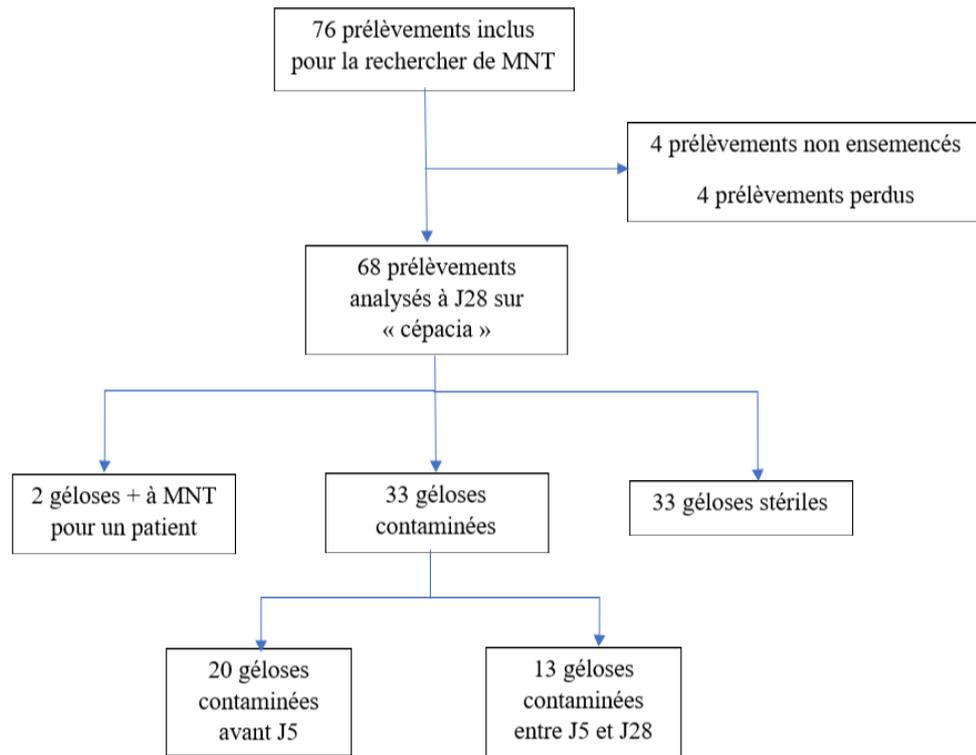


Figure 44 : Tableau récapitulatif des géloses "cépacia" contaminées, stériles et positives.

## IV. Discussions

Le diagnostic d'infection à mycobactérie non tuberculeuse est difficile chez les patients atteints de la mucoviscidose de par leur symptomatologie respiratoire, les signes cliniques peu spécifiques et la difficulté à isoler les souches en culture, souvent contaminées par la flore endogène des patients. Cependant, il est important d'instaurer un traitement approprié, le plus rapidement possible pour éradiquer une MNT chez ces patients fragiles. Nous savons que les patients atteints de la mucoviscidose ont souvent des colonisations bactériennes, le plus souvent à *Staphylococcus aureus* ou *Pseudomonas aeruginosa*, parfois très résistants aux antibiotiques. Ils sont donc fréquemment sous cures d'antibiotiques lors de leurs exacerbations bronchiques. Il est important pour le clinicien de faire la différence entre une colonisation ou une infection à MNT afin d'instaurer un traitement antibiotique si nécessaire.

Les recommandations pour l'ensemencement des expectorations provenant de patients ayant la mucoviscidose sont de procéder à une double décontamination avec du N-acétyl-L-cystéine-NaOH suivie de l'acide oxalique à 5% dans la majorité des protocoles ou directement par 1% de chlorhexidine (171). Cela permet d'éliminer les colonisations bactériennes et fongiques très présentes chez ces patients. La question de l'effet de cette décontamination sur la viabilité des MNT se pose.

L'objectif de cette étude a donc été d'étudier en parallèle l'effet de la simple décontamination et de la double décontamination sur la croissance des MNT mais aussi d'étudier l'intérêt de prolonger l'incubation à 28 jours des géloses « cepacia ».

Il faut savoir qu'au CHU de CAEN depuis 2011, il y a eu environ 160 patients suivis pour leur mucoviscidose (59 depuis janvier 2019). Parmi ces patients seulement 10 étaient colonisés/infectés à MNT (7 enfants et 3 adultes lors de leur première culture positive à MNT) depuis 2011.

Parmi ces 10 patients :

- 6 avaient une colonisation/infection à MABSC (60%) dont 2 lors de notre étude et 1 qui a présenté une colonisation/infection à *M. lentiflavum*.
- 1 patient infecté à MAC (10%) à l'âge de 20 ans et ayant plusieurs cures antibiotiques pour éliminer cette MNT mais sans succès (patient décédé à l'âge de 26 ans).
- 3 patients (30%) ont eu sur seulement un prélèvement à une MNT saprophyte de l'environnement : *M. gordonae* dont 1 lors de notre étude.

Parmi les 6 patients ayant eu un MABSC dans leurs expectorations :

- 1 patiente est décédée à l'âge de 9 ans avec 2 ans de colonisation à *M. abscessus subsp abscessus sequevar erm(41) T28* sans mutations *rhl* et ni *rrs*.
- 1 était colonisé à MABSC depuis 8 ans avec une co-infection à *M. intracellulare* pendant 1 an mais ce patient a été perdu de vue.
- 1 patiente a été greffée pulmonaire et avait présenté un seul prélèvement positif à *M. abscessus subsp bolletii*.
- 3 patients toujours suivis au CHU. Ces trois patients sont trois des quatre cas retrouvés positifs à une MNT dans notre étude.
  - o *M. abscessus subsp abscessus sequevar erm(41) T28* avec une mutation *rhl* et une mutation *rrs* (patient numéro 1 : BeaEd).
  - o *M. abscessus subsp abscessus sequevar erm(41) T28* avec une mutation *rhl* et sans mutation *rrs* (patient numéro 2 : ChiLo). Patiente connue à *M. lentiflavum* lors de notre étude.
  - o *M. abscessus subsp massiliense* sans mutation *rhl* ni *rrs* (patient numéro 3 : TroLo).

Lors de cette étude de 7 mois, 76 prélèvements ont été inclus ce qui représente 42 patients ayant la mucoviscidose. L'étude des ECBC chez ces patients nous a confirmé la présence de MNT chez 4 patients soit 9,5% de notre population (9 prélèvements). Ce taux semble comparable avec la littérature Française (*Roux et al.* 2009 : 6,6% et *Cavalli et al.* 2014 : 12%) et mondiale (prévalence entre 4 et 20%).

Au moment de l'étude, deux de ces quatre patients étaient colonisés avec une souche de MABSC depuis 8 et 2 ans (patient numéro 1 : BeaEd et patiente numéro 3 : TroEl respectivement). D'après les critères ATS/IDSA, ces deux patients sont infectés à MABSC. Ils ont déjà eu un traitement d'induction anti-mycobactérie mais sans réussite d'éradication de la souche.

Une patiente (patiente numéro 4 : GosKe) a eu seulement un prélèvement positif à *M. goodnae*. Nous ne nous sommes pas plus attardés sur cette dernière patiente car ce germe est considéré comme un agent contaminant de l'environnement.

Une patiente (patiente numéro 2 : ChiLo) a eu plusieurs prélèvements positifs (3 sur 5) à *M. lentiflavium* lors de notre étude et non connue colonisée auparavant à cette souche. En effet cette patiente était connue entre 2016 et 2018 à MABSC mais depuis deux ans aucun de ses ECBC ne retrouvaient cette souche. Les prélèvements à *M. lentiflavium* sont pour l'instant considérés comme une colonisation et non une infection. Aucun traitement n'a été instauré mais un suivi clinique rapproché a été mis en place.

*Mycobacterium lentiflavum* est une mycobactérie non tuberculeuse à croissance lente. L'impact clinique de cette MNT dans les infections pulmonaires chez les patients ayant la mucoviscidose n'est pas bien défini. C'est une espèce qui provoque principalement des lymphadénites cervicales chez les jeunes enfants et patients immunodéprimés (308). Initialement cette espèce était considérée comme un contaminant provenant de l'environnement (eau) mais des études ont montré une possible dissémination chez les patients greffés. Elle est rarement isolée dans les ECBC des patients ayant la mucoviscidose. Cependant, en 2015, une étude réalisée à Marseille révèle une émergence épidémique de *M. lentiflavum* chez les patients ayant la mucoviscidose. Cette mycobactérie se retrouve être la troisième espèce isolée de cette étude (309).

Sur les neuf prélèvements positifs à une MNT dans notre étude, quatre ont poussé plus rapidement sur les milieux ayant eu une D1, de 10 à 14 jours. Deux de ces quatre prélèvements (pour la même patiente (n°2)) n'ont poussé que sur les milieux ayant eu une D1. Nous avons donc vu que la D2 avait un effet sur la viabilité des MNT sur ces prélèvements positifs. Le délai moyen de positivité était de 6,7 jours (de 4 à 15 jours) pour la D1 et de 9,1 jours (de 4 à 25 jours) pour la D2. Cependant si on prend en compte les prélèvements de la patiente numéro 2 n'ayant poussé que sur la D1, ce temps moyen de croissance lors de la D1 est alors de 14,4 jours (de 4 à 43 jours) *versus* 27,8 jours (de 4 à > 90 jours) pour la D2.

Par contre, 29% de nos prélèvements étaient contaminés par de la flore lors de la D1 contre 9,2% lors de la D2. La seconde décontamination est donc nécessaire pour éliminer la flore commensale présente dans certains prélèvements d'expectoration des patients atteints de la mucoviscidose. Mais elle touche la viabilité des mycobactéries et empêche correctement sa pousse sur les milieux de culture.

Nous avons un cas particulier pour un patient : HenFr, qui a toujours (lors de notre étude et aussi auparavant) ses prélèvements contaminés par des bactéries (BGN) sur les deux types de décontamination (D1 et D2). Pour ce patient, les examens directs sont toujours négatifs mais au vu de la faible sensibilité de ce test, il pourrait être intéressant d'utiliser une autre méthode

de décontamination : chlorhexidine ou acide sulfurique par exemple. Une autre solution serait de faire une recherche moléculaire sur ses prélèvements.

Il est important de s'attarder sur le rapport bénéfice risque du type de protocole de décontamination mis en place. Trois solutions s'offrent donc à nous :

- Continuer à faire directement la double décontamination (D2) sur tous nos ECBC (protocole actuel). Le problème principal de cette méthode est le risque de sous diagnostic d'infection à MNT due à l'effet néfaste de l'acide oxalique sur la viabilité des MNT comme pour la patiente numéro 2 de notre étude. Nous avons estimé que ceci n'est pas acceptable.
- Soit nous utilisons le protocole effectué dans cette étude c'est-à-dire les deux types de décontaminations (D1 + D2) en parallèle. Cette méthode est rassurante et optimale pour ne pas manquer de diagnostiquer une infection à MNT. Mais cela entraîne une charge de travail conséquente pour les techniciens et une augmentation du coût de l'analyse. Nous avons en moyenne 180 ECBC de patients ayant la mucoviscidose par an au CHU. Si nous ajoutons deux MGIT et deux coletsos par prélèvement, cela entraîne un surcoût financier de 2549€ par an (tableau 11 ci-dessous).

*Tableau 11 : Prix unitaire des milieux de culture MGIT et coletsos et pour une décontamination. 180 étant le nombre moyen de prélèvements par an au CHU de Caen pour la recherche de MNT. Taux de gélose contaminées lors d'une simple décontamination : 29%*

	Prix unitaire	Coût par décontamination	Coût pour une D1 puis D2
MGIT	5,60€	2x5,60€	2x5,60x29%
Coletsos	1,48€	2x1,48€	2x1,48x29%
<b>Total (180 patients)</b>		2548,8€	739,2€

- Soit dans un premier temps, une D1 est effectuée sur tous nos prélèvements. Si les cultures se contaminent, on pratique une D2 sur le prélèvement initial. Le problème principal de ce protocole est l'allongement du délai de rendu des résultats. Ce délai sera fonction du temps moyen de contamination des géloses ayant eu une D1. Suivant nos calculs, ce temps moyen de contamination est estimé à 10,6 jours (intervalle de 2 jours à 32 jours). A la vue de nos résultats, la D2 par acide oxalique ne serait faite que sur 29% de nos prélèvements. Cette méthode engendre un surplus de coût d'environ 739,2€ (tableau 11) par an mais un temps de travail moins important que si les deux décontaminations étaient faites en parallèle. Elles nous permettrait de ne pas sous diagnostiquer les infections à MNT.

Au total, la dernière proposition semble la plus adaptée pour notre service car le surcoût financier et la charge de travail sont moindres par rapport à un système de deux méthodes de décontamination en parallèle. De plus, le délai d'environ 11 jours pour ensemercer les géloses avec une double décontamination, si la première est contaminée, semble raisonnable et plus acceptable que le fait de sous-diagnostiquer les infections à MNT si l'on fait uniquement une double décontamination par NaOH-NALC et acide oxalique. On ne peut donc pas se permettre de faire juste une double décontamination comme dans notre protocole initial malgré un taux important de contamination (29%) lors de la première décontamination.

Enfin nous pouvons optimiser également notre organisation au cas par cas. On peut cibler les patients ayant toujours la D1 contaminée et ne faire que pour eux une D2.

Plusieurs limites sont présentes dans cette étude :

Tout d'abord il y a la faible puissance de notre étude qui s'explique par une période d'inclusion courte de 7 mois et par le fait que peu de patients au CHU de Caen sont colonisés/infectés à MNT : seulement 10 depuis 2011.

D'autre part, nous avons été impactés par la pandémie à COVID-19. Peu de prélèvements chez les sujets ayant eu la mucoviscidose ont été faits pendant cette période (7 prélèvements de 23 mars au 6 mai : confinement). Comparativement, sur cette même période en 2019 au CHU de Caen, nous avons reçu une vingtaine de prélèvements en plus.

Enfin la troisième limite de cette étude est le type de gélose *Burkholderia cepacia* (Oxoid P0093A) utilisée au laboratoire du CHU de Caen. Ce type de gélose ne semble pas approprié pour l'identification de MNT car seulement deux sont revenues positives (même patient). En effet, en début d'étude, certaines géloses ont été « perdues » et le taux de contamination de celle-ci était assez élevé 46%.

Perspectives :

A la fin de notre étude est apparue en commercialisation des géloses NTM Elite® (bioMérieux référence 423144). Ces géloses sont décrites comme étant un équivalent des géloses RGM citées au début de cette thèse. Elles semblent très prometteuses pour la détection des MNT et d'une utilisation facilitée. En effet, il n'y a pas besoin de décontaminer préalablement les prélèvements, ce milieu est plus sélectif que les milieux conventionnels et inhibe la plupart des microorganismes contaminants. C'est pourquoi, après cette étude, ces géloses ont été testés sur une vingtaine d'expectorations de patients ayant la mucoviscidose.

## Conclusion

En France et dans le monde, la prévalence d'infection à MNT augmente depuis plusieurs années et ce pour plusieurs raisons comme l'augmentation de l'espérance de vie des patients ayant la mucoviscidose (de nos jours arrivé à plus de 50 ans) et de meilleures méthodes de diagnostic (PCR, MGIT). Une étude a montré qu'en 2025, une augmentation d'environ 50% de patients atteints de la mucoviscidose est attendue (20% pour les enfants et 75% pour les adultes dans les pays d'Europe de l'Ouest) (310). L'augmentation de la longévité des patients atteints de la mucoviscidose sera aussi associée à l'augmentation de la sévérité de certaines comorbidités comme le diabète, le cancer et les infections à des pathogènes opportunistes comme les MNT.

Il est donc nécessaire d'avoir des méthodes de diagnostic rapides et efficaces pour instaurer un traitement si la clinique est en faveur d'une infection.

La détection de MNT chez les patients ayant la mucoviscidose est rendue plus difficile par la présence de bactéries colonisant le tractus respiratoire. Pour éviter leur croissance sur les milieux de culture utilisés pour la détection des MNT, il peut être nécessaire de faire une décontamination supplémentaire avec de l'acide oxalique. Cependant cet acide en plus d'affecter la viabilité des bactéries, affecte celle des MNT.

Durant notre étude, 4/9 de nos prélèvements positifs à MNT ont montré une croissance plus rapide à partir des prélèvements décontaminés une fois. La seconde décontamination par acide oxalique a un impact défavorable sur la viabilité des MNT. Dans certains cas, nous avons montré que le laboratoire peut passer à côté d'une colonisation/infection à MNT si seule la double décontamination, trop agressive, est pratiquée.

En revanche le fait de pratiquer une simple décontamination par du N-acétyl-L-cystéine-NaOH augmente significativement le nombre de milieux de cultures contaminés par la flore bactérienne. Dans notre étude, le taux de contamination seulement sur les milieux de culture ayant eu une D1 est de 23,7% contre 3,9% sur seulement les cultures ayant eu une D2. Cet inconvénient n'est pas opposable au fait que nous pouvions passer à côté d'une infection à MNT.

Nous avons aussi montré que 6 patients sur les 16 ayant eu des prélèvements contaminés par des bactéries, ont quasiment l'ensemble de leurs prélèvements contaminés. Dans notre organisation, il serait possible d'étiqueter les patients pour lesquels les cultures simples décontaminées sont toujours contaminées et donc pour lesquels il est nécessaire de faire

directement une double décontamination sur leurs prélèvements. Cela pourrait être possible en étudiant les antécédents des patients : colonisation bactérienne et antécédents de cultures contaminées lors de la recherche de MNT.

Cette thèse va permettre d'améliorer les bonnes pratiques de laboratoire, en instaurant pour la plupart des expectorations de patients ayant la mucoviscidose, une D1 puis une D2 s'il y a une contamination des milieux de culture en D1. Malgré un temps technicien et un coût supplémentaire, on ne plus se permettre de faire seulement une double décontamination.

La mise sur le marché récent des géloses RGM ou NTM ELITE (bioMérieux référence 423144) nous permettraient peut-être de régler ce problème car elles semblent très sélectives et ne nécessitent pas de décontamination préalable des expectorations de patients ayant la mucoviscidose. De plus, elles sont particulièrement adaptées pour la détection des MABSC, qui représente 60% des MNT positives dans les expectorations des patients ayant la mucoviscidose au CHU de Caen. L'arrivée de ces géloses sur le marché au moment de l'étude nous a permis d'initier un travail dont les résultats sont à venir.

# Bibliographies

1. Lopes-Pacheco M, Pedemonte N, Kicic A. Editorial: Emerging Therapeutic Approaches for Cystic Fibrosis. *Front Pharmacol.* 2019;10:1440.
2. Scotet V, Duguépérroux I, Saliou P, Rault G, Roussey M, Audrézet M-P, et al. Evidence for decline in the incidence of cystic fibrosis: a 35-year observational study in Brittany, France. *Orphanet J Rare Dis.* 1 mars 2012;7:14.
3. Welsh MJ, Smith AE. Cystic Fibrosis. *Sci Am.* déc 1995;273(6):52-9.
4. Riordan JR, Rommens JM, Kerem B-S, Alon N, Rozmahel R, Grzelczak Z, et al. Identification of the Cystic Fibrosis Gene: Cloning and Characterization of Complementary DNA. 245:8.
5. Boxerbaum B. Isolation of rapidly growing mycobacteria in patients with cystic fibrosis. *The Journal of Pediatrics.* avr 1980;96(4):689-91.
6. Smith MJ, Efthimiou J, Hodson ME, Batten JC. Mycobacterial isolations in young adults with cystic fibrosis. *Thorax.* 1 mai 1984;39(5):369-75.
7. Olivier KN, Weber DJ, Wallace RJ, Faiz AR, Lee J-H, Zhang Y, et al. Nontuberculous Mycobacteria: I: Multicenter Prevalence Study in Cystic Fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med.* 15 mars 2003;167(6):828-34.
8. Georges M des, Guittard C, Altiéri J-P, Templin C, Sarles J, Sarda P, et al. High heterogeneity of CFTR mutations and unexpected low incidence of cystic fibrosis in the Mediterranean France. *Journal of Cystic Fibrosis.* 1 déc 2004;3(4):265-72.
9. Des Georges M, Guittard C, Claustres M. Les bases moléculaires de la mucoviscidose en France : plus de 300 mutations et 506 géotypes différents sont en cause. *Med Sci (Paris).* 1998;14(12):1413.
10. Girodon-Boulandet E, Costa C. Génétique de la mucoviscidose. *Médecine thérapeutique / Pédiatrie.* 31 mai 2005;8(3):126-34.
11. rapport\_du\_registre\_-\_donnees\_2017.pdf [Internet]. [cité 17 déc 2019]. Disponible sur: [https://www.vaincrelamuco.org/sites/default/files/rapport\\_du\\_registre\\_-\\_donnees\\_2017.pdf](https://www.vaincrelamuco.org/sites/default/files/rapport_du_registre_-_donnees_2017.pdf)
12. Burgel P-R. Évolutions épidémiologiques de la mucoviscidose en France: perspectives à 10 ans. *Archives de Pédiatrie.* déc 2016;23(12):12S4-8.
13. Mucoviscidose [Internet]. Institut Pasteur. 2015 [cité 27 déc 2019]. Disponible sur: <https://www.pasteur.fr/fr/centre-medical/fiches-maladies/mucoviscidose>
14. Davidson DJ, Porteous DJ. The genetics of cystic fibrosis lung disease. :9.
15. Schwiebert EM, Benos DJ, Egan ME, Stutts MJ, Guggino WB. CFTR Is a Conductance Regulator as well as a Chloride Channel. *Physiological Reviews.* 1 janv 1999;79(1):S145-66.
16. Zhang Z, Ott CJ, Lewandowska MA, Leir S-H, Harris A. Molecular mechanisms controlling CFTR gene expression in the airway. *J Cell Mol Med.* juin 2012;16(6):1321-30.
17. Cystic Fibrosis Mutation Database [Internet]. [cité 6 janv 2020]. Disponible sur: <http://www.genet.sickkids.on.ca/cftr/Home.html>

18. Mehta G, Macek M, Mehta A. Cystic fibrosis across Europe: EuroCareCF analysis of demographic data from 35 countries. *Journal of Cystic Fibrosis*. déc 2010;9:S5-21.
19. Rohlfes EM, Zhou Z, Heim RA, Nagan N, Rosenblum LS, Flynn K, et al. Cystic Fibrosis Carrier Testing in an Ethnically Diverse US Population. *Clinical Chemistry*. 1 juin 2011;57(6):841-8.
20. Estivill X, Bancells C, Ramos C. Geographic distribution and regional origin of 272 cystic fibrosis mutations in European populations. :20.
21. Welsh MJ, Smith AE. Molecular mechanisms of CFTR chloride channel dysfunction in cystic fibrosis. *Cell*. juill 1993;73(7):1251-4.
22. Delaisi B. Actualités dans la mucoviscidose. *Revue de Pneumologie Clinique*. août 2013;69(4):225-8.
23. Hubert D, Bui S, Marguet C, Colomb-Jung V, Murriss-Espin M, Corvol H, et al. Nouvelles thérapeutiques de la mucoviscidose ciblant le gène ou la protéine CFTR. *Revue des Maladies Respiratoires*. oct 2016;33(8):658-65.
24. Rogers GB, Taylor SL, Hoffman LR, Burr LD. The impact of CFTR modulator therapies on CF airway microbiology. *J Cyst Fibros*. 12 août 2019;
25. Sosnay PR, Raraigh KS, Gibson RL. Molecular Genetics of Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator. *Pediatric Clinics of North America*. août 2016;63(4):585-98.
26. Bell SC, Mall MA, Gutierrez H, Macek M, Madge S, Davies JC, et al. The future of cystic fibrosis care: a global perspective. *The Lancet Respiratory Medicine*. janv 2020;8(1):65-124.
27. Pranke I, Golec A, Hinzpeter A, Edelman A, Sermet-Gaudelus I. Emerging Therapeutic Approaches for Cystic Fibrosis. From Gene Editing to Personalized Medicine. *Front Pharmacol* [Internet]. 27 févr 2019 [cité 23 mai 2020];10. Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6400831/>
28. rapport\_depistage\_neonatal\_systematique\_de\_la\_mucoviscidose\_en\_france.pdf [Internet]. [cité 22 déc 2019]. Disponible sur: [https://www.has-sante.fr/upload/docs/application/pdf/2009-04/rapport\\_depistage\\_neonatal\\_systematique\\_de\\_la\\_mucoviscidose\\_en\\_france.pdf](https://www.has-sante.fr/upload/docs/application/pdf/2009-04/rapport_depistage_neonatal_systematique_de_la_mucoviscidose_en_france.pdf)
29. De Boeck K, Wilschanski M, Castellani C, Taylor C, Cuppens H, Dodge J, et al. Cystic fibrosis: terminology and diagnostic algorithms. *Thorax*. juill 2006;61(7):627-35.
30. Johansen HK, Nir M, Koch C, Schwartz M, Høiby N. Severity of cystic fibrosis in patients homozygous and heterozygous for  $\Delta F508$  mutation. *The Lancet*. mars 1991;337(8742):631-4.
31. Kerem E, Corey M, Kerem BS, Rommens J, Markiewicz D, Levison H, et al. The relation between genotype and phenotype in cystic fibrosis--analysis of the most common mutation (delta F508). *N Engl J Med*. 29 nov 1990;323(22):1517-22.
32. Ferrari M, Cremonesi L. Genotype-phenotype correlation in cystic fibrosis patients. *Ann Biol Clin (Paris)*. 1996;54(6):235-41.
33. Consortium TCFG-P. Correlation between Genotype and Phenotype in Patients with Cystic Fibrosis [Internet]. <http://dx.doi.org/10.1056/NEJM199310283291804>. 2010 [cité 26 déc 2019]. Disponible sur: [https://www.nejm.org/doi/10.1056/NEJM199310283291804?url\\_ver=Z39.88-2003&rft\\_id=ori%3Arid%3Aacrossref.org&rft\\_dat=cr\\_pub%3Dwww.ncbi.nlm.nih.gov](https://www.nejm.org/doi/10.1056/NEJM199310283291804?url_ver=Z39.88-2003&rft_id=ori%3Arid%3Aacrossref.org&rft_dat=cr_pub%3Dwww.ncbi.nlm.nih.gov)

34. McKone EF, Goss CH, Aitken ML. CFTR Genotype as a Predictor of Prognosis in Cystic Fibrosis. *Chest*. nov 2006;130(5):1441-7.
35. McKone EF, Emerson SS, Edwards KL, Aitken ML. Effect of genotype on phenotype and mortality in cystic fibrosis: a retrospective cohort study. *The Lancet*. mai 2003;361(9370):1671-6.
36. Desmarquest P, Feldmann D, Tamalat A, Boule M, Fauroux B, Tournier G, et al. Genotype analysis and phenotypic manifestations of children with intermediate sweat chloride test results. *Chest*. déc 2000;118(6):1591-7.
37. Santis G, Osborne L, Knight RA, Hodson ME. Independent genetic determinants of pancreatic and pulmonary status in cystic fibrosis. *The Lancet*. nov 1990;336(8723):1081-4.
38. Crossley JR, Elliott RB, Smith PA. Dried-blood spot screening for cystic fibrosis in the newborn. *Lancet*. 3 mars 1979;1(8114):472-4.
39. Munck A, Cheillan D, Girodon E, Nguyen Khoa T, Wizla N, Audrezet M-P, et al. Dépistage néonatal de la mucoviscidose en France : aspects pratiques et perspectives. *Perfectionnement en Pédiatrie*. juin 2019;2(2):163-71.
40. Parad RB, Comeau AM, Dorkin HL, Dovey M, Gerstle R, Martin T, et al. Sweat testing infants detected by cystic fibrosis newborn screening. *J Pediatr*. sept 2005;147(3 Suppl):S69-72.
41. Southern KW, Munck A, Pollitt R, Travert G, Zanolla L, Dankert-Roelse J, et al. A survey of newborn screening for cystic fibrosis in Europe. *J Cyst Fibros*. janv 2007;6(1):57-65.
42. Masson E. Mucoviscidose : actualités en génétique [Internet]. EM-Consulte. [cité 7 mars 2020]. Disponible sur: <https://www.em-consulte.com/article/1099919/article/mucoviscidose-actualites-en-genetique>
43. Iléus méconial - Pédiatrie [Internet]. Édition professionnelle du Manuel MSD. [cité 8 avr 2020]. Disponible sur: <https://www.msmanuals.com/fr/professional/p%C3%A9diatrie/troubles-gastro-intestinaux-chez-le-nouveau-n%C3%A9-et-chez-le-nourrisson/il%C3%A9us-m%C3%A9conial>
44. Padoan R, Cirilli N, Falchetti D, Cesana BM. Risk factors for adverse outcome in infancy in meconium ileus cystic fibrosis infants: A multicentre Italian study. *Journal of Cystic Fibrosis*. nov 2019;18(6):863-8.
45. Blackman SM, Deering-Brose R, McWilliams R, Naughton K, Coleman B, Lai T, et al. Relative Contribution of Genetic and Nongenetic Modifiers to Intestinal Obstruction in Cystic Fibrosis. *Gastroenterology*. oct 2006;131(4):1030-9.
46. Efrati O, Nir J, Fraser D, Cohen-Cymbarknoh M, Shoseyov D, Vilozni D, et al. Meconium Ileus in Patients With Cystic Fibrosis Is Not a Risk Factor for Clinical Deterioration and Survival: The Israeli Multicenter Study. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*. févr 2010;50(2):173-8.
47. Johnson J-A, Bush A, Buchdahl R. Does presenting with meconium ileus affect the prognosis of children with cystic fibrosis? *Pediatr Pulmonol*. 29 juill 2010;45(10):951-8.
48. Evans AKC, Fitzgerald DA, McKay KO. The impact of meconium ileus on the clinical course of children with cystic fibrosis. *European Respiratory Journal*. 1 nov 2001;18(5):784-9.

49. Kerem E, Corey M, Kerem B, Durie P, Tsui L-C, Levison H. Clinical and genetic comparisons of patients with cystic fibrosis, with or without meconium ileus. *The Journal of Pediatrics*. mai 1989;114(5):767-73.
50. Dray X, Hubert D, Munck A, Moreau J, Marteau P. Manifestations digestives de la mucoviscidose de l'adulte. *Gastroentérologie Clinique et Biologique*. déc 2005;29(12):1279-85.
51. developers N. Caractéristiques cliniques de la mucoviscidose [Internet]. 2018 [cité 8 avr 2020]. Disponible sur: <http://www.cfch.ch/fr/mucoviscidose/maladie-hereditaire/caracteristiques-cliniques-de-la-mucoviscidose/>
52. Boeck KD, Amaral MD. Progress in therapies for cystic fibrosis. *The Lancet Respiratory Medicine*. 1 août 2016;4(8):662-74.
53. pnds\_2017\_vf1.pdf [Internet]. [cité 26 déc 2019]. Disponible sur: [https://www.has-sante.fr/upload/docs/application/pdf/2017-09/pnds\\_2017\\_vf1.pdf](https://www.has-sante.fr/upload/docs/application/pdf/2017-09/pnds_2017_vf1.pdf)
54. Jennings MT, Dasenbrook EC, Lechtzin N, Boyle MP, Merlo CA. Risk factors for persistent methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infection in cystic fibrosis. *J Cyst Fibros*. nov 2017;16(6):681-6.
55. Goss CH, Muhlebach MS. Review: *Staphylococcus aureus* and MRSA in cystic fibrosis. *J Cyst Fibros*. sept 2011;10(5):298-306.
56. Gilligan PH. Microbiology of Airway Disease in Patients with Cystic Fibrosist. *CLIN MICROBIOL REV*. 1991;4:17.
57. Mariani-Kurkdjian P, Bingen E. Bactéries pathogènes dans la mucoviscidose. *Archives de Pédiatrie*. sept 2003;10:S342-6.
58. Hauser AR, Jain M, Bar-Meir M, McColley SA. Clinical Significance of Microbial Infection and Adaptation in Cystic Fibrosis. *Clinical Microbiology Reviews*. 1 janv 2011;24(1):29-70.
59. Junge S, Görlich D, den Reijer M, Wiedemann B, Tümmler B, Ellemunter H, et al. Factors Associated with Worse Lung Function in Cystic Fibrosis Patients with Persistent *Staphylococcus aureus*. Omri A, éditeur. *PLoS ONE*. 18 nov 2016;11(11):e0166220.
60. Schneider M, Muhlemann K, Droz S, Couzinet S, Casaulta C, Zimmerli S. Clinical Characteristics Associated with Isolation of Small-Colony Variants of *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa* from Respiratory Secretions of Patients with Cystic Fibrosis. *Journal of Clinical Microbiology*. 1 mai 2008;46(5):1832-4.
61. Besier S, Smaczny C, von Mallinckrodt C, Krahl A, Ackermann H, Brade V, et al. Prevalence and Clinical Significance of *Staphylococcus aureus* Small-Colony Variants in Cystic Fibrosis Lung Disease. *Journal of Clinical Microbiology*. 1 janv 2007;45(1):168-72.
62. Kahl B, Herrmann M, Everding AS, Koch HG, Becker K, Harms E, et al. Persistent Infection with Small Colony Variant Strains of *Staphylococcus aureus* in Patients with Cystic Fibrosis. *Journal of Infectious Diseases*. 1 avr 1998;177(4):1023-9.
63. Wolter DJ, Emerson JC, McNamara S, Buccat AM, Qin X, Cochrane E, et al. *Staphylococcus aureus* Small-Colony Variants Are Independently Associated With Worse Lung Disease in Children With Cystic Fibrosis. *Clinical Infectious Diseases*. 1 août 2013;57(3):384-91.

64. Proctor RA, von Eiff C, Kahl BC, Becker K, McNamara P, Herrmann M, et al. Small colony variants: a pathogenic form of bacteria that facilitates persistent and recurrent infections. *Nat Rev Microbiol.* avr 2006;4(4):295-305.
65. Malhotra S, Hayes D, Wozniak DJ. Mucoid *Pseudomonas aeruginosa* and regional inflammation in the cystic fibrosis lung. *J Cyst Fibros.* nov 2019;18(6):796-803.
66. Heltshe SL, Khan U, Beckett V, Baines A, Emerson J, Sanders DB, et al. Longitudinal development of initial, chronic and mucoid *Pseudomonas aeruginosa* infection in young children with cystic fibrosis. *Journal of Cystic Fibrosis.* mai 2018;17(3):341-7.
67. Martha B, Croisier D, Fanton A, Astruc K, Piroth L, Huet F, et al. Factors associated with mucoid transition of *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis patients. *Clinical Microbiology and Infection.* 1 juin 2010;16(6):617-23.
68. Li Z. Longitudinal Development of Mucoid *Pseudomonas aeruginosa* Infection and Lung Disease Progression in Children With Cystic Fibrosis. *JAMA.* 2 févr 2005;293(5):581.
69. Hentzer M, Teitzel GM, Balzer GJ, Heydorn A, Molin S, Givskov M, et al. Alginate Overproduction Affects *Pseudomonas aeruginosa* Biofilm Structure and Function. *Journal of Bacteriology.* 15 sept 2001;183(18):5395-401.
70. Govan JR, Deretic V. Microbial pathogenesis in cystic fibrosis: mucoid *Pseudomonas aeruginosa* and *Burkholderia cepacia*. *Microbiological reviews.* 1996;60(3):539-74.
71. Henry RL, Mellis CM, Petrovic L. Mucoid *Pseudomonas aeruginosa* is a marker of poor survival in cystic fibrosis. *Pediatr Pulmonol.* mars 1992;12(3):158-61.
72. Pedersen SS, Hoiby N, Espersen F, Koch C. Role of alginate in infection with mucoid *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis. *Thorax.* 1 janv 1992;47(1):6-13.
73. Heijerman H. Infection and inflammation in cystic fibrosis: a short review. *J Cyst Fibros.* août 2005;4 Suppl 2:3-5.
74. Cardines R, Giufrè M, Pompilio A, Fiscarelli E, Ricciotti G, Bonaventura GD, et al. *Haemophilus influenzae* in children with cystic fibrosis: Antimicrobial susceptibility, molecular epidemiology, distribution of adhesins and biofilm formation. *International Journal of Medical Microbiology.* janv 2012;302(1):45-52.
75. Bryant JM, Grogono DM, Rodriguez-Rincon D, Everall I, Brown KP, Moreno P, et al. Emergence and spread of a human-transmissible multidrug-resistant nontuberculous mycobacterium. *Science.* 11 nov 2016;354(6313):751-7.
76. SITE DE MICROBIOLOGIE MEDICALE [Internet]. [cité 5 avr 2020]. Disponible sur: <http://www.microbes-edu.org/mecanisme/pheno2/maltophilia.html>
77. Goss CH, Otto K, Aitken ML, Rubenfeld GD. Detecting *Stenotrophomonas maltophilia* does not reduce survival of patients with cystic fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med.* 1 août 2002;166(3):356-61.
78. Stanojevic S, Ratjen F, Stephens D, Lu A, Yau Y, Tullis E, et al. Factors influencing the acquisition of *Stenotrophomonas maltophilia* infection in cystic fibrosis patients. *J Cyst Fibros.* déc 2013;12(6):575-83.

79. Waters V, Atenafu EG, Lu A, Yau Y, Tullis E, Ratjen F. Chronic *Stenotrophomonas maltophilia* infection and mortality or lung transplantation in cystic fibrosis patients. *Journal of Cystic Fibrosis*. sept 2013;12(5):482-6.
80. Goss CH. Association between *Stenotrophomonas maltophilia* and lung function in cystic fibrosis. *Thorax*. 1 nov 2004;59(11):955-9.
81. Waters V, Atenafu EG, Salazar JG, Lu A, Yau Y, Matukas L, et al. Chronic *Stenotrophomonas maltophilia* infection and exacerbation outcomes in cystic fibrosis. *J Cyst Fibros*. janv 2012;11(1):8-13.
82. Dalbøge CS, Hansen CR, Pressler T, Høiby N, Johansen HK. Chronic pulmonary infection with *Stenotrophomonas maltophilia* and lung function in patients with cystic fibrosis. *Journal of Cystic Fibrosis*. sept 2011;10(5):318-25.
83. Barsky EE, Williams KA, Priebe GP, Sawicki GS. Incident *Stenotrophomonas maltophilia* infection and lung function decline in cystic fibrosis. *Pediatr Pulmonol*. oct 2017;52(10):1276-82.
84. De Baets F, Schelstraete P, Van Daele S, Haerynck F, Vanechoutte M. *Achromobacter xylosoxidans* in cystic fibrosis: Prevalence and clinical relevance. *Journal of Cystic Fibrosis*. janv 2007;6(1):75-8.
85. Lambiase A, Catania MR, del Pezzo M, Rossano F, Terlizzi V, Sepe A, et al. *Achromobacter xylosoxidans* respiratory tract infection in cystic fibrosis patients. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. août 2011;30(8):973-80.
86. Kanellopoulou M, Pournaras S, Iglezos H, Skarmoutsou N, Papafrangas E, Maniatis AN. Persistent colonization of nine cystic fibrosis patients with an *Achromobacter* (*Alcaligenes*) *xylosoxidans* clone. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. avr 2004;23(4):336-9.
87. SITE DE MICROBIOLOGIE MEDICALE [Internet]. [cité 5 avr 2020]. Disponible sur: <http://www.microbes-edu.org/mecanisme/pheno2/xyloxydans.htmlhaus>
88. Rønne Hansen C, Pressler T, Høiby N, Gormsen M. Chronic infection with *Achromobacter xylosoxidans* in cystic fibrosis patients; a retrospective case control study. *J Cyst Fibros*. déc 2006;5(4):245-51.
89. Firmida MC, Pereira RHV, Silva EASR, Marques EA, Lopes AJ. Clinical impact of *Achromobacter xylosoxidans* colonization/infection in patients with cystic fibrosis. *Braz J Med Biol Res* [Internet]. 2016 [cité 25 mars 2020];49(4). Disponible sur: [http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0100-879X2016000400703&lng=en&tIng=en](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-879X2016000400703&lng=en&tIng=en)
90. Recio R, Brañas P, Martínez MT, Chaves F, Orellana MA. Effect of respiratory *Achromobacter* spp. infection on pulmonary function in patients with cystic fibrosis. *Journal of Medical Microbiology*. 1 juill 2018;67(7):952-6.
91. Tetart M, Wallet F, Kyheng M, Leroy S, Perez T, Le Rouzic O, et al. Impact of *Achromobacter xylosoxidans* isolation on the respiratory function of adult patients with cystic fibrosis. *ERJ Open Res*. oct 2019;5(4):00051-2019.
92. Amoureux L, Bador J, Siebor E, Taillefumier N, Fanton A, Neuwirth C. Epidemiology and resistance of *Achromobacter xylosoxidans* from cystic fibrosis patients in Dijon, Burgundy: First French data. *Journal of Cystic Fibrosis*. mars 2013;12(2):170-6.

93. Ridderberg W, Bendstrup KEM, Olesen HV, Jensen-Fangel S, Nørskov-Lauritsen N. Marked increase in incidence of *Achromobacter xylosoxidans* infections caused by sporadic acquisition from the environment. *J Cyst Fibros.* déc 2011;10(6):466-9.
94. Cools P, Ho E, Vranckx K, Schelstraete P, Wurth B, Franckx H, et al. Epidemic *Achromobacter xylosoxidans* strain among Belgian cystic fibrosis patients and review of literature. *BMC Microbiol.* déc 2016;16(1):122.
95. Meghdas I, Loïez C, Baïda N, Dabboussi F, Hamze M, Husson M-O, et al. Épidémiologie des infections provoquées par les bactéries du « complexe *Burkholderia cepacia* » au cours de la mucoviscidose. *Archives de Pédiatrie.* avr 2004;11(4):360-6.
96. Agodi A, Mahenthiralingam E, Barchitta M, Giannino V, Sciacca A, Stefani S. *Burkholderia cepacia* Complex Infection in Italian Patients with Cystic Fibrosis: Prevalence, Epidemiology, and Genomovar Status. *Journal of Clinical Microbiology.* 1 août 2001;39(8):2891-6.
97. Manno G, Dalmastrì C, Tabacchioni S, Vandamme P, Lorini R, Minicucci L, et al. Epidemiology and Clinical Course of *Burkholderia cepacia* Complex Infections, Particularly Those Caused by Different *Burkholderia cenocepacia* Strains, among Patients Attending an Italian Cystic Fibrosis Center. *Journal of Clinical Microbiology.* 1 avr 2004;42(4):1491-7.
98. Isles A, Maclusky I, Corey M, Gold R, Prober C, Fleming P, et al. *Pseudomonas cepacia* infection in cystic fibrosis: An emerging problem. *The Journal of Pediatrics.* févr 1984;104(2):206-10.
99. Kenna DTD, Lilley D, Coward A, Martin K, Perry C, Pike R, et al. Prevalence of *Burkholderia* species, including members of *Burkholderia cepacia* complex, among UK cystic and non-cystic fibrosis patients. *Journal of Medical Microbiology.* 1 avr 2017;66(4):490-501.
100. Holmes A, Nolan R, Taylor R, Finley R, Riley M, Jiang R, et al. An Epidemic of *Burkholderia cepacia* Transmitted between Patients with and without Cystic Fibrosis. *J INFECT DIS.* mai 1999;179(5):1197-205.
101. Coenye T, Vandamme P, Govan JRW, LiPuma JJ. Taxonomy and Identification of the *Burkholderia cepacia* Complex. *Journal of Clinical Microbiology.* 1 oct 2001;39(10):3427-36.
102. Henry DA, Mahenthiralingam E, Vandamme P, Coenye T, Speert DP. Phenotypic Methods for Determining Genomovar Status of the *Burkholderia cepacia* Complex. *Journal of Clinical Microbiology.* 1 mars 2001;39(3):1073-8.
103. Butler SL, Doherty CJ, Hughes JE, Nelson JW, Govan JR. *Burkholderia cepacia* and cystic fibrosis: do natural environments present a potential hazard? *Journal of clinical microbiology.* 1995;33(4):1001-4.
104. Segonds C, Bingen E, Couetdic G, Mathy S, Brahimi N, Marty N, et al. Genotypic analysis of *Burkholderia cepacia* isolates from 13 French cystic fibrosis centers. *Journal of clinical microbiology.* 1997;35(8):2055-60.
105. Whiteford ML, Wilkinson JD, McColl JH, Conlon FM, Michie JR, Evans TJ, et al. Outcome of *Burkholderia* (*Pseudomonas*) *cepacia* colonisation in children with cystic fibrosis following a hospital outbreak. *Thorax.* 1 nov 1995;50(11):1194-8.
106. Govan JRW, Doherty CJ, Nelson JW, Brown PH, Greening AP, Maddison J, et al. Evidence for transmission of *Pseudomonas cepacia* by social contact in cystic fibrosis. *The Lancet.* juill 1993;342(8862):15-9.

107. McDowell A, Mahenthiralingam E, Dunbar KEA, Moore JE, Crowe M, Elborn JS. Epidemiology of *Burkholderia cepacia* complex species recovered from cystic fibrosis patients: issues related to patient segregation. *Journal of Medical Microbiology*. 1 juill 2004;53(7):663-8.
108. Courtney JM, Dunbar KEA, McDowell A, Moore JE, Warke TJ, Stevenson M, et al. Clinical outcome of *Burkholderia cepacia* complex infection in cystic fibrosis adults. *Journal of Cystic Fibrosis*. juin 2004;3(2):93-8.
109. da Costa Capizzani CP, Caçador NC, Torres LAGMM, Tonani L, Vandamme P, da Costa Darini AL. Clinical and microbiological profile of chronic *Burkholderia cepacia* complex infections in a cystic fibrosis reference hospital in Brazil. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. nov 2017;36(11):2263-71.
110. Ledson MJ. Outcome of *Burkholderia cepacia* colonisation in an adult cystic fibrosis centre. *Thorax*. 1 févr 2002;57(2):142-5.
111. Yeung JC, Machuca TN, Chaparro C, Cypel M, Stephenson AL, Solomon M, et al. Lung transplantation for cystic fibrosis. *The Journal of Heart and Lung Transplantation*. févr 2020;S1053249820314042.
112. Snell G, Reed A, Stern M, Hadjiliadis D. The evolution of lung transplantation for cystic fibrosis: A 2017 update. *Journal of Cystic Fibrosis*. sept 2017;16(5):553-64.
113. Koutsokera A, Varughese RA, Sykes J, Orchanian-Cheff A, Shah PS, Chaparro C, et al. Pre-transplant factors associated with mortality after lung transplantation in cystic fibrosis: A systematic review and meta-analysis. *Journal of Cystic Fibrosis*. mai 2019;18(3):407-15.
114. Lung Transplantation and Survival in Children with Cystic Fibrosis. *N Engl J Med*. 31 juill 2008;359(5):e6.
115. Stephenson AL, Sykes J, Berthiaume Y, Singer LG, Aaron SD, Whitmore GA, et al. Clinical and demographic factors associated with post-lung transplantation survival in individuals with cystic fibrosis. *The Journal of Heart and Lung Transplantation*. sept 2015;34(9):1139-45.
116. De Soyza A, Meachery G, Hester KLM, Nicholson A, Parry G, Tocewicz K, et al. Lung transplantation for patients with cystic fibrosis and *Burkholderia cepacia* complex infection: A single-center experience. *The Journal of Heart and Lung Transplantation*. déc 2010;29(12):1395-404.
117. Chaparro C, Maurer J, Gutierrez C, Krajden M, Chan C, Winton T, et al. Infection with *Burkholderia cepacia* in Cystic Fibrosis: Outcome Following Lung Transplantation. *Am J Respir Crit Care Med*. janv 2001;163(1):43-8.
118. Liou TG, Adler FR, Huang D. Use of Lung Transplantation Survival Models to Refine Patient Selection in Cystic Fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med*. mai 2005;171(9):1053-9.
119. SITE DE MICROBIOLOGIE MEDICALE [Internet]. [cité 5 avr 2020]. Disponible sur: <http://www.microbes-edu.org/mecanisme/pheno2/cepacia.html>
120. Maeda Y, Elborn JS, Parkins MD, Reihill J, Goldsmith CE, Coulter WA, et al. Population structure and characterization of viridans group streptococci (VGS) including *Streptococcus pneumoniae* isolated from adult patients with cystic fibrosis (CF). *Journal of Cystic Fibrosis*. mars 2011;10(2):133-9.

121. Esposito S, Colombo C, Tosco A, Montemitro E, Volpi S, Ruggiero L, et al. Streptococcus pneumoniae oropharyngeal colonization in children and adolescents with cystic fibrosis. Journal of Cystic Fibrosis. mai 2016;15(3):366-71.
122. Thornton CS, Brown EL, Alcantara J, Rabin HR, Parkins MD. Prevalence and impact of Streptococcus pneumoniae in adult cystic fibrosis patients: a retrospective chart review and capsular serotyping study. BMC Pulm Med. déc 2015;15(1):49.
123. Pimentel de Araujo F, D'Ambrosio F, Camilli R, Fiscarelli E, Di Bonaventura G, Baldassarri L, et al. Characterization of Streptococcus pneumoniae clones from paediatric patients with cystic fibrosis. Journal of Medical Microbiology. 1 déc 2014;63(12):1704-15.
124. Mastella G, Rainisio M, Harms HK, Hodson ME, Koch C, Navarro J, et al. Allergic bronchopulmonary aspergillosis in cystic fibrosis. A European epidemiological study. Eur Respir J. sept 2000;16(3):464.
125. de Almeida MB, Bussamra MHF, Rodrigues JC. Allergic bronchopulmonary aspergillosis in paediatric cystic fibrosis patients. Paediatr Respir Rev. mars 2006;7(1):67-72.
126. Cimon B, Chabasse D, Bouchara J-P. Rôle des champignons dans la pathologie respiratoire au cours de la mucoviscidose. Revue Francophone des Laboratoires. déc 2007;2007(397):59-65.
127. Saunders RV, Modha DE, Claydon A, Gaillard EA. Chronic *Aspergillus fumigatus* colonization of the pediatric cystic fibrosis airway is common and may be associated with a more rapid decline in lung function. Med Myco. 1 juill 2016;54(5):537-43.
128. Hong G, Psoter KJ, Jennings MT, Merlo CA, Boyle MP, Hadjiliadis D, et al. Risk factors for persistent Aspergillus respiratory isolation in cystic fibrosis. Journal of Cystic Fibrosis. sept 2018;17(5):624-30.
129. Noni M, Katelari A, Dimopoulos G, Doudounakis S-E, Tzoumaka-Bakoula C, Spoulou V. Aspergillus fumigatus chronic colonization and lung function decline in cystic fibrosis may have a two-way relationship. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. nov 2015;34(11):2235-41.
130. Reihill JA, Moore JE, Elborn JS, Ennis M. Effect of Aspergillus fumigatus and Candida albicans on pro-inflammatory response in cystic fibrosis epithelium. Journal of Cystic Fibrosis. déc 2011;10(6):401-6.
131. Bakare N, Rickerts V, Bargon J, Just-Nübling G. Prevalence of Aspergillus fumigatus and other fungal species in the sputum of adult patients with cystic fibrosis. Mycoses. févr 2003;46(1-2):19-23.
132. Morrell MR, Pilewski JM. Lung Transplantation for Cystic Fibrosis. Clinics in Chest Medicine. mars 2016;37(1):127-38.
133. Chambers DC, Yusef RD, Cherikh WS, Goldfarb SB, Kucheryavaya AY, Khusch K, et al. The Registry of the International Society for Heart and Lung Transplantation: Thirty-fourth Adult Lung And Heart-Lung Transplantation Report—2017; Focus Theme: Allograft ischemic time. The Journal of Heart and Lung Transplantation. oct 2017;36(10):1047-59.
134. Liou TG. Survival Effect of Lung Transplantation Among Patients With Cystic Fibrosis. JAMA. 5 déc 2001;286(21):2683.

135. Fakhro M, Ingemansson R, Skog I, Algotsson L, Hansson L, Koul B, et al. 25-year follow-up after lung transplantation at Lund University Hospital in Sweden: superior results obtained for patients with cystic fibrosis. *Interact CardioVasc Thorac Surg.* juill 2016;23(1):65-73.
136. Gilljam M, Nyström U, Dellgren G, Skog I, Hansson L. Survival after lung transplantation for cystic fibrosis in Sweden. *Eur J Cardiothorac Surg.* 7 oct 2016;ezw328.
137. Vaincre la Mucoviscidose [Internet]. Vaincre la Mucoviscidose. [cité 26 déc 2019]. Disponible sur: <https://www.vaincrelamuco.org/>
138. KALYDECO [Internet]. Haute Autorité de Santé. [cité 8 avr 2020]. Disponible sur: [https://www.has-sante.fr/jcms/p\\_3098921/fr/kalydeco](https://www.has-sante.fr/jcms/p_3098921/fr/kalydeco)
139. ORKAMBI (lumacaftor / ivacaftor), correcteur et potentialisateur du gène CFTR [Internet]. Haute Autorité de Santé. [cité 8 avr 2020]. Disponible sur: [https://www.has-sante.fr/jcms/c\\_2656337/fr/orkambi-lumacaftor-ivacaftor-correcteur-et-potentialisateur-du-gene-cftr](https://www.has-sante.fr/jcms/c_2656337/fr/orkambi-lumacaftor-ivacaftor-correcteur-et-potentialisateur-du-gene-cftr)
140. ORKAMBI (lumacaftor / ivacaftor), correcteur et potentialisateur du gène CFTR [Internet]. Haute Autorité de Santé. [cité 8 avr 2020]. Disponible sur: [https://www.has-sante.fr/jcms/c\\_2889886/fr/orkambi-lumacaftor-ivacaftor-correcteur-et-potentialisateur-du-gene-cftr](https://www.has-sante.fr/jcms/c_2889886/fr/orkambi-lumacaftor-ivacaftor-correcteur-et-potentialisateur-du-gene-cftr)
141. 20191120\_vertex\_orkambi\_cp.pdf [Internet]. [cité 8 avr 2020]. Disponible sur: [https://www.vaincrelamuco.org/sites/default/files/20191120\\_vertex\\_orkambi\\_cp.pdf](https://www.vaincrelamuco.org/sites/default/files/20191120_vertex_orkambi_cp.pdf)
142. Symkevi®, nouveau traitement pour la mucoviscidose, obtient l'autorisation de mise sur le marché européenne [Internet]. Vaincre la Mucoviscidose. 2018 [cité 8 avr 2020]. Disponible sur: <https://www.vaincrelamuco.org/2018/11/15/symkevir-nouveau-traitement-pour-la-mucoviscidose-obtient-lautorisation-de-mise-sur-le>
143. SYMKEVI / KALYDECO [Internet]. Haute Autorité de Santé. [cité 22 mai 2020]. Disponible sur: [https://www.has-sante.fr/jcms/p\\_3184439/fr/symkevi-kalydeco](https://www.has-sante.fr/jcms/p_3184439/fr/symkevi-kalydeco)
144. Trithérapie : autorisation de mise sur le marché aux Etats-Unis [Internet]. Vaincre la Mucoviscidose. 2019 [cité 8 avr 2020]. Disponible sur: <https://www.vaincrelamuco.org/2019/10/23/trithérapie-autorisation-de-mise-sur-le-marche-aux-etats-unis-2875>
145. Ramsey BW, Davies J, McElvaney NG, Tullis E, Bell SC, Dřevínek P, et al. A CFTR Potentiator in Patients with Cystic Fibrosis and the *G551D* Mutation. *N Engl J Med.* 3 nov 2011;365(18):1663-72.
146. Sawicki GS, McKone EF, Pasta DJ, Millar SJ, Wagener JS, Johnson CA, et al. Sustained Benefit from Ivacaftor Demonstrated by Combining Clinical Trial and Cystic Fibrosis Patient Registry Data. *Am J Respir Crit Care Med.* oct 2015;192(7):836-42.
147. Rowe SM, Heltshe SL, Gonska T, Donaldson SH, Borowitz D, Gelfond D, et al. Clinical Mechanism of the Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator Potentiator Ivacaftor in *G551D*-mediated Cystic Fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med.* 15 juill 2014;190(2):175-84.
148. Heltshe SL, Mayer-Hamblett N, Burns JL, Khan U, Baines A, Ramsey BW, et al. *Pseudomonas aeruginosa* in Cystic Fibrosis Patients With *G551D*-CFTR Treated With Ivacaftor. *Clinical Infectious Diseases.* 1 mars 2015;60(5):703-12.

149. Timpe A, Runyon EH. The Relationship of « Atypical » Acid-Fast Bacteria to Human Disease: A Preliminary Report. *Clinical Infectious Diseases*. 1 sept 1981;3(5):1098-103.
150. Runyon EH. Anonymous Mycobacteria in Pulmonary Disease. *Medical Clinics of North America*. janv 1959;43(1):273-90.
151. Andréjak C, Lescure F-X, Schmit J-L, Jounieaux V. Diagnostic et traitement des mycobactérioses atypiques d'expression respiratoire. *Revue des Maladies Respiratoires*. déc 2011;28(10):1293-309.
152. Figure 5: Classification des mycobactéries (Millet, 2011) [Internet]. ResearchGate. [cité 1 févr 2020]. Disponible sur: [https://www.researchgate.net/figure/Classification-des-mycobacteries-Millet-2011\\_fig2\\_310620695](https://www.researchgate.net/figure/Classification-des-mycobacteries-Millet-2011_fig2_310620695)
153. Structure de la paroi des mycobactéries et classification [Internet]. *microbiologiemedicale.fr*. [cité 27 févr 2020]. Disponible sur: <https://microbiologiemedicale.fr/classification-structure-paroi-mycobacteries/>
154. Griffith DE. Emergence of Nontuberculous Mycobacteria as Pathogens in Cystic Fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med*. 15 mars 2003;167(6):810-2.
155. Species [Internet]. [cité 19 févr 2020]. Disponible sur: <https://lpsn.dsmz.de/species?page=M#Myceligenerans>
156. von Reyn CF, Waddell RD, Eaton T, Arbeit RD, Maslow JN, Barber TW, et al. Isolation of *Mycobacterium avium* complex from water in the United States, Finland, Zaire, and Kenya. *Journal of Clinical Microbiology*. 1993;31(12):3227-30.
157. Griffith DE, Aksamit T, Brown-Elliott BA, Catanzaro A, Daley C, Gordin F, et al. An Official ATS/IDSA Statement: Diagnosis, Treatment, and Prevention of Nontuberculous Mycobacterial Diseases. *Am J Respir Crit Care Med*. 15 févr 2007;175(4):367-416.
158. Haworth CS, Banks J, Capstick T, Fisher AJ, Gorsuch T, Laurenson IF, et al. British Thoracic Society guidelines for the management of non-tuberculous mycobacterial pulmonary disease (NTM-PD). *Thorax*. 1 nov 2017;72(Suppl 2):ii1-64.
159. Bar-On O, Mussaffi H, Mei-Zahav M, Prais D, Steuer G, Stafler P, et al. Increasing nontuberculous mycobacteria infection in cystic fibrosis. *J Cyst Fibros*. janv 2015;14(1):53-62.
160. Roux A-L, Catherinot E, Ripoll F, Soismier N, Macheras E, Ravilly S, et al. Multicenter study of prevalence of nontuberculous mycobacteria in patients with cystic fibrosis in France. *J Clin Microbiol*. déc 2009;47(12):4124-8.
161. Cavalli Z, Reynaud Q, Bricca R, Nove-Josserand R, Durupt S, Reix P, et al. High incidence of non-tuberculous mycobacteria-positive cultures among adolescent with cystic fibrosis. *J Cyst Fibros*. sept 2017;16(5):579-84.
162. Qvist T, Gilljam M, Jönsson B, Taylor-Robinson D, Jensen-Fangel S, Wang M, et al. Epidemiology of nontuberculous mycobacteria among patients with cystic fibrosis in Scandinavia. *Journal of Cystic Fibrosis*. janv 2015;14(1):46-52.
163. Gardner AI, McClenaghan E, Saint G, McNamara PS, Brodli M, Thomas MF. Epidemiology of Nontuberculous Mycobacteria Infection in Children and Young People With Cystic Fibrosis: Analysis of UK Cystic Fibrosis Registry. *Clinical Infectious Diseases*. 15 févr 2019;68(5):731-7.

164. Adjemian J, Olivier KN, Prevots DR. Epidemiology of Pulmonary Nontuberculous Mycobacterial Sputum Positivity in Patients with Cystic Fibrosis in the United States, 2010–2014. *Annals ATS*. juill 2018;15(7):817-26.
165. Skolnik K, Kirkpatrick G, Quon BS. Nontuberculous Mycobacteria in Cystic Fibrosis. *Curr Treat Options Infect Dis*. déc 2016;8(4):259-74.
166. Adjemian J, Olivier KN, Prevots DR. Nontuberculous Mycobacteria among Patients with Cystic Fibrosis in the United States. Screening Practices and Environmental Risk. *Am J Respir Crit Care Med*. sept 2014;190(5):581-6.
167. Seddon P, Fidler K, Raman S, Wyatt H, Ruiz G, Elston C, et al. Prevalence of Nontuberculous Mycobacteria in Cystic Fibrosis Clinics, United Kingdom, 2009. *Emerg Infect Dis*. juill 2013;19(7):1128-30.
168. Hoefsloot W, van Ingen J, Andrejak C, Ångeby K, Bauriaud R, Bemer P, et al. The geographic diversity of nontuberculous mycobacteria isolated from pulmonary samples: an NTM-NET collaborative study. *Eur Respir J*. déc 2013;42(6):1604-13.
169. Pierre-Audigier C, Ferroni A, Sermet-Gaudelus I, Le Bourgeois M, Offredo C, Vu-Thien H, et al. Age-Related Prevalence and Distribution of Nontuberculous Mycobacterial Species among Patients with Cystic Fibrosis. *Journal of Clinical Microbiology*. 1 juill 2005;43(7):3467-70.
170. Catherinot E, Roux A-L, Vibet M-A, Bellis G, Ravilly S, Lemonnier L, et al. Mycobacterium avium and Mycobacterium abscessus complex target distinct cystic fibrosis patient subpopulations. *J Cyst Fibros*. janv 2013;12(1):74-80.
171. Floto RA, Olivier KN, Saiman L, Daley CL, Herrmann J-L, Nick JA, et al. US Cystic Fibrosis Foundation and European Cystic Fibrosis Society consensus recommendations for the management of non-tuberculous mycobacteria in individuals with cystic fibrosis. *Thorax*. janv 2016;71(Suppl 1):i1-22.
172. Esther CR, Esserman DA, Gilligan P, Kerr A, Noone PG. Chronic Mycobacterium abscessus infection and lung function decline in cystic fibrosis. *Journal of Cystic Fibrosis*. mars 2010;9(2):117-23.
173. Bange FC, Brown BA, Smaczny C, Wallace RJ, Böttger EC. Lack of transmission of mycobacterium abscessus among patients with cystic fibrosis attending a single clinic. *Clin Infect Dis*. 01 2001;32(11):1648-50.
174. Sermet-Gaudelus I, Le Bourgeois M, Pierre-Audigier C, Offredo C, Guillemot D, Halley S, et al. *Mycobacterium abscessus* and Children with Cystic Fibrosis. *Emerg Infect Dis*. déc 2003;9(12):1587-91.
175. Doyle RM, Rubio M, Dixon G, Hartley J, Klein N, Coll P, et al. Cross-transmission Is Not the Source of New Mycobacterium abscessus Infections in a Multicenter Cohort of Cystic Fibrosis Patients. *Clin Infect Dis [Internet]*. [cité 3 févr 2020]; Disponible sur: <https://academic.oup.com/cid/advance-article/doi/10.1093/cid/ciz526/5521616>
176. Bryant JM, Grogono DM, Greaves D, Foweraker J, Roddick I, Inns T, et al. Whole-genome sequencing to identify transmission of Mycobacterium abscessus between patients with cystic fibrosis: a retrospective cohort study. *The Lancet*. mai 2013;381(9877):1551-60.
177. Tortoli E. Impact of Genotypic Studies on Mycobacterial Taxonomy: the New Mycobacteria of the 1990s. *Clinical Microbiology Reviews*. 1 avr 2003;16(2):319-54.

178. Aitken ML, Limaye A, Pottinger P, Whimbey E, Goss CH, Tonelli MR, et al. Respiratory Outbreak of *Mycobacterium abscessus* Subspecies *massiliense* in a Lung Transplant and Cystic Fibrosis Center. *Am J Respir Crit Care Med*. 15 janv 2012;185(2):231-2.
179. Netgen. Mycobactéries non tuberculeuses : quoi de neuf ? [Internet]. *Revue Médicale Suisse*. [cité 5 févr 2020]. Disponible sur: <https://www.revmed.ch/RMS/2009/RMS-226/Mycobacteries-non-tuberculeuses-quoi-de-neuf>
180. Viviani L, Harrison MJ, Zolin A, Haworth CS, Floto RA. Epidemiology of nontuberculous mycobacteria (NTM) amongst individuals with cystic fibrosis (CF). *J Cyst Fibros*. 2016;15(5):619-23.
181. Binder AM, Adjemian J, Olivier KN, Prevots DR. Epidemiology of Nontuberculous Mycobacterial Infections and Associated Chronic Macrolide Use among Persons with Cystic Fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med*. oct 2013;188(7):807-12.
182. Martiniano SL, Sontag MK, Daley CL, Nick JA, Sagel SD. Clinical Significance of a First Positive Nontuberculous Mycobacteria Culture in Cystic Fibrosis. *Annals ATS*. janv 2014;11(1):36-44.
183. Levy I, Grisaru-Soen G, Lerner-Geva L, Kerem E, Blau H, Bentur L, et al. Multicenter Cross-Sectional Study of Nontuberculous Mycobacterial Infections among Cystic Fibrosis Patients, Israel. *Emerg Infect Dis*. mars 2008;14(3):378-84.
184. Coolen N, Morand P, Martin C, Hubert D, Kanaan R, Chapron J, et al. Reduced risk of nontuberculous mycobacteria in cystic fibrosis adults receiving long-term azithromycin. *J Cyst Fibros*. sept 2015;14(5):594-9.
185. Verregghen M, Heijerman HG, Reijers M, van Ingen J, van der Ent CK. Risk factors for *Mycobacterium abscessus* infection in cystic fibrosis patients; a case–control study. *Journal of Cystic Fibrosis*. juill 2012;11(4):340-3.
186. Chalermkulrat W. Non-tuberculous mycobacteria in end stage cystic fibrosis: implications for lung transplantation. *Thorax*. 1 juin 2006;61(6):507-13.
187. Esther CR, Henry MM, Molina PL, Leigh MW. Nontuberculous mycobacterial infection in young children with cystic fibrosis. *Pediatr Pulmonol*. juill 2005;40(1):39-44.
188. Schwartz M, Fisher S, Story-Roller E, Lamichhane G, Parrish N. Activities of Dual Combinations of Antibiotics Against Multidrug-Resistant Nontuberculous Mycobacteria Recovered from Patients with Cystic Fibrosis. *Microbial Drug Resistance*. oct 2018;24(8):1191-7.
189. Singh S, Bouzinbi N, Chaturvedi V, Godreuil S, Kremer L. In vitro evaluation of a new drug combination against clinical isolates belonging to the *Mycobacterium abscessus* complex. *Clinical Microbiology and Infection*. déc 2014;20(12):O1124-7.
190. Yang B, Jhun BW, Moon SM, Lee H, Park HY, Jeon K, et al. Clofazimine-Containing Regimen for the Treatment of *Mycobacterium abscessus* Lung Disease. *Antimicrob Agents Chemother*. juin 2017;61(6):e02052-16, /aac/61/6/e02052-16.atom.
191. Roux A-L, Catherinot E, Soismier N, Heym B, Bellis G, Lemonnier L, et al. Comparing *Mycobacterium massiliense* and *Mycobacterium abscessus* lung infections in cystic fibrosis patients. *Journal of Cystic Fibrosis*. janv 2015;14(1):63-9.
192. Leung JM, Olivier KN. Nontuberculous mycobacteria: the changing epidemiology and treatment challenges in cystic fibrosis. *Curr Opin Pulm Med*. nov 2013;19(6):662-9.

193. Horne D, Skerrett S. Recent advances in nontuberculous mycobacterial lung infections. *F1000Res*. 1 oct 2019;8:1710.
194. Gilljam M, Scherstén H, Silverborn M, Jönsson B, Ericsson Hollsing A. Lung transplantation in patients with cystic fibrosis and *Mycobacterium abscessus* infection. *Journal of Cystic Fibrosis*. juill 2010;9(4):272-6.
195. Qvist T, Pressler T, Thomsen VO, Skov M, Iversen M, Katzenstein TL. Nontuberculous Mycobacterial Disease Is Not a Contraindication to Lung Transplantation in Patients With Cystic Fibrosis: A Retrospective Analysis in a Danish Patient Population. *Transplantation Proceedings*. janv 2013;45(1):342-5.
196. Sanguinetti M, Ardito F, Fiscarelli E, La Sorda M, D'Argenio P, Ricciotti G, et al. Fatal Pulmonary Infection Due to Multidrug-Resistant *Mycobacterium abscessus* in a Patient with Cystic Fibrosis. *Journal of Clinical Microbiology*. 1 févr 2001;39(2):816-9.
197. Lobo LJ, Chang LC, Esther CR, Gilligan PH, Tulu Z, Noone PG. Lung transplant outcomes in cystic fibrosis patients with pre-operative *Mycobacterium abscessus* respiratory infections. *Clin Transplant*. juill 2013;27(4):523-9.
198. Tissot A, Thomas MF, Corris PA, Brodliè M. NonTuberculous Mycobacteria infection and lung transplantation in cystic fibrosis: a worldwide survey of clinical practice. *BMC Pulm Med*. déc 2018;18(1):86.
199. Orens JB, Estenne M, Arcasoy S, Conte JV, Corris P, Egan JJ, et al. International Guidelines for the Selection of Lung Transplant Candidates: 2006 Update—A Consensus Report From the Pulmonary Scientific Council of the International Society for Heart and Lung Transplantation. *The Journal of Heart and Lung Transplantation*. juill 2006;25(7):745-55.
200. Nash KA, Brown-Elliott BA, Wallace RJ. A Novel Gene, *erm(41)*, Confers Inducible Macrolide Resistance to Clinical Isolates of *Mycobacterium abscessus* but Is Absent from *Mycobacterium chelonae*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 1 avr 2009;53(4):1367-76.
201. Kim H-Y, Kim BJ, Kook Y, Yun Y-J, Shin JH, Kim B-J, et al. *Mycobacterium massiliense* is differentiated from *Mycobacterium abscessus* and *Mycobacterium bolletii* by erythromycin ribosome methyltransferase gene (*erm*) and clarithromycin susceptibility patterns. *Microbiology and Immunology*. 2010;54(6):347-53.
202. Bastian S, Veziris N, Roux A-L, Brossier F, Gaillard J-L, Jarlier V, et al. Assessment of Clarithromycin Susceptibility in Strains Belonging to the *Mycobacterium abscessus* Group by *erm* (41) and *rrl* Sequencing. *Antimicrob Agents Chemother*. févr 2011;55(2):775-81.
203. Maurer FP, Castelberg C, Quiblier C, Bottger EC, Somoskovi A. *Erm(41)*-dependent inducible resistance to azithromycin and clarithromycin in clinical isolates of *Mycobacterium abscessus*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 1 juin 2014;69(6):1559-63.
204. Liu W, Li B, Chu H, Zhang Z, Luo L, Ma W, et al. Rapid detection of mutations in *erm(41)* and *rrl* associated with clarithromycin resistance in *Mycobacterium abscessus* complex by denaturing gradient gel electrophoresis. *J Microbiol Methods*. 2017;143:87-93.
205. Mougari F, Amarsy R, Veziris N, Bastian S, Brossier F, Berçot B, et al. Standardized interpretation of antibiotic susceptibility testing and resistance genotyping for *Mycobacterium abscessus* with regard to subspecies and *erm41* sequevar. *J Antimicrob Chemother*. août 2016;71(8):2208-12.

206. CASFM2020\_Avril2020\_V1.1.pdf [Internet]. [cité 27 mai 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)
207. Rapport\_CNR\_2015\_web2.pdf [Internet]. [cité 25 mars 2020]. Disponible sur: [http://cnrmyctb.free.fr/IMG/pdf/Rapport\\_CNR\\_2015\\_web2.pdf](http://cnrmyctb.free.fr/IMG/pdf/Rapport_CNR_2015_web2.pdf)
208. Mougari F, Loiseau J, Veziris N, Bernard C, Bercot B, Sougakoff W, et al. Evaluation of the new GenoType NTM-DR kit for the molecular detection of antimicrobial resistance in non-tuberculous mycobacteria. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. juin 2017;72(6):1669-77.
209. Meier A, Kirschner P, Springer B, Steingrube VA, Brown BA, Wallace RJ, et al. Identification of mutations in 23S rRNA gene of clarithromycin-resistant *Mycobacterium intracellulare*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 1 févr 1994;38(2):381-4.
210. Wallace RJ, Meier A, Brown BA, Zhang Y, Sander P, Onyi GO, et al. Genetic basis for clarithromycin resistance among isolates of *Mycobacterium chelonae* and *Mycobacterium abscessus*. *Antimicrob Agents Chemother*. juill 1996;40(7):1676-81.
211. Huh HJ, Kim S-Y, Shim HJ, Kim DH, Yoo IY, Kang O-K, et al. GenoType NTM-DR Performance Evaluation for Identification of *Mycobacterium avium* Complex and *Mycobacterium abscessus* and Determination of Clarithromycin and Amikacin Resistance. Land GA, éditeur. *J Clin Microbiol*. 5 juin 2019;57(8):e00516-19, /jcm/57/8/JCM.00516-19.atom.
212. Griffith DE, Brown-Elliott BA, Langsjoen B, Zhang Y, Pan X, Girard W, et al. Clinical and Molecular Analysis of Macrolide Resistance in ***Mycobacterium avium*** Complex Lung Disease. *Am J Respir Crit Care Med*. 15 oct 2006;174(8):928-34.
213. Catherinot E, Roux A-L, Vibet M-A, Bellis G, Lemonnier L, Le Roux E, et al. Inhaled therapies, azithromycin and *Mycobacterium abscessus* in cystic fibrosis patients. *Eur Respir J*. mai 2013;41(5):1101-6.
214. Brown-Elliott BA, Iakhiaeva E, Griffith DE, Woods GL, Stout JE, Wolfe CR, et al. In Vitro Activity of Amikacin against Isolates of *Mycobacterium avium* Complex with Proposed MIC Breakpoints and Finding of a 16S rRNA Gene Mutation in Treated Isolates. *Journal of Clinical Microbiology*. 1 oct 2013;51(10):3389-94.
215. Nessar R, Reytrat JM, Murray A, Gicquel B. Genetic analysis of new 16S rRNA mutations conferring aminoglycoside resistance in *Mycobacterium abscessus*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. août 2011;66(8):1719-24.
216. Wu M, Li B, Guo Q, Xu L, Zou Y, Zhang Y, et al. Detection and molecular characterisation of amikacin-resistant *Mycobacterium abscessus* isolated from patients with pulmonary disease. *Journal of Global Antimicrobial Resistance*. déc 2019;19:188-91.
217. Renvoisé A, Brossier F, Galati E, Veziris N, Sougakoff W, Aubry A, et al. Assessing Primary and Secondary Resistance to Clarithromycin and Amikacin in Infections Due to *Mycobacterium avium* Complex. *Antimicrob Agents Chemother*. nov 2015;59(11):7153-5.
218. Petroff SA. A NEW AND RAPID METHOD FOR THE ISOLATION AND CULTIVATION OF TUBERCLE BACILLI DIRECTLY FROM THE SPUTUM AND FECES. *The Journal of Experimental Medicine*. 1 janv 1915;21(1):38-42.
219. Tacquet A, Tison F. [New technic of isolation of mycobacteria by sodium laurylsulfate]. *Ann Inst Pasteur (Paris)*. mai 1961;100:676-80.

220. 2003-Bioforma-29-Mycobactéries Mycobactérioses.pdf [Internet]. [cité 28 déc 2019]. Disponible sur: <https://sjbm.fr/images/cahiers/2003-Bioforma-29-Mycobact%C3%A9ries%20Mycobact%C3%A9rioses.pdf>
221. Kubica GP, Dye WE, Cohn ML, Middlebrook G. Sputum digestion and decontamination with N-acetyl-L-cysteine-sodium hydroxide for culture of mycobacteria. *Am Rev Respir Dis.* mai 1963;87:775-9.
222. De Bel A, De Geyter D, De Schutter I, Mouton C, Wellemans I, Hanssens L, et al. Sampling and Decontamination Method for Culture of Nontuberculous Mycobacteria in Respiratory Samples of Cystic Fibrosis Patients. *J Clin Microbiol.* déc 2013;51(12):4204-6.
223. Ferroni A, Vu-Thien H, Lanotte P, Le Bourgeois M, Sermet-Gaudelus I, Fauroux B, et al. Value of the Chlorhexidine Decontamination Method for Recovery of Nontuberculous Mycobacteria from Sputum Samples of Patients with Cystic Fibrosis. *Journal of Clinical Microbiology.* 1 juin 2006;44(6):2237-9.
224. F.-C. B, E. B. Improved Decontamination Method for Recovering Mycobacteria from Patients with Cystic Fibrosis. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases.* 1 juill 2002;21(7):546-8.
225. Bange F-C, Kirschner P, Böttger EC. Recovery of Mycobacteria from Patients with Cystic Fibrosis. *Journal of Clinical Microbiology.* 1999;37(11):3761-3.
226. Whittier S, Hopfer RL, Knowles MR, Gilligan PH. Improved recovery of mycobacteria from respiratory secretions of patients with cystic fibrosis. *Journal of Clinical Microbiology.* 1993;31(4):861-4.
227. Whittier S, Olivier K, Gilligan P, Knowles M, Della-Latta P. Proficiency Testing of Clinical Microbiology Laboratories Using Modified Decontamination Procedures for Detection of Nontuberculous Mycobacteria in Sputum Samples from Cystic Fibrosis Patients. :3.
228. Buijtel PCAM, Petit PLC. Comparison of NaOH-N-acetyl cysteine and sulfuric acid decontamination methods for recovery of mycobacteria from clinical specimens. *Journal of Microbiological Methods.* juill 2005;62(1):83-8.
229. Hanna BA, Ebrahimzadeh A, Elliott LB, Morgan MA, Novak SM, Rusch-Gerdes S, et al. Multicenter Evaluation of the BACTEC MGIT 960 System for Recovery of Mycobacteria. *Journal of Clinical Microbiology.* 1999;37(3):748-52.
230. Esther CR, Hoberman S, Fine J, Allen S, Culbreath K, Rodino K, et al. Detection of Rapidly Growing Mycobacteria in Routine Cultures of Samples from Patients with Cystic Fibrosis ▽ . *J Clin Microbiol.* avr 2011;49(4):1421-5.
231. Plongla R, Preece CL, Perry JD, Gilligan PH. Evaluation of RGM Medium for Isolation of Nontuberculous Mycobacteria from Respiratory Samples from Patients with Cystic Fibrosis in the United States. Forbes BA, éditeur. *J Clin Microbiol.* mai 2017;55(5):1469-77.
232. Preece CL, Perry A, Gray B, Kenna DT, Jones AL, Cummings SP, et al. A novel culture medium for isolation of rapidly-growing mycobacteria from the sputum of patients with cystic fibrosis. *J Cyst Fibros.* mars 2016;15(2):186-91.
233. Eltringham I, Pickering J, Gough H, Preece CL, Perry JD. Comparison of Mycobacterial Growth Indicator Tube with Culture on RGM Selective Agar for Detection of Mycobacteria in Sputum

Samples from Patients with Cystic Fibrosis. Forbes BA, éditeur. J Clin Microbiol. août 2016;54(8):2047-50.

234. Scohy A, Gohy S, Mathys V, Sapriel G, Toussaint L, Bressant F, et al. Comparison of the RGM medium and the mycobacterial growth indicator tube automated system for isolation of non-tuberculous mycobacteria from sputum samples of cystic fibrosis patients in Belgium. J Clin Tuberc Other Mycobact Dis. déc 2018;13:1-4.
235. Rotcheewaphan S, Odusanya OE, Henderson CM, Stephenson D, Olivier KN, Perry JD, et al. Performance of RGM Medium for Isolation of Nontuberculous Mycobacteria from Respiratory Specimens from Non-Cystic Fibrosis Patients. J Clin Microbiol. 2019;57(2).
236. Stephenson D, Perry A, Appleby MR, Lee D, Davison J, Johnston A, et al. An evaluation of methods for the isolation of nontuberculous mycobacteria from patients with cystic fibrosis, bronchiectasis and patients assessed for lung transplantation. BMC Pulm Med [Internet]. 21 janv 2019 [cité 26 déc 2019];19. Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6341538/>
237. Preece CL, Wichelhaus TA, Perry A, Jones AL, Cummings SP, Perry JD, et al. Evaluation of Various Culture Media for Detection of Rapidly Growing Mycobacteria from Patients with Cystic Fibrosis. Land GA, éditeur. J Clin Microbiol. juill 2016;54(7):1797-803.
238. Bhalla GS, Sarao MS, Kalra D, Bandyopadhyay K, John AR. Methods of phenotypic identification of non-tuberculous mycobacteria. Practical Laboratory Medicine. nov 2018;12:e00107.
239. Butler WR, Jost KC, Kilburn JO. Identification of mycobacteria by high-performance liquid chromatography. Journal of Clinical Microbiology. 1991;29(11):2468-72.
240. Adekambi T. Dissection of phylogenetic relationships among 19 rapidly growing Mycobacterium species by 16S rRNA, hsp65, sodA, recA and rpoB gene sequencing. INTERNATIONAL JOURNAL OF SYSTEMATIC AND EVOLUTIONARY MICROBIOLOGY. 1 nov 2004;54(6):2095-105.
241. Blackwood KS, He C, Gunton J, Turenne CY, Wolfe J, Kabani AM. Evaluation of recA Sequences for Identification of Mycobacterium Species. Journal of Clinical Microbiology. 2000;38(8):2846-52.
242. Kirschner P, Springer B, Vogel U, Meier A, Wrede A, Kiekenbeck M, et al. Genotypic identification of mycobacteria by nucleic acid sequence determination: report of a 2-year experience in a clinical laboratory. Journal of Clinical Microbiology. 1993;31(11):2882-9.
243. Kim SH, Shin JH. Identification of nontuberculous mycobacteria using multilocus sequence analysis of 16S rRNA, hsp65, and rpoB. J Clin Lab Anal. janv 2018;32(1):e22184.
244. Kox LF, van Leeuwen J, Knijper S, Jansen HM, Kolk AH. PCR assay based on DNA coding for 16S rRNA for detection and identification of mycobacteria in clinical samples. Journal of clinical microbiology. 1995;33(12):3225-33.
245. Springer B, Stockman L, Teschner K, Roberts GD, Böttger EC. Two-laboratory collaborative study on identification of mycobacteria: molecular versus phenotypic methods. Journal of clinical microbiology. 1996;34(2):296-303.
246. Böddinghaus B, Rogall T, Flohr T, Blöcker H, Böttger EC. Detection and identification of mycobacteria by amplification of rRNA. Journal of Clinical Microbiology. 1990;28(8):1751-9.

247. Chen ZH, Butler WR, Baumstark BR, Ahearn DG. Identification and differentiation of *Mycobacterium avium* and *M. intracellulare* by PCR. *Journal of clinical microbiology*. 1996;34(5):1267-9.
248. Adekambi T, Colson P, Drancourt M. *rpoB*-Based Identification of Nonpigmented and Late-Pigmenting Rapidly Growing *Mycobacteria*. *Journal of Clinical Microbiology*. 1 déc 2003;41(12):5699-708.
249. de Zwaan R, van Ingen J, van Soolingen D. Utility of *rpoB* Gene Sequencing for Identification of Nontuberculous *Mycobacteria* in the Netherlands. *J Clin Microbiol*. juill 2014;52(7):2544-51.
250. Arnold C, Barrett A, Cross L, Magee JG. The use of *rpoB* sequence analysis in the differentiation of *Mycobacterium abscessus* and *Mycobacterium chelonae*: a critical judgement in cystic fibrosis? *Clinical Microbiology and Infection*. mai 2012;18(5):E131-3.
251. Lee H, Bang H-E, Bai G-H, Cho S-N. Novel Polymorphic Region of the *rpoB* Gene Containing *Mycobacterium* Species-Specific Sequences and Its Use in Identification of *Mycobacteria*. *Journal of Clinical Microbiology*. 1 mai 2003;41(5):2213-8.
252. Kim B-J, Lee S-H, Lyu M-A, Kim S-J, Bai G-H, Kim S-J, et al. Identification of *Mycobacterial* Species by Comparative Sequence Analysis of the RNA Polymerase Gene (*rpoB*). *Journal of Clinical Microbiology*. 1999;37(6):1714-20.
253. McNabb A, Eisler D, Adie K, Amos M, Rodrigues M, Stephens G, et al. Assessment of Partial Sequencing of the 65-Kilodalton Heat Shock Protein Gene (*hsp65*) for Routine Identification of *Mycobacterium* Species Isolated from Clinical Sources. *Journal of Clinical Microbiology*. 1 juill 2004;42(7):3000-11.
254. Kim H. Differentiation of *Mycobacterium* species by analysis of the heat-shock protein 65 gene (*hsp65*). *INTERNATIONAL JOURNAL OF SYSTEMATIC AND EVOLUTIONARY MICROBIOLOGY*. 1 juill 2005;55(4):1649-56.
255. Ringuet H, Akoua-Koffi C, Honore S, Varnerot A, Vincent V, Berche P, et al. *hsp65* Sequencing for Identification of Rapidly Growing *Mycobacteria*. *Journal of Clinical Microbiology*. 1999;37(3):852-7.
256. Turenne CY, Semret M, Cousins DV, Collins DM, Behr MA. Sequencing of *hsp65* Distinguishes among Subsets of the *Mycobacterium avium* Complex. *Journal of Clinical Microbiology*. 1 févr 2006;44(2):433-40.
257. Swanson DS, Kapur V, Stockbauer K, Pan X, Frothingham R, Musser JM. Subspecific Differentiation of *Mycobacterium avium* Complex Strains by Automated Sequencing of a Region of the Gene (*hsp65*) Encoding a 65-Kilodalton Heat Shock Protein. *International Journal of Systematic Bacteriology*. 1 avr 1997;47(2):414-9.
258. Macheras E, Roux A-L, Bastian S, Leao SC, Palaci M, Sivadon-Tardy V, et al. Multilocus Sequence Analysis and *rpoB* Sequencing of *Mycobacterium abscessus* (*Sensu Lato*) Strains. *Journal of Clinical Microbiology*. 1 févr 2011;49(2):491-9.
259. Zelazny AM, Root JM, Shea YR, Colombo RE, Shamputa IC, Stock F, et al. Cohort Study of Molecular Identification and Typing of *Mycobacterium abscessus*, *Mycobacterium massiliense*, and *Mycobacterium bolletii*. *Journal of Clinical Microbiology*. 1 juill 2009;47(7):1985-95.
260. Nie W, Duan H, Huang H, Lu Y, Bi D, Chu N. Species identification of *Mycobacterium abscessus* subsp. *abscessus* and *Mycobacterium abscessus* subsp. *bolletii* using *rpoB* and *hsp65*, and

- susceptibility testing to eight antibiotics. *International Journal of Infectious Diseases*. août 2014;25:170-4.
261. Macheras E, Roux A-L, Ripoll F, Sivadon-Tardy V, Gutierrez C, Gaillard J-L, et al. Inaccuracy of Single-Target Sequencing for Discriminating Species of the *Mycobacterium abscessus* Group. *Journal of Clinical Microbiology*. 1 août 2009;47(8):2596-600.
262. Blauwendraat C, Dixon GLJ, Hartley JC, Foweraker J, Harris KA. The use of a two-gene sequencing approach to accurately distinguish between the species within the *Mycobacterium abscessus* complex and *Mycobacterium chelonae*. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. août 2012;31(8):1847-53.
263. Maugein J. Identification moléculaire des mycobactéries non tuberculeuses. *Revue Francophone des Laboratoires*. avr 2007;2007(391):57-62.
264. Mijs W, Vreese KD, Devos A, Pottel H, Valgaeren A, Evans C, et al. Evaluation of a Commercial Line Probe Assay for Identification of *Mycobacterium* Species from Liquid and Solid Culture. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*. 1 nov 2002;21(11):794-802.
265. Suffys PN, da Silva Rocha A, de Oliveira M, Dias Campos CE, Werneck Barreto AM, Portaels F, et al. Rapid Identification of *Mycobacteria* to the Species Level Using INNO-LiPA *Mycobacteria*, a Reverse Hybridization Assay. *J Clin Microbiol*. déc 2001;39(12):4477-82.
266. Tortoli E, Pecorari M, Fabio G, Messinò M, Fabio A. Commercial DNA Probes for *Mycobacteria* Incorrectly Identify a Number of Less Frequently Encountered Species. *J Clin Microbiol*. janv 2010;48(1):307-10.
267. Tortoli E, Nanetti A, Piersimoni C, Cichero P, Farina C, Mucignat G, et al. Performance Assessment of New Multiplex Probe Assay for Identification of *Mycobacteria*. *Journal of Clinical Microbiology*. 1 mars 2001;39(3):1079-84.
268. Roth A, Fischer M, Hamid ME, Michalke S, Ludwig W, Mauch H. Differentiation of Phylogenetically Related Slowly Growing *Mycobacteria* Based on 16S-23S rRNA Gene Internal Transcribed Spacer Sequences. *Journal of Clinical Microbiology*. 1998;36(1):139-47.
269. Tortoli E, Mariottini A, Mazzarelli G. Evaluation of INNO-LiPA MYCOBACTERIA v2: Improved Reverse Hybridization Multiple DNA Probe Assay for *Mycobacterial* Identification. *Journal of Clinical Microbiology*. 1 sept 2003;41(9):4418-20.
270. Padilla E, Gonzalez V, Manterola JM, Perez A, Quesada MD, Gordillo S, et al. Comparative Evaluation of the New Version of the INNO-LiPA *Mycobacteria* and GenoType *Mycobacterium* Assays for Identification of *Mycobacterium* Species from MB/BacT Liquid Cultures Artificially Inoculated with *Mycobacterial* Strains. *Journal of Clinical Microbiology*. 1 juill 2004;42(7):3083-8.
271. Taillard C, Greub G, Weber R, Pfyffer GE, Bodmer T, Zimmerli S, et al. Clinical Implications of *Mycobacterium kansasii* Species Heterogeneity: Swiss National Survey. *Journal of Clinical Microbiology*. 1 mars 2003;41(3):1240-4.
272. GenoType *Mycobacterium* CM | Detection and differentiation of NTM [Internet]. [cité 15 mars 2020]. Disponible sur: <https://www.hain-lifescience.de/en/products/microbiology/mycobacteria/ntm/genotype-mycobacterium-cm.html>

273. Couto I, Machado D, Viveiros M, Rodrigues L, Amaral L. Identification of nontuberculous mycobacteria in clinical samples using molecular methods: a 3-year study. *Clinical Microbiology and Infection*. août 2010;16(8):1161-4.
274. Gitti Z, Neonakis I, Fanti G, Kontos F, Maraki S, Tselentis Y. Use of the GenoType Mycobacterium CM and AS Assays To Analyze 76 Nontuberculous Mycobacterial Isolates from Greece. *Journal of Clinical Microbiology*. 1 juin 2006;44(6):2244-6.
275. Mäkinen J, Marjamäki M, Marttila H, Soini H. Evaluation of a novel strip test, GenoType Mycobacterium CM/AS, for species identification of mycobacterial cultures. *Clinical Microbiology and Infection*. mai 2006;12(5):481-3.
276. Lee AS, Jelfs P, Sintchenko V, Gilbert GL. Identification of non-tuberculous mycobacteria: utility of the GenoType Mycobacterium CM/AS assay compared with HPLC and 16S rRNA gene sequencing. *Journal of Medical Microbiology*. 1 juill 2009;58(7):900-4.
277. Richter E, Rusch-Gerdes S, Hillemann D. Evaluation of the GenoType Mycobacterium Assay for Identification of Mycobacterial Species from Cultures. *Journal of Clinical Microbiology*. 1 mai 2006;44(5):1769-75.
278. Russo C, Tortoli E, Menichella D. Evaluation of the New GenoType Mycobacterium Assay for Identification of Mycobacterial Species. *Journal of Clinical Microbiology*. 1 févr 2006;44(2):334-9.
279. Makinen J, Sarkola A, Marjamaki M, Viljanen MK, Soini H. Evaluation of GenoType and LiPA MYCOBACTERIA Assays for Identification of Finnish Mycobacterial Isolates. *Journal of Clinical Microbiology*. 1 sept 2002;40(9):3478-81.
280. Sarkola A, Mäkinen J, Marjamäki M, Marttila HJ, Viljanen MK, Soini H. Prospective evaluation of the GenoType Assay for routine identification of mycobacteria. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* [Internet]. août 2004 [cité 18 mars 2020];23(8). Disponible sur: <http://link.springer.com/10.1007/s10096-004-1168-7>
281. Ruiz P, Gutierrez J, Zerolo FJ, Casal M. GenoType Mycobacterium Assay for Identification of Mycobacterial Species Isolated from Human Clinical Samples by Using Liquid Medium. *Journal of Clinical Microbiology*. 1 août 2002;40(8):3076-8.
282. Kehrmann J, Kurt N, Rueger K, Bange F-C, Buer J. GenoType NTM-DR for Identifying Mycobacterium abscessus Subspecies and Determining Molecular Resistance: TABLE 1. McAdam AJ, éditeur. *J Clin Microbiol*. juin 2016;54(6):1653-5.
283. Plikaytis BB, Plikaytis BD, Yakrus MA, Butler WR, Woodley CL, Silcox VA, et al. Differentiation of slowly growing Mycobacterium species, including Mycobacterium tuberculosis, by gene amplification and restriction fragment length polymorphism analysis. *Journal of Clinical Microbiology*. 1992;30(7):1815-22.
284. Sajduda A, Martin A, Portaels F, Palomino JC. hsp65 PCR-restriction analysis (PRA) with capillary electrophoresis for species identification and differentiation of Mycobacterium kansasii and Mycobacterium chelonae–Mycobacterium abscessus group. *International Journal of Infectious Diseases*. mars 2012;16(3):e193-7.
285. Saifi M, Jabbarzadeh E, Bahrmand AR, Karimi A, Pourazar S, Fateh A, et al. HSP65-PRA identification of non-tuberculosis mycobacteria from 4892 samples suspicious for mycobacterial infections. *Clinical Microbiology and Infection*. août 2013;19(8):723-8.

286. Steingrube VA, Gibson JL, Brown BA, Zhang Y, Wilson RW, Rajagopalan M, et al. PCR amplification and restriction endonuclease analysis of a 65-kilodalton heat shock protein gene sequence for taxonomic separation of rapidly growing mycobacteria. *Journal of clinical microbiology*. 1995;33(1):149-53.
287. Kim H, Kim S-H, Shim T-S, Kim M, Bai G-H, Park Y-G, et al. PCR restriction fragment length polymorphism analysis (PRA)-algorithm targeting 644 bp Heat Shock Protein 65 (hsp65) gene for differentiation of *Mycobacterium* spp. *Journal of Microbiological Methods*. 2005;62(2):199-209.
288. Devallois A, Goh KS, Rastogi N. Rapid identification of mycobacteria to species level by PCR-restriction fragment length polymorphism analysis of the hsp65 gene and proposition of an algorithm to differentiate 34 mycobacterial species. *Journal of clinical microbiology*. 1997;35(11):2969-73.
289. Telenti A, Marchesi F, Balz M, Bally F, Böttger EC, Bodmer T. Rapid identification of mycobacteria to the species level by polymerase chain reaction and restriction enzyme analysis. *Journal of Clinical Microbiology*. 1993;31(2):175-8.
290. Brunello F, Ligozzi M, Cristelli E, Bonora S, Tortoli E, Fontana R. Identification of 54 Mycobacterial Species by PCR-Restriction Fragment Length Polymorphism Analysis of the hsp65 Gene. *Journal of Clinical Microbiology*. 1 août 2001;39(8):2799-806.
291. Taylor TB, Patterson C, Hale Y, Safranek WW. Routine use of PCR-restriction fragment length polymorphism analysis for identification of mycobacteria growing in liquid media. *Journal of clinical microbiology*. 1997;35(1):79-85.
292. Wu T-L, Chia J-H, Kuo A-J, Su L-H, Wu T-S, Lai H-C. Rapid Identification of Mycobacteria from Smear-Positive Sputum Samples by Nested PCR-Restriction Fragment Length Polymorphism Analysis. *Journal of Clinical Microbiology*. 1 nov 2008;46(11):3591-4.
293. Kim B-J, Hong S-K, Lee K-H, Yun Y-J, Kim E-C, Park Y-G, et al. Differential Identification of *Mycobacterium tuberculosis* Complex and Nontuberculous Mycobacteria by Duplex PCR Assay Using the RNA Polymerase Gene (rpoB). *Journal of Clinical Microbiology*. 1 mars 2004;42(3):1308-12.
294. Beenhouwer HD, Claeys G, Verschraegen G, Rouck AD, Paepe N, Elaichouni A, et al. Identification of Mycobacterium Species by Using Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis. *J CLIN MICROBIOL*. 1993;31:5.
295. Lee H, Park H-J, Cho S-N, Bai G-H, Kim S-J. Species Identification of Mycobacteria by PCR-Restriction Fragment Length Polymorphism of the rpoB Gene. *Journal of Clinical Microbiology*. 2000;38(8):2966-71.
296. Kim B-J, Lee K-H, Park B-N, Kim S-J, Bai G-H, Kim S-J, et al. Differentiation of Mycobacterial Species by PCR-Restriction Analysis of DNA (342 Base Pairs) of the RNA Polymerase Gene (rpoB). *Journal of Clinical Microbiology*. 1 juin 2001;39(6):2102-9.
297. Dobner P, Feldmann K, Rifai M, Löscher T, Rinder H. Rapid identification of mycobacterial species by PCR amplification of hypervariable 16S rRNA gene promoter region. *Journal of clinical microbiology*. 1996;34(4):866-9.
298. Package Inserts | AccuProbe Culture Identification Tests | Hologic [Internet]. [cité 16 mars 2020]. Disponible sur: <https://www.hologic.com/package-inserts/diagnostic-products/accuprobe-culture-identification-tests>

299. Alcaide F, Amlerová J, Bou G, Ceysens PJ, Coll P, Corcoran D, et al. How to: identify non-tuberculous Mycobacterium species using MALDI-TOF mass spectrometry. *Clinical Microbiology and Infection*. juin 2018;24(6):599-603.
300. Buchan BW, Riebe KM, Timke M, Kostrzewa M, Ledebner NA. Comparison of MALDI-TOF MS With HPLC and Nucleic Acid Sequencing for the Identification of Mycobacterium Species in Cultures Using Solid Medium and Broth. *American Journal of Clinical Pathology*. 1 janv 2014;141(1):25-34.
301. Pignone M, Greth KM, Cooper J, Emerson D, Tang J. Identification of Mycobacteria by Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time-of-Flight Mass Spectrometry. *Journal of Clinical Microbiology*. 1 juin 2006;44(6):1963-70.
302. 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. *Journal of Clinical Microbiology*. 1 mai 2011;49(5):1790-4.
303. Rodríguez-Sánchez B, Ruiz-Serrano MJ, Marín M, López Roa P, Rodríguez-Créixems M, Bouza E. Evaluation of Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization–Time of Flight Mass Spectrometry for Identification of Nontuberculous Mycobacteria from Clinical Isolates. Patel R, éditeur. *J Clin Microbiol*. août 2015;53(8):2737-40.
304. Huang T-S, Lee C-C, Tu H-Z, Lee SS-J. Rapid identification of mycobacteria from positive MGIT broths of primary cultures by MALDI-TOF mass spectrometry. Hasnain SE, éditeur. *PLoS ONE*. 2 févr 2018;13(2):e0192291.
305. El Khéchine A, Couderc C, Flaudrops C, Raoult D, Drancourt M. Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry Identification of Mycobacteria in Routine Clinical Practice. Heimesaat MM, éditeur. *PLoS ONE*. 13 sept 2011;6(9):e24720.
306. Lotz A, Ferroni A, Beretti J-L, Dauphin B, Carbonnelle E, Guet-Revillet H, et al. Rapid Identification of Mycobacterial Whole Cells in Solid and Liquid Culture Media by Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry. *J Clin Microbiol*. déc 2010;48(12):4481-6.
307. Fangous M-S, Mougari F, Gouriou S, Calvez E, Raskine L, Cambau E, et al. Classification Algorithm for Subspecies Identification within the Mycobacterium abscessus Species, Based on Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization–Time of Flight Mass Spectrometry. Land GA, éditeur. *J Clin Microbiol*. sept 2014;52(9):3362-9.
308. Miqueleiz-Zapatero A, Santa Olalla-Peralta C, Guerrero-Torres MD, Cardeñoso-Domingo L, Hernández-Milán B, Domingo-García D. Mycobacterium lentiflavum as the main cause of lymphadenitis in pediatric population. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2018;36(10):640-3.
309. Phelippeau M, Dubus J-C, Reynaud-Gaubert M, Gomez C, Stremmer le Bel N, Bedotto M, et al. Prevalence of Mycobacterium lentiflavum in cystic fibrosis patients, France. *BMC Pulm Med*. déc 2015;15(1):131.
310. Burgel P-R, Bellis G, Olesen HV, Viviani L, Zolin A, Blasi F, et al. Future trends in cystic fibrosis demography in 34 European countries. *European Respiratory Journal*. 1 juill 2015;46(1):133-41.



VU, LE PRESIDENT DU JURY

CAEN, LE

VU, LE DIRECTEUR DE LA FACULTE  
DES SCIENCES PHARMACEUTIQUES

CAEN, LE

L'université n'entend donner aucune approbation ni improbation aux opinions émises dans les thèses et mémoires. Ces opinions doivent être considérées comme propres à leurs auteurs.

## TITRE

Evaluation d'un changement de techniques de laboratoire pour la recherche de mycobactéries non tuberculeuses chez des patients atteints de mucoviscidose.

---

## Résumé

La décontamination des expectorations chez les patients ayant la mucoviscidose pour la recherche de mycobactéries non tuberculeuses (MNT) est indispensable pour limiter le risque de contamination des milieux de culture par la flore bactérienne. Cette décontamination au CHU de Caen se déroule en deux étapes : NaOH NALC puis ajout de l'acide oxalique. L'objectif de cette étude est de comparer le taux de contamination et la viabilité des MNT par une simple décontamination par NaOH-NALC (D1) ou une double décontamination (D2). Cette étude s'est déroulée au CHU de CAEN du 27/12/19 au 21/07/20 avec l'inclusion de 42 patients soit 76 expectorations. 4 patients (9 prélèvements) se sont révélés positifs à MNT, 2 à MABSC (déjà connus depuis plusieurs années), 1 à *M. lentiflavium* et 1 à une MNT contaminante : *M. gordonae*. Une différence du temps de croissance sur les patients positifs a été observée sur 4/9 prélèvements avec une croissance plus rapide de 10 à 14 jours en faveur de la D1 et une croissance exclusive sur la D1 pour 2 prélèvements d'une même patiente. Pour les 2 prélèvements ayant une différence de temps de croissance entre les deux types de décontamination, la moyenne de croissance sur la D1 est de 14,4 jours contre 27,8 jours pour la D2. Le taux de contamination des milieux est plus important sur la D1 : 29% versus 9% pour la D2. Le temps moyen de contamination des géloses ayant eu une D1 est de 10,6 jours. Cette étude montre que l'acide oxalique a bien un impact sur la viabilité des MNT et peut entraîner une sous-estimation du nombre de MNT identifié chez les patients ayant la mucoviscidose. Il nous semble alors indispensable de changer de techniques d'ensemencement, malgré une augmentation du temps de travail et de coût financier. A présent toutes les expectorations seront décontaminées par le protocole D1. Les prélèvements contaminés seront techniqués par la méthode D2, dans un deuxième temps si nécessaire.

---

## TITLE

EVALUATION OF A CHANGE IN LABORATORY METHODS FOR THE DETECTION OF NON-TUBERCULOUS MYCOBACTERIA IN PATIENTS WITH CYSTIC FIBROSIS.

---

## Summary

Decontamination of sputum from patients with cystic fibrosis for the detection of non-tubercular mycobacteria (NTM) is essential to limit the risk of contamination of the culture media by the bacterial flora. This decontamination in the CAEN University Hospital takes place in two stages: NaOH NALC then addition of

---

oxalic acid. The objective of this study is to compare contamination rate and viability of MNT by a simple decontamination with NaOH-NALC (D1) or double decontamination (D2). This study took place at the CAEN University Hospital from 27/12/19 to 21/07/20 with the inclusion of 42 patients, i.e. 76 sputum. 4 patients tested positive for NTM (9 samples), 2 for MABSC (already known for several years), 1 for *M. lentiflavium* and 1 for a contaminating NTM: *M. goodnae*. A difference in the growth time on positive patients was observed on a 4/9 samples with a 10 to 14-day faster growth time in favour of D1 and an exclusive push on the D1 for 2 samples from the same patient. For the 2 samples with a difference in growth time between the two types of decontamination, the average growth time on D1 is 14.4 days compared to 27.8 days for D2. The contamination rate of the media is higher on D1: 29% versus 4% on D2. The average time of contamination of agar having had a D1 is 10.6 days. This study shows that oxalic acid does have an impact on the viability of NTM and may underestimate the number of NTM identified in patient with cystic fibrosis. It seems to us then essential to change seeding techniques, despite an increase in working time and financial cost. At present, all sputum will be decontaminated by protocol D1. Contaminated samples will be treated by the D2 method, in a second step if necessary.

---

#### **Mots-clés**

Mycobactéries non tuberculeuses, MNT, mucoviscidose, décontamination, contamination, *Mycobacterium lentiflavum*, *Mycobacteroides abscessus*, viabilité