



UNIVERSITE PARIS.DIDEROT (Paris 7)
SORBONNE PARIS CITE



ECOLE DOCTORALE Bio Sorbonne Paris Cité
Laboratoire INSERM IAME UMR1137
DOCTORAT
Infectiologie

Thèse présentée par **Faïza MOUGARI**

**Étude phénotypique et génotypique de la résistance à
la clarithromycine chez *Mycobacterium abscessus*,
de la caractérisation des isolats à la thérapeutique**

Phenotypic and genotypic study of clarithromycin resistance in Mycobacterium abscessus, characterization of isolates to therapy

Thèse dirigée par le Pr Emmanuelle CAMBAU

Soutenue le 31 mai 2016

Jury

M. le Pr Jean Louis GAILLARD	Président
Mme le Pr Florence DOUCET-POPULAIRE	Rapporteur
M. le Pr Sylvain GODREUIL	Rapporteur
M. le Pr Michel ARTHUR	Examineur
Mme le Pr Isabelle SERMET-GAUDELUS	Examineur
Mme le Pr Emmanuelle CAMBAU	Directeur de thèse

ABSTRACT

This work focuses on phenotypic and genotypic characterization of clarithromycin resistance in *Mycobacterium abscessus*. This nontuberculous mycobacteria is causing infections in patients with chronic lung diseases, especially cystic fibrosis, and extra-respiratory diseases usually in a iatrogenic healthcare context. *M. abscessus* is extremely resistant to most available antibiotics with no standard effective treatment so far.

In a first draft we reviewed current literature for nontuberculous mycobacteria and *M. abscessus* infections.

As a preliminary work, we studied *M. abscessus* genotyping by a semi-automated REP-PCR DiversiLab® and identification of *M. abscessus* subspecies (*M. abscessus* subsp. *abscessus*, *M. abscessus* subsp. *bolletii* and *M. abscessus* subsp. *massiliense*) by MALDI-TOF mass spectrometry (MS). We showed that REP-PCR DiversiLab® distinguished *M. abscessus* strains but did not differentiate in subspecies. REP-PCR DiversiLab® showed that each patient is infected by a different strain but a cystic fibrosis patient is infected by the same strain over time. MALDI-TOF MS can distinguish subspecies using a specific algorithm of 5 peak analysis.

The main part of our work was the phenotypic and genotypic study of clarithromycin resistance mechanisms for *M. abscessus* with two approaches: one descriptive including clinical strains, the other done through *in vitro* mutant selection to mimic what happens in patients in case of treatment failure. In the clinical study, we studied also resistance to other antibiotics especially amikacin (second important antibiotic).

For both approaches, phenotypic and genotypic studies have been done with success with the description of new resistance mechanisms. The majority of mutants and resistant clinical strains had mutations of 23S rRNA or in ribosomal proteins part of the interaction site with clarithromycin. Nevertheless, some mutants showed a high level resistance without modification of ribosomal 50S subunit. These mutants were compared to the parental strains and existing genomes by whole genome sequencing.

Knowledge of resistance mechanisms to clarithromycin and amikacin allowed us to develop a molecular diagnostic test prototype based on multiplex PCR and hybridization probes assay developed with the industrial Hain LifeScience (GenoType NTM-DR). The clinical evaluation in our laboratory gave highly satisfactory results. This diagnostic test is now commercially available.

In conclusion, our work solved difficulties of phenotypic and genotypic approaches for clarithromycin resistance in *M. abscessus*, showing that natural inducible resistance was due to *erm(41)* gene polymorphism unequally distributed among subspecies and that acquired resistance was mainly related to changes in the 50S subunit of the mycobacterial ribosome. We have developed new tools for diagnosis and epidemiological surveillance of *M. abscessus* infection. This will increase our knowledge of these infections and lead to new therapeutic trials.

RÉSUMÉ

Notre travail de Thèse de sciences porte sur la caractérisation phénotypique et génotypique de la résistance à la clarithromycine (antibiotique indispensable pour le traitement) chez *Mycobacterium abscessus*. Cette mycobactérie non tuberculeuse est responsable d'infections pulmonaires chroniques, en particulier chez les patients atteints de mucoviscidose, et d'infections extra-pulmonaires nosocomiales, le plus souvent iatrogènes. *M. abscessus* se distingue par son extrême résistance aux antibiotiques et on ne connaît pas aujourd'hui de traitement efficace.

La partie bibliographique synthétise les données bactériologiques et médicales sur les mycobactéries non tuberculeuses (MNT) et *M. abscessus* en particulier.

Comme travail préliminaire, nous avons étudié le génotypage de *M. abscessus* par une méthode de REP-PCR standardisée et l'identification des sous-espèces de *M. abscessus* (*M. abscessus* subsp. *abscessus*, *M. abscessus* subsp. *bolletii* et *M. abscessus* subsp. *massiliense*) par spectrométrie de masse MALDI-TOF. Nous avons pu montrer que la REP-PCR DiversiLab® distinguait les souches de *M. abscessus* mais pas les sous-espèces. La REP-PCR DiversiLab® a montré que les malades étaient infectés par des souches différentes mais qu'un malade atteint de mucoviscidose conservait la même souche au cours du temps. A l'opposé, la spectrométrie de masse MALDI-TOF permet de distinguer les sous-espèces (en suivant un algorithme basé sur la reconnaissance de 5 pics) mais pas les souches.

La partie principale de la thèse est l'étude de la résistance à la clarithromycine chez *M. abscessus* avec deux approches: l'une descriptive portant sur des souches cliniques, l'autre expérimentale à travers un modèle de sélection de mutants *in vitro* pour mimer ce qui se passe en cas d'échec de traitement. Dans le cas des souches cliniques, nous y avons ajouté l'étude de la résistance aux autres antibiotiques en particulier à l'amikacine, second antibiotique indispensable au traitement.

Pour les deux approches, les études phénotypiques et génotypiques ont été menées avec succès avec la description de nouveaux mécanismes de résistance. La majorité des mutants et des souches cliniques résistantes à la clarithromycine avaient des mutations de l'ARNr 23S ou des protéines ribosomales englobant le site d'interaction avec la clarithromycine. Certains montraient néanmoins une résistance de haut niveau sans mutation de la sous-unité 50S du ribosome. Ces mutants ont été comparés aux souches parentales et aux génomes existants par séquençage haut débit.

La connaissance des mécanismes de résistance à la clarithromycine et à l'amikacine nous a permis de développer un prototype de test moléculaire diagnostique à base de PCR multiplex et sondes d'hybridation que nous avons réalisé en collaboration avec l'industriel Hain LifeScience (GenoType NTM-DR). Le prototype a été évalué au laboratoire avec des résultats de performance très satisfaisants. Ce test est désormais commercialisé.

En conclusion, notre travail a permis de résoudre les difficultés de l'approche phénotypique et génotypique de la résistance à la clarithromycine chez *M. abscessus* en montrant que la résistance naturelle ou inductible était due au polymorphisme du gène *erm(41)* distribué inégalement entre les sous-espèces, et que la résistance acquise était principalement liée aux modifications de la sous-unité 50S du ribosome mycobactérien. Nous avons développé de nouveaux outils pour le diagnostic et la surveillance épidémiologique des infections à *M. abscessus*. Ceci permettra de progresser dans la connaissance de ces infections et de pouvoir conduire des essais thérapeutiques.