

A black and white photograph of a petri dish containing numerous white, circular fungal colonies of varying sizes. The colonies are densely packed in some areas and more sparse in others. The background is dark, making the white colonies stand out. The text is overlaid on the image.

**Rapport annuel  
d'activité**

**2018**

**Centre national de  
référence Mycoses Invasives  
et Antifongiques**

**Année d'exercice  
2017**

**Responsables**

Pr. Françoise Dromer  
Pr. Stéphane Bretagne, adjoint  
Pr. Olivier Lortholary, adjoint

**Collaborateurs**

M. Alexandre Alanio, médecin mycologue  
Mme Anne Boullié, technicienne  
Mme Reine Bouyssié, assistante  
Mme Marie Desnos-Ollivier, ingénieur  
Mme Dea Garcia-Hermoso, ingénieur  
Mme Cécile Gautier, technicienne  
Mme Fanny Lanternier, médecin clinicien  
Mme Karine Sitbon, médecin d'études cliniques

<b>RESUME ANALYTIQUE .....</b>	<b>1</b>
<b>SUMMARY .....</b>	<b>2</b>
<b>1 MISSIONS ET ORGANISATION DU CNR .....</b>	<b>3</b>
<b>2 ACTIVITES D'EXPERTISE .....</b>	<b>3</b>
2.1 ÉVOLUTIONS DES TECHNIQUES .....	3
2.2 TRAVAUX D'ÉVALUATION DES TECHNIQUES, REACTIFS ET TROUSSES .....	4
2.3 TECHNIQUES TRANSFEREES VERS D'AUTRES LABORATOIRES .....	4
2.4 COLLECTIONS DE MATERIEL BIOLOGIQUE .....	4
2.5 ACTIVITES D'EXPERTISE .....	5
2.5.1 Expertise 2017 sur les levures .....	6
2.5.2 Expertise 2017 sur les champignons filamenteux .....	9
2.5.3 Expertise 2017 sur la sensibilité aux antifongiques .....	13
2.5.4 Expertise 2017 sur les mycoses endémiques .....	14
2.5.5 Expertise 2017 en anatomopathologie .....	15
2.5.6 Expertise 2017 pour les diagnostics moléculaires .....	15
2.6 ACTIVITES DE SEQUENÇAGE .....	16
<b>3 ACTIVITES DE SURVEILLANCE .....</b>	<b>16</b>
3.1 DESCRIPTION DU RESEAU DE PARTENAIRES .....	17
3.2 SURVEILLANCE DE L'ÉVOLUTION ET DES CARACTERISTIQUES DES INFECTIONS .....	19
3.2.1 Cryptococcoses .....	20
3.2.2 Fongémies .....	21
3.2.3 Pneumocystoses .....	22
3.2.4 Mucormycoses .....	23
3.2.5 Aspergilloses .....	24
3.2.6 Fusarioses .....	26
3.3 SURVEILLANCE DE LA RESISTANCE DES AGENTS PATHOGENES AUX ANTI-INFECTIEUX .....	26
3.3.1 Définitions utilisées pour exprimer la résistance .....	27
3.3.2 Résultats de la surveillance des résistances aux antifongiques pour les levures .....	28
3.3.3 Résultats de la surveillance des résistances aux antifongiques pour les filamenteux .....	30
3.3.4 Analyse des tendances .....	33
3.4 INTERFACES AVEC LES RESEAUX DE SURVEILLANCE NATIONAUX OU INTERNATIONAUX .....	34
3.5 ENQUETES OU ETUDES PONCTUELLES CONCOURANT A LA SURVEILLANCE .....	35
Mise en place de technique de génotypage de <i>Trichosporon asahii</i> .....	35
<b>4 ALERTE .....</b>	<b>37</b>
Cas groupés d'infections à <i>Magnusiomyces capitatus</i> .....	37
<b>5 ACTIVITES DE RETRO-INFORMATION, DE FORMATION ET DE CONSEIL .....</b>	<b>38</b>
5.1 CONSEIL ET EXPERTISE AUX PROFESSIONNELS DE SANTE .....	38
5.2 CONSEIL ET EXPERTISE AUX AUTORITES SANITAIRES .....	39
<b>6 TRAVAUX DE RECHERCHE ET PUBLICATIONS EN LIEN DIRECT AVEC L'ACTIVITE DU CNR .....</b>	<b>40</b>
6.1 ACTIVITES DE RECHERCHE EN 2017 EN LIEN DIRECT AVEC LES MISSIONS ET ACTIVITES DU CNR .....	40
6.1.1 Études concernant la cryptococcose .....	40
Etude PreCASA .....	40
Etude ACTA .....	40
6.1.2 Études concernant la pneumocystose .....	41
6.1.3 Études concernant les candidoses et autres fongémies à levures .....	42
Fongémies dues aux espèces fréquentes de <i>Candida</i> spp .....	42
Fongémies dues aux levures rares .....	42
Endocardites à <i>Candida</i> spp .....	43
Traitement des candidémies sévères .....	43
Traitement des péritonites à <i>Candida</i> spp .....	43
6.1.4 Aspergilloses et autres infections à champignons filamenteux .....	43
6.1.5 Études concernant les techniques d'identification et la phylogénie .....	44

Amélioration des techniques d'identification des champignons « barcoding » .....	44
Analyse des souches du genre <i>Fusarium</i> .....	44
Étude Européen sur la diversité de coelomycètes responsables des infections chez l'homme .....	44
<b>6.2 LISTE DES PUBLICATIONS ET COMMUNICATIONS EN LIEN DIRECT AVEC LES MISSIONS ET ACTIVITES DU CNR ...</b>	<b>45</b>
6.2.1 <i>Publications nationales</i> .....	45
6.2.2 <i>Publications internationales</i> .....	45
6.2.3 <i>Communications nationales</i> .....	47
6.2.4 <i>Communications internationales</i> .....	47
6.2.5 <i>Conférences sur invitations</i> .....	48
<b>7 COOPERATION AVEC LES LABORATOIRES DE SANTE ANIMALE, D'HYGIENE ALIMENTAIRE, ENVIRONNEMENTAUX.....</b>	<b>48</b>
<b>8 PROGRAMME D'ACTIVITE POUR LES ANNEES SUIVANTES.....</b>	<b>48</b>
<b>9 LISTE DES COLLABORATEURS DU CNRMA.....</b>	<b>49</b>
9.1 CC-CNRMA FORMANT RESSIF.....	49
9.2 CENTRES PARTICIPANTS A L'ODL.....	49
9.3 PARTICIPANTS A LA SURVEILLANCE DES MYCOSES INVASIVES EN 2017.....	49
<b>ANNEXE 1 : MISSIONS &amp; ORGANISATION DU CNR .....</b>	<b>51</b>
1.1. MISSIONS DU CNR ET DE SES EVENTUELS LABORATOIRES ASSOCIES .....	51
1.2. ORGANISATION DU CNR ET DE SES EVENTUELS LABORATOIRES ASSOCIES.....	51
Composition de l'équipe.....	51
1.3. LOCAUX ET EQUIPEMENTS .....	52
1.4. COLLECTIONS DE MATERIEL BIOLOGIQUE.....	53
Collections de levures.....	54
Collection de champignons filamenteux .....	55
Collection d'images numériques .....	55
Collection d'ADN génomique .....	55
Base de données de séquences : Institut Pasteur FungiBank.....	55
Collection de sérums .....	56
1.5. DEMARCHE QUALITE DU LABORATOIRE .....	56
<b>ANNEXE 2 : CAPACITES TECHNIQUES DU CNR.....</b>	<b>58</b>
2.1. LISTE DES TECHNIQUES DE REFERENCE .....	58
Techniques pour le diagnostic, l'identification et l'évaluation de la sensibilité aux antifongiques.....	58
Techniques mises en place en 2017 .....	58
2.2. LISTE DES MARQUEURS EPIDEMIOLOGIQUES DISPONIBLES.....	58
2.3. LISTE DES TECHNIQUES RECOMMANDEES PAR LE CNR.....	59
Identification des champignons .....	59
Diagnostic des mycoses endémiques .....	60
Détermination de la sensibilité aux antifongiques des isolats de champignons pathogènes.....	61
Désinfection des surfaces.....	61

## Résumé analytique

Les missions du Centre National de Référence des Mycoses invasives et Antifongiques (CNRMA) sont l'expertise sur les champignons pathogènes responsables de mycoses invasives et la surveillance épidémiologique et microbiologique des mycoses invasives incluant les pneumocystoses. La majorité de ces missions sont assurées à l'Institut Pasteur dans l'unité de Mycologie Moléculaire (Pr. F. Dromer), mais les diagnostics moléculaires sont réalisés dans le service de Parasitologie-Mycologie de l'hôpital Saint-Louis (Pr. S. Bretagne) tandis que l'expertise anatomopathologique est effectuée dans la plateforme dédiée de l'unité de Neuropathologie Expérimentale à l'Institut Pasteur (Pr. F. Chrétien) et les avis thérapeutiques dans le service de Maladies Infectieuses et Tropicales de l'hôpital Necker-Enfants Malades (Pr. O. Lortholary).

En 2017, l'expertise a porté sur 900 isolats (levures, filamenteux, champignons dimorphiques reçus au cours de l'année pour lesquels nous avons effectué l'identification par approche polyphasique et la détermination de la sensibilité à huit antifongiques selon la méthode EUCAST), ainsi que des liquides biologiques ou tissus pour des diagnostics moléculaires (n=266) ou anatomopathologiques (n=42). Les nouvelles identifications et la veille taxonomique permettent au CNRMA d'alimenter et de mettre à jour la base de séquences « Institut Pasteur FungiBank ».

Le CNRMA a mis en place en 2012 le réseau de centres collaborateurs du CNRMA (les CC-CNRMA) et l'a agrandi en 2017. Les 29 CC-CNRMA forment le RESeau de Surveillance des Infections Fongiques invasives (RESSIF). RESSIF collecte, de façon active et pérenne, toutes les informations sur les infections fongiques invasives probables ou prouvées et les isolats correspondants des espèces non communes et, pour les espèces communes, les isolats de sensibilité diminuée à au moins un antifongique. L'Observatoire des Levures (ODL) mis en place en 2002 en région parisienne surveille de façon plus spécifique les fongémies à levures et collecte tous les isolats pour les caractériser de façon standardisée. Le site de déclaration en ligne a été remodelé et permet maintenant à tout clinicien ou mycologue qui le souhaite de participer à la surveillance indépendamment des réseaux de surveillance active (RESSIF ou ODL). Nous avons complété l'analyse en 2017 des données de l'ODL (Bretagne *et al.* JAC 2017 ; et Lortholary *et al.* Intensive Care Med. 2017). La base RESSIF comprend actuellement 8806 cas d'infections fongiques invasives, et représente une base unique au plan international que nous avons commencé à « nettoyer » pour analyser les 5 premières années.

Le CNRMA continue à investiguer les cas groupés d'infections dues à des espèces rares en utilisant le séquençage de génomes entiers grâce à la plateforme mise en place à l'Institut Pasteur. L'utilisation d'un panel de souches comprenant la souche type de l'espèce et des isolats épidémiologiquement liés ou non, et de souches historiques de sa collection a permis notamment d'affirmer l'absence d'un clone unique lors de la survenue de cas groupés de fongémies dus à *Magnusiomyces capitatus* dans un même centre hospitalier en 2017.

## Summary

The missions of the NRCMA combine expertise on pathogenic fungi responsible for invasive fungal infections (IFIs) and the microbiological and epidemiological surveillance of all IFIs including pneumocystoses. Most of the missions are fulfilled at Institut Pasteur in the molecular Mycology unit (head, Pr. F. Dromer), or in the Experimental Neurophatology unit for the histopathology expertise (head Pr. F. Chrétien), whereas molecular diagnoses are performed at Hopital Saint Louis (parasitology-mycology laboratory, head Pr. S. Bretagne), and therapeutic advice at Hôpital Necker (Infectious Diseases and Tropical Medicine ward, head Pr. O. Lortholary).

In 2017, the NRCMA performed expertise on 900 isolates (characterization) and 312 biological specimen or tissues (molecular or histopathological diagnoses) and provided 3 to 5 daily therapeutic advice. The expertise on the isolates included identification by polyphasic approach (morphology, MALDI-TOF and DNA sequencing of multiple loci) and susceptibility to eight antifungal drugs by the EUCAST method. Nucleotide sequences obtained from newly identified isolates are uploaded in the Institut Pasteur FungiBank database that we launched in 2015.

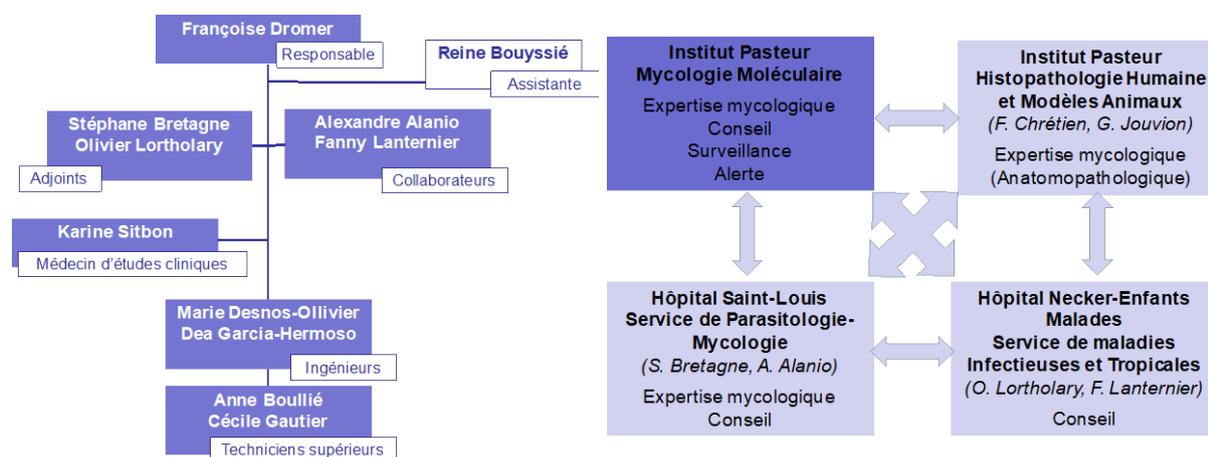
The network of collaborative centers called RESSIF (RESeau de Surveillance des Infections Fongiques) has expanded since 2012. It now includes 29 hospitals from remote regions of metropolitan France and the ultramarine territories that notify all their cases of proven or probable IFIs to the NRCMA. The notifications are made on a secured website administered at the NRCMA. The centers send also the isolates (all the non-common species or the common species with abnormal susceptibility to one or more antifungal drugs). The YEASTS program (Observatoire Des Levures) launched in 2002 continues with 14 participating centers that notify their cases of yeast fungemia and send all the corresponding isolates. The third source of information in IFIs is the passive notification when isolates are sent for expertise. Any clinician or mycologist/microbiologist willing to participate in the surveillance of IFIs can request parameters allowing notification on line on the “renovated” website. In 2017, we continued the data analysis from the YEASTS program (Bretagne *et al.* JAC 2017; et Lortholary *et al.* Intensive Care Med. 2017) and have started to clean the first 5 years of the very unique RESSIF database that now includes 8806 IFIs.

In 2017, the NRCMA has been involved in the investigation of a few grouped cases. We used whole genome sequencing and the bioinformatics analysis provided at the dedicated P2M platform at Institut Pasteur. Large panels of strains including epidemiologically related and unrelated strains, recently isolated or present in the collection as well as type strain allowed us to uncover for example that a single clone of *Magnusiomyces capitatus* was not involved in the occurrence of several cases of fungemia in the same hospital.

# 1 Missions et organisation du CNR

Le cahier des charges du CNR Mycoses invasives et Antifongiques (CNRMA) comprend l'expertise mycologique sur les champignons responsables de mycoses invasives incluant les pneumocystoses, la surveillance épidémiologique de toutes les mycoses invasives incluant les pneumocystoses et la participation aux alertes et activité de conseils.

Le CNRMA est situé au sein de l'unité de Mycologie Moléculaire de l'Institut Pasteur. Il n'a pas de laboratoire associé. La diversité des missions du CNRMA et des genres/espèces pathogènes nous a conduit à une organisation dans laquelle les "équipes" composées d'un ingénieur et d'un technicien associés à au moins l'un des responsables ou collaborateurs du CNR se spécialisent dans certaines thématiques (expertise sur les filamenteux, les levures, la détermination de la sensibilité aux antifongiques, génotypage, mise au point de techniques d'identification ou de typage, surveillance, ...). La continuité de l'expertise globale est bien sûr assurée en cas d'absence de l'un des membres de l'équipe. La composition de l'équipe et l'organisation fonctionnelle du CNRMA sont décrites ci-dessous (**Figure 1**). Il faut ici noter que certaines activités se font en dehors de l'unité de mycologie moléculaire, soit sur le campus de l'Institut Pasteur (expertise anatomopathologique), soit dans les services des collaborateurs et adjoints hospitalo-universitaires (Saint-Louis – diagnostics moléculaires, et Necker-Enfants Malades – avis thérapeutiques).



**Figure 1 : Organigramme fonctionnel du CNRMA**

Le CNR a été accrédité selon la norme NF EN ISO 15189 en mars 2015 (n°8-2588). La portée d'accréditation est visible sur le site du [COFRAC](#). Le CNR poursuit la démarche d'accréditation selon les conditions imposées par la Loi du 30 mai 2013 (2013-442).

*Les détails sont disponibles dans l'annexe 1.*

## 2 Activités d'expertise

Le CNRMA a reçu, en 2017, 900 souches dans le cadre de demande d'expertise ou de réseau de surveillance. Aux expertises réalisées au CNRMA se sont ajoutées celles réalisées dans l'unité Neuropathologie Expérimentale dirigée par le Pr. F. Chrétien sur les prélèvements anatomopathologiques et celles réalisées sur le site de Saint-Louis (SLS) dans le laboratoire de Parasitologie-Mycologie dirigé par le Pr. S. Bretagne pour le diagnostic moléculaire sur échantillon biologique.

### 2.1 Évolutions des techniques

Le CNRMA continue à développer les outils d'identification des champignons d'espèces rares pour lesquelles les caractéristiques morphologiques sont insuffisamment discriminantes et les séquences disponibles dans les bases de données inexistantes ou non fiables. Les identifications d'espèces réalisées par MALDI-TOF sont systématiquement contrôlées par séquençage nucléotidique d'un ou plusieurs loci,

dès lors qu'il s'agit d'une espèce rare ou d'identification difficile ou incertaine.

Le CNRMA utilise maintenant les données issues du séquençage des génomes entiers pour comparer les souches dans le cadre d'investigation de cas groupés d'infections invasives liées à des espèces rares.

## 2.2 Travaux d'évaluation des techniques, réactifs et trousses

Le diagnostic de la pneumocystose nécessite une quantification la plus précise possible dans la mesure où de cette quantification peut dépendre l'attitude thérapeutique. Une comparaison de 4 tests qPCR personnels et de 6 kits commerciaux a été réalisée et présentée comme poster au 8th TIMM<sup>1</sup>. Ces tests comportaient des étapes d'extraction différentes (acides nucléiques totaux versus ADN seulement) et ciblaient des gènes différents. Six tests présentaient une sensibilité et une spécificité de 100%. Quatre tests ne détectaient pas la dernière dilution d'ADN de *Pneumocystis* et un test présentait un faux positif. Les tests basés sur l'extraction d'acides nucléiques totaux suivis d'une reverse transcription donnaient des quantifications supérieures et semblent donc devoir être privilégiés. Pour la cible, le gène mitochondrial mtSSU présentait la meilleure sensibilité. Ces comparaisons sont indispensables pour harmoniser les résultats pour une interprétation clinique consensuelle.

## 2.3 Techniques transférées vers d'autres laboratoires

Le CNRMA n'a pas transféré de techniques en 2017. En revanche il a enrichi la base de données de séquences, Institut Pasteur Fungibank (<http://fungibank.pasteur.fr/>), constituée des séquences ADN de pathogènes fongiques (levures et champignons filamenteux) associés aux données de CMI. Cette base de données est publique, accessible sans mot de passe pour l'utilisateur. Les centres collaborateurs du CNRMA peuvent obtenir des paramètres de connexion qui leur donnent accès à davantage d'information et de séquences.

La base contient actuellement 1860 séquences (ITS, 26S, IGS, actine, FKS) pour 1698 souches de levures et 1952 séquences (18S, 28S, ITS, calmoduline, actine,  $\beta$ -tubuline, EF1- $\alpha$ , RPB1, RPB2, CYP51A) pour 934 souches de champignons filamenteux. La base de données est implémentée régulièrement avec les nouvelles données disponibles.

## 2.4 Collections de matériel biologique

Les collections telles que décrites dans l'annexe 1 se sont enrichies des souches reçues au cours de l'année. Elles comprennent depuis 2002 des souches de :

- Levures correspondant à 28 genres et 103 espèces différentes (1 à près de 3000 isolats/espèce) comprenant plus de 4900 souches collectées dans le cadre de l'Observatoire des Levures, près de 2500 souches d'autres sites profonds ou superficiels, et plus de 3000 souches de cryptocoques, auxquels s'ajoutent des souches de référence achetées dans des collections internationales.
- Champignons filamenteux correspondant à 93 genres et 349 espèces différentes (1 à 313 isolats/espèce) avec près de 3000 souches d'origine clinique y compris des champignons dimorphiques stockés en P3 et des souches de référence achetées dans des collections internationales.
- Le CNR a distribué une soixantaine de souches des champignons filamenteux essentiellement dans le cadre d'une étude phylogénétique internationale.

---

<sup>1</sup> Maud Gits-Muselli, et al, Mycoses.2017;60(suppl 2):110-111

## 2.5 Activités d'expertise

Le CNRMA a reçu sur le site IP/CNRMA 900 échantillons dont une faible proportion n'était pas conforme à ses missions [(mycoses superficielles (n=14) et demandes de sérologies (n=10)], et d'autres (n=39) dont l'identification n'a pu aboutir immédiatement car ils contenaient des mélanges de plusieurs espèces nécessitant purification avant analyse (n=8) ou des souches non viables (n=31) dont certaines n'ont pas été retrouvées par les laboratoires expéditeurs. Enfin certains échantillons correspondaient à des expertises faites à SLS ou en anatomopathologie, et d'autres échantillons ont été reçus directement à SLS ou sur le site IP/anatomopathologie.

L'expertise clinique est difficilement chiffrable, mais les cliniciens du CNRMA sont sollicités par mail ou téléphone 3 à 5 fois/ jour.

Au total, l'activité d'expertise est résumée dans le tableau suivant (**Tableau 1**) qui ne prend pas en compte la veille taxonomique impliquant la reprise de certaines souches en complément d'identification en raison de changement taxonomique par exemple.

**Tableau 1 : Résumé de l'activité d'expertise en 2017**

TYPE D'EXPERTISE	Levures (n= 554)	Filamenteux (n=263)	Classe 3 (n=13)
<b>Expertise sur les souches</b>			
MALDI-TOF	554		
Détermination de la sensibilité aux antifongiques	554	238	
Séquençage Sanger (>2 régions/souches)	191	263	13
<b>Typage</b>			
qPCR de <i>Saprochaete clavata</i>	19		
MLST de <i>Candida tropicalis</i>	11		
Ploïdie et typage de <i>Cryptococcus neoformans</i>	69		
Microsatellites <i>C. albicans</i> (5 marqueurs)	8		
Microsatellites <i>C. glabrata</i> (5 marqueurs)	2		
Microsatellites <i>C. parapsilosis</i> (3 marqueurs)	11		
<b>Recherche de mutations</b>			
FKS	10		
CYP51		7	
NGS	120		
<b>Expertise anatomopathologique</b>		42	
<b>Diagnostic moléculaire</b>			
Histoplasmose		254	
Coccidioidomycose		12	
<b>Avis thérapeutiques</b>		3 à 5 / jour	

En volume, l'activité de laboratoire du CNRMA est stable mais le nombre de séquences réalisées a augmenté en raison de l'utilisation d'un plus grand nombre de loci pour les identifications. Plus de 90% des isolats de champignons filamenteux identifiés sont testés pour leur sensibilité aux antifongiques et quasiment 100% des levures. L'absence de détermination des CMI est uniquement liée à des problèmes techniques (absence de fructification, champignon de classe 3).

L'activité d'expertise est associée à *un rapport envoyé au correspondant dans les 10 jours suivants*. Ce résultat est final dans la grande majorité des cas (sauf pour le typage ou la recherche de mutation et une partie des filamenteux). Si ce n'est pas le cas, un résultat préliminaire avec le profil de sensibilité aux antifongiques est envoyé dans ce délai de 10 jours. Les résultats finaux sur l'identification de l'espèce ou le typage sont envoyés dès qu'ils sont disponibles. Le pôle d'identification des pathogènes au sein de la CIBU (cellule d'intervention biologique d'urgence) nous fournit dans la demi-journée les

chromatogrammes pour les urgences définies au CNRMA, ce qui nous permet de donner une réponse au correspondant moins de 48h après réception de l'isolat.

Toute demande d'expertise est systématiquement accompagnée d'une fiche de demande d'expertise (modifiée en 2017 et disponible sur le site web du CNRMA). En l'absence d'information sur une souche provenant d'un prélèvement profond, le correspondant est systématiquement contacté par téléphone pour obtenir les informations manquantes. Les demandes non conformes entraînent l'envoi d'un courrier au laboratoire expéditeur et sont classées au bout d'un mois en l'absence de réponse. En 2017, 14 demandes (1.5%) étaient non conformes car ne correspondant pas aux missions du CNR (mycoses superficielles, expertise relevant d'un LABM), et 10 (1%) concernaient des demandes de sérologies des mycoses exotiques, technique arrêtée pour manque de fiabilité depuis 2015.

La quasi-totalité des échantillons était en provenance de France Métropolitaine (94%) ou des DOM-TOM (5%). Six demandes nous sont parvenues de l'étranger cette année (Italie) dans le cadre de notre expertise sur *Geotrichum* spp pour l'investigation d'une série de cas groupés dans une institution.

Les souches proviennent des laboratoires hospitaliers, en raison même des missions du CNRMA qui couvrent uniquement les mycoses invasives. Les isolats reçus avaient été en majorité cultivés à partir du sang (54%), d'échantillons pulmonaires (16%), cutanés (7%), liquides céphalo-rachidiens (4%), échantillons oculaires (6%), ORL (4%), osseux (4%) ou digestifs (2%). Des précisions sont données plus loin en fonction de l'expertise microbiologique requise.

### **Expertise 2017 sur les levures**

Les levures provenaient essentiellement d'hémocultures (80%), mais aussi des poumons (5,2%), du système nerveux central (4,9%), de lésions ostéo-articulaires (2,5%), de l'appareil digestif (2,4%), des urines (1,6%) et de la peau (1,5%).

Le niveau de caractérisation pour les 554 levures identifiées (correspondant à 40 genres et espèces différents) est celui décrit précédemment. Nous avons donc réalisé :

- ✓ Une analyse phénotypique : pureté sur milieu chromogène, profil protéique par MALDI-TOF, et en fonction du genre ou espèce suspectés, activité uréase, température de croissance, fermentation de certains sucres, croissance en milieux hyperosmolaires, croissance sur milieu CGB, cultures sur lame pour l'observation de structures particulières.
- ✓ Une identification moléculaire pour tous les isolats d'espèces communes ayant un profil protéique inhabituel, et pour toutes les espèces de levures moins fréquentes voire rares, soit 191 isolats avec amplification d'un ou plusieurs loci :
  - Régions ITS1-5.8S-ITS2 (142 isolats)
  - Région D1D2 de la sous-unité 26S (84 isolats)
  - Amplification de la région IGS1 (10 isolats de *Trichosporon* spp.)
  - Amplification du gène codant l'actine (19 isolats de *Clavispora lusitaniae*)
  - Amplification d'une partie du gène RPBI (9 isolats de *Meyerozyma guilliermondii* et 1 isolat de *Meyerozyma caribbica*)
- ✓ Un profil de sensibilité des souches aux 8 antifongiques pour 546 isolats (certaines souches ne se développant pas dans les milieux tests, les CMI ne peuvent être analysées, et par ailleurs, hors contexte particulier, les CMI ne sont déterminées que pour l'un des isolats en cas de cryptococcose disséminée)
- ✓ Un typage MLST pour rechercher le clone 5FC-R pour 11 isolats de *C. tropicalis* résistants à la 5FC (9 patients, 11 souches différentes du clone R-5FC)
- ✓ Le séquençage des gènes *Fks* pour 10 isolats, résistants aux échinocandines ou liés épidémiologiquement à des isolats résistants.
- ✓ L'identification en urgence d'isolats de *Geotrichum* spp. et/ou du clone épidémique de 2012 pour

ceux adressés comme *Saprochaete clavata* a été réalisée sur 19 isolats et a abouti à l'identification finale de *Saprochaete clavata* (n=13), *Magnusiomyces capitatus* (n=6). La PCR en temps réel mise au point au CNRMA a permis de donner un résultat dans la journée suivant la réception de la souche pour les isolats suspects avec donc identification de 13 isolats de *S. clavata* (7 de France et 6 d'Italie), aucune ne correspondant au clone épidémique de 2012 ou au clone B.

- ✓ La détermination de la ploïdie et le sérotypage de 69 souches de *Cryptococcus* sp. aboutissant à la caractérisation de 66 souches de *Cr. neoformans* (53 sérotype A, 7 sérotype D, 5 AD) et aucune souche de *Cr. gattii*.

La détermination de certains caractères phénotypiques peut paraître obsolète alors que les techniques moléculaires et le MALDI-TOF sont accessibles à tous. Elle est fondamentale pour constituer une base de données fiable et une collection de souches bien caractérisées. Rappelons que l'identification des espèces au sein des complexes d'espèces n'a pas nécessairement d'intérêt pour la prise en charge des patients. En revanche, c'est tout l'intérêt du CNR dont l'expertise permet de caractériser ces espèces rares et de colliger les données cliniques correspondantes, pour, à terme, déterminer si ces espèces sont associées à des pathologies de présentations ou de pronostics différents justifiant leur identification en routine.

**Tableau 2: Dénominations taxonomiques pour les levures**

Espèce actuelle	Synonyme usité en clinique	Autre synonyme
<i>Candida albicans</i>	<i>Candida africana</i>	<i>Candida albicans</i>
<i>Candida duobushaemulonii</i>	<i>Candida haemulonii*</i>	<i>Candida haemulonii</i> type II
<i>Clavispora lusitaniae</i>	<i>Candida lusitaniae</i>	
<i>Cyberlindnera fabianii</i>	<i>Candida fabianii</i>	
<i>Cyberlindnera jadinii</i>	<i>Candida utilis</i>	<i>Pichia jadinii</i>
<i>Cryptococcus neoformans</i>	<i>Cryptococcus neoformans</i>	<i>Cryptococcus neoformans</i> var. <i>neoformans**</i>
<i>Cryptococcus gattii</i>		<i>Cryptococcus neoformans</i> var. <i>grubii**</i> <i>Cryptococcus neoformans</i> var. <i>gattii</i>
<i>Debaryomyces hansenii</i>	<i>Candida famata</i>	
<i>Diutina catenulata</i>	<i>Candida catenulata</i>	
<i>Diutina rugosa</i>	<i>Candida rugosa</i>	
<i>Galactomyces candidus</i>	<i>Geotrichum candidum</i>	
<i>Kazachstania pintolopesii</i>		<i>Candida pintolopesii</i>
<i>Kluyveromyces marxianus</i>	<i>Candida kefir</i>	
<i>Kodamaea ohmeri</i>	<i>Candida ohmeri</i>	<i>Pichia ohmeri</i>
<i>Kluyveromyces lactis</i>	<i>Candida sphaerica</i>	
<i>Magnusiomyces capitatus</i>	<i>Geotrichum capitatum</i>	
<i>Meyerozyma caribbica</i>	<i>Candida fermentati</i>	
<i>Meyerozyma guilliermondii</i>	<i>Candida guilliermondii</i>	<i>Pichia guilliermondii</i>
<i>Pichia kudriavzevii</i>	<i>Candida krusei</i>	<i>Issatchenkia orientalis</i>
<i>Saprochaete clavata</i>	<i>Geotrichum clavatum</i>	
<i>Torulasporea delbrueckii</i>	<i>Candida colliculosa</i>	
<i>Wickerhamomyces anomalus</i>	<i>Candida pelliculosa</i>	<i>Pichia anomala</i>
<i>Wickerhamiella pararugosa</i>	<i>Candida pararugosa</i>	
<i>Yarrowia lipolytica</i>	<i>Candida lipolytica</i>	

\* *C. haemulonii* et *C. duobushaemulonii* sont deux espèces distinctes \*\**C. neoformans* var. *grubii* correspond au sérotype A et *C. neoformans* var. *neoformans* au sérotype D

Nous avons poursuivi la constitution d'une base de données complète (caractères phénotypiques CMI et séquences) dans BioloMICS, et alimenté la nouvelle base de données Institut Pasteur FungiBank. Il faut noter que de constantes révisions taxonomiques entraînent des changements de noms, y compris pour des

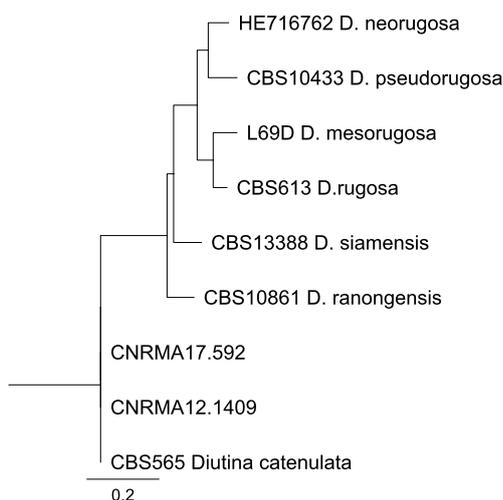
espèces courantes (**Tableau 2**). En tant que Centre de Référence, le CNRMA se doit de donner les noms taxonomiques en vigueur, mais maintient dans le compte-rendu le nom d'usage de façon à ne pas perturber l'interprétation des résultats par les cliniciens ou mycologues/microbiologistes non experts de ce domaine très spécialisé.

Outre les espèces fréquentes (*Candida albicans*, *Candida glabrata*, *Candida parapsilosis*, *Candida tropicalis*, *Pichia kudriavzevii*, *Kluyveromyces marxianus* var. *marxianus*), nous avons identifié ou confirmé l'identification de *Candida dubliniensis*, *Candida auris*, *Candida duobushaemulonii*, *Candida homilientoma*, *Candida inconspicua*, *Candida orthopsilosis*, *Candida metapsilosis*, *Candida nivariensis*, *Wickerhamiella pararugosa*, *Candida sorbosivorans*, *Clavispora lusitaniae*, *Cyberlindnera jadinii*, *Diutina catenulata*, *Kodamaea ohmeri*, *Lodderomyces elongisporus*, *Magnusiomyces capitatus*, *Meyerozyma caribbica*, *Meyerozyma guilliermondii*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Saprochaete clavata*, *Saprochaete gigas*, *Torulaspora delbrueckii*, *Wickerhamomyces anomalus*, *Yarrowia lipolytica*.

Parmi les levures basidiomycètes, outre *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* et var. *grubii*, *Rhodotorula mucilaginosa*, *Trichosporon asahii*, *Trichosporon dermatis*, *Trichosporon lactis*, *Trichosporon mycotoxinivorans*.

Toutes ces espèces sont, rappelons-le, responsables d'infections sévères et il ne s'agit donc pas ici d'une liste purement "botanique". Plusieurs espèces n'ayant jamais ou très rarement été impliquées en pathologies humaines ont d'ailleurs été identifiées dans des cas d'infection invasive en 2017 :

- Une fongémie à ***Hyphopichia homilientoma*** (syn. *Candida homilientoma*) : cette espèce de levure ascomycète décrite en 1973 appartient au clade des *Hyphopichia*, et est associée aux insectes mais n'avait jamais été décrite comme impliquée en pathologie humaine. Aucune utilisation en biotechnologies ou industries agro-alimentaires n'est connue. Les souches décrites pour cette espèce ont été retrouvées en Afrique du Sud sur des insectes mais également en association avec des insectes vivant dans des chênes en Corée et des nids de fourmis au Brésil. Les levures de cette espèce sont capables de produire des hyphes et parfois des blastoconidies.
- Une fongémie due à l'espèce ***Candida sorbosivorans*** et diagnostiquée aux Antilles : cette espèce décrite en 2001 et appartenant au clade des *Starmerella* est capable de pousser à 37°C et ne produit pas de filaments ni de pseudofilaments. Aucun cas d'infection chez l'homme n'avait été décrit à ce jour. Les souches de collection ont été isolées dans du matériel industriel contaminé utilisé pour un processus de transformation de sorbitol en sorbose (souche type CBS8768) ; au Brésil dans de la pulpe de fruits tropicaux et dans une boisson non alcoolisée en Hollande. Récemment cette espèce a également été identifiée comme producteur potentiel d'érythritol (édulcorant naturel ayant un grand intérêt en biotechnologies).
- Une fongémie due à ***Diutina catenulata*** (syn. *Candida catenulata*) : cette espèce de levure ascomycète a été décrite en 1942 mais assignée au nouveau genre *Diutina* en 2015. Ce genre comprend 8 espèces dont l'espèce *D. rugosa* (syn. *Candida rugosa*) décrite en pathologie humaine (**Figure 2**). Le genre *Diutina* fait partie des *Saccharomycetales* mais semble bien séparé de tous les autres genres décrits jusqu'à présent. La plupart des souches de *D. catenulata* ont été isolées chez l'homme (selles, perlèche) ou dans son environnement proche (nombreux fromages artisanaux et commerciaux). Son activité lipolytique pourrait expliquer sa présence dans les fromages et ses capacités de décontamination des sols pollués par le pétrole et des déchets alimentaires, ce qui en fait une espèce d'intérêt biotechnologique. Un seul cas de fongémie a été décrit en 1999. Nous avons reçu une autre souche en 2012 isolées de squames d'un patient en Martinique.



**Figure 2 : arbre phylogénique des souches du genre Diutina**

Neighbor Joining Tree consensus construit avec l'alignement multiple (MUSCLE alignment) des séquences des régions ITS (délimitées par les séquences des amorces ITS1/ITS4) des souches cliniques (CNRMA12.1409, CNRMA17.592 de *D. catenulata* et des souches types du genre *Diutina* (arbre construit avec le logiciel Geneious v.11.0.5, bootstrap 1000 repliquats)

### Expertise 2017 sur les champignons filamenteux

Les champignons filamenteux étaient isolés essentiellement des poumons (35,2%), de la peau (18,9%), de l'œil (16,7%) de la sphère ORL (10,0%), du sang (6,7%), mais aussi des os (6,3%), du tube digestif (1,5%) ou du cerveau (2,6%).

**Tableau 3 : Dénominations taxonomiques pour les champignons filamenteux**

Dénomination précédente	Espèce actuelle
<i>Acremonium kiliense</i>	<i>Sarocladium kiliense</i>
<i>Acremonium strictum</i>	<i>Sarocladium strictum</i>
<i>Bipolaris spicifera</i>	<i>Curvularia spicifera</i>
<i>Emericella nidulans</i>	<i>Aspergillus nidulans</i>
<i>Emericella quadrilineata</i>	<i>Aspergillus quadrilineatus</i>
<i>Fusarium delphinoides</i>	<i>Bisifusarium delphinoides</i>
<i>Fusarium dimerum</i>	<i>Bisifusarium dimerum</i>
<i>Geosmithia argillacea</i>	<i>Rasamsonia argillacea</i>
<i>Madurella grisea</i>	<i>Trematosphaeria grisea</i>
<i>Myceliophthora thermophila</i>	<i>Thermothelomyces thermophilus</i>
<i>Neosartorya hiratsukae</i>	<i>Aspergillus hiratsukae</i>
<i>Ochroconis gallopava</i>	<i>Verruconis gallopava</i>
<i>Paecilomyces lilacinus</i>	<i>Purpureocillium lilacinum</i>
<i>Penicillium marneffeii</i>	<i>Talaromyces marneffeii</i>
<i>Penicillium purpureogenum</i>	<i>Talaromyces purpureogenus</i>
<i>Pseudallescheria minutispora</i>	<i>Scedosporium minutisporum</i>
<i>Pyrenochaeta romeroi</i>	<i>Medicopsis romeroi</i>
<i>Roussoella percutanea</i>	<i>Parathyridaria percutanea</i>
<i>Scedosporium prolificans</i>	<i>Lomentospora prolificans</i>

Le niveau de caractérisation pour les 270 champignons filamenteux identifiés cette année (97 genres et espèces différents incluant quelques souches de champignons dimorphiques classe 3) est celui décrit plus haut. Le tableau suivant décrit les changements récents (**Tableau 3**). De plus, chaque année, en raison de changements taxonomiques ou d'études en cours, des souches sont ressorties de la collection pour complément d'identification.

Nous avons ainsi réalisé :

- ✓ Une identification phénotypique complète et la constitution d'un fichier numérique complet (macroscopie et microscopie) pour toutes les souches étudiées
- ✓ Une caractérisation moléculaire avec séquençage des régions ITS1-5.8S-ITS2 et de la région 28S pour tous les isolats, et de certains gènes (EF-1alpha, RPB1, RPB2, calmoduline, beta-tubuline, actine pour des filamenteux tels que les *Mucorales*, *Aspergillus* section *Fumigati*, *Fusarium* spp., *Phaeoacremonium* spp., le complexe *Pseudallescheria/Scedosporium*, les coelomycètes ...), ce qui a abouti cette année à l'amplification de EF-1alpha (69 isolats) RPB2 (69 isolats) beta tubuline (124 isolats), calmoduline (55 isolats), actine (3 isolats) et RPB1 (10 isolats)
- ✓ La recherche des mutations CYP51A pour 8 isolats d'*A. fumigatus* résistants aux azolés
- ✓ La détermination du profil de sensibilité à 8 antifongiques pour 237 isolats (sachant que les conditions de réalisation des CMI ne permettent pas une croissance adéquate de certaines espèces et/ou isolats).

Rappelons que l'identification des espèces au sein des complexes d'espèces n'a pas nécessairement d'intérêt pour la prise en charge des patients. En revanche, c'est tout l'intérêt du CNR dont l'expertise permet de caractériser ces espèces rares et de colliger les données cliniques correspondantes, pour, à terme, déterminer si ces espèces sont associées à des pathologies de présentations ou de pronostics différents justifiant leur identification en routine.

Pour le genre *Aspergillus*, nous avons caractérisé 76 souches principalement isolées de lésions respiratoires (73%). Plusieurs espèces appartenant aux 9 sections d'*Aspergillus* ont été identifiées (Figure 3). Les espèces majoritaires identifiées étaient *A. fumigatus* (29%) et *A. flavus* (24%) appartenant aux sections *Fumigati* et *Flavi* respectivement. Le reste des espèces rencontrées étaient : *A. sydowii* (sect. *Versicolores*) ; *A. nidulans*, *A. quadrilineatus*, *A. latus* (sect. *Nidulantes*) ; *A. calidoustus* (sect. *Usti*) ; *A. alliaceus*, *A. parasiticus* (sect. *Flavi*) ; *A. terreus*, *A. alabamensis* (sect. *Terrei*), *A. iizukae* (sect. *Flavipedes*) ; *A. lentulus*, *Neosartorya hiratsukae* (sect. *Fumigati*) ; *A. tubingensis*, *A. welwitschiae* (sect. *Nigri*) et finalement *A. montevidensis*, *A. intermedius* (sect. *Aspergillus*).

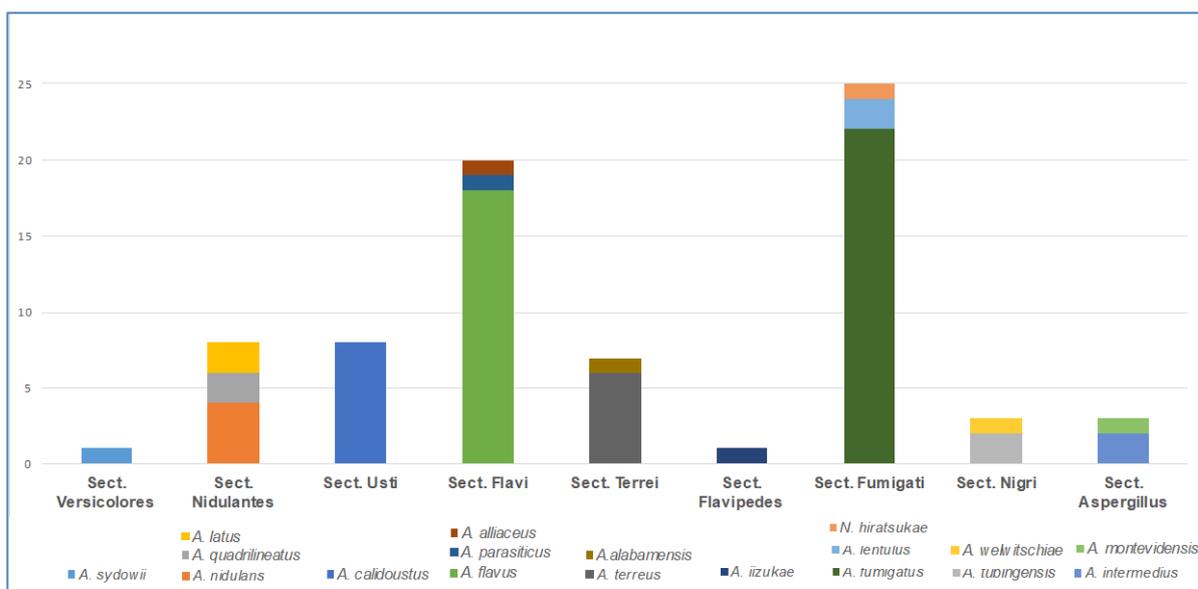


Figure 3 : Distribution par « section » des souches d'*Aspergillus* spp. identifiées en 2017

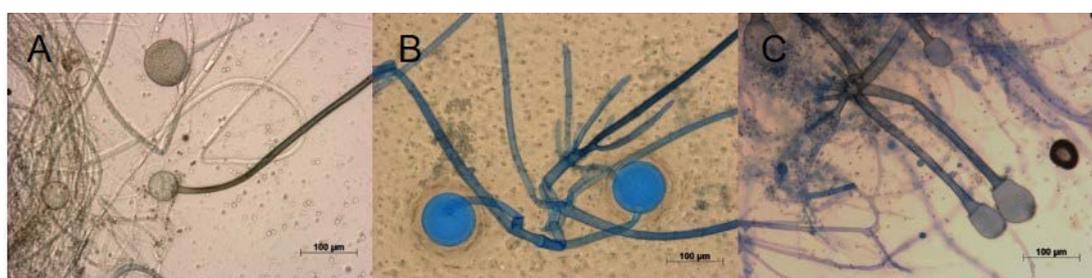
Les 48 souches caractérisées du genre *Fusarium* étaient distribuées dans les différents complexes d'espèces : les complexes *Fusarium solani* (FSSC) et *Fusarium oxysporum* (FOSC) étaient les plus représentés avec 15 et 16 souches respectivement (Figure 4). D'autres espèces appartenant aux complexes

*Fusarium fujikuroi* (FFSC), *Fusarium incarnatum-equiseti* (FISC) et *Bisfusarium dimerum* (FDSC) ont été expertisées.



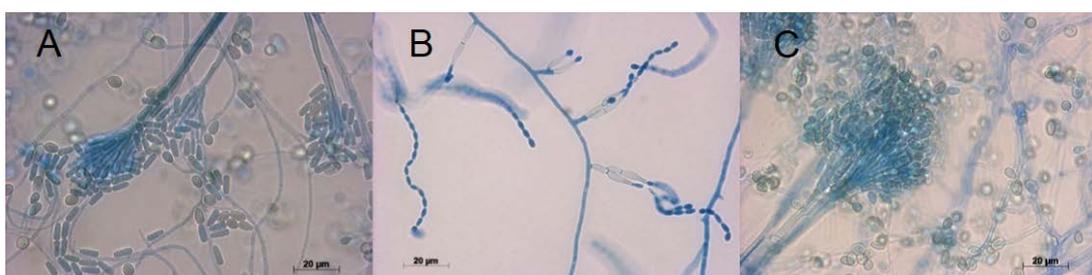
**Figure 4 : Aspect microscopique (conidiophores et conidies) des souches de *Fusarium* spp. Complexe d'espèces *Fusarium solani* (A, C) et complexe d'espèces *Fusarium oxysporum* (B)**

Dans l'ordre de *Mucorales*, nous avons identifié 44 espèces isolées majoritairement d'échantillons pulmonaires (39%) et ORL (27%), et appartenant aux genres : *Rhizopus* (*R. arrhizus*, *R. microsporus* ; 32%, **Figure 5**) ; *Mucor* (*M. circinelloides*, *M. irregularis* *M. plumbeus* *M. indicus* ; 27%); *Lichtheimia* (*L. corymbifera*, *L. ramosa* ; 23%) et en moindre proportion des espèces de *Rhizomucor pusillus*, *Cunninghamella* spp. et *Syncephalastrum racemosum*.



**Figure 5 : Sporangiohores et sporangiospores des souches de l'ordre des Mucorales (A) *Rhizopus arrhizus* ; (B, C) *Rhizopus microsporus***

Les 27 souches appartenant à l'ordre de *Microascales* correspondaient à une dizaine d'espèces différentes groupées dans les genres *Pseudallescheria/Scedosporium* (*Scedosporium apiospermum*, *S. boydii*, *S. dehoogii*) ; *Lomentospora* (*L. prolificans*) ; *Microascus* (*Microascus murinus*, *M. cirrosus*, *M. restrictus*) ; *Scopulariopsis* (*S. brevicaulis*) (**Figure 6**).



**Figure 6 : Aspect microscopique (conidiophores et conidies) des souches de l'ordre de *Microascales* (A) *Scedosporium dehoogii* (B) *Microascus murinus*, (C) *Scedosporium apiospermum***

Dans l'ordre des *Pleosporales*, nous avons identifié plusieurs membres : les hyphomycètes *Alternaria infectoria*, *A. alternata* ; *Curvularia spicifera*, *C. hominis* (**Figure 7**) ; des champignons appartenant aux coelomycètes tels que *Paraconiothyrium cyclothyrioides*, *Parathyridaria percutanea* (syn. *Roussoella percutanea*) et également des agents responsables des mycétomes tels que *Trematosphaeria grisea* (syn. *Madurella grisea*) et *Madurella pseudomycetomatis*.



**Figure 7 :** Aspect morphologique de (A) *Curvularia hominis* (phragmospores) ; (B) culture de *Colletotrichum* sur milieu malt 2% (MEA) (C) *Lasiodiplodia theobromae* (jeunes conidies)

**D'autres champignons coelomycètes** appartenant aux ordres *Botryosphaeriales* (*Lasiodiplodia theobromae* ; *Neoscytalidium dimidiatum*) et *Glomerellales* (*Colletotrichum* spp., **Figure 7**) ont été identifiés (**Figure 7**).

**Parmi les membres de l'ordre Hypocreales**, l'espèce *Purpureocillium lilacinum* (**Figure 8**) était la plus fréquente avec une dizaine de souches expertisées, suivie de *Trichoderma asperelloides*, *T. longibrachiatum*, *Sarocladium kiliense* (**Figure 8**) et *Metarhizium robertsii*.

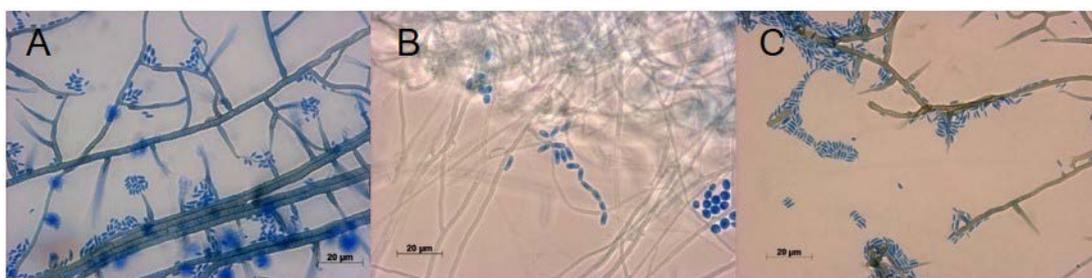
Nous avons caractérisé **des souches des levures noires et espèces apparentées** telles qu'*Exophiala dermatitidis*, *E. xenobiotica*, *E. spinifera*, *Fonsecaea nubica* (**Figure 8**), *F. monophora*, *Phialophora chinensis* et *Rhinochrysiella similis* pour l'ordre de *Chaetothyriales*.



**Figure 8 :** Aspect microscopique des champignons de l'ordre *Hypocreales* (A, C) de l'ordre *Chaetothyriales* (A) *Purpureocillium lilacinum* ; (B) *Fonsecaea nubica* ; (C) *Sarocladium kiliense*

**D'autres hyphomycètes dematiés** ont été identifiés : *Pleurostomophora richardsiae* (ordre *Calosphaeriales*) ; *Phaeoacremonium venezuelense*, *Ph. parasiticum* (ordre *Togniniales*).

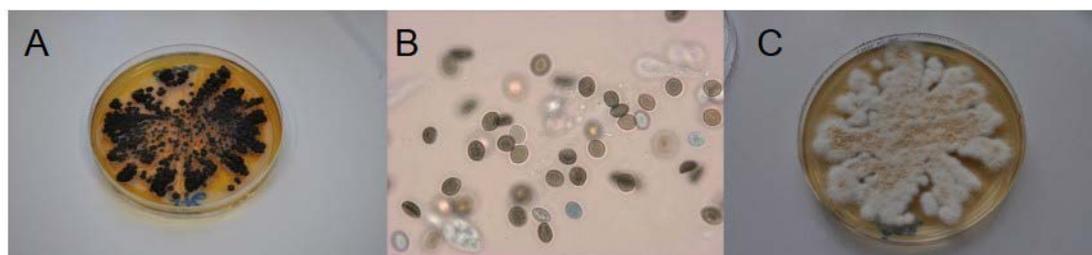
**Le genre Nannizziopsis** appartenant à l'ordre *Onygenales* était représenté par quatre isolats dont l'identification d'espèce est en cours.



**Figure 9 :** Aspect microscopique des hyphomycètes dematiés : (A) *Phaeoacremonium parasiticum* (C) *Ph. venezuelense* et (B) *Nannizziopsis* sp.

Nous avons également identifié des champignons ascomycètes appartenant à **l'ordre de Sordariales** tels que *Chaetomium astrotrichoides*, *C. globosum* et *Thermothelomyces thermophilus* (syn. *Myceliophthora thermophila*) (**Figure 10**); des espèces appartenant aux *Eurotiales* tels que *Paecilomyces variotii*, *Rasamsonia argillacea* et *Penicillium digitatum* ; et d'autres ascomycètes avec une taxonomie incertaine

au niveau d'ordre : *Valsaria* (famille de *Dothideomycetes*) ; *Acrophialophora levis* et *Triadelphia pulvinata* (ordre *incertae sedis*).



**Figure 10 : Aspect macroscopique des champignons ascomycètes *Triadelphia pulvinata* (A) et *Thermothelomyces thermophilus* (C) ; (B) Ascospores mélanisées de *Chaetomium globosum***

**Concernant les champignons basidiomycètes**, cinq isolats ont été analysés : *Hormographiella aspergillata*, *Hexagonia* sp., *Schizophyllum commune*, *Trametes polyzona* et une souche pour laquelle la morphologie et le séquençage n'ont pas permis l'identification de genre et espèce pour le moment.

Finalement nous avons pu expertiser (en laboratoire de confinement P3) 11 agents responsables des **mycoses endémiques** : *Histoplasma* spp (n=8), *Coccidioides* spp (n=2) et *Cladophialophora bantiana* (n=1).

Toutes ces espèces sont, rappelons-le, responsables d'infections sévères et il ne s'agit donc pas ici encore d'une liste purement "botanique".

#### **Expertise 2017 sur la sensibilité aux antifongiques**

La détermination de la sensibilité aux antifongiques se fait par la technique mise au point par l'EUCAST (The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing). La technique est adaptée pour les antifongiques et les espèces non étudiés dans les documents EUCAST. En l'absence de valeur critique (break points) définie pour toutes les espèces et tous les antifongiques et étant donnée l'absence de corrélation *in vivo/in vitro* dans de nombreuses situations cliniques, les résultats de CMI (concentrations minimales inhibitrices) ne sont jamais interprétés en termes de sensibilité et de résistance pour un isolat donné. En revanche, les profils de sensibilité nous servent :

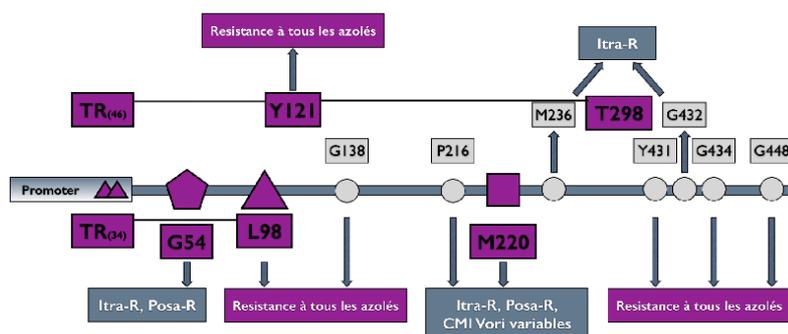
- ✓ à surveiller l'apparition d'isolats ou d'espèces de moindre sensibilité à un ou plusieurs antifongiques dans un centre ou dans plusieurs centres, ce qui déclenche éventuellement une enquête ou justifie une attention particulière
- ✓ à déterminer les profils de sensibilité des souches "sauvages" aux nouveaux antifongiques en cours de commercialisation
- ✓ à déterminer, dans des cas particuliers, si un échec thérapeutique est lié à l'émergence d'un isolat de moindre sensibilité à l'antifongique prescrit.

Au total, 784 isolats ont été testés en 2017 pour leur sensibilité aux antifongiques. Le nombre très important d'antifongiques testés, de genres et d'espèces différents rend impossible un compte rendu détaillé, certaines espèces n'étant représentées que par un très petit nombre d'isolats. Nous présentons donc les données de CMI depuis 2003, et en nous limitant : 1) aux espèces pour lesquelles au moins 5 isolats ont été testés et 2) aux antifongiques pertinents pour les espèces concernées. Une analyse des tendances sera faite plus loin sur un nombre limité d'espèces de levures analysées dans le cadre de l'Observatoire des Levures (ODL), pour éviter le biais lié à l'envoi de souches isolées dans un contexte connu d'échec thérapeutique.

En effet, nous recevons des isolats pour confirmation d'une moindre sensibilité décelée en routine, et pour recherche d'une éventuelle mutation dans les gènes cibles. Ainsi, nous avons fait le séquençage des gènes *Fks* pour 9 isolats de levures résistants aux échinocandines :

- 4 *Candida albicans* provenant de 3 patients avec CMI haute et présence de mutation en région HS1 : S645P pour 3 souches et F641S pour une souche
- 3 *Candida glabrata* provenant de 3 patients avec CMI haute et mutation : F659V en région HS1 du gène *FKS2*, deletion en position F659 en région HS1 du gène *FKS2* et S625P en région HS1 du gène *FKS1*
- 1 souche de *Candida tropicalis* avec CMI hautes et présence d'une mutation S645P en région HS1
- 1 souche de *Candida dubliniensis* avec CMI hautes et une mutation S645P en région HS1

Nous avons également recherché des mutations dans le gène *CYP51A* (**Figure 11**) pour 7 isolats d'*A. fumigatus* résistants aux antifongiques azolés. Nous avons mis en évidence les mutations suivantes : TR34/L98H (4 isolats) ; G54R (1 isolat) ; M220I (1 isolat) et une combinaison F46Y/M172V/E427K (1 isolat) déjà décrites dans la littérature (**Tableau 4**).



**Figure 11 : Schéma du gène *Cyp51A* d'*A. fumigatus* et principales mutations**

Ce schéma reprend les substitutions, responsables d'un phénotype de résistance aux antifongiques azolés, les plus fréquemment rencontrées chez les isolats cliniques (modifié de Alanio A. *et al.*) Itra: itraconazole ; Vori : voriconazole ; Posa : posaconazole, R : résistant

**Tableau 4 : Mutations dans le gène *cyp51A* d'*Aspergillus fumigatus* rapportées dans la littérature<sup>2</sup>**

Mutations	Mécanisme
G54/W/R/E/V/A	Mutation décrite pour des souches résistantes
M220/T/V/I/K/R/L	Mécanisme <b>connu</b>
G448S	Mécanisme <b>connu</b>
TR <sub>34</sub> /L98H avec ou sans S297T/F497I TR <sub>46</sub> /Y121F/T289A avec ou sans S297T/F497I TR53	Hyper expression par modification dans le promoteur du gène
F46Y/M172V/N248T/D255E/E427K ou autres	Mutation décrite pour des souches résistantes et sensibles
G138/C/S	Mutation décrite pour des souches résistantes avec mécanisme <b>non connu</b>
P216L F219/S/C/I I242V N248K Y431/S/C G432/S/A G434C	Mutation décrite occasionnellement pour des résistantes et sensibles

### Expertise 2017 sur les mycoses endémiques

L'expertise concernant les mycoses endémiques relève davantage des conseils sur la démarche diagnostique ou/et thérapeutique. Le CNRMA n'a pas été sollicité cette année pour explorer des expositions accidentelles

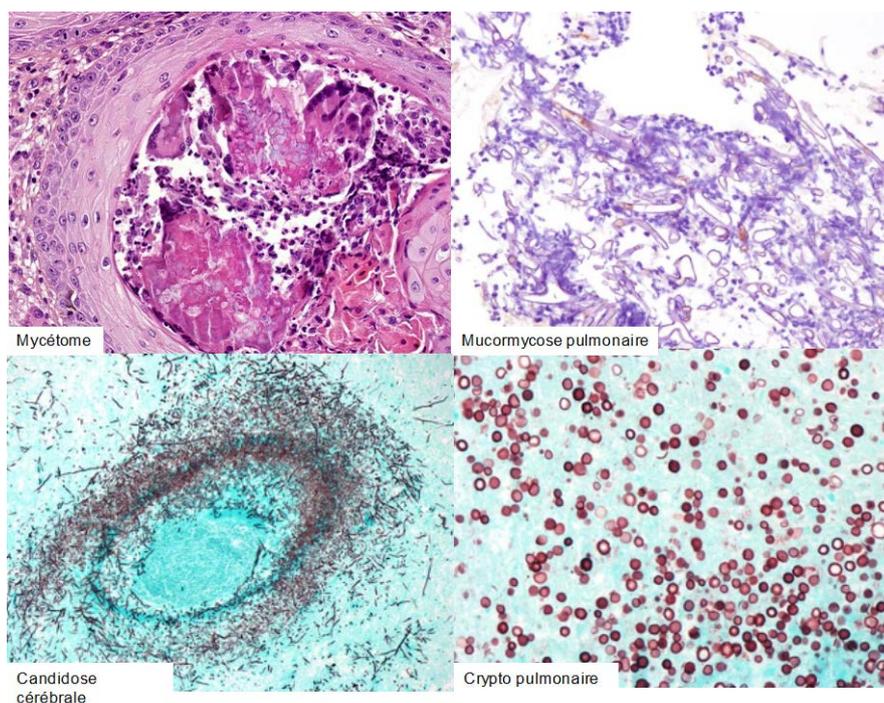
<sup>2</sup> Rivero-Menendez O, Alastruey-Izquierdo A, Mellado E, Cuenca-Estrella M. 2016. Triazole Resistance in *Aspergillus* spp.: A Worldwide Problem? *J. Fungi (Basel)*. 2016 Jul 4; 2(3). doi: 10.3390/jof2030021

groupées à des champignons dimorphiques (classe 3). En revanche, il a été sollicité pour la confirmation ou l'identification d'isolats (cf. plus haut) et des diagnostics moléculaires

### **Expertise 2017 en anatomopathologie**

Les demandes d'expertise mycologique en histopathologie arrivent maintenant directement dans l'unité de Neuropathologie Expérimentale de l'Institut Pasteur (NEIP) dirigée par Fabrice Chrétien (PU-PH, Hôpital Sainte Anne, Paris). Les demandes concernent des patients pour lesquels le diagnostic de mycose a été évoqué ou posé (culture positive ou non). Les colorations utiles (HES, PAS, Gomori-Grocott, bleu alcian) ainsi que d'éventuelles techniques d'immunohistochimie avec des anticorps spécifiques (commercialisés ou préparés au CNRMA) sont réalisées sous la responsabilité de Gregory Jouvion (NEIP). Une réunion hebdomadaire est ensuite organisée pour une confrontation des expertises anatomopathologiques, cliniques et mycologiques sur ces dossiers, découlant parfois sur la mise en route d'un diagnostic moléculaire après extraction d'ADN.

Cette organisation a été mise en place progressivement en 2012 et est active depuis début 2013. En 2017, les demandes provenaient à part à peu près égale d'hôpitaux de l'AP-HP ou de centres hospitaliers en province. Au total 42 échantillons ont été analysés et discutés, aboutissant à un diagnostic de certitude (22 dossiers, 52%) ou de présomption (5 dossiers, 12%) (**Figure 12**). Dans 15 cas, le diagnostic n'a pas pu être établi en l'absence d'éléments fongiques visibles. Les données histopathologiques ont été confrontées aux données éventuellement disponibles au CNRMA et aux diagnostics moléculaires.



**Figure 12 : Sélection d'expertise anatomopathologique**

Mycétome (coloration HES) ; Mucormycose (immunohisto-chimie avec des anticorps anti-Mucorales) ; Candidose cérébrale et cryptococcose (Gomori-Grocott)

### **Expertise 2017 pour les diagnostics moléculaires**

La détection d'acides nucléiques à visée diagnostique pose des problèmes différents selon que l'on s'intéresse à des biopsies ou à d'autres prélèvements (sanguins, urinaires, ou respiratoires). Dans le premier cas, la question est l'identification d'un élément fongique vu en microscopie. Dans le deuxième cas, il s'agit de détecter un champignon auquel on peut attribuer une pathologie.

La généralisation de la PCR quantitative (qPCR) avec les optimisations et les contrôles adéquats permet de multiplier les tests diagnostiques, de remplacer certaines méthodes, comme la microscopie, et d'en compléter d'autres, comme les recherches d'antigènes. Ces tests qPCR ont été optimisés dans le laboratoire

de Mycologie-Parasitologie de l'hôpital St-Louis en insistant sur les étapes pré-analytiques. Ces tests pratiqués en routine concernent l'aspergillose invasive, la pneumocystose, les mucormycoses, et l'histoplasmosse. Pour l'aspergillose invasive et la pneumocystose, l'immense majorité des laboratoires hospitaliers réalisent ces examens. La question est donc l'harmonisation des pratiques.

Peu de laboratoire ont en revanche développé un test de diagnostic d'histoplasmosse<sup>3</sup>. Ce test est réalisé à partir de prélèvement invasifs (tissu pathologiques), superficiel (écouvillon cutané/buccal) et à partir de sang prélevé sur anticoagulant. Sur les 254 prélèvements (166 patients) adressés au laboratoire, 17 étaient positifs correspondant à 10 patients pour lesquels le diagnostic, évoqué sur le contexte clinique, a été confirmé par l'histologie et/ou la culture. La PCR spécifique pour le diagnostic de coccidioïdomycose a été réalisée pour 4 patients (12 prélèvements), et positive pour l'un d'entre eux.

## **2.6 Activités de séquençage**

### ***Le CNR a-t-il eu accès à une plateforme de séquençage ?***

Oui, l'Institut Pasteur est doté d'une plateforme dite Plateforme de Microbiologie Mutualisée (P2M), qui est ouverte à l'ensemble des CNRs ainsi qu'aux laboratoires de référence dans le Réseau International des Instituts Pasteur et instituts associés. Dans un esprit de mutualisation technologique, P2M regroupe les demandes et permet ainsi l'utilisation en routine du séquençage à haut débit multi-pathogènes.

La technologie utilisée par cette plateforme de séquençage est la technologie Illumina (fabrication des librairies + séquenceurs). Les banques sont préparées avec le kit Nextera XT et engagées sur le séquenceur NextSeq 500. Une série de matériels est également utilisée pour réaliser les contrôles de qualité tout au long du processus de fabrication de séquence. Des robots pipeteur et extracteur permettent d'homogénéiser et de normaliser les ADN et amplicons avant d'entrer dans le pipeline de production.

### ***Le CNR a-t-il eu accès à une expertise bio-informatique ?***

Les CNRs ont la possibilité de faire appel à une expertise bio-informatique, en sollicitant les services supports en interne à l'Institut Pasteur. Ils ont actuellement accès aux bio-informaticiens du HUB du C3BI, qui qualifient et réalisent une analyse de premier niveau (contaminations, qualité, assemblage) sur les données sortantes. Ces bioinformaticiens peuvent également apporter leur aide aux CNR, pour le développement de méthodes de génotypage et d'autres pipelines d'analyses des séquences, y compris en cas d'épidémie. Malheureusement, la demande est très supérieure à l'offre (1,2 ETP dédié) et les CNR ne peuvent donc pas être aidés simultanément. Les CNRs et les unités qui les hébergent doivent donc faire appel à des ingénieurs ou bio-informaticiens membres de leur équipe de recherche ou employés sur contrat dédié. Par ailleurs, les ETP du HUB dédiés aux CNRs font l'objet d'une négociation interne annuelle.

Le CNRMA ne dispose pas de bioinformaticien dans l'équipe, mais l'une des ingénieures se forme à ces analyses en collaboration avec les bioinformaticiens de P2M. Ce sont donc eux qui ont encore fait les analyses cette année avec leurs outils propres.

### ***Le CNR a-t-il fait appel aux techniques de séquençage à des fins de santé publique ?***

Le CNRMA a utilisé le séquençage génome entier (WGS) pour investiguer des cas groupés d'infections à des pathogènes fongiques rares. Le CNRMA a ainsi réalisé en 2017 le séquençage de 120 génomes de champignons, sachant que certains séquençages ont été refaits en raison de résultats non interprétables ou pour vérification. Dans la mesure où les génomes de ces espèces ne sont pas disponibles, le CNR est obligé d'abord de définir l'échantillonnage approprié (souche type, souches historiques, souches épidémiologiquement liées et non liées) pour permettre une interprétation des données de WGS. La description de ces analyses est faite plus loin (§3.5 et 4). Les séquences ne sont pas encore déposées mais le seront prochainement comme nous l'avons fait dans le passé dans la base de données EMBL.

## **3 Activités de surveillance**

---

<sup>3</sup> Alanio, A. *et al.*, 2017. Diagnosis of histoplasmosis: switching from microscopy/culture to RNA/DNA detection. *Mycoses*, 60, pp.28–29.

Les missions de surveillance du CNRMA couvrent le vaste champ des mycoses invasives, auquel s'est ajoutée, depuis 2012, la surveillance des pneumocystoses.

#### **Au cours de l'année 2017 :**

- Dans le cadre de la surveillance active par le biais de ses réseaux de partenaires (ODL et RESSIF), 936 fongémies à levures (dont 251 dans l'ODL) et 794 infections fongiques invasives hors fongémies ont été enregistrées dans RESSIF.
- Dans le cadre de la surveillance passive, 121 autres infections fongiques invasives ont été déclarées incluant des cryptococcoses, mycoses exotiques et mycoses rares.
- Un cas d'infection à *Candida auris* a été déclaré au CNRMA (confirmé au CNR et suivi d'une alerte auprès des mycologues)
- Le génotypage de souches a été fait par les techniques disponibles (microsatellites pour des cas groupés d'infections à *C. parapsilosis* ou des infections récurrentes dues à *C. albicans* ou *C. glabrata*; MLST pour des infections récurrentes à *C. tropicalis* chez un même patient ou pour détecter le clone résistant à la 5FC, PCR multiplex pour les souches de *C. neoformans* ; qPCR pour les isolats de *S. clavata*), et par séquençage du génome entier (n=120 au total) pour des cas groupés d'infection à *Trichosporon asahii* et *Magnusiomyces capitatus*.

### **3.1 Description du réseau de partenaires**

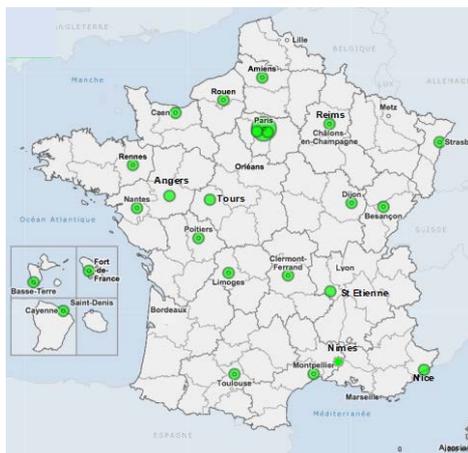
La surveillance utilise trois types de réseaux de partenaires :

- L'Observatoire des Levures (ODL), mis en place en 2002, fait appel à un réseau de mycologues/microbiologistes de tous les hôpitaux de court séjour de l'AP-HP et quelques hôpitaux de la périphérie en Ile-de-France. Pendant 8 ans, le réseau a fonctionné avec 27 centres participants. Les restructurations et quelques défections font que l'ODL fonctionne actuellement (année 16) avec 15 centres actifs<sup>4</sup>. Ces centres déclarent de façon exhaustive toutes leurs fongémies à levures et envoient les isolats correspondants quelle que soit l'espèce isolée.
- Le RESeau de Surveillance des Infections Fongiques (RESSIF) a été mis en place en 2012 à l'occasion du renouvellement du mandat du CNRMA et de l'extension de ses missions. Il comprenait, en 2012, 13 centres collaborateurs du CNRMA (CC-CNRMA). Après un appel à volontaires parmi tous les correspondants hospitaliers du CNRMA en 2013, puis à l'occasion de la préparation du nouveau mandat en 2016, RESSIF compte maintenant 29 CC-CNRMA<sup>5</sup>. La particularité de RESSIF est de s'appuyer sur une charte de fonctionnement, signée par tous les partenaires et définissant le rôle de chacun et ses engagements. RESSIF permettra de déterminer avec plus de précision l'incidence de certaines mycoses invasives et d'obtenir des données sur la pneumocystose qu'il serait difficile de chiffrer par le biais d'une surveillance passive (**Figure 13**). Les CC-CNRMA envoient tous les isolats correspondants aux espèces non fréquentes (donc toutes, sauf *A. fumigatus*, *C. albicans*, *C. glabrata*,

<sup>4</sup> Liste des Centres participants à l'ODL par ordre alphabétique des villes, les référents mycologues étant indiqués entre parenthèses : Bobigny - **hôpital Avicenne** (Sophie Brun), Bondy - **hôpital Jean Verdier** (Isabelle Poilane), Boulogne - **hôpital Ambroise Paré** (Anne-Laure Roux), Créteil - **hôpital Henri Mondor** (Françoise Botterel), Garches - **hôpital Raymond Poincaré** (Anne-Laure Roux), Kremlin-Bicêtre - **hôpital du Kremlin Bicêtre** (Adela Angouvant), Paris - **hôpital Cochin** (André Paugam), **hôpital Necker Enfants Malades** (Marie-Elisabeth Bougnoux), **hôpital Bichat** (Sandrine Houzé), **hôpital Saint-Louis** (Stéphane Bretagne), **hôpital Robert Debré** (Patricia Marianni), **hôpital Lariboisière** (Stéphane Bretagne), LeChesnay-CH de Versailles (Odile Eloy), Villejuif - **hôpital Paul Brousse** (Adela Angouvant) et **Institut Gustave Roussy** (Elisabeth Chachaty).

<sup>5</sup> Liste des 29 CC-CNRMA par ordre alphabétique des villes, les référents mycologues étant indiqués entre parenthèses : Amiens (Taieb Chouaki, Anne Totet), Angers (Jean-Philippe Bouchara), Besançon (Laurence Millon), Caen (Julie Bonhomme), Cayenne (Magalie Demar), Clermont-Ferrand (Philippe Poirier), Dijon (Frédéric Dalle), Fort-de-France (Nicole Desbois), Institut Gustave Roussy (Elisabeth Chachaty), Limoges (Bernard Bouteille), Montpellier (Laurence Lachaux) Nantes (Florent Morio), Nice (Martine Gari-Toussaint, Lilia Hasseine), Nîmes (Mylène Sasso), Paris - **hôpital Cochin** (André Paugam), Paris - **hôpital Saint-Louis** (Stéphane Bretagne), Paris - **hôpital des Quinze-Vingt** (Lilia Merabet), Paris - **hôpital Necker Enfants Malades** (Marie-Elisabeth Bougnoux), Paris - **hôpital Robert Debré** (Patricia Marianni), Poitiers (Catherine Kauffmann-Lacroix), Pointe-à-Pitre (Muriel Nicolas), Reims (Dominique Toubas), Rennes (Jean-Pierre Gangneux), Rouen (Loïc Favennec), Saint-Etienne (Hélène Raberin), Strasbourg (Valérie Bru), Toulouse (Sophie Cassaing), Tours (Jacques Chandener, Guillaume Desoubeaux), Versailles (Odile Eloy)

*C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. krusei*, *C. kefyr*) à moins que l'isolat n'ait un profil anormal de sensibilité aux antifongiques. Le CNRMA reçoit donc l'isolat correspondant dans environ 25% des cas, mais souvent de façon décalée par rapport à l'isolement dans le centre.



**Figure 13 : Répartition géographique des 29 CC-CNRMA composant RESSIF en 2017**

- Enfin, les collègues mycologues, microbiologistes et cliniciens qui ne font pas partie des deux réseaux précédents, contribuent, par des déclarations occasionnelles, à la surveillance de certaines infections fongiques invasives rares, en particulier la cryptococcose, mais aussi les mucormycoses, fusarioses ou mycoses endémiques... Les correspondants envoient alors systématiquement les souches pour expertise. Ces déclarations sont utiles pour augmenter la couverture de la surveillance et caractériser des souches d'espèces rares. Le nombre de centres ayant déclaré au moins une cryptococcose depuis 1985 s'élevait à 199 en avril 2018.

EN 2017, grâce à la collaboration avec EpiConcept et à l'outil VOOZANOO®, nous avons simplifié les déclarations en ligne en créant un portail unique (<https://epidemiopasteur.fr/ressif>) (Figure 14), où selon l'implication des collaborateurs dans l'un ou l'autre des réseaux, l'accès aux informations demandées change, le questionnaire étant plus léger (déclaration simplifiée) pour les partenaires de l'ODL ou les déclarations hors RESSIF. En revanche, pour la surveillance des cryptococcoses, le portail d'accès à la déclaration en ligne est resté séparé car cette base de données est unique dans la mesure où elle est alimentée par les notifications de cas de toute la France depuis 1985.

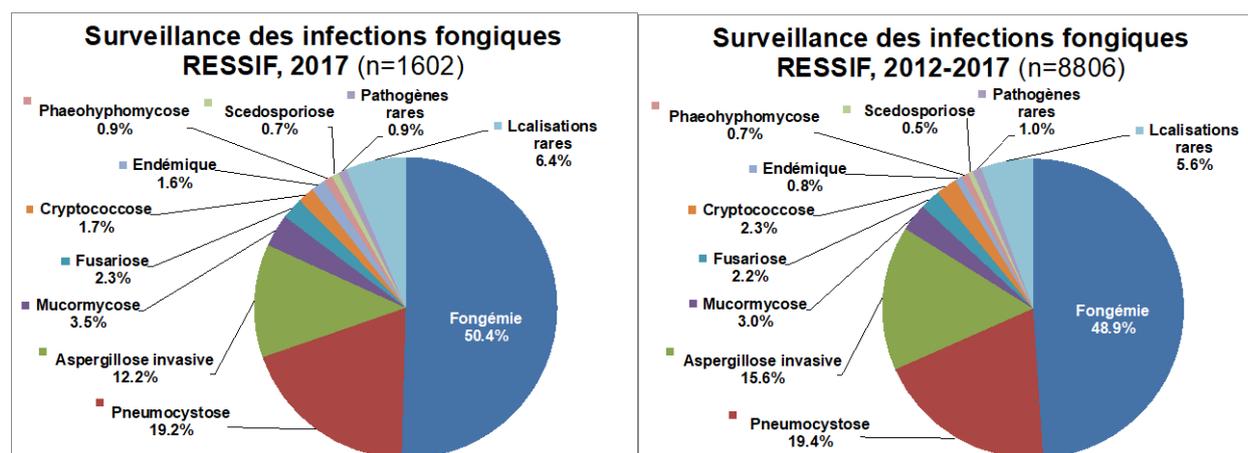
**Figure 14: Portail unique de déclaration des mycoses invasives**

Tout professionnel de santé (microbiologiste ou clinicien) souhaitant participer à la surveillance des mycoses invasives peut adresser un mail à [cnrma@pasteur.fr](mailto:cnrma@pasteur.fr) en demandant l'ouverture d'un compte. Au

1<sup>er</sup> avril 2018, 226 déclarations avaient été faites sur la fiche simplifiée (dont 146 au titre de l'ODL) et 9361 sur la fiche complète dont 9032 au titre de RESSIF, le serveur étant utilisé par certains pour stocker des informations concernant des cas hors surveillance de RESSIF (par exemple les péritonites post-opératoires ou les sinusites non invasives). À ce jour, 58 centres hospitaliers répartis dans 40 départements ont utilisé le portail de déclaration en ligne.

### 3.2 Surveillance de l'évolution et des caractéristiques des infections

En 2017, 1602 épisodes d'IFI ont été déclarés dans le cadre de RESSIF, ce qui porte à 8806 le nombre d'IFI répertoriées (**Figure 15**), avec une répartition qui ne change pas beaucoup en 2017 en comparant à l'ensemble de la base de données (2012-2017) qui compte près de 9000 cas.

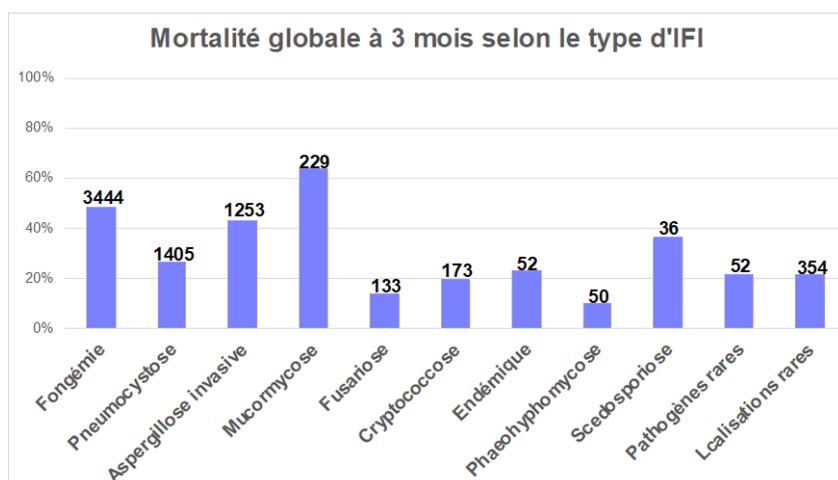


**Figure 15 : Répartition des principales IFI répertoriées dans RESSIF en 2017 et depuis 2012**

Près d'un tiers des patients était hospitalisé en réanimation au moment du diagnostic d'IFI (1,4%) et plus d'un sur 10 était en chirurgie. Globalement, la proportion d'hommes était toujours plus élevée que celle des femmes avec un sexe ratio de 1,7/1. Les principaux facteurs de risque pour les 8229 patients concernés par ces 8806 IFIs se répartissaient en pathologies malignes (44,2%), transplantation d'organes solides (7,9%), infection par le VIH (4,9%), chirurgie récente (18,2%), autres facteurs favorisant (24% maladies systémiques, diabète, traitement corticoïdes, traumatisme, ...) et, rarement, aucune cause n'est retrouvée (1,2%). L'âge médian était de 61 ans (extrêmes 0-98 ans).

Dans environ 5,5% des cas, les infections sont dues à plusieurs espèces dans un même site anatomique, qu'il s'agisse d'une fongémie avec deux levures ou d'une aspergillose pulmonaire et d'une pneumocystose. Dans 5,5% des cas, il s'agit soit d'une récurrence (2%), soit d'un nouvel épisode (3,5%) dû soit à un nouveau pathogène dans le même site ou dans un site différent (aspergillose pulmonaire et fongémie), soit au même pathogène dans un nouveau site (fongémie suivie d'une arthrite par exemple).

L'évolution à 3 mois était très variable selon les IFI (**Figure 16**), le pronostic le plus péjoratif étant associé aux mucormycoses avec une mortalité globale > 60%.



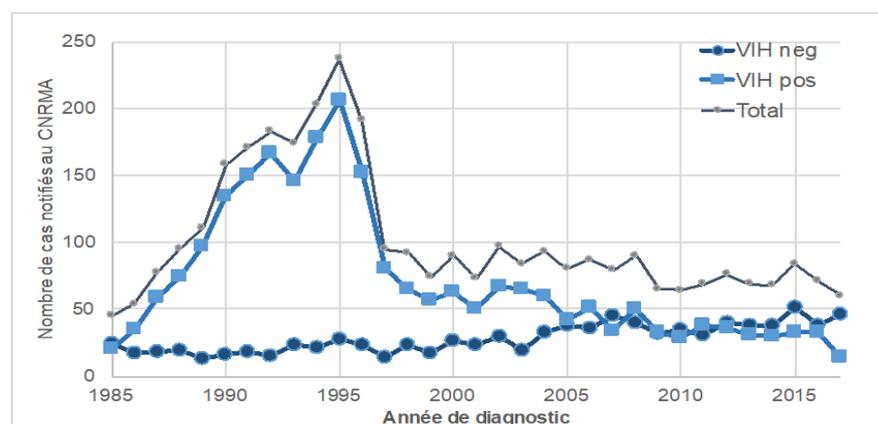
**Figure 16 : Mortalité globale à 3 mois en fonction des IFI diagnostiquées**

Les chiffres correspondent au nombre de cas pour lesquels l'information était disponible à la date du bilan.

Dans la mesure où certaines de ces mycoses sont très rares, il nous semble peu pertinent de faire un bilan limité à l'année en cours, nous ferons donc une analyse par type d'IFI et sur l'ensemble de la base de données.

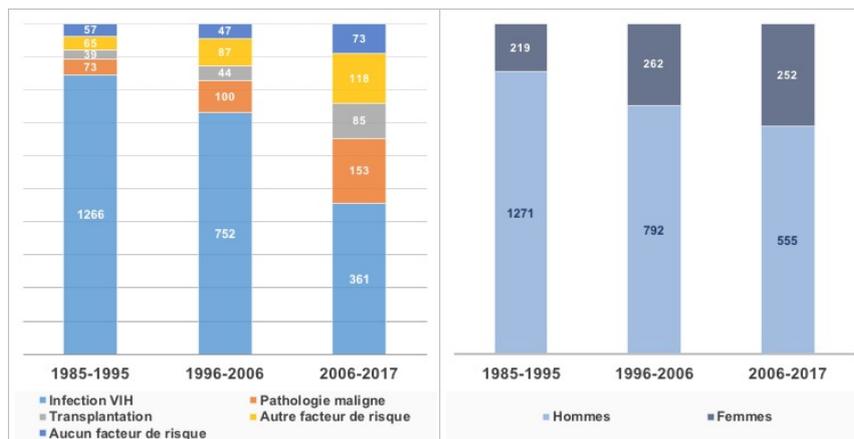
### *Cryptococcoses*

Au moment du bilan (avril 2018), 3378 cas de cryptococcose ont été enregistrés dans RESOMYC, avec pour l'année 2017, seulement 60 cas enregistrés contre 70 à la même époque l'an dernier (**Figure 17**). Il est vraisemblable qu'il s'agit là d'un retard de déclaration et non d'une baisse réelle, la baisse n'étant d'ailleurs constatée que chez les patients séropositifs.



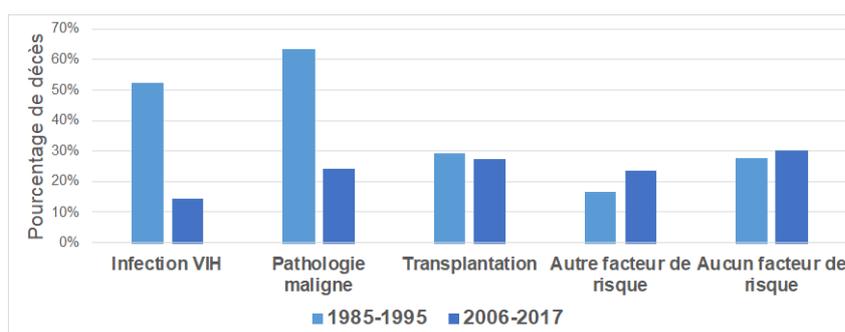
**Figure 17 : Évolution des cas de cryptococcose déclarés en France (1985-2017)**

Nous avons cependant analysé les facteurs de risque en fonction de 5 grandes catégories (infection VIH, pathologie malignes, transplantation d'organe solide, autre facteur de risque, et aucun facteur de risque identifié) et sur trois périodes « 1985-1995 », « 1996-2006 » et « 2007-2017 ». L'épidémiologie de la cryptococcose en France évolue significativement au cours de ces trois périodes avec, à chaque fois, un doublement des cas diagnostiqués dans chacune des catégories chez les patients séronégatifs pour le VIH et à l'inverse une diminution en gros d'un facteur 2 chez les patients séropositifs pour le VIH (**Figure 18**) ( $p < 0,0001$ ). La proportion de femmes a bien entendu augmenté en parallèle ( $p < 0,0001$ ). Une analyse plus détaillée de ces évolutions est prévue prochainement.



**Figure 18 : Principaux facteurs de risque et répartition hommes/femmes selon la période de diagnostic chez les patients ayant une cryptococcose en France (1985 -2017)**

Si l'on compare la 1<sup>ère</sup> et la 3<sup>ème</sup> période, le pourcentage de patients ayant une méningoencéphalite n'a pas beaucoup évolué dans les différentes catégories. Si l'on considère seulement les patients avec méningoencéphalite, la mortalité globale à 3 mois a chuté chez les patients séropositifs et les patients d'hématologie, mais pas dans les autres catégories suggérant une prise en charge différente et/ou un retard de diagnostic (**Figure 19**). Globalement, la mortalité à 3 mois reste significativement plus élevée chez les patients séronégatifs en comparaison des patients séropositifs (27,1% vs. 14,9%,  $p < 0,0001$ ).



**Figure 19 : Comparaison des décès à 3 mois selon le facteur de risque de cryptococcose et la période de diagnostic**

### Fongémies

Nous ne ferons pas de bilan spécifique de l'ODL car nous venons d'analyser les fongémies en hématologie<sup>6</sup> et les levures rares<sup>7</sup>.

Contrairement à l'ODL où seules les fongémies à levures étaient colligées, dans RESSIF, tout champignon isolé du sang est répertorié. On compte ainsi au moment du bilan, 4455 épisodes avec hémocultures positives comprenant 4389 levures, 15 champignons dimorphiques et 51 filamenteux.

Parmi les levures, 3% (n=130) étaient des basidiomycètes (75 *Cr. neoformans*, 22 *Rhodotorula mucilaginosa*, 22 *Trichosporon* spp., et 11 *Malassezia* spp.). Parmi les 4259 levures ascomycètes, les principales étaient, comme dans l'observatoire des levures *C. albicans* (51,5%), *C. glabrata* (16,8%), *C. parapsilosis* (12,5%), *C. tropicalis* (7,4%), *C. krusei* (3,1%), *C. kefyr* et *Cl. lusitaniae* (1,8% chacun). Des

<sup>6</sup> Lortholary O, et al. (2017) The risk and clinical outcome of candidemia depending on underlying malignancy. *Intensive Care Med* 38(Suppl 7):311–662.

<sup>7</sup> Bretagne S, et al. (2017) Predisposing factors and outcome of uncommon yeast species-related fungaemia based on an exhaustive surveillance programme (2002-14). *J Antimicrob Chemother.* doi:10.1093/jac/dkx045.

espèces très rarement isolées en pathologie humaine ont été identifiées (*Candida catenulata*, *Candida homilientoma*, *Candida sorbosivorans*, *Candida theae*, *Candida rugosa*, *Debaryomyces fabryi*).

Quelques diagnostics de mycoses endémiques ont été faits ou confirmés par des hémocultures positives (*Histoplasma capsulatum* var. *capsulatum*, et 1 *Talaromyces (Penicillium) marneffeii*).

Enfin, 51 infections dues à des champignons filamenteux ont été associées à des hémocultures positives et en particulier 22 infections à *Fusarium* spp., 5 mucormycoses, et 24 espèces variées.

Le tableau clinique et l'évolution sont globalement très différents selon les pathogènes fongiques identifiés, comme le montre le tableau suivant (**Tableau 5**).

**Tableau 5 : Principales caractéristiques des fongémies**

	Levures		Dimorphiques	Filamenteux
	Ascomycètes (n= 4259)	Basidiomycètes (n = 130)	(n=15)	(n=58)
<b>Sexe ratio</b>	1,6 / 1	2,1 / 1	3,7 / 1	1,1 / 1
<b>Age médian [extrêmes]</b>	63 [0 – 98]	52 [0 – 85]	46 [26 – 61]	57 [0 - 90]
<b>Facteurs de risque</b>				
Pathologie maligne	38,5%	36,4%	14,3%	60,9%
Chirurgie récente	32,2%	8,3%	-	6,5%
Transplantation d'organe	3,3%	9,9%	-	2,2%
Infection VIH	0,2%	22,3%	85,7%	-
Autres	25,5%	21,5%	-	28,3%
Aucun	0,4%	1,7%	-	2,2%
Tt corticoïde prolongé	11,3%	16,2%	6,7%	24,1%
<b>Mortalité globale à 3 mois</b>	41,1%	29,8%	38,5%	39,2%

Aucune tendance n'est décelable au cours du temps ou en fonction des régions. Nous sommes d'ailleurs en train d'analyser les tendances pour les fongémies à levures en collaboration avec Didier Che (SPF) en utilisant la base ODL qui nous permet d'analyser une période beaucoup plus longue.

### ***Pneumocystoses***

Depuis 2012, 1707 cas de pneumocystose ont été répertoriés dans RESSIF. Il s'agissait majoritairement d'hommes (65,2%) adultes (59±16 ans) avec seulement 1,8% d'enfants (**Tableau 6**). Les patients étaient infectés par le VIH dans 17% des cas seulement. Les conditions prédisposantes pour les patients séronégatifs se répartissaient entre pathologies malignes (58,5%), transplantation d'organe (18,6%) et autres pathologies (22,0%). A noter que dans un certain nombre de cas, la pneumocystose était diagnostiquée en même temps qu'une autre IFI (aspergillose pulmonaire (n=36), cryptococcose (n=6) et scedosporiose (n=1)). Les co-infections aspergilloso-pneumocystoses sont en cours d'analyse par l'un des CC-CNRMA (Rennes, F. Robert-Gangneux) en collaboration avec le CNRMA.

L'examen direct était positif dans 48,7% et la PCR dans 82,6 % des cas en moyenne avec des variations significatives selon le terrain (p<0,0001). Le diagnostic était établi par la seule PCR dans 51% des cas (examen direct négatif) et par le seul examen direct dans 17% des cas.

Le diagnostic des pneumocystoses continue à poser des problèmes en l'absence de consensus sur les critères. Un travail d'harmonisation des résultats des PCR diagnostiques au niveau des laboratoires européens a été fait. Il s'agit d'une première étape sur les outils diagnostiques, sachant que cela ne résoudra pas les questions d'interprétation qui ne pourront être abordées qu'en collaboration avec les cliniciens. Les épisodes de PCP étaient classés en infections prouvées (microscopie positive - 55,7%), infections probables (microscopie négative et PCR positive avec un Cq ≤30 - 24,5%) et infections possibles pour les autres cas (19,8%), avec des différences significatives selon le terrain (p<0,0001).

Le pronostic des pneumocystoses était meilleur chez les patients séropositifs pour le VIH comparé aux autres, et en particulier aux patients atteints de pathologie maligne ( $p < 0,001$ , logrank test) (**Tableau 6**).

**Tableau 6 : Caractéristiques des épisodes de pneumocystoses**

	VIH	Transplantation d'organe	Pathologie maligne	Autre
<b>Sex ratio</b>	3,1 / 1	1,5 / 1	1,9 / 1	1,4 / 1
<b>Age médian</b> [extrêmes]	47 [1,5 – 75,0]	61 [9 – 88]	65 [0,2 – 89]	64 [0,3 – 90]
<b>Moyens diagnostiques</b>				
Ex. direct positif	79,2%	58,8%	39,2%	39,6%
PCR positive	69,6%	76,1%	85,9%	90,2%
<b>Type d'infection</b>				
Prouvée	82%	67%	45,5%	50%
Probable	14,5%	23%	28%	26%
<b>Mortalité globale à 3 mois</b>	6,6%	17,1%	35,9%	27,9%

### *Mucormycoses*

Pour les 260 cas de mucormycoses rapportés dans RESSIF (67% d'hommes, âge moyen de 58 ans, 9 enfants), les principaux facteurs de risque se répartissaient en pathologie maligne (63,5%), diabète (9,2%), transplantation (7,7%), et traumatisme/brûlures étendues (13,1%). L'infection invasive était prouvée dans 56,9% des cas. Une infection simultanée par un autre pathogène dans le même site était diagnostiquée pour 52 patients (*Aspergillus* spp. dans 81% des cas). Dans 48,4% des cas en moyenne, l'épisode de mucormycose survenait alors que le patient était sous antifongiques, plus fréquemment chez les patients d'hématologie (61,9%) que les autres ( $p < 0,001$ ). Les localisations différaient selon le facteur de risque sous-jacent (**Tableau 7**).

**Tableau 7 : Caractéristiques des mucormycoses répertoriées dans RESSIF**

	Hémopathies malignes (n = 165)	Transplantation d'organe (n = 20)	Diabète (n = 24)	Brûlures étendues – traumatisme (n = 34)
<b>Sex ratio</b>	1,8 / 1	2,3 / 1	5 / 1	2,1 / 1
<b>Age médian</b> [extrêmes]	9 [4 – 83]	57,5 [8 – 77]	62 [41 – 85]	48 [17 – 81]
<b>Localisation</b>				
Pulmonaire	64,5%	61,1%	31,8%	16,1%
ORL	18,2%	18,8%	59,1%	3%
Ostéoarticulaire	-	-	9,1%	19,4%
Cutanées	11,9%	12,5%	-	61,3%
<b>IFI prouvée</b>	50,3%	60,0%	75,0%	76,5%
<b>Moyens diagnostiques</b>				
Isolement en culture	61,0%	75,0%	79,2%	97,1%
Histologie	58,1%	65,0%	91,7%	75,5%
PCR diagnostique	55,2%	25,0%	45,8%	32,4%
<b>Mortalité globale à 3 mois</b>	75,5%	52,6%	45,0%	41,7%

Le diagnostic avait été fait par culture (69,2%), histologie/examen direct (64,3%) et/ou PCR (48,6%). L'identification polyphasique systématique des isolats permet de mettre en évidence une diversité impressionnante en termes de genres et espèces avec 6 espèces représentant 84% du total. On constate des différences de répartition des espèces selon le terrain sous-jacent (**Figure 20**), rendant importante l'identification précise des espèces en cause, et ceci d'autant plus que la mortalité associée semble différer selon les espèces, potentiellement en rapport avec la pathologie en cause et la localisation de l'infection.

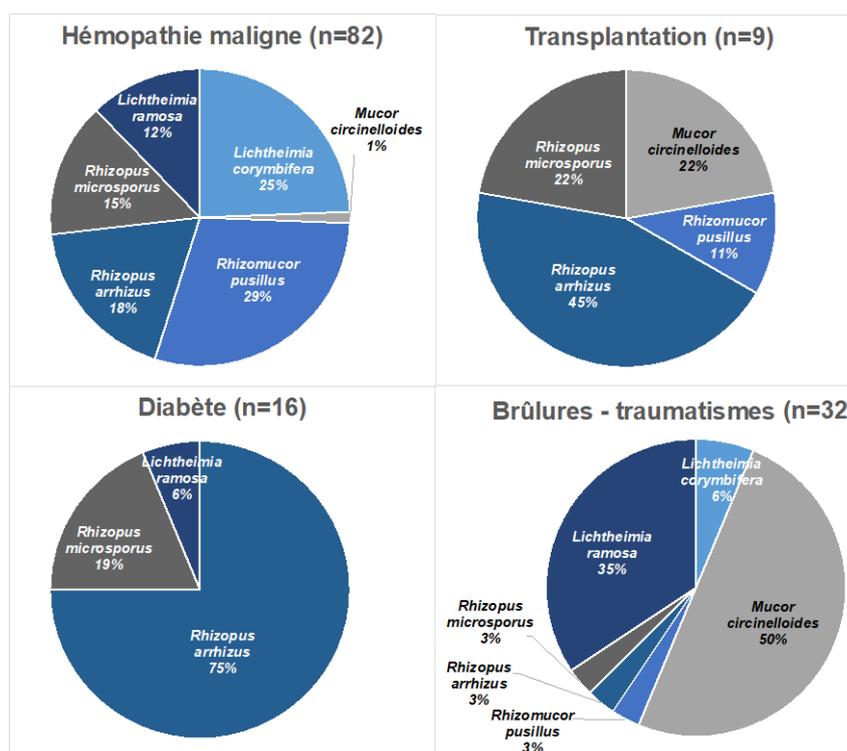


Figure 20 : Distribution des 6 principales espèces de Mucorales en fonction du terrain

En revanche, il ne semble pas y avoir de différence majeure de sensibilité aux antifongiques (Tableau 8), sauf peut-être les CMI de certains antifongiques un peu plus basses sur *Rhizomucor pusillus* (le tableau complet des CMI ainsi que les données sur l'isavuconazole figurent plus loin).

Tableau 8 : Profil de sensibilité des 6 principales espèces de Mucorales

Espèce (nombre d'isolats testés)	Valeurs des CMI 150 / CMI 90 (mg/L) pour les antifongiques*						
	AMB	Itra	Vori	Posa	Caspo	Mica	Terbi
<i>Lichtheimia corymbifera</i> (n=60)	0.5/0.5	1/≥8	≥8/≥8	0.5/1	≥8/≥8	≥8/≥8	0.5/1
<i>Lichtheimia ramosa</i> (n=65)	0.12/0.25	2/≥8	≥8/≥8	0.5/1	≥8/≥8	≥8/≥8	1/2
<i>Mucor circinelloides</i> (n=63)	0.03/0.12	≥8/≥8	≥8/≥8	1/≥8	≥8/≥8	≥8/≥8	≥8/≥8
<i>Rhizomucor pusillus</i> (n=54)	0.06/0.12	0.5/1	≥8/≥8	0.25/0.5	≥8/≥8	≥8/≥8	0.25/0.5
<i>Rhizopus arrhizus</i> (n=82)	0.12/0.25	0.5/4	8/≥8	0.25/1	≥8/≥8	≥8/≥8	≥8/≥8
<i>Rhizopus microsporus</i> (n=51)	0.06/0.12	1/≥8	8/≥8	0.5/1	≥8/≥8	≥8/≥8	0.5/1

### Aspergilloses

De 2012 à 2017, 1371 cas d'AI ont été répertoriés dans RESSIF, dont 84% d'infections probables et 16% d'infections prouvées. L'âge médian des 1352 patients était de 59 ans [0-91 ans] avec 2,8% d'enfant et une majorité d'hommes (63,6%). Dans 2% des cas il s'agissait d'une récurrence.

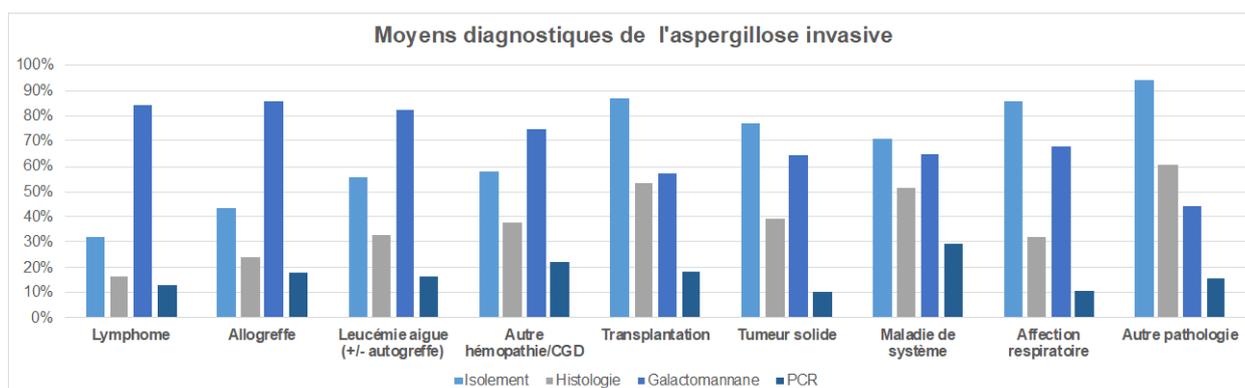
Dans près de 10% des cas, le site anatomique était infecté par 2 pathogènes, le plus souvent par deux espèces d'*Aspergillus* (n=35), mais pouvaient être associés à l'*Aspergillus* une *Mucorale* (n=42), *Pneumocystis jirovecii* (n=37), un *Fusarium* spp. (n=8) ou d'autres filamenteux (n=8). Dans 16 cas supplémentaires, une fongémie concomitante à l'aspergillose était diagnostiquée.

Nous avons analysé les facteurs de risque en utilisant les catégories que nous avons utilisées pour l'analyse de SAIF<sup>8</sup> : lymphomes (25,2%), allogreffes quel qu'en soit le motif (18,1%), leucémies aiguës ± autogreffe

<sup>8</sup> Lortholary O, et al. Epidemiological trends in invasive aspergillosis in France: the SAIF network (2005-2007). Clin Microbiol Infect. 2011; 17:1882-1889.

(11,5%), autres hémopathies et déficits immunitaires congénitaux (11,9%), transplantations d'organes (11,1%), cancers (6,5%), pathologies respiratoires chroniques (2,1%), maladies de système (3,0%) et diverses pathologies autres (10,7%). Près d'un tiers des patients globalement (32,7%) et plus de la moitié des patients ayant eu une allogreffe (52,7%) avaient un traitement antifongique au moment du diagnostic de l'aspergillose.

Il faut cependant garder en mémoire que les critères de diagnostic de l'AI imposent des critères d'hôte que ne remplissent pas nécessairement les patients ayant des pathologies respiratoires chroniques par exemple. Les modalités du diagnostic variaient considérablement selon le terrain sous-jacent (**Figure 21**).



**Figure 21 : Éléments contribuant au diagnostic de l'aspergillose invasive**

Lorsqu'un *Aspergillus* est isolé, l'espèce en cause était *Aspergillus fumigatus* dans plus de deux tiers des cas (67%), et globalement, l'isolat appartenait dans 80% des cas à la section *Fumigati*, et rarement aux sections *Flavi* (8%), *Nidulantes* ou *Nigri* (4% chacune) ou *Terrei* (2%). Cette distribution changeait ( $p=0,051$ ) si le patient avait reçu des antifongiques antérieurement, avec un peu moins d'isolats de la section *Fumigati* (74,8%) et davantage de section *Nidulantes* (5,2% vs. 3,8%), *Nigri* (5,7% vs. 2,7%) ou d'*A. calidoustus* (3,23% vs. 0,6%,  $p=0,004$ ). La distribution changeait aussi en fonction du terrain sous-jacent (**Figure 22**). Des données complémentaires sont nécessaires pour savoir s'il s'agit d'une réelle différence ou d'un simple biais d'interprétation des résultats de la culture.

En analysant l'évolution globale pour les 1123 patients pour lesquels elle était rapportée, la mortalité globale était de 41% à 3 mois. Elle était significativement plus élevée en cas d'infection par une espèce de la section *Fumigati* ( $n=518$ , 47,7%,  $p=0,018$ ) et en revanche plus faible en cas d'infection par une espèce de la section *Nigri* ( $n=21$ , 23,8%,  $p=0,042$ ) qu'en cas d'infection par une autre espèce (35,2%). L'évolution, connue pour 6 des 10 patients infectés par *A. calidoustus*, était fatale dans 100% des cas dans un délai médian de 5 jours [0-68 j]. L'évolution variait aussi significativement en fonction du facteur de risque ( $p<0,0001$ ) avec une mortalité globale de 66,7% en cas de pathologie respiratoire chronique ( $n=21$ ) à 30,5% chez les patients transplantés d'organes solides ( $n=124$ ). La mortalité était significativement également plus élevée si le diagnostic était fait avec isolement d'une souche (45,3% vs. 35,4%,  $p=0,001$ ), la détection du galactomannane aspergillaire (44,5% vs. 30,7%,  $p<0,0001$ ) ou l'histologie (45,4% vs. 38,8%,  $p=0,037$ ).

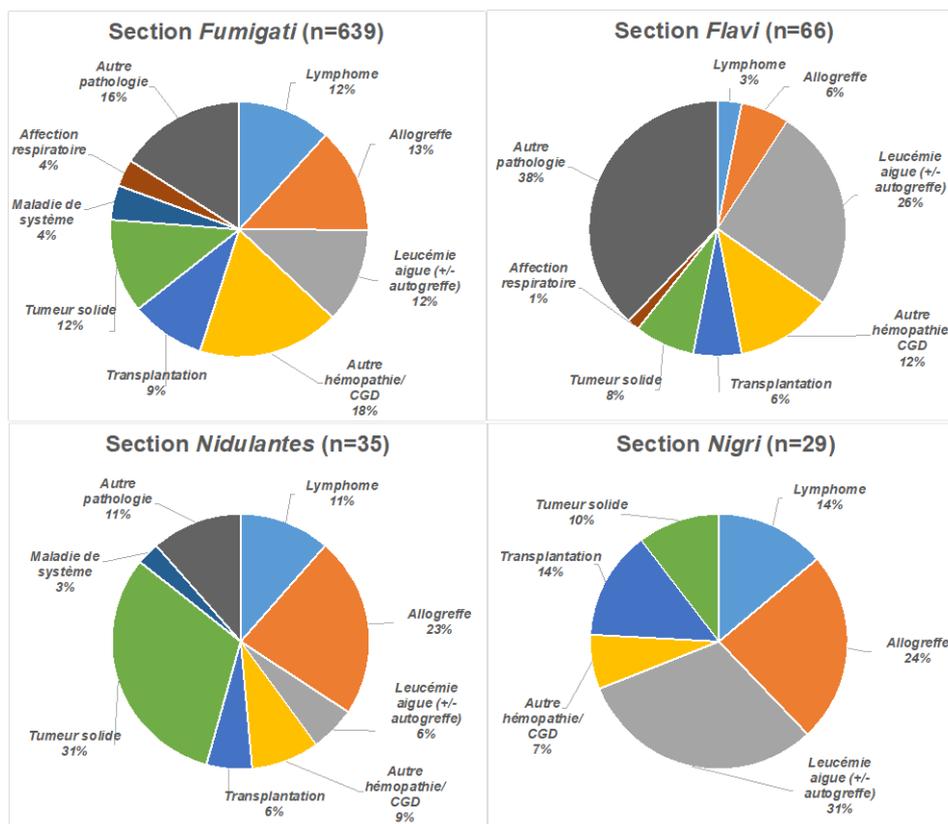


Figure 22 : Pathologies sous-jacentes selon l'espèce impliquée dans l'AI

### *Fusarioses*

Nous avons actuellement répertorié 193 cas d'infection à *Fusarium* spp, dont 53% sont des infections prouvées, et 65,8% sont des infections oculaires. Cette dernière localisation est associée à des traumatismes par corps étrangers et en particulier des lentilles de contact, ce qui explique la prédominance féminine (seulement 37,8% d'hommes) et l'âge médian plus jeune (37 ans [17-75]). Les autres localisations étaient des localisations ostéo-articulaires et/ou cutanées (15%), majoritairement liées à des traumatismes locaux et/ou brûlures étendues (72,4%) mais survenant aussi dans un contexte d'immunosuppression (25,6%), qui accompagnait les autres tableaux cliniques dans 83,8% des cas (fongémies (54,1%), localisation pulmonaires (32,4%) et ORL (8,1%)). Il faut noter qu'une prescription antifongique antérieure était notée pour 15,3% des patients, plus fréquemment dans un contexte hématologique (59,5% des patients) que dans les autres situations ( $p < 0,0001$ ). La mortalité globale à 3 mois était de 28% dans les localisations non oculaires. La mortalité était de 32,4% en hématologie et de 19,4% dans les cas de traumatisme loco-régional (incluant les brûlures étendues).

Cette analyse succincte montre que la base de données RESSIF est, d'ores et déjà, une source pertinente d'information, à la fois sur les pathologies rencontrées en France et leur évolution, sur les espèces impliquées et leurs caractéristiques (génotypes, sensibilité aux antifongiques), mais aussi sur les pratiques diagnostiques et thérapeutiques. Cette base de données doit servir à des analyses approfondies des différentes tendances évolutives de ces infections qui sont en cours, en collaboration avec certains des CC-CNRMA.

### 3.3 Surveillance de la résistance des agents pathogènes aux anti-infectieux

Dans la mesure où les seuils de résistance n'ont été définis pour cette technique que pour quelques antifongiques et sur les espèces communes, nous présenterons les résultats en termes de CMI50 et de CMI90, c'est-à-dire, les concentrations correspondant aux concentrations minimales de l'antifongique inhibant respectivement 50% et 90% des isolats de l'espèce concernée. Soulignons cependant que depuis

notre étude publiée en 2008<sup>9</sup>, nous recherchons systématiquement une mutation dans le gène *Fks* lorsque la CMI de la caspofungine est  $\geq 0,5$   $\mu\text{g/ml}$  en AM3 (sauf pour les isolats de *C. parapsilosis*). En pratique, nous interprétons donc les résultats des CMI en fonction du profil de sensibilité obtenu pour les isolats de la même espèce testés dans les mêmes conditions au CNRMA, en sachant que cette interprétation est d'autant plus fiable que le nombre d'isolats déjà testés est grand. Pour améliorer la lisibilité de ce rapport, nous avons choisi de présenter les données cumulées des profils de CMI obtenus depuis 2003 pour les levures et les champignons filamenteux séparément.

### Définitions utilisées pour exprimer la résistance

Nous retranscrivons ici les seuils établis par le comité EUCAST pour *Candida* sp. (**Tableau 9**) et *Aspergillus* spp. (**Tableau 10**), sachant que, pour la caspofungine et la micafungine, nous avons modifié la technique en utilisant le milieu AM3 au lieu du milieu RPMI, et établi qu'une CMI de la caspofungine au-dessus de 0,5mg/L pour une espèce de *Candida* autre que celles du complexe *C. parapsilosis/orthopsilosis/metapsilosis*, était habituellement associée à une mutation dans le hot spot d'un ou plusieurs gènes *Fks*.

**Tableau 9 : Seuils cliniques EUCAST pour *Candida* spp.**

*Candida* spp.

EUCAST Antifungal Clinical Breakpoint Table v. 9.0 valid from 2018-02-12

MIC method (EUCAST standardised broth microdilution method)  
 Medium: RPMI1640-2% glucose, MOPS buffer  
 Inoculum: Final  $0.5 \times 10^8 - 2.5 \times 10^8$  cfu/mL  
 Incubation: 18-24h  
 Reading: Spectrophotometric, complete (>90%) inhibition for amphotericin B but 50% growth inhibition for other compounds  
 Quality control: *C. parapsilosis* ATCC 22019 or *C. krusei* ATCC 6258

Antifungal agent	MIC breakpoint (mg/L)																
	<i>C. albicans</i>		<i>C. dubliniensis</i>		<i>C. glabrata</i>		<i>C. krusei</i>		<i>C. parapsilosis</i>		<i>C. tropicalis</i>		<i>C. guilliermondii</i>		Non-species related breakpoints <sup>1</sup>		
	S $\leq$	R >	S $\leq$	R >	S $\leq$	R >	S $\leq$	R >	S $\leq$	R >	S $\leq$	R >	S $\leq$	R >	S $\leq$	R >	
Amphotericin B	1	1	IE	IE	1	1	1	1	1	1	1	1	1	IE	IE	IE	IE
Anidulafungin	0.032	0.032	IE	IE	0.064	0.064	0.064	0.064	0.002	4	0.064	0.064	IE <sup>2</sup>	IE <sup>2</sup>	IE	IE	
Caspofungin	Note <sup>3</sup>	Note <sup>3</sup>	IE	IE	Note <sup>3</sup>	Note <sup>3</sup>	Note <sup>3</sup>	Note <sup>3</sup>	Note <sup>3</sup>	Note <sup>3</sup>	Note <sup>3</sup>	Note <sup>3</sup>	IE <sup>2</sup>	IE <sup>2</sup>	IE	IE	
Fluconazole	2	4	IE	IE	0.002	32	-	-	2	4	2	4	IE <sup>2</sup>	IE <sup>2</sup>	2	4	
Isavuconazole	IE	IE	IE	IE	IE	IE	IE	IE	IE	IE	IE	IE	IE	IE	IE	IE	
Itraconazole	0.064	0.064	0.064	0.064	IE <sup>2</sup>	IE <sup>2</sup>	IE <sup>2</sup>	IE <sup>2</sup>	0.125	0.125	0.125	0.125	IE <sup>2</sup>	IE <sup>2</sup>	IE	IE	
Micafungin	0.016	0.016	IE	IE	0.032	0.032	IE <sup>4</sup>	IE <sup>4</sup>	0.002	2	IE <sup>4</sup>	IE <sup>4</sup>	IE <sup>4</sup>	IE <sup>4</sup>	IE	IE	
Posaconazole	0.064	0.064	0.064	0.064	IE <sup>2</sup>	IE <sup>2</sup>	IE <sup>2</sup>	IE <sup>2</sup>	0.064	0.064	0.064	0.064	IE <sup>2</sup>	IE <sup>2</sup>	IE	IE	
Voriconazole <sup>6</sup>	0.064 <sup>5</sup>	0.25 <sup>5</sup>	0.064	0.25	IE	IE	IE	IE	0.125 <sup>5</sup>	0.25 <sup>5</sup>	0.125 <sup>5</sup>	0.25 <sup>5</sup>	IE <sup>2</sup>	IE <sup>2</sup>	IE	IE	

### Notes

1. Non-species related breakpoints have been determined mainly on the basis of PK/PD data and are independent of MIC distributions of specific species. They are for use only for organisms that do not have specific breakpoints. 2. The ECOFFs for these species are in general higher than for *C. albicans*. 3. Isolates that are susceptible to anidulafungin as well as micafungin should be considered susceptible to caspofungin, until caspofungin breakpoints have been established. Similarly, *C. parapsilosis* isolates intermediate to anidulafungin and micafungin can be regarded intermediate to caspofungin. EUCAST breakpoints have not yet been established for caspofungin, due to significant inter-laboratory variation in MIC ranges for caspofungin. 4. MICs for *C. tropicalis* are 1-2 two-fold dilution steps higher than for *C. albicans* and *C. glabrata*. In the clinical study successful outcome was numerically slightly lower for *C. tropicalis* than for *C. albicans* at both dosages (100 and 150 mg daily). However, the difference was not significant and whether it translates into a relevant clinical difference is unknown. MICs for *C. krusei* are approximately three two-fold dilution steps higher than those for *C. albicans* and, similarly, those for *C. guilliermondii* are approximately eight two-fold dilutions higher. In addition, only a small number of cases involved these species in the clinical trials. This means there is insufficient evidence to indicate whether the wild-type population of these pathogens can be considered susceptible to micafungin. 5. Strains with MIC values above the S/I breakpoint are rare or not yet reported. The identification and antifungal susceptibility tests on any such isolate must be repeated and if the result is confirmed the isolate sent to a reference laboratory. Until there is evidence regarding clinical response for confirmed isolates with MIC above the current resistant breakpoint they should be reported resistant. A clinical response of 76% was achieved in infections caused by the species listed below when MICs were lower than or equal to the epidemiological cut-offs. Therefore, wild type populations of *C. albicans*, *C. dubliniensis*, *C. parapsilosis* and *C. tropicalis* are considered susceptible. 6. For *Candida* the intermediate category is introduced to acknowledge that the increased exposure obtained by iv dosing is sufficient (potentially confirmed by TDM). There is not enough information available for the response to voriconazole of infections caused by *Candida* isolates with higher MICs

<sup>9</sup> Desnos-Ollivier M, et al. Mutations in the *fks1* gene in *Candida albicans*, *C. tropicalis*, and *C. krusei* correlate with elevated caspofungin MICs uncovered in AM3 medium using the method of the European Committee on Antibiotic Susceptibility Testing. Antimicrob Agents Chemother. 2008; 52:3092-3098.

**Tableau 10: Seuils cliniques EUCAST pour *Aspergillus* spp.**

*Aspergillus* spp.

EUCAST Antifungal Clinical Breakpoint Table v. 9.0 valid from 2018-02-12

MIC method (EUCAST standardised broth microdilution method)  
 Medium: RPMI1640-2% glucose, MOPS as buffer  
 Inoculum: Final 1x10<sup>5</sup> – 2.5x10<sup>5</sup> cfu/mL  
 Incubation: 48h  
 Reading: Visual, complete inhibition for amphotericin B and azoles (MIC), aberrant growth endpoint for echinocandins (MEC).  
 Quality control: *A. fumigatus* ATCC 204305, *A. flavus* ATCC 204304, *A. fumigatus* F 6919, *A. flavus* CM 1813, *C. parapsilosis* ATCC 22019 (read after 18-24 h) or *C. krusei* ATCC 6258 (read after 18-24 h).

Antifungal agent	MIC breakpoint (mg/L)											
	<i>A. flavus</i>		<i>A. fumigatus</i>		<i>A. nidulans</i>		<i>A. niger</i>		<i>A. terreus</i>		Non-species related breakpoints <sup>1</sup>	
	S ≤	R >	S ≤	R >	S ≤	R >	S ≤	R >	S ≤	R >	S ≤	R >
Amphotericin B	IE <sup>2</sup>	IE <sup>2</sup>	1	2	Note <sup>3</sup>	Note <sup>3</sup>	1	2	-	-	IE	IE
Anidulafungin	IE	IE	IE	IE	IE	IE	IE	IE	IE	IE	IE	IE
Caspofungin	IE	IE	IE	IE	IE	IE	IE	IE	IE	IE	IE	IE
Fluconazole	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Isavuconazole	IE <sup>2</sup>	IE <sup>2</sup>	1	1	0.25	0.25	IE <sup>2</sup>	IE <sup>2</sup>	1	1	IE	IE
Itraconazole <sup>4</sup>	1	2	1	2	1	2	IE <sup>2,5</sup>	IE <sup>2,5</sup>	1	2	IE <sup>5</sup>	IE <sup>5</sup>
Micafungin	IE	IE	IE	IE	IE	IE	IE	IE	IE	IE	IE	IE
Posaconazole <sup>4</sup>	IE <sup>2</sup>	IE <sup>2</sup>	0.125 <sup>6</sup>	0.25 <sup>6</sup>	IE <sup>2</sup>	IE <sup>2</sup>	IE <sup>2</sup>	IE <sup>2</sup>	0.125 <sup>6</sup>	0.25 <sup>6</sup>	IE	IE
Voriconazole <sup>4</sup>	IE <sup>2</sup>	IE <sup>2</sup>	1	2	IE	IE	IE <sup>2</sup>	IE <sup>2</sup>	IE <sup>2</sup>	IE <sup>2</sup>	IE	IE

**Notes**

1. Non-species related breakpoints have been determined mainly on the basis of PK/PD data and are independent of MIC distributions of specific species. They are for use only for organisms that do not have specific breakpoints. 2. The ECOFFs for these species are in general one step higher than for *A. fumigatus*. 3. There are too few MIC data to establish ECOFFs and hence to suggest any breakpoints. 4. Monitoring of azole trough concentrations in patients treated for fungal infection is recommended. 5. The MIC values for isolates of *A. niger* and *A. versicolor* are in general higher than those for *A. fumigatus*. Whether this translates into a poorer clinical response is unknown. 6. Provided adequate drug exposure has been confirmed using therapeutic drug monitoring (TDM). There remains some uncertainty regarding cut-off values for posaconazole concentrations that separate patients with a high probability of clinical success from those with a low probability of clinical success. In some circumstances (e.g. patients with persistent and profound neutropenia, large lesions, or those with other features associated with a poor clinical outcome) a relatively high trough concentration should be sought. Preclinical and clinical data suggest this value should be >1 mg/L at steady state. For other patient groups a lower trough concentration may be acceptable. For prophylaxis a target concentration of >0.7 mg/L has been suggested.

**Résultats de la surveillance des résistances aux antifongiques pour les levures**

Les données du CNRMA concernent actuellement plus de 8000 isolats de levures dont la sensibilité a été testée à 8 ou 9 antifongiques systémiques. Nous présentons ci-dessous les résultats concernant les espèces pour lesquelles plus de 10 isolats ont été testés depuis 2003, et les antifongiques pertinents correspondants (Tableau 11).

Il faut remarquer que les CMI50 et les CMI90 du voriconazole et du posaconazole sont nettement plus hautes pour *C. glabrata* et *C. krusei* que pour *C. albicans* confirmant l'existence fréquente de "résistances" croisées. A quelques exceptions près, les CMI hautes observées font partie du profil naturel des espèces (comme *C. krusei* et le fluconazole, *C. haemulonii* et l'amphotéricine B et les azolés, *C. parapsilosis* et les échinocandines). La distribution des valeurs de CMI de la micafungine est comparable à celle de la caspofungine sur les espèces de levures « fréquentes ». Comme la caspofungine, la micafungine n'a pas d'activité sur les levures des genres *Cryptococcus*, *Geotrichum*, *Rhodotorula* et *Trichosporon*. Il n'y a donc pas d'argument microbiologique pour privilégier l'une ou l'autre des échinocandines disponibles en France. La détermination de l'espèce permettant le plus souvent de prédire la susceptibilité aux antifongiques, la détermination systématique de la sensibilité aux antifongiques est donc pour l'instant secondaire dans la prise en charge thérapeutique en dehors de circonstances particulières (échecs, prescriptions antérieures d'antifongiques). Par contre, les données de CMI sont un élément très important de la surveillance épidémiologique lorsque les données sont générées avec la même technique et centralisées comme ici au CNRMA.

**Tableau 11 : Profil de sensibilité des levures aux antifongiques**  
(mise à jour 09/03/2018)

Espèces étudiées		Valeurs des CMI50 / CMI90 mg/L pour les antifongiques*						
Nom d'usage en clinique (nbre d'isolats testés)	Nom actuel	AMB	5-FC	Fluco	Vori	Posa	Caspo**	Mica**
<i>C. albicans</i> (n=3007)		0.06/0.12	≤0.12/0.5	0.25/0.5	≤0.01/≤0.01	0.03/0.06	0.03/0.06	0.03/0.03
<i>C. dubliniensis</i> (n=120)		≤0.014/0.06	≤0.12/≤0.12	≤0.12/0.25	≤0.01/≤0.01	0.03/0.06	0.03/0.03	0.015/0.03
<i>C. glabrata</i> (n=1173)		0.12/0.25	≤0.12/≤0.12	16/64	0.25/1	0.5/2	0.06/0.12	0.03/0.03
<i>C. nivariensis</i> (n=10)		0.12/0.12	1/1	4/4	0.06/0.12	0.25/0.25	0.06/0.12	0.015/-
<i>C. parapsilosis</i> (n=733)		0.06/0.12	≤0.12/0.25	0.5/2	≤0.01/0.06	0.06/0.12	0.25/1	0.25/0.5
<i>C. orthopsilosis</i> (n=39)		0.03/0.06	≤0.12/≤0.12	0.5/16	0.03/1	0.06/0.12	0.12/0.25	0.12/0.25
<i>C. metapsilosis</i> (n=35)		0.06/0.12	≤0.12/≤0.12	1/2	0.03/0.06	0.03/0.12	0.06/0.25	0.12/0.25
<i>C. tropicalis</i> (n=592)		0.06/0.12	≤0.12/32	0.5/4	0.03/0.25	0.06/0.25	0.03/0.06	0.03/0.03
<i>C. krusei</i> (n=312)	<i>Pichia kudriavzevii</i>	0.12/0.25	2/4	32/64	0.25/0.5	0.12/0.25	0.12/0.25	0.06/0.12
<i>C. inconspicua</i> (n=35)		0.12/0.25	2/4	16/32	0.12/0.5	0.12/0.25	0.03/0.06	0.03/0.03
<i>C. kefyr</i> (n=159)	<i>Kluyveromyces marxianus</i>	0.06/0.25	0.5/8	0.25/1	≤0.01/≤0.01	0.06/0.12	0.015/0.03	0.03/0.06
<i>C. guilliermondii</i> (n=102)	<i>Meyerozyma guilliermondii</i>	0.03/0.06	≤0.12/≤0.12	8/64	0.06/0.5	0.25/0.5	0.06/0.25	0.12/0.25
<i>C. fermentati</i> (n=32)	<i>Meyerozyma caribbica</i>	0.12/0.25	≤0.12/≤0.12	8/64	0.12/2	0.25/0.5	0.12/0.5	0.25/2
<i>C. lusitaniae</i> (n=180)	<i>Clavospora lusitaniae</i>	0.06/0.25	≤0.12/1	0.25/0.5	≤0.01/0.03	0.03/0.06	0.03/0.06	0.03/0.06
<i>C. haemulonii</i> (n=39)		<b>0.5/2</b>	≤0.12/0.25	32/≥64	≥8/≥8	2/≥8	0.03/0.06	0.06/0.12
<i>C. haemulonii</i> type II (n=38)	<i>Candida duobushaemulonii</i>	2/8	≤0.12/≥64	32/≥64	≥8/≥8	4/≥8	0.03/0.03	0.03/0.06
<i>C. palmiophila</i> (n=20)		0.12/0.5	≤0.12/0.5	8/32	0.12/0.25	0.12/0.25	0.06/0.25	0.03/0.25
<i>Pichia jadinii</i> (n=23)	<i>Cyberlindnera jadinii</i>	0.06/0.12	≤0.12/1	1/4	0.06/0.12	0.12/0.25	0.015/1	0.015/2
<i>C. pelliculosa</i> (n=32)	<i>Wickerhamomyces anomalus</i>	0.06/0.12	≤0.12/16	2/4	0.12/0.25	0.25/0.5	0.03/0.06	0.03/0.03
<i>Pichia ohmeri</i> (n=29)	<i>Kodamaea ohmeri</i>	0.06/0.06	≤0.12/1	4/16	0.03/0.12	0.06/0.12	0.06/≥8	0.06/ 0.12
<i>Pichia norvegensis</i> (n=15)		0.06/0.12	4/8	32/64	0.25/0.5	0.12/0.25	0.06/0.06	0.03/0.06
<i>S. cerevisiae</i> (n=56)		0.06/0.12	≤0.12/≤0.12	8/16	0.12/0.25	0.5/1	0.12/0.25	0.12/0.25
<i>C. lipolytica</i> (n=23)	<i>Yarrowia lipolytica</i>	0.5/2	16/≥64	4/8	0.06/0.12	0.25/1	0.12/0.5	0.25/0.25
<i>Geotrichum candidum</i> (n=34)	<i>Galactomyces candidus</i>	0.25/0.5	0.25/1	16/64	0.25/1	0.25/1	1/≥8	0.5/≥8
<i>G. capitatum</i> (n=54)	<i>Magnusiomyces capitatus</i>	0.25/0.5	≤0.12/0.25	8/16	0.06/0.5	0.12/1	≥8/≥8	≥8/≥8
<i>G. clavatum</i> (n=158)	<i>Saprochaete clavata</i>	0.25/0.5	0.5/1	32/64	0.5/2	0.5/1	≥8/≥8	≥8/≥8
<i>Cr. neoformans</i> var. <i>grubii</i> (n=869)		0.25/0.5	4/16	4/8	0.06/0.12	0.12/0.25	≥8/ ≥8	4/≥8
<i>Cr. neoformans</i> var. <i>neoformans</i> (n=203)		0.12/0.25	4/16	1/4	≤0.015/0.06	0.03/0.25	≥8/ ≥8	1/≥8
<i>Cr. neoformans</i> hybrides AD (n=120)		0.12/0.25	4/16	2/8	0.03/0.12	0.06/0.12	≥8/ ≥8	2/≥8
<i>Cr. gattii</i> (n = 27)		0.12/0.25	2/8	8/16	0.12/0.5	0.25/0.5	≥8/ ≥8	≥8/≥8
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i> (n=45)		0.25/0.5	0.25/0.5	≥64/≥64	2/8	1/2	≥8/ ≥8	≥8/≥8
<i>Trichosporon asahii</i> (n=52)		2/≥8	32/≥64	4/16	0.06/0.25	0.25/0.5	≥8/≥8	4/≥8

\* AMB (amphotéricine B), 5-FC (5-fluorocytosine), Fluco (fluconazole), Vori (voriconazole), Posa (posaconazole), Caspo (casprofingine), Mica (micafungine). \*\* En raison d'un changement du milieu test (RPMI remplacé par AM3), les résultats ne concernent que les souches testées depuis début 2005 pour la casprofingine ou début 2008 pour la micafungine.

Dans la mesure où l'isavuconazole n'a été testé que depuis janvier 2015, nous présentons ici la comparaison des CMI sur des espèces pour lesquelles plus de 10 isolats ont été testés en parallèle avec les différents azolés (**Tableau 12**). Sur ces espèces, les CMI de l'isavuconazole sont équivalentes à celles du voriconazole sauf sur les isolats de *S. cerevisiae* pour lesquels elles sont un peu plus basses, ceux de *C. neoformans* pour lesquels elles sont un peu plus élevées, mais surtout ceux de *M. capitatus* ou *S. clavata* pour lesquels elles sont très nettement plus élevées.

**Tableau 12: Profil de sensibilité des levures à 4 azolés, dont l'isavuconazole**

pour les espèces pour lesquelles au moins 10 isolats ont été testés depuis janvier 2015 (technique EUCAST, mise à jour 09/03/2018)

Espèce (nbre isolats testés)	CMI50/CMI90 mg/L pour les azolés			
	Fluconazole	Posaconazole	Voriconazole	Isavuconazole
<i>Candida albicans</i> (n=468)	≤0.125/0.25	≤0.015/0.03	≤0.015/≤0.015	≤0.007/≤0.007
<i>Candida dubliniensis</i> (n=45)	≤0.125/0.25	0.03/0.03	≤0.015/≤0.015	≤0.007/≤0.007
<i>Candida glabrata</i> (n=212)	8/32	0.5/1	0.125/0.5	0.25/0.5
<i>Candida parapsilosis</i> (n=54)	0.5/2	0.06/0.125	≤0.015/0.06	0.015/0.03
<i>Candida orthopsilosis</i> (n=13)	0.5/16	0.06/0.125	0.03/1	0.015/0.06
<i>Candida metapsilosis</i> (n=13)	1/1	0.06/0.06	≤0.015/0.03	0.05/0.015
<i>Candida tropicalis</i> (n=109)	0.25/1	0.03/0.06	0.03/0.06	≤0.007/0.03
<i>Pichia kudriavzevii</i> (n=87)	32/≥64	0.125/0.25	0.25/0.5	0.125/0.25
<i>Khuyveromyces marxianus</i> (n=43)	0.25/0.5	0.06/0.125	≤0.015/≤0.015	≤0.007/≤0.007
<i>Clavospora lusitanae</i> (n=64)	0.25/0.5	0.03/0.06	≤0.015/≤0.015	≤0.007/0.015
<i>Meyerozyma guilliermondii</i> (n=25)	4/≥64	0.25/0.5	0.125/0.5	0.25/2
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> (n=19)	4/32	0.5/1	0.25/0.5	0.03/0.5
<i>Kodamaea ohmeri</i> (n=12)	4/4	0.03/0.125	≤0.015/0.06	0.015/0.06
<i>Wickerhamomyces anomalus</i> (n=10)	2/8	0.06/0.25	0.06/0.25	0.06/0.06
<i>Magnusiomyces capitatus</i> (n=28)	4/16	0.12/0.5	0.03/0.25	4/≥4
<i>Saprochaete clavata</i> (n=75)	16/32	0.25/1	0.25/0.5	4/≥4
<i>C. neoformans</i> var. <i>grubii</i> (n=173)	2/8	0.03/0.125	≤0.015/0.06	0.06/0.25
<i>C. neoformans</i> var. <i>neoformans</i> (n=26)	1/2	≤0.015/0.06	≤0.015/0.03	0.015/0.03
<i>C. neoformans</i> AD hybrid (n=31)	2/8	0.03/0.125	≤0.015/0.03	0.03/0.125
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i> (n=18)	≥64/≥64	0.5/2	1/4	1/4
<i>Trichosporon asahii</i> (n=15)	2/8	0.25/0.5	0.06/0.125	0.25/1

### Résultats de la surveillance des résistances aux antifongiques pour les filamenteux

Depuis 2003, le CNRMA a déterminé la sensibilité à 8 ou 9 antifongiques systémiques de près de 2300 isolats de champignons filamenteux (**Tableau 13**). Dans la mesure où l'isavuconazole n'a été testé qu'à partir de 2015, les données sont présentées plus loin dans un tableau séparé car le nombre de souches est plus limité.

Ces isolats nous sont envoyés pour de multiples raisons : difficulté d'identification requérant notre expertise, difficulté de prise en charge thérapeutique en raison de la rareté de l'espèce, de la localisation, de l'immunodéficience de l'hôte ou de l'absence d'efficacité sous traitement. Elles ne proviennent donc pas d'un programme de surveillance systématique (sauf celles qui sont analysées dans le cadre de RESSIF). Cependant, à quelques exceptions près (*A. fumigatus* en particulier), les "résistances" observées font partie du profil naturel des espèces et ne représentent pas des résistances acquises sous traitement antifongique. Les profils de sensibilité des espèces pour lesquelles plus de 5 isolats ont été testés sont présentés. Pour les Mucorales, on retrouve une bonne activité *in vitro* de l'amphotéricine B et une activité du posaconazole variable selon les espèces, et l'absence d'activité du voriconazole et des échinocandines.

**Tableau 13 : Profil de sensibilité des champignons filamenteux aux antifongiques (MAJ 09/03/2018)**

Espèce (nombre d'isolats testés)	Valeurs des CMI50 / CMI90 (mg/L) pour les antifongiques*						
	AMB	Itra	Vori	Posa	Caspo	Mica	Terbi
<i>Cunninghamella bertholletiae</i> (n=12)	0.5/1	1/≥8	≥8/≥8	0.5/1	≥8/≥8	≥8/≥8	0.12/0.25
<i>Lichtheimia corymbifera</i> (n =60)	0.5/0.5	1/≥8	≥8/≥8	0.5/1	≥8/≥8	≥8/≥8	0.5/1
<i>Lichtheimia ornata</i> (n=7)	0.25/-	0.5/-	≥8/-	0.5/-	≥8/-	≥8/-	0.5/-
<i>Lichtheimia ramosa</i> (n=65)	0.12/0.25	2/≥8	≥8/≥8	0.5/1	≥8/≥8	≥8/≥8	1/2
<i>Mucor circinelloides</i> (n=63)	0.03/0.12	≥8/≥8	≥8/≥8	1/≥8	≥8/≥8	≥8/≥8	≥8/≥8
<i>Mucor indicus</i> (n=15)	0.06/0.12	≥8/≥8	≥8/≥8	1/2	≥8/≥8	≥8/≥8	≥8/≥8
<i>Mucor spp.</i> (n=9)	0.12/-	≥8/-	≥8/-	2/-	≥8/-	≥8/-	≥8/-
<i>Rhizomucor pusillus</i> (n=54)	0.06/0.12	0.5/1	≥8/≥8	0.25/0.5	≥8/≥8	≥8/≥8	0.25/0.5
<i>Rhizomucor miehei</i> (n=8)	0.03/-	0.03/-	2/-	0.06/-	≥8/-	2/-	0.25/-
<i>Rhizopus arrhizus</i> (n =82)	0.12/0.25	0.5/4	8/≥8	0.25/1	≥8/≥8	≥8/≥8	≥8/≥8
<i>Rhizopus microsporus</i> (n=51)	0.06/0.12	1/≥8	8/≥8	0.5/1	≥8/≥8	≥8/≥8	0.5/1
<i>Saksenaia vasiformis</i> complex (n=5)	8/-	0.25/-	8/-	0.12/-	≥8/-	≥8/-	0.25/-
<i>Syncephalastrum racemosum</i> (n=5)	≤0.015/-	≥8/-	≥8/-	0.5/-	≥8/-	≥8/-	0.5/-
<i>Acremonium sp.</i> (n=9)	4/-	≥8/-	2/-	≥8/-	≥8/-	≥8/-	4/-
<i>Alternaria infectoria</i> complex (n=27)	0.25/0.5	0.5/1	4/≥8	0.12/0.5	0.5/1	0.06/0.12	0.5/1
<i>Alternaria alternata</i> complex (n=28)	0.25/1	1/4	2/8	0.25/1	0.5/≥8	0.25/≥8	4/≥8
<i>Aspergillus flavus</i> (n=127)	1/4	0.12/0.25	0.5/0.5	0.12/0.25	0.25/0.5	≤0.01/0.03	0.03/0.06
<i>Aspergillus fischeri</i> (n=5)	1/-	0.5/-	0.5/-	0.25/-	0.5/-	0.03/-	0.12/-
<i>Aspergillus fumigatus</i> itraR (CMI>2mg/L) (n=74)	0.25/0.5	≥8/≥8	4/8	1/2	0.5/0.5	≤0.007/0.03	1/4
<i>Aspergillus fumigatus</i> (n=236)	0.25/0.5	0.25/0.5	0.25/1	0.06/0.25	0.5/0.5	0.015/0.03	2/4
<i>Aspergillus nidulans</i> (n=32)	2/4	0.12/0.5	0.12/0.25	0.12/0.5	0.5/4	≤0.01/0.06	0.12/0.5
<i>Aspergillus quadrilineatus</i> (n=16)	0.5/1	0.12/0.5	0.12/0.25	0.12/0.25	2/2	≤0.01/0.03	0.12/0.25
<i>Aspergillus calidoustus</i> (n=16)	1/2	4/≥8	4/8	≥8/≥8	1/≥8	≤0.01/0.12	0.25/0.5
<i>Aspergillus</i> section <i>Usti</i> (n=28)	0.5/1	2/≥8	4/8	≥8/≥8	2/≥8	0.25/≥8	0.25/0.5
<i>Aspergillus</i> section <i>Nigri</i> (n=26)	0.25/0.5	0.5/4	0.5/1	0.25/0.5	0.25/0.5	≤0.01/0.5	0.12/0.5
<i>Aspergillus tubingensis</i> (n=14)	0.25/0.25	0.5/4	1/2	0.25/0.25	0.25/0.25	≤0.01/≤0.0	0.12/0.25
<i>Aspergillus terreus</i> (n=41)	4/8	0.06/0.25	0.5/0.5	0.06/0.12	0.5/2	≤0.01/0.03	0.06/0.12
<i>Aspergillus sydowii</i> (n=5)	2/-	0.5/-	0.5/-	0.25/-	0.12/-	≤0.01/-	0.06/-
<i>Aspergillus versicolor</i> (n=9)	1/-	0.25/-	0.25/-	0.12/-	0.5/-	0.03/-	0.25/-
<i>Aureobasidium pullulans</i> (n=7)	0.25/-	0.03/-	0.12/-	0.06/-	1/-	1/-	1/-
<i>Chaetomium spp.</i> (n=11)	1/8	0.25/0.5	0.25/1	0.25/0.5	1/2	0.25/0.5	1/16
<i>Curvularia spp.</i> (n=18)	0.06/0.25	0.25/≥8	0.5/2	0.12/0.5	0.5/2	0.06/0.5	0.5/2
<i>Doratomyces spp.</i> (n=5)	2/-	≥8/-	4/-	1/-	1/-	0.12/-	2/-
<i>Exophiala dermatitidis</i> (n=30)	0.12/0.25	0.5/1	0.06/0.25	0.12/0.5	4/≥8	1/≥8	0.06/0.25
<i>Exophiala jeanselmei</i> (n=8)	1/-	0.5/-	0.25/-	0.25/-	2/-	2/-	0.06/-
<i>Exophiala oligosperma</i> (n=5)	0.25/-	0.25/-	0.25/-	0.25/-	≥8/-	2/-	0.03/-
<i>Exophiala spinifera</i> (n=7)	0.12/-	0.06/-	0.12/-	0.25/-	2/-	0.25/-	0.06/-
<i>Fonsecaea pedrosoi</i> (n=5)	0.25/-	0.12/-	0.06/-	0.06/-	1/-	1/-	0.03/-
<i>Fonsecaea nubica</i> (n=9)	0.5/-	0.03-	0.06/	0.12/-	1/-	1/-	0.03/-
<i>Fusarium fujikuroi</i> complex (n=132)	4/8	≥8/≥8	4/8	4/≥8	≥8/≥8	≥8/≥8	1/2
<i>Fusarium dimerum</i> complex (n=25)	0.5/0.5	≥8/≥8	2/8	≥8/≥8	≥8/≥8	≥8/≥8	0.5/1
<i>Fusarium incarnatum-equiseti</i> complex (n=5)	1/-	≥8/-	2/-	1/-	≥8/-	≥8/-	4/-
<i>Fusarium oxysporum</i> complex (n=155)	2/4	≥8/≥8	4/8	2/≥8	≥8/≥8	≥8/≥8	2/4
<i>Fusarium solani</i> complex (n=193)	4/8	≥8/≥8	8/≥8	≥8/≥8	8/≥8	≥8/≥8	≥8/≥8
<i>Lecytophora hoffmannii</i> (n=5)	0.25/-	0.25/-	1/-	0.25/-	2/-	2/-	0.5/-
<i>Lomentospora prolificans</i> (n=31)	8/≥8	≥8/≥8	8/≥8	≥8/≥8	4/≥8	4/≥8	≥8/≥8
<i>Medicopsis romeroi</i> (n=6)	0.5/-	4/-	0.5/-	1/-	4/-	2/-	0.12/-
<i>Microascus cirrosus</i> (n=6)	8/-	≥8/-	≥8/-	4/-	4/-	≥8/-	2/-

(suite Tableau 13)	AMB	Itra	Vori	Posa	Caspo	Mica	Terbi
<i>Neoscytalidium</i> sp. (n=7)	0.12/-	≥8/-	0.12/-	0.5/-	0.5/-	0.12/-	0.5/-
<i>Purpureocillium lilacinum</i> (n=44)	8/≥8	2/≥8	0.25/0.5	0.25/0.5	≥8/≥8	2/≥8	0.25/0.5
<i>Paecilomyces variotii</i> (n=15)	0.06/0.5	0.12/0.5	8/≥8	0.12/0.5	2/4	0.03/0.25	1/8
<i>Penicillium</i> spp. (n=28)	0.5/8	1/≥8	8/≥8	1/≥8	2/≥8	0.12/2	0.25/1
<i>Penicillium chrysogenum</i> (n=7)	0.5/-	0.25/-	1/-	0.25/-	0.5/-	0.03/-	0.25/-
<i>Phaeoacremonium parasiticum</i> (n=14)	0.5/2	≥8/≥8	0.25/0.25	0.25/1	≥8/≥8	≥8/≥8	0.12/0.5
<i>Pleurostomophora richardsiae</i> (n=7)	0.25/-	0.25/-	0.5/-	0.25/-	4/-	1/-	1/-
<i>Pseudallescheria ellipsoidea</i> (n=8)	≥8/-	1/-	0.5/-	1/-	0.5/-	0.25/-	≥8/-
<i>Sarocladium kiliense</i> (n=10)	8/≥8	≥8/≥8	0.5/1	1/≥8	4/≥8	4/≥8	0.5/0.5
<i>Scedosporium boydii</i> (n=39)	8/≥8	0.5/≥8	0.25/0.5	0.5/1	1/2	0.25/1	≥8/≥8
<i>Scedosporium apiospermum</i> (n=95)	8/≥8	1/≥8	0.5/1	1/2	1/2	0.25/1	≥8/≥8
<i>Scedosporium dehoogii</i> (n=10)	8/≥8	0.5/1	0.25/0.5	0.5/1	2/2	0.25/0.5	≥8/-
<i>Scedosporium minutisporum</i> (n=5)	8/-	0.5/-	0.25/-	0.5/-	2/-	0.25/-	≥8/-
<i>Scopulariopsis brevicaulis</i> (n=18)	8/≥8	≥8/≥8	8/≥8	≥8/≥8	1/4	0.25/0.5	2/8
<i>Sporothrix schenckii</i> (n=19)	1/2	0.5/2	8/≥8	1/4	≥8/≥8	≥8/≥8	0.06/2
<i>Thermothelomyces thermophilus</i> (n=8)	1/-	0.12/-	0.12/-	0.06/-	4/-	0.5/-	2/-
<i>Trichoderma longibrachiatum</i> (n=20)	1/2	≥8/≥8	0.5/1	1/2	0.5/1	0.06/0.25	1/2
<i>Trichoderma</i> spp. (n=8)	1/-	≥8/-	1/-	8/-	0.5/-	0.06/-	2/-
<i>Hormographiella aspergillata</i> (n=5)	0.06/-	≥8	1/-	2/-	≥8/-	4/-	8/-
<i>Phanerochaete chrysosporium</i> (n=6)	0.03/-	0.12/-	0.06/-	0.25/-	≥8/-	≥8/-	4/-

\*AMB (amphotéricine B), Itra (itraconazole), Vori (voriconazole), Posa (posaconazole), Caspo (caspofungine), Terbi (terbinafine), Mica (micafungine) ;  
- : non déterminable pour moins de 10 isolats testés - (filamenteux testés au CNRMA depuis 2003)

Plusieurs isolats d'*A. fumigatus* ont des CMI élevées à l'itraconazole avec parfois une résistance croisée pour le voriconazole et le posaconazole. Nous avons cette année, séparé dans le tableau, les souches pour lesquelles les CMI de l'itraconazole étaient élevées (>2 mg/L) de façon à mieux mettre en évidence le profil des souches sauvages puisque les souches d'*A. fumigatus* nous sont souvent envoyées dans un contexte d'échec thérapeutique ou de suspicion de résistance. *La proportion élevée des souches résistantes par rapport aux souches d'A. fumigatus testées au CNR est donc totalement artificielle et ne reflète pas du tout une réalité épidémiologique.* Certaines espèces émergentes, comme les *Aspergillus* de la section *Usti*, ont des profils de sensibilité particuliers avec des CMI élevées pour tous les azolés et les échinocandines. Les *Fusarium* spp. et *Lomentospora prolificans* sont caractérisés par une résistance à la plupart des antifongiques systémiques, y compris les nouveaux azolés et les échinocandines. Les dématiés ont globalement une bonne sensibilité à l'amphotéricine B et aux azolés. On peut remarquer que l'activité des différents azolés n'est pas superposable même pour une espèce donnée. Certaines espèces ont des CMI basses pour l'itraconazole et le posaconazole et des CMI hautes pour le voriconazole (*Mucorales*, *Exophiala dermatitidis*, ou la forme mycélienne de *Sporothrix schenckii*). A l'inverse, des CMI basses pour le voriconazole et hautes pour l'itraconazole et le posaconazole sont observées pour d'autres espèces (*Trichoderma* spp.).

Dans la mesure où l'isavuconazole n'a été testé que depuis janvier 2015, nous présentons ici la comparaison des CMI sur des espèces pour lesquelles plus de 10 isolats ont été testés en parallèle avec les différents azolés (**Tableau 14**). Sur ces espèces, les CMI de l'isavuconazole sont très élevées et comparables à celles du voriconazole et de l'itraconazole sur les *Mucorales* et sur les *Fusarium* spp. Pour les autres espèces testées, les CMI de l'isavuconazole sont la plupart du temps plus hautes que pour tout ou partie des autres azolés, ce qui, rappelons-le, ne préjuge pas de l'activité *in vivo* de cet antifongique étant données les différences de pharmacocinétique.

**Tableau 14 : Profil de sensibilité des filamenteux à 4 azolés, dont l'isavuconazole**

pour les espèces pour lesquelles au moins 5 isolats ont été testés depuis janvier 2015 (technique EUCAST, mise à jour 09/03/2018)

Espèce (nbre d'isolats)	CMI50/CMI90 pour les azolés			
	Posaconazole	Itraconazole	Voriconazole	Isavuconazole
<i>Cunninghamella bertholletiae</i> (n=6)	0.5/-	8/-	≥8/-	≥8/-
<i>Lichtheimia corymbifera</i> (n=16)	0.5/0.5	1/2	≥8/≥8	4/≥8
<i>Lichtheimia ramosa</i> (n=15)	0.5/0.5	1/≥8	≥8/≥8	≥8/≥8
<i>Mucor circinelloides</i> (n=30)	1/≥8	≥8/≥8	≥8/≥8	≥8/≥8
<i>Mucor indicus</i> (n=12)	1/2	≥8/≥8	≥8/≥8	≥8/≥8
<i>Rhizopus arrhizus</i> (n=23)	0.25/1	2/8	8/≥8	2/≥8
<i>Rhizopus microsporus</i> (n=16)	0.5/≥8	2/≥8	8/≥8	2/≥8
<i>Rhizomucor pusillus</i> (n=10)	0.25/0.25	0.5/0.5	≥8/≥8	4/≥8
<i>Aspergillus calidoustus</i> (n=12)	≥8/≥8	4/≥8	4/8	2/4
<i>Aspergillus flavus</i> (n=50)	0.125/0.125	0.125/0.25	0.5/1	0.5/1
<i>Aspergillus fumigatus</i> non Ritra (n=50)	0.06/0.12	0.25/0.5	0.25/0.5	0.5/1
<i>Aspergillus fumigatus</i> Ritra (n=29)	0.5/2	≥8/≥8	4/8	1/4
<i>Aspergillus nidulans</i> (n=7)	0.06/-	0.125/-	0.125/-	0.125/-
<i>Aspergillus</i> section <i>Nigri</i> (n=5)	0.125/-	0.5/-	0.5/-	1/-
<i>Aspergillus quadrilineatus</i> (n=6)	0.06/-	0.06/-	0.06/-	0.125/-
<i>Aspergillus terreus</i> (n=10)	0.06/0.12	0.06/0.25	0.5/1	0.5/1
<i>Aspergillus tubingensis</i> (n=7)	0.25/-	0.5/-	1/-	4/-
<i>Exophiala dermatitidis</i> (n=5)	0.12/-	0.12/-	0.25/-	1/-
<i>Fusarium dimerum</i> complex (n=9)	≥8/-	≥8/-	2/8	≥8/-
<i>Fusarium fujikuroi</i> complex (n=29)	4/≥8	≥8/≥8	4/8	≥8/≥8
<i>Fusarium oxysporum</i> complex (n=47)	2/≥8	≥8/≥8	2/4	≥8/≥8
<i>Fusarium solani</i> complex (n=50)	≥8/≥8	≥8/≥8	8/8	≥8/≥8
<i>Lomentospora prolificans</i> (n=7)	≥8/-	≥8/-	8/-	≥8/-
<i>Scedosporium apiospermum</i> (n=33)	0.5/1	0.51/≥8	0.5/0.5	2/4
<i>Scedosporium boydii</i> (n=7)	0.25/-	1/-	0.25/-	1/-
<i>Scopulariopsis brevicaulis</i> (n=6)	2/-	≥8/-	4/-	4/-
<i>Phaeoacremonium parasiticum</i> (n=6)	0.5/-	≥8/-	0.25/-	2/-
<i>Purpureocillium lilacinum</i> (n=17)	0.25/-	8/≥8	0.25/0.5	0.5/2

L'ensemble des résultats souligne l'intérêt de l'identification des champignons filamenteux au niveau de l'espèce et de la détermination centralisée des sensibilités *in vitro* aux antifongiques (même pour plusieurs antifongiques d'une même famille pharmacologique).

### Analyse des tendances

L'analyse de 15 années de surveillance de la sensibilité aux antifongiques de quatre des principales espèces de *Candida* responsables de fongémies en Ile-de-France (ODL) ne met pas en évidence d'évènements inhabituels (**Tableau 15, Figure 23**). Pour *Candida albicans*, il existe une proportion très faible (0,5%) d'isolats résistants aux antifongiques azolés prescrits en thérapeutique (fluconazole et voriconazole). Il en est de même pour la caspofungine et donc pour les autres échinocandines micafungine et anidulafungine. Ceci permet, d'un point de vue microbiologique, d'utiliser le fluconazole dès que l'état du malade l'autorise. Il n'existe pas de souche sauvage de *C. albicans* ayant une sensibilité diminuée à la caspofungine sans pression antifongique antérieure.

La résistance de *C. glabrata* au fluconazole diminue significativement (actuellement <4% des isolats avec une CMI>32mg/L) à l'opposé de ce qui est apporté dans d'autres pays, en particulier aux USA. La prévalence de la résistance de *C. glabrata* aux échinocandines reste globalement faible (2,3%).

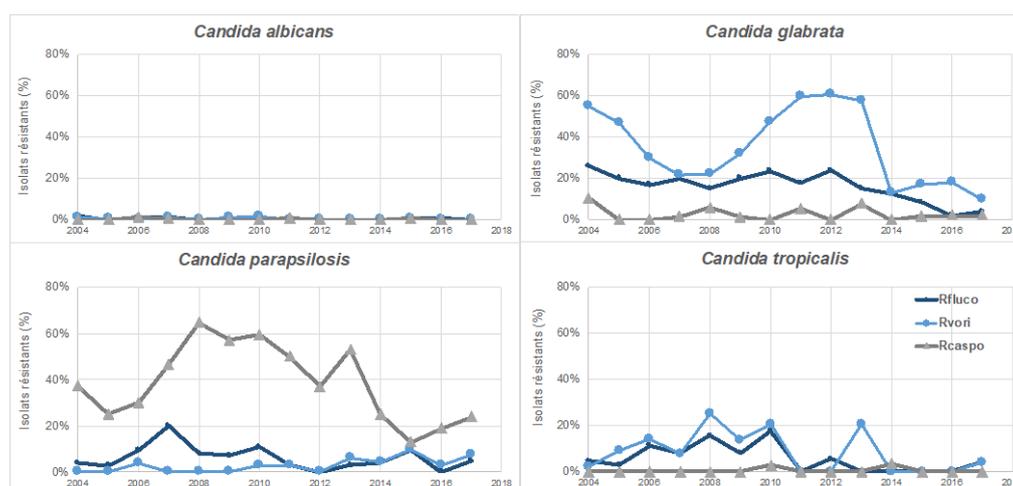
La résistance au fluconazole et au voriconazole concerne un petit pourcentage des isolats de *Candida parapsilosis* (en moyenne 6,1% et 2,5% respectivement), avec des variations selon les années, mais aucune tendance significative à la hausse. Il importe cependant de surveiller ce phénomène car le fluconazole représente actuellement la proposition thérapeutique de première ligne sur le plan international. On rappelle que le complexe *parapsilosis* est intrinsèquement de moindre sensibilité ou résistant aux échinocandines. Pour *Candida tropicalis*, on note une prévalence variable de résistance aux deux azolés testés selon les années mais une tendance globale à la baisse de ce phénomène. Les isolats résistants à la caspofungine sont extrêmement rare.

**Tableau 15 : Proportion d'isolats de levures résistants au fluconazole, voriconazole ou caspofungine**  
(Données de l'ODL)

Espèces	Fluconazole		Voriconazole		Caspofungine	
	Seuil mg/L	% R [extrêmes]	Seuil mg/L	% R [extrêmes]	Seuil mg/L	% R [extrêmes]
<i>C. albicans</i>	> 4	0,5 % [0 - 1,9]	> 0,25	0,5 % [0 - 1,5]	> 0,25	0,5 % [0 - 23,1]*
<i>C. glabrata</i>	> 32	16,8 % [2 - 25,9] *#	> 0,25	35,9 % [9,6 - 69,4]*#	> 0,25	2,3 % [0 - 10,5]
<i>C. parapsilosis</i>	> 4	6,1 % [0 - 20,0] *	> 0,25	2,5 % [0 - 9,7]	-	
<i>C. tropicalis</i>	> 4	7,0 % [0 - 17,6] *#	> 0,25	9,7 % [0 - 25,0]*#	> 0,25	0,5 % [0 - 3,4]

\* p<0,05 (variation significative du pourcentage de résistance de 2004 à 2017, Chi2)

# p <0,05 (test de tendance)



**Figure 23 : Evolution du pourcentage d'isolats "résistants" au cours du temps (données de l'ODL)**

Pour *A. fumigatus*, le CNRMA n'a pas mis en place d'observatoire, mais les quelques études régionales de monitoring systématique prouvent que le phénomène de résistance ne concerne qu'une très petite proportion des isolats cliniques des patients immunodéprimés. En revanche, chez les patients avec pathologies pulmonaires chroniques (mucoviscidose, bronchopathie chronique) traités au long cours par des azolés, l'isolement d'*A. fumigatus* résistant aux azoles est fréquent, mais sans que cela se traduise par une infection invasive. Ces pathologies ne sont pas surveillées dans le cadre du CNRMA. Une généralisation des prophylaxies antifongiques chez les patients d'hématologie peut faire craindre une plus grande fréquence d'infection à *A. fumigatus* résistant justifiant la poursuite de la surveillance.

### 3.4 Interfaces avec les réseaux de surveillance nationaux ou internationaux

Aucune des infections fongiques invasives n'est surveillée par Santé Publique France. Les surveillances faites au CNRMA ne font donc pas l'objet d'une confrontation de données en cours d'année, sauf en cas de phénomènes anormaux.

Il n'existe pas de réseaux internationaux de surveillance, mais les responsables du CNRMA sont en contact avec les microbiologistes et les infectiologues européens et internationaux lors des congrès en particulier ou de colloques ou dans des groupes de travail, tel que l'EUCAST qui indirectement surveille la sensibilité aux anti-infectieux en collectant les données permettant de définir les "epidemiological cutoff" (ECOFFs ou ECVs). Le CNRMA contribue à ces surveillances en envoyant ses données à l'EUCAST. Par ailleurs, le CNRMA sait solliciter les collègues étrangers en cas de phénomène inhabituel.

### 3.5 Enquêtes ou études ponctuelles concourant à la surveillance

#### Mise en place de technique de génotypage de *Trichosporon asahii*

*Trichosporon asahii* est une espèce de levure basidiomycète responsable d'infection invasive chez l'homme. Dans le genre *Trichosporon*, c'est l'espèce la plus fréquemment impliquée en pathologie humaine mais les infections à *Trichosporon* spp. restent rares en France. Aucune méthode robuste de typage n'existe pour différencier les souches appartenant à l'espèce *T. asahii*. Une proposition de génotypage par séquençage de la région IGS1 dans le gène codant l'ARN ribosomique a été publiée<sup>10</sup>. Dans cette étude, les auteurs décrivent 6 génotypes différents pour 61 isolats provenant de différents pays. Le génotype 1 est majoritaire. Les 6 génotypes n'ont pas de spécificité géographique.

Au CNRMA, l'identification des espèces du genre *Trichosporon* est faite en routine par séquençage de la région IGS1, car ce locus permet une meilleure différenciation des espèces au sein des clades identifiés par séquençage des régions ITS et D1D2<sup>11</sup>. L'utilisation de ce locus comme marqueur de détermination du génotype ne nous semble pas suffisante, et l'identification de souches ayant un « génotype » IGS1 différent permet tout au plus d'affirmer que ces souches ont sans doute une origine différente. Identifier deux souches ayant un même « génotype » IGS1 ne permet pas de conclure à une origine commune.

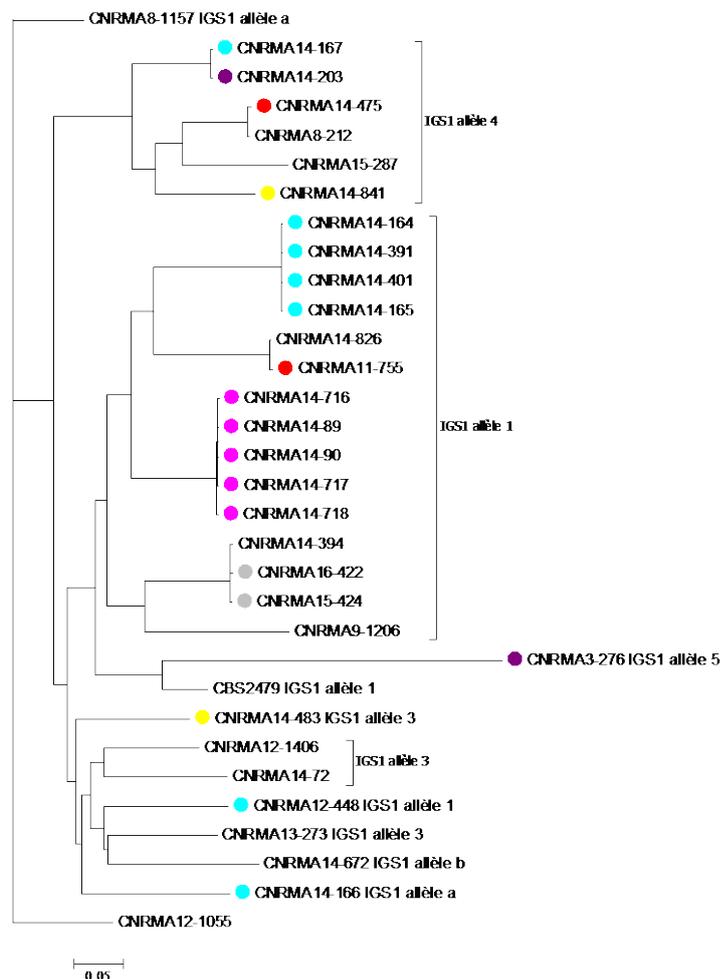
Nous avons été sollicités en 2014 par deux hôpitaux pour des cas groupés d'infections à *T. asahii* mais à l'époque le séquençage des régions IGS1 avait seulement pu conclure que les souches appartenaient au « génotype » majoritaire 1. La mise au point d'une nouvelle méthode de typage était donc nécessaire pour cette espèce dans la mesure où cette question revient régulièrement au CNRMA. L'objectif était donc d'utiliser le WGS afin d'étudier la diversité génétique de cette espèce et d'identifier des marqueurs de génotypage.

---

<sup>10</sup> Rodriguez-Tudela JL et al. Genotype distribution of clinical isolates of *Trichosporon asahii* based on sequencing of intergenic spacer 1. *Diagn microbiol Infect Dis*. **2007**;58(4):435-40.

<sup>11</sup> Sugita T et al. Sequence analysis of the ribosomal DNA intergenic spacer 1 regions of *Trichosporon* species. *J. Clin Microbiol*. **2002**;40(5):1826-30.

Le séquençage génome entier a donc été effectué à P2M pour un panel de 45 souches cliniques et la souche type de *Trichosporon asahii* (CBS2479) dont le génome est déjà disponible sur GenBank, partiellement annoté et réparti en 342 contigs. En collaboration avec le C3BI de l'Institut Pasteur (Corinne Maufrais), nous avons pu commencer l'analyse des données NGS pour 32 souches cliniques reçues au CNRMA entre 2003 et 2016 provenant de 29 patients différents, en utilisant le génome de la souche type comme référence. Les isolats avaient entre 148294 et 175236 SNPs et entre 57451 et 67919 indels de différence, entre eux et par rapport au génome de référence. Nous avons construit un arbre Neighbor Joining après alignement des SNPs (taille de 297725) qui permet d'observer que les isolats ayant le même allèle pour le locus IGS1 sont généralement regroupés dans un même cluster (**Figure 24**) mais cela révèle aussi une diversité génétique au sein d'un cluster et entre isolats de même allèle IGS1 surtout si les isolats sont éloignés dans le temps ou dans l'espace. Pour deux patients infectés par des isolats multiples correspondant à des dates et/ou des sites de prélèvement différents nous pouvons conclure que les isolats sont identiques (99% des SNPs similaires).



**Figure 24: Neighbor Joining Tree construit après alignement des SNPs pour les 32 isolats cliniques et la souche type de *Trichosporon asahii***

Chaque couleur correspond à un hôpital. Les allèles de la région IGS1 sont indiqués.

Ces résultats confirment qu'un patient est infecté par une souche unique mais suggèrent que le séquençage de la région IGS1 n'est pas assez discriminant pour des investigations épidémiologiques. Des analyses supplémentaires seront nécessaires pour identifier les régions permettant de développer une méthode de typage plus rapide que le WGS et plus discriminante que le séquençage d'IGS1.

## 4 Alerte

Les interactions entre le CNR et Santé Publique France (Unité Infections liées aux soins et Résistance aux Antibiotiques, Valérie PONTIES, Mélanie COLOMB-COTINAT, et Anne BERGER-CARBONNE) sont motivées par des cas groupés notifiés par e-SIN ou des cas inhabituels identifiés au CNRMA. Les informations sont souvent simultanées, SPF nous signalant des cas pour lesquels nous venons juste d'être sollicités par les mycologues correspondants, ce qui permet souvent une circulation rapide des informations pertinentes. Les informations circulent par messagerie électronique et par téléphone.

- Nous avons ainsi été prévenus par SPF de cas de pneumocystose dans deux centres hospitaliers prenant en charge des patients transplantés rénaux. Dans un cas, le centre ne nous a pas sollicité, et dans l'autre cas, les mycologues nous ont fait parvenir quelques échantillons, mais nous n'avons pas pu conclure sur l'existence d'une souche commune à tous les patients.
- Pour le cas d'infection à *C. auris* SPF et le CNR ont été sollicités en même temps par leurs correspondants respectifs, ce qui a permis, au CNRMA, de vite confirmer l'identification de l'espèce et de lancer une alerte nationale auprès des mycologues français. Le cas est resté isolé.
- Des infections invasives à *S. clavata* ont justifié l'implication du CNRMA en urgence pour identification de la souche et éventuelle investigation complémentaire. Dans chaque cas, le CNRMA a prévenu le centre concerné et SPF.
- De même, des cas groupés d'infections à *M. capitatus* ont été notifiés à SPF et au CNRMA. L'identification a rapidement été confirmée, en revanche le typage a pris plusieurs semaines en raison de l'absence de technique de référence, comme expliqué ci-dessous.

### Cas groupés d'infections à *Magnusiomyces capitatus*

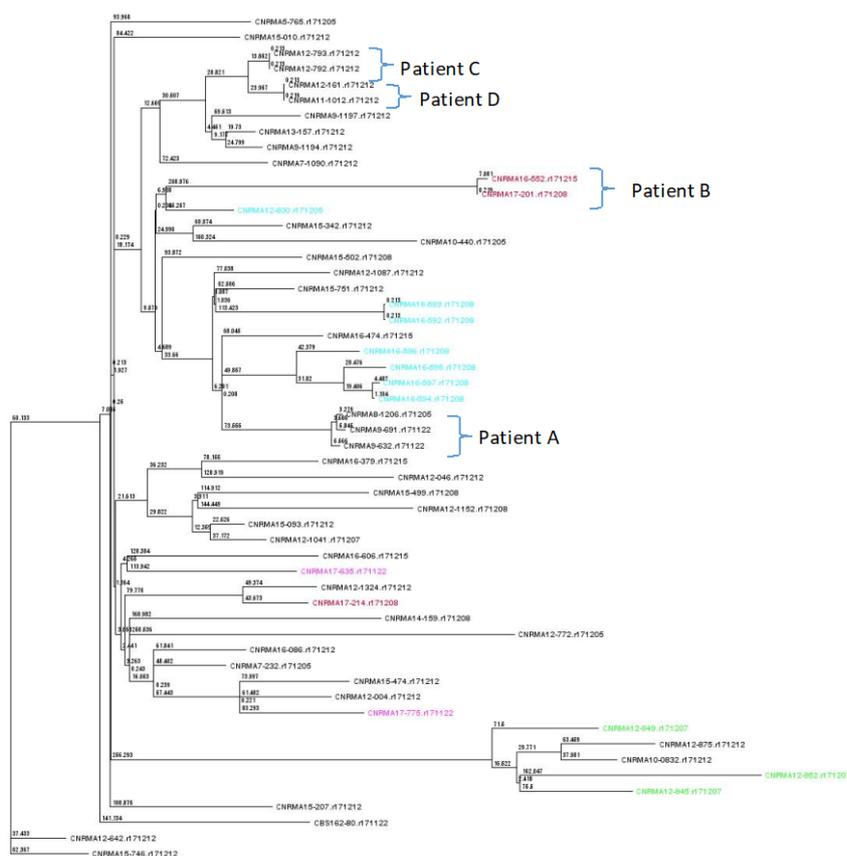
En Octobre 2017, un correspondant (Hôpital 1) a contacté le CNRMA pour l'informer que deux patients (P1 et P2) avaient des hémocultures positives à *Magnusiomyces capitatus* qui est une espèce rare de levures proches de l'espèce *Saprochaete clavata* responsable d'une épidémie en France en 2012 chez des patients leucémiques. De plus ce correspondant avait isolé une souche de *M. capitatus* dans un circuit de lavage de l'hôpital et souhaitait donc savoir si cela pouvait être la source de la contamination.

Cette espèce étant rare, il n'existe aucune méthode de génotypage rapide pour déterminer le lien éventuel entre des isolats. Le séquençage génome entier et l'analyse des données WGS ont été réalisés à P2M en collaboration avec Vincent Enouf et Alexis Criscuolo, par technique Illumina. Le panel des souches analysées comprenait la souche type (CBS162.80, isolée en Angleterre en 1979 du lait d'une vache ayant une mammité), 2 souches environnementales, 1 souche animale et 58 souches cliniques isolées entre 2005 et 2017, de 53 patients hospitalisés en France, Suisse et Espagne. Ce panel comprenant des souches historiques, des souches liées ou non épidémiologiquement, et, pour certains patients, plusieurs souches d'un même épisode, nous ont permis d'interpréter la variabilité au sein de l'espèce et au cours de l'infection chez un même individu.

Le génome de la souche type CBS 162.80 a été assemblé *de novo* en 2500 contigs et utilisé comme génome de référence pour l'analyse phylogénétique. Une matrice de 15M de caractères alignés a été construite à partir de l'agglomération des résultats de mapping de chacune des 60 souches contre la souche type. Cette matrice contenant environ 342000 sites variables a été utilisée pour inférer un arbre Maximum Likelihood (ML).

De l'analyse phylogénétique, nous pouvons conclure que, parmi les isolats étudiés, 7 isolats sont très divergents dont la souche du système de lavage isolé en 2017 de l'hôpital 1, très éloignée donc de celle des patients P1 et P2, ce qui permet de l'exclure comme source commune de contamination (**Figure 25**). L'analyse des souches pour les 4 patients (A à D) pour lesquels plusieurs souches étaient disponibles (sites et/ou dates de prélèvements différents), a permis de découvrir qu'elles étaient très peu différentes (moins de 10 SNPs de différence), tandis que des souches isolées dans un même hôpital ne se retrouvaient pas nécessairement groupées ensemble. Toutefois, des souches isolées dans un même hôpital sur une courte période (une année, exemple hôpital 2) peuvent appartenir à un même cluster. Cette analyse préliminaire

nous a permis de conclure que les souches de patients P1 et P2 étaient *a priori* différentes (CNRMA17.775 et CNRMA17.635). Des séquençages supplémentaires (génomique d'une même souche avant et après passage dans un modèle animal) sont nécessaires afin de déterminer précisément le taux de mutations de l'espèce et ainsi pouvoir déterminer précisément si les variations entre souches très proches sont dues à des artefacts techniques ou des variations génétiques.



**Figure 25 : ML tree construit en excluant les 7 isolats de *M. capitatus* divergents du cluster principal**  
 En rose, les 3 souches de l'hôpital 1 ; en vert, les isolats isolés en 2012 en Suisse ; en turquoise, les isolats de l'hôpital 2 prélevés en 2009 et 2016 ; en rouge, les isolats de l'hôpital 3 prélevés en 2011, 2015 et 2016. Nombre de SNPs indiqués sur les branches. Les patients A à D avaient des souches de sites et/ou de dates de prélèvements différents.

## 5 Activités de rétro-information, de formation et de conseil

*Ce chapitre concerne principalement les activités à destination des professionnels de santé (notamment formation aux techniques de laboratoire); les activités liées à l'enseignement et la formation universitaires sont exclues.*

### 5.1 Conseil et expertise aux professionnels de santé

Les responsables et collaborateurs du CNRMA sont sollicités quotidiennement pour des avis ou des conseils concernant les techniques, l'interprétation de résultats, la démarche diagnostique et la prise en charge des patients atteints de mycoses invasives. Les correspondants sont des cliniciens et des microbiologistes/mycologues. Des sollicitations peuvent aussi venir de l'étranger.

Cette activité n'est pas chiffrable mais elle représente une composante importante de l'activité des responsables du CNRMA, en particulier pour les conseils thérapeutiques. Les correspondants peuvent nous joindre grâce à l'alias [cnrma@pasteur.fr](mailto:cnrma@pasteur.fr) qui aboutit sur les adresses mail des trois responsables (F. Dromer, S. Bretagne et O. Lortholary) et des collaborateurs (A. Alanio, M. Desnos-Ollivier, D. Garcia-Hermoso, F. Lanternier, K. Sitbon).

Le site internet du [CNRMA](https://www.pasteur.fr/fr/sante-publique/CNR/les-cnr/mycoses-invasives-antifongiques-) (<https://www.pasteur.fr/fr/sante-publique/CNR/les-cnr/mycoses-invasives-antifongiques->) est régulièrement mis à jour avec en particulier les modalités d'envoi des échantillons et des souches et les fiches de demande d'expertise ainsi que les fiches de surveillance des mycoses invasives. Le rapport d'activité de l'année précédente est également disponible sur le site.

Une réunion annuelle est organisée pour les partenaires des réseaux de surveillance active RESSIF et ODL. Elle permet de faire le point sur le fonctionnement des réseaux et de discuter des points d'amélioration, des études à prévoir ... Elle fait l'objet d'un compte-rendu envoyé à tous les partenaires.

## 5.2 Conseil et expertise aux autorités sanitaires

### Au plan national

- Les responsables et adjoints du CNRMA ont été sollicités en mars 2017 par la DGS pour faire un point sur les infections à *Mucor indicus*.
- Olivier Lortholary et Stéphane Bretagne ont été sollicités comme experts pour les recommandations HAS ([www.has-sante.fr](http://www.has-sante.fr)) suivantes :
  - Actualisation des actes de biologie médicale relatifs au diagnostic des candidoses invasives ([https://www.has-sante.fr/portail/upload/docs/application/pdf/2017-10/argumentaire\\_candidoses\\_invasives.pdf](https://www.has-sante.fr/portail/upload/docs/application/pdf/2017-10/argumentaire_candidoses_invasives.pdf))
  - Evaluation es actes de diagnostic biologique de la pneumocystose (*Pneumocystis jirovecii*) ([https://www.has-sante.fr/portail/upload/docs/application/pdf/2017-10/argumentaire\\_pneumocystose.pdf](https://www.has-sante.fr/portail/upload/docs/application/pdf/2017-10/argumentaire_pneumocystose.pdf))
  - Actualisation des actes de biologie médicale relatifs au diagnostic des infections à *Aspergillus* ([https://www.has-sante.fr/portail/upload/docs/application/pdf/2017-06/dir42/argumentaire\\_aspergillose.pdf](https://www.has-sante.fr/portail/upload/docs/application/pdf/2017-06/dir42/argumentaire_aspergillose.pdf))

### Au plan international

- **EUCAST** : Nous participons activement en tant que représentants pour la France à l'AFST (AntiFungal Susceptibility Testing) sous-comité de l'EUCAST (European Committee for Antibiotic Susceptibility Testing). Ce comité regroupe 1 à 2 membres par pays (environ 15 pays sont représentés et Olivier Lortholary est notre représentant).
- **ECIL** : Olivier Lortholary est membre expert de la conférence européenne sur la prise en charge des infections au cours des hémopathies (ECIL) septembre 2017
- **ESCMID-ECMM-ERS** : O. Lortholary est membre expert de la conférence de consensus européenne sur la prise en charge de l'aspergillose invasive « Diagnosis and management of *Aspergillus* diseases : executive summary of the 2017 ESCMID-ECMM-ERS guideline ». Clin Microbiol Infect 2018
- **EORTC** : le CNRMA est actif au sein du groupe d'étude des antifongiques de l'Organisation Européenne de Recherche et de Lutte contre le Cancer (EORTC) à Bruxelles. Olivier Lortholary a notamment participé à l'actualisation du consensus des définitions des infections fongiques invasives (2008, 2013).
- **EFISG** : au sein de la Société Européenne de Microbiologie (ESCMID), s'est créé un groupe d'étude des infections fongiques (EFISG) dont le secrétariat a été assuré par O. Lortholary jusqu'en 2007. L'objectif de ce groupe est de pouvoir mener en Europe des études épidémiologiques, physiopathologiques et cliniques dans le domaine des infections fongiques systémiques en dehors du domaine de l'hématologie couvert dans l'EORTC. Ce groupe rassemble cliniciens et mycologues de nombreux pays européens concernés par ces thématiques.

- **ISHAM :**
  - o Dea Garcia-Hermoso représente le CNRMA dans le groupe de travail « Joined ECMM/ISHAM Working Group » sur les infections à *Pseudallescheria/Scedosporium*
  - o Dea Garcia-Hermoso est membre du groupe de travail sur « Barcoding and identification of fungi »
  - o Françoise Dromer et Marie Desnos-Ollivier sont membres du groupe de travail sur le génotypage des souches cliniques et environnementales de *C. neoformans* et *C. gattii*.
  - o La non-incorporation de la PCR dans les critères diagnostiques de l'aspergillose invasive a motivé la création en 2006 d'un groupe de travail (EAPCRI pour European *Aspergillus* PCR Initiative sous l'égide de l'ISHAM ; <http://www.eapcri.eu/>) constitué de paires clinicien-microbiologiste. Stéphane Bretagne a été un membre fondateur de ce groupe. Les nouvelles recommandations internationales devraient inclure la PCR *Aspergillus* dans les critères diagnostiques. En 2016, il a été décidé d'élargir le champ du groupe à d'autres espèces fongiques, *Pneumocystis* et Mucorales, le groupe devenant FPCRI pour Fungal PCR Initiative. Alexandre Alanio a pris la direction du groupe *Pneumocystis* avec comme objectif premier l'harmonisation des procédures entre les différents centres européens à l'aide de contrôles de qualité.

## **6 Travaux de recherche et publications en lien direct avec l'activité du CNR**

### **6.1 Activités de recherche en 2017 en lien direct avec les missions et activités du CNR**

#### *Études concernant la cryptococcose*

##### Etude PreCASA

La méningite à cryptocoque est une cause majeure de mortalité au cours du SIDA en Afrique. La détection de l'antigène cryptococcique est prédictive de la survenue de la méningite chez les patients infectés par le VIH à un stade d'immunodépression avancé et naïfs d'anti-rétroviraux. Le screening systématique de l'antigène cryptococcique suivi d'un traitement préemptif par fluconazole oral est recommandé. Nous avons émis l'hypothèse que l'utilisation d'un test antigénique semi-quantitatif pourrait avoir un impact important.

L'étude a été menée à Yaoundé, Cameroun. Les patients ayant une antigénémie détectable ont eu une ponction lombaire. Une évaluation simultanée du test immunochromatographique IMMY était réalisée avec celle du nouveau LFA Biosynex® CryptoPS test et les deux tests étaient ensuite comparés à un test ELISA commercialisé. La prévalence de l'antigénémie chez 186 adultes était de 7.5% (95%CI: 4.5-12.4). Parmi les patients avec une antigénémie, la prévalence de la méningite était de 45.5% (95%CI: 18.3-75.7). Les tests IMMY et Biosynex CryptoPS étaient très concordants dans le serum, plasma, et LCS (Kappa: 98.4, 99.5, 100%, respectivement,  $p < 0.001$ ), mais pas dans les urines. En comparaison avec le test ELISA, les spécificités respectives étaient de 96.6 and 98.3%. Avec le test Biosynex CryptoPS, tous les patients avec méningite avaient une bande T2 dans le sérum et aucun en l'absence de méningite. Le titre médian en ELISA était de 160 (IQR: 13.5-718.8) et des titres  $>160$  étaient corrélés à la présence d'une méningite et à la présence d'une bande T2 avec le test Biosynex CryptoPS.

Cette étude permet de penser que le test Biosynex pourrait avoir un intérêt pour identifier rapidement les patients ayant une méningoencéphalite à cryptocoques et donc les orienter vers une prise en charge adaptée à la sévérité de cette infection.

##### Etude ACTA

Nous avons participé à toutes les étapes de l'étude ACTA en coordonnant un des centres investigateurs avec obtention d'un financement par l'ANRS (ACTA Current Controlled Trials number,

ISRCTN45035509)<sup>12</sup>. Cette étude testait si deux stratégies alternatives de traitement de la cryptococcose méningée en Afrique (fluconazole à forte dose + flucytosine deux semaines per os ou une semaine d'amphotéricine B) pouvaient se substituer à la classique bithérapie de deux semaines par amphotéricine B. Chaque groupe recevant l'amphotéricine B recevait en combinaison soit le fluconazole, soit la flucytosine. Tous les patients recevaient le fluconazole en consolidation et ont été suivis pendant 10 semaines. Au total, 721 patients ont été randomisés. La mortalité à 2 semaines et 10 semaines était de 18.2% (41 décès) et 35.1% (79 décès) dans le groupe des 225 patients traités par voie orale, de 21.9% (49 décès) et 36.2% (81 décès) pour les 224 patients traités une semaine par amphotéricine B, et de 21.4% (49 décès) et 39.7% (9 décès) pour les 229 patients traités deux semaines par amphotéricine B. La non-infériorité du traitement oral ou du traitement court était obtenue. Associée à l'amphotéricine B, la flucytosine était significativement supérieure au fluconazole (71 décès [31.1%] vs. 101 décès [45.0%]). Une semaine d'amphotéricine B plus flucytosine était associée à la plus faible mortalité à 10 semaines (24.2% ; 95% IC, 16.2 à 32.1). Les effets secondaires comme l'anémie étaient plus fréquents dans le groupe de traitement intraveineux pendant deux semaines que dans les autres groupes.

En conclusion, une semaine de traitement par amphotéricine B plus flucytosine ou deux semaines de traitement par fluconazole plus flucytosine sont désormais des traitements d'induction licites de la méningite à cryptocoque dans les pays à faibles ressources. Cette étude a d'ores et déjà permis de modifier les recommandations thérapeutiques de l'OMS dans la cryptococcose méningée.

### ***Études concernant la pneumocystose***

Le CNRMA participe à la surveillance de la pneumocystose, deuxième infection fongique rapportée après les candidémies. Cette infection est de diagnostic difficile chez les patients non-VIH, qui présentent des tableaux sévères malgré des charges fongiques faibles dans les voies respiratoires<sup>13</sup>. Les recommandations du 5th ECIL ([European Conference on Infections in Leukaemia](#)) coordonnées par A. Alanio et S. Bretagne proposent l'utilisation des techniques de PCR quantitatives (qPCR) pour le diagnostic<sup>14</sup>. De nombreuses trousse commerciales sont disponibles. Une comparaison de 10 protocoles incluant huit trousse commerciales a démontré une plus grande sensibilité des tests techniques de PCR utilisant les acides nucléiques totaux avec une étape de transcription reverse. La cible mitochondriale mtSSU est plus sensible que la cible usuelle mtLSU, elle-même plus sensible que la cible nucléaire MSG (Major Surface Glycoprotein)<sup>1</sup>.

Pour distinguer entre portage et infection active qui reste un problème non résolu, une étude de validation est en cours explorant l'intérêt du ratio de différents gènes. Une valeur <6 du ratio d'expression des gènes mtSSU et mtLSU est apparue comme statistiquement corrélée aux formes actives de la maladie<sup>15</sup>.

Pour étudier la transmission de *P. jirovecii*, des marqueurs microsatellites avaient été développés<sup>16</sup> et un premier travail sur l'hôpital St Louis a démontré une transmission entre patients greffés rénaux. Une deuxième étude dans le service d'hématologie de l'hôpital Henri Mondor utilisant les marqueurs microsatellites a confirmé la transmission entre patients<sup>17</sup>. Ces mêmes marqueurs ont été utilisés pour un

---

<sup>12</sup> Molloy SF, et al. Antifungal Combinations for Treatment of Cryptococcal Meningitis in Africa. *N Engl J Med* 2018; 378(11):1004–1017

<sup>13</sup> A. Alanio, S. Bretagne. Review: *Pneumocystis jirovecii* detection in asymptomatic patients: what does its natural history tell us? *F1000 research* 2017, 6.

<sup>14</sup> Alanio A *et al.* on behalf of ECIL-5, EBMT, EORTC, ICHS, and ELN. ECIL guidelines for treatment of *Pneumocystis jirovecii* pneumonia in patients with haematological malignancies and stem cell transplant recipients. *J Antimicrob Chemother.* 2016; 71(9):2386-96

<sup>15</sup> M. Gits-Muselli, C. Valero, S. Hamane, N. Guigue, S. Bretagne, Alanio A. Mitochondrial *Pneumocystis jirovecii* gene expression: a promising tool for diagnosis. Oral presentation. 27th ECCMID (Avril 2017, Vienna).

<sup>16</sup> Gits-Muselli, M. *et al.*, 2015. New Short Tandem Repeat-Based Molecular Typing Method for *Pneumocystis jirovecii* Reveals Intrahospital Transmission between Patients from Different Wards. *PLoS one*, 10(5).e0125763.

<sup>17</sup> Robin, C. *et al.*, 2017. Molecular Demonstration of a *Pneumocystis* Outbreak in Stem Cell Transplant Patients: Evidence for Transmission in the Daycare Center. *Frontiers in microbiology*, 8.

travail collaboratif européen<sup>18</sup>. Seize centres européens (dont 5 français) se sont joints à cette analyse de 249 prélèvements respiratoires de patients présentant une pneumocystose. Cette étude a montré une grande variabilité des génotypes, mais toujours avec une tendance à un enrichissement dans certaines populations de greffés d'organe.

Ceci confirme la grande contagiosité de *P. jirovecii*, ce qui doit être pris en compte dans les politiques de prévention chez les patients immunodéprimés. Les méthodes développées par le CNRMA tant au niveau du diagnostic positif que du génotypage, sont des outils performants pour aborder ces questions.

### ***Études concernant les candidoses et autres fongémies à levures***

#### Fongémies dues aux espèces fréquentes de *Candida* spp.

Nous avons repris toutes les fongémies dues aux espèces communes de *Candida* spp. notifiées dans l'ODL entre 2002 et 2014, pour analyser les facteurs de risque et l'évolution des candidémies<sup>19</sup>.

Pour les 3417 patients (3336 isolats), les principaux facteurs de risque étaient un cancer solide (34%, du tractus digestif dans 46% des cas), ou une hémopathie (17%, essentiellement lymphome (42%) et leucémie aigüe (33,5%)). Les patients d'hématologie étaient plus jeunes, plus souvent pré-exposés aux antifongiques, plus souvent infectés par *C. tropicalis*, *C. krusei* et *C. kefyr*, et plus souvent traité en première intention par une échinocandine. Comparés aux autres, les patients hospitalisés en réanimation étaient significativement moins souvent infectés par *C. parapsilosis*, avaient plus souvent eu une chirurgie récente, avec une plus importante mortalité globale à J8 et J30. Sur la période considérée, la mortalité globale augmentait chez les patients cancéreux en réanimation. Les patients dont la fongémie était connue mais qui ne recevaient pas de traitement antifongique avaient un risque accru de décéder. Enfin, en utilisant les patients infectés par *C. albicans* comme référence, l'analyse multivariée a permis de démontrer que le risque d'être infecté par une espèce donnée était associé à un ou plusieurs facteurs parmi âge, sexe, type d'hémopathie maligne, l'environnement hospitalier (service de réanimation ou non), statut VIH, et pré-exposition éventuelle aux antifongiques.

Ces résultats démontrent que la prise en compte du contexte (réanimation, pathologie sous-jacente ...), avant même l'identification de l'espèce causale, pourrait améliorer la prise en charge des candidémies.

#### Fongémies dues aux levures rares

Nous avons utilisé la base de données de l'ODL pour analyser les fongémies aux levures non fréquentes (cad, tout celles qui n'étaient pas dues à *Candida albicans*, *Candida glabrata*, *Candida parapsilosis*, *Candida tropicalis* et *Candida krusei*). Ces cas font souvent l'objet de cas cliniques et c'est grâce à la constitution de l'ODL et à la participation active des mycologues qui nous envoient données et souches que ce travail a pu être réalisé. C'est aussi toute la force de l'ODL de centraliser les souches au CNRMA et de permettre d'identifier certaines espèces très rares peu représentées dans les bases de données publiques (MALDI-TOF ou séquences).

Les 338 fongémies dues à ces levures rares (UYS) répertoriées entre octobre 2002 et décembre 2014 ont été comparées aux 1998 fongémies dues à *C. albicans* survenues pendant la période, ce qui a permis d'avoir une référence commune à tous pour identifier les paramètres spécifiques de ces infections rares. Les principaux résultats ont été :

- La grande diversité des espèces en cause (n=35 incluant 27 ascomycètes et 8 basidiomycètes) dont 11 avaient des CMI élevées de la caspofungine et 15 du fluconazole.
- L'existence d'une hémopathie maligne et la préexposition aux antifongiques étaient des facteurs indépendants de survenue d'une fongémie à UYS en analyse multivariée.

<sup>18</sup> Alanio, A. et al., 2017. Diversity of *Pneumocystis jirovecii* Across Europe: A Multicentre Observational Study. *Ebiomedicine*, 22 :155–163.

<sup>19</sup> Lortholary, O. et al., 2017. The risk and clinical outcome of candidemia depending on underlying malignancy. *Intensive care medicine*, 43(5), 652–662.

- Si l'on considérait les espèces individuellement ou par groupe, seules les infections dues à *Candida kefyr* et à *Trichosporon* spp. restaient associées aux hémopathies malignes et les infections dues à *Geotrichum* spp. (*M. capitatus* et *S. clavata*) aux leucémies aigües, tandis que les infections dues à *Geotrichum* spp. ou à *Trichosporon* spp. étaient associées à une préexposition à la caspofungine.

Une grande diversité d'espèce peut donc être responsable de fongémies. Les facteurs de risque et le pronostic diffèrent en fonction des espèces, ce qui justifie une identification précise de l'espèce dès la positivité de l'hémoculture<sup>20</sup>.

#### Endocardites à *Candida* spp.

Les endocardites sur prothèse valvulaire à *Candida* spp. sont rares et délabrantes. Les recommandations de prise en charge sont basées sur des recommandations d'experts. Nous avons analysé 46 cas diagnostiqués en Espagne et en France entre 2001 et 2015, et suivis pendant une médiane de 9 mois<sup>21</sup>. 48% avaient un antécédent d'endocardite ; 65% étaient liées aux soins ; 20% des patients étaient toxicomanes actifs. Les patients de moins de 66 ans et sans insuffisance cardiaque étaient plus souvent opérés, mais la chirurgie n'était pas associée à une meilleure survie à 6 mois. Les patients qui recevaient l'amphotéricine B liposomale avaient une survie accrue par rapport à ceux traités par échinocandines. Un traitement d'entretien par le fluconazole était prescrit chez 21 patients pour une durée médiane de 13 mois (2-84 moi) diminuant la fréquence des rechutes.

#### Traitement des candidémies sévères.

Les recommandations internationales proposent l'utilisation d'une échinocandine dans le traitement de première intention des candidoses invasives. Nous avons comparé le devenir des patients ayant une candidose invasive en France et hospitalisés en réanimation et inclus dans l'étude AmarCAND2 (835 patients) selon le traitement antifongique reçu (échinocandines ou azolés)<sup>22</sup>. 397 patients ont été sélectionnés, 242 traités par échinocandines et 155 traités par azolés ; 179 en choc septique. Après ajustement sur les variables confondantes, il n'y avait pas d'association significative entre le traitement initial et la mortalité. Il y avait cependant une tendance à un bénéfice des échinocandines en cas de choc septique.

#### Traitement des péritonites à *Candida* spp.

L'analyse des pratiques thérapeutiques dans les péritonites à *Candida* en réanimation dans le cadre de l'étude AmarCAND2 ne montre pas d'influence du choix antifongique initial sur la survie à J28<sup>23</sup>. La survenue d'une péritonite à *Candida* liée aux soins influençait le pronostic ; il en était de même pour le délai d'institution du traitement antifongique dans le groupe de pronostic favorable.

#### ***Aspergilloses et autres infections à champignons filamenteux***

L'aspergillose pulmonaire chronique compliquant la sarcoïdose est associée à une mortalité élevée sans que le poids respectif de chaque affection soit précisé. Une large étude monocentrique portant sur 65 patients dont 44 hommes, diagnostiqués entre 1980 et 2015 a été menée<sup>24</sup>. La quasi-totalité des patients (n=64) avait une forme fibro-kystique de sarcoïdose. La forme chronique cavitaire d'aspergillose était la plus fréquente. Sur le plan thérapeutique, 55 patients étaient traités au long cours par antifongiques, 14 ont eu au moins une séance de radiologie interventionnelle, 11 une chirurgie de résection et 2 une transplantation pulmonaire. Environ la moitié des patients étaient décédés, le plus souvent d'une évolutivité

<sup>20</sup> Bretagne, S. *et al.*, 2017. Predisposing factors and outcome of uncommon yeast species-related fungaemia based on an exhaustive surveillance programme (2002-14). JAC 72(6):1784–1793.

<sup>21</sup> Rivoisy, C. *et al.*, 2018. Prosthetic Valve *Candida* spp. Endocarditis: New Insights Into Long-term Prognosis-The ESCAPE Study. CID 66(6),825–832.

<sup>22</sup> Bailly, S. *et al.*, 2017. Impact of echinocandin on prognosis of proven invasive candidiasis in ICU: A post-hoc causal inference model using the AmarCAND2 study. J Infect 74(4) :408–417.

<sup>23</sup> Montravers, P. *et al.*, 2017. Antifungal therapy for patients with proven or suspected *Candida* peritonitis: Amarcand2, a prospective cohort study in French intensive care units. CMI 23(2), 117.e1–117.e8.

<sup>24</sup> Uzunhan, Y. *et al.*, 2017. Chronic pulmonary aspergillosis complicating sarcoidosis. European Resp J, 49(6) : 1602396.

de la sarcoïdose. La mortalité n'était pas accrue par l'aspergillose pulmonaire chronique après appariement à des témoins.

### ***Études concernant les techniques d'identification et la phylogénie***

#### **Amélioration des techniques d'identification des champignons « barcoding »**

L'objectif principal est d'établir une base globale des séquences ITS (comme marqueur fongique universel) pour les souches pathogènes d'origine humaine en incorporant les différentes bases de données existantes et en veillant au contrôle de qualité de ces séquences. Le CNRMA a fourni des séquences ITS de 227 espèces fongiques (93 filamenteux, 134 levures) et participé activement à l'écriture du manuscrit publié en 2012<sup>25</sup>. Cette base de données nommée ISHAM ITS Database <http://its.mycologylab.org/> est hébergée à l'Université de Sydney et visible dans le site Mycobank. Elle couvre la plupart des espèces d'intérêt clinique et fournit un outil performant pour l'identification des espèces fongiques. Nous alimentons régulièrement la base avec des séquences obtenues à partir d'espèces fongiques qui ne sont pas représentées.

Ils existent cependant des limites dans l'efficacité des ITS à identifier des espèces pour certains groupes fongiques. Ceci a soulevé la question de savoir si la région ITS est la plus indiquée comme cible universelle pour l'identification des champignons. La recherche des nouveaux marqueurs de barcoding s'est avérée alors indispensable. En 2013, Stielow et collègues ont testé environ 100 amorces sur des gènes différents des gènes ribosomiques de nombreuses espèces fongiques. Dea Garcia-Hermoso a été sollicitée pour évaluer ces nouveaux marqueurs en comparaison de cibles connues sur des souches cliniques de *Scedosporium apiospermum* de la collection du CNRMA tandis que d'autres équipes testaient d'autres souches d'intérêt clinique. En 2015 le facteur d'élongation (TEF1 $\alpha$ ) a été proposé officiellement comme le barcode secondaire pour l'identification d'espèces fongiques caractérisées de manière peu fiable avec les régions ITS<sup>26</sup>.

En 2017, le CNRMA a été à nouveau convié par Wieland Meyer (Westmead Millennium Institute for Medical Research, Sydney) pour participer à la création d'une base de données de séquences en amplifiant ce locus avec des amorces spécifiques. Ainsi, la mise en place d'un système double (ITS et TEF1 $\alpha$ ) permettra une meilleure identification des champignons d'intérêt médicale. Nous avons amplifié et séquencé cette région pour 92 souches de champignons filamenteux appartenant à 46 espèces et 145 souches de levures appartenant à 69 espèces.

#### **Analyse des souches du genre *Fusarium***

Les infections chez l'homme provoquées par les espèces du genre *Fusarium* ont des présentations cliniques variées et dépendent de l'état immunitaire de l'hôte. Six complexes d'espèces ont été impliqués dans des cas chez l'homme et chez l'animal. Nous avons initié une étude pour analyser l'association entre la présentation clinique et évolution des fusarioses notifiées au CNRMA et les espèces de *Fusarium* en cause. Grâce à nos systèmes de surveillances semi-passive (RESOMYC) et active (RESSIF) nous avons caractérisé par une approche polyphasique plus de 300 souches de *Fusarium* collectées depuis 11 ans au CNRMA en nous basant sur l'analyse des séquences partielles des gènes EF1-alpha (facteur d'élongation) et RPB2 (RNA polymérase II subunit) pour l'analyse phylogénétique. Les données préliminaires ont été présentées au TIMM à Belgrade en 2017<sup>27</sup>.

#### **Étude Européen sur la diversité de coelomycètes responsables des infections chez l'homme**

En continuité du travail réalisé sur les infections cutanées et sous-cutanées par les coelomycètes en

---

<sup>25</sup> Irinyi L *et al.* 2015. International Society of Human and Animal Mycology (ISHAM)-ITS reference DNA barcoding database- the quality controlled standard tool for routine identification of human and animal pathogenic fungi. *Med Mycol* 53:313-337.

<sup>26</sup> Stielow JB, Lévesque CA, Seifert KA, Meyer W, Irinyi L, Smits D, *et al.* 2015. One fungus, which genes? Development and assessment of universal primers for potential secondary fungal DNA barcodes. *Pers.: Mol. Phyl. Evol. Fungi* 35: 242-263

<sup>27</sup> Garcia-Hermoso, D *et al.*, 2017. 6 *Fusarium* species complexes and disease presentation in humans: preliminary analysis of 155 cases from a 5-yr prospective surveillance in France. *Mycoses*, 60, pp.22–23.

France<sup>28</sup>, une collaboration avec le Pr. Cano de l'Universitat Rovira i Virgili à Reus, Espagne été établie pour participer à l'étude européenne sur la diversité phylogénétique des coelomycètes d'intérêt médical. Outre les études morphologiques et les séquences, la sensibilité aux antifongiques a été déterminée par la méthode EUCAST pour les souches ayant la capacité de fructifier. Le CNRMA a contribué à cette étude avec plus de 50 souches, et 280 séquences de différents loci (28S, ITS,  $\beta$ -tubuline, RPB2, facteur d'élongation1- $\alpha$ ). L'objectif de ce travail est essentiellement la description morphologique et l'analyse phylogénétique visant à réviser la taxonomie, encore fluctuante, de ce groupe des champignons. La rédaction du manuscrit est en phase finale.

## 6.2 Liste des publications et communications en lien direct avec les missions et activités du CNR

### Publications nationales

1. Fréal E, Bex V, Reboux G, Roussel S, Bretagne S. [Classical and molecular methods for identification and quantification of domestic moulds]. *Rev Mal Respir*. 2017; 34:1124-1137
2. Jamilloux Y, Bernard C, Lortholary O, Kerever S, Lelievre L, Gerfaud-Valentin M, Broussolle C, Valeyre D, Seve P. [Opportunistic infections and sarcoidosis]. *Rev Med Interne*. 2017; 38:320-327.
3. Lafont E, Aguilar C, Vironneau P, Kania R, Alanio A, Poirée S, Lortholary O, Lanternier F [Fungal sinusitis]. *Rev Mal Respir* 2017 ; 34: 672–692
4. Quaesaet L, Stindel E, Lanternier F, Williams T, Jaffuel S, Moalic E, Garcia Hermoso D, Lortholary O, Ansart S. Miltefosine-based regimen as salvage therapy in *Lomentospora prolificans* bone and joint infection. *Med Mal Infect*. 2018; 48:63-65.

### Publications internationales

#### 2017

1. Alanio A, Bretagne S. Challenges in microbiological diagnosis of invasive *Aspergillus* infections. *F1000Res*. 2017; 6
2. Alanio A, Bretagne S. Performance evaluation of multiplex PCR including *Aspergillus*-not so simple! *Med Mycol*. 2017; 55:56-62.
3. Alanio A, Bretagne S. *Pneumocystis jirovecii* detection in asymptomatic patients: what does its natural history tell us? *F1000Res*. 2017; 6:739.
4. Alanio A, Desnos-Ollivier M, Garcia-Hermoso D, Bretagne S. Investigating Clinical Issues by Genotyping of Medically Important Fungi: Why and How? *Clin Microbiol Rev*. 2017; 30:671-707.
5. Alanio A, Gits-Muselli M, Guigue N, Desnos-Ollivier M, Calderon EJ, Di Cave D, Dupont D, Hamprecht A, Hauser PM, Helweg-Larsen J, Kicia M, Lagrou K, Lengerova M, Matos O, Melchers WJG, Morio F, Nevez G, Totet A, White LP, Bretagne S. Diversity of *Pneumocystis jirovecii* Across Europe: A Multicentre Observational Study. *EBioMedicine*. 2017; 22:155-163.
6. Alanio A, Menotti J, Gits-Muselli M, Hamane S, Denis B, Rafoux E, Peffault de la Tour R, Touratier S, Bergeron A, Guigue N, Bretagne S. Circulating *Aspergillus fumigatus* DNA Is Quantitatively Correlated to Galactomannan in Serum. *Front Microbiol*. 2017; 8:2040.
7. Bailly S, Leroy O, Azoulay E, Montravers P, Constantin JM, Dupont H, Guillemot D, Lortholary O, Mira JP, Perrigault PF, Gangneux JP, Timsit JF, Amar CSG. Impact of echinocandin on prognosis of proven invasive candidiasis in ICU: A post-hoc causal inference model using the AmarCAND2 study. *J Infect*. 2017:408-417.
8. Baron M, Zini JM, Challan Belval T, Vignon M, Denis B, Alanio A, Malphettes M. Fungal infections in patients treated with ibrutinib: two unusual cases of invasive aspergillosis and cryptococcal meningoencephalitis. *Leuk Lymphoma*. 2017; 58:2981-2982.
9. Bretagne S, Renaudat C, Desnos-Ollivier M, Sitbon K, Lortholary O, Dromer F, French Mycosis Study Group. Predisposing factors and outcome of uncommon yeast species-related fungaemia

---

<sup>28</sup> Guégan S, Garcia-Hermoso D, Sitbon K, Ahmed S, Moguelet P, Dromer F, Lortholary O. 2016. Ten-Year Experience of Cutaneous and/or Subcutaneous Infections Due to Coelomycetes in France. *Open Forum Infect Dis* 3:ofw106.

based on an exhaustive surveillance programme (2002-14). *J. Antimicrob. Chemother.* 2017; 72: 1784–1793

10. Cambau E, Durand-Zaleski I, Bretagne S, Brun-Buisson C, Cordonnier C, Duval X, Herwegh S, Pottecher J, Courcol R, Bastuji-Garin S, team Es. Performance and economic evaluation of the molecular detection of pathogens for patients with severe infections: the EVAMICA open-label, cluster-randomised, interventional crossover trial. *Intensive Care Med.* 2017; 43:1613-1625.
11. Colley T, Alanio A, Kelly SL, Sehra G, Kizawa Y, Warrilow AGS, Parker JE, Kelly DE, Kimura G, Anderson-Dring L, Nakaoki T, Sunose M, Onions S, Crepin D, Lagasse F, Crittall M, Shannon J, Cooke M, Bretagne S, King-Underwood J, Murray J, Ito K, Strong P, Rapeport G. In Vitro and In Vivo Antifungal Profile of a Novel and Long-Acting Inhaled Azole, PC945, on *Aspergillus fumigatus* Infection. *Antimicrob Agents Chemother.* 2017; 61:pii: e02280-16.
12. Cordonnier C, Alanio A, Cesaro S, Maschmeyer G, Einsele H, Donnelly JP, Hauser PM, Lagrou K, Melchers WJ, Helweg-Larsen J, Matos O, Bretagne S, Maertens J, a joint venture of The European Group for Blood Marrow Transplantation, The European Organization for Research Treatment of Cancer, The Immunocompromised Host Society, The European LeukemiaNet, (ECIL5). *Pneumocystis jirovecii* pneumonia: still a concern in patients with haematological malignancies and stem cell transplant recipients-authors' response. *J Antimicrob Chemother.* 2017; 72:1266-1268.
13. Gamaletsou MN, Rammaert B, Bueno MA, Sipsas NV, Moriyama B, Kontoyiannis DP, Roilides E, Zeller V, Taj-Aldeen SJ, Henry M, Petraitis V, Denning DW, Lortholary O, Walsh TJ, International Osteoarticular Mycoses C. *Aspergillus* arthritis: analysis of clinical manifestations, diagnosis, and treatment of 31 reported cases. *Med Mycol.* 2017; 55:246-254.
14. Gauthier A, Jaubert J, Traversier N, Lemant J, Balu L, Garcia-Hermoso D, Welti S, Favel A, Picot S, Hoarau G. *Trametes polyzona*, an emerging filamentous basidiomycete in Reunion Island. *Mycoses.* 2017; 60:412-415.
15. Gits-Muselli M, Benderdouche M, Hamane S, Mingui A, Feuilhade de Chauvin M, Guigue N, Picat MQ, Bourrat E, Petit A, Bagot M, Alanio A, Bretagne S. Continuous increase of *Trichophyton tonsurans* as a cause of tinea capitis in the urban area of Paris, France: a 5-year-long study. *Med Mycol.* 2017; 55:476-484.
16. Lortholary O, Renaudat C, Sitbon K, Desnos-Ollivier M, Bretagne S, Dromer F, French Mycoses Study Group. The risk and clinical outcome of candidemia depending on underlying malignancy. *Intensive Care Med* 2017; 43: 652–662
17. Molloy SF, Chiller T, Greene GS, Burry J, Govender NP, Kanyama C, Mfinanga S, Lesikari S, Mapoure YN, Kouanfack C, Sini V, Temfack E, Boulware DR, Dromer F, Denning DW, Day J, Stone NRH, Bicanic T, Jarvis JN, Lortholary O, Harrison TS, Jaffar S, Loyse A. Cryptococcal meningitis: A neglected NTD? *PLoS Negl Trop Dis.* 2017; 11:e0005575.
18. Montravers P, Perrigault PF, Timsit JF, Mira JP, Lortholary O, Leroy O, Gangneux JP, Guillemot D, Bensoussan C, Bailly S, Azoulay E, Constantin JM, Dupont H, Amar CSG. Antifungal therapy for patients with proven or suspected *Candida* peritonitis: Amarcand2, a prospective cohort study in French intensive care units. *Clin Microbiol Infect.* 2017; 23:117 e1-117 e8.
19. Nourrisson C, Garcia-Hermoso D, Morio F, Kauffmann-Lacroix C, Berrette N, Bonhomme J, Poirier P, Lortholary O, French Mycosis Study G. *Thermothelomyces thermophila* human infections. *Clin Microbiol Infect.* 2017; 23:338-341.
20. Pasquier E, Kunda J, De Beaudrap P, Loyse A, Temfack E, Molloy SF, Harrison TS, Lortholary O. Long term mortality and disability in Cryptococcal Meningitis: a systematic literature review. *Clin Infect Dis.* 2017; 66:1122-1132.
21. Pilmis B, Coignard-Biehler H, Rouzard C, Jullien V, Lanternier F, Lortholary O. Acute reversible pancreatitis induced by posaconazole. *J Antimicrob Chemother.* 2017; 72:628-630.
22. Rammaert B, Candon S, Maunoury C, Bougnoux ME, Jouvion G, Braun T, Correas JM, Lortholary O. Thalidomide for steroid-dependent chronic disseminated candidiasis after stem cell transplantation: A case report. *Transpl Infect Dis.* 2017; 19:e12637.
23. Robin C, Alanio A, Gits-Muselli M, la Martire G, Schlemmer F, Botterel F, Angebault C, Leclerc M, Beckerich F, Redjoul R, Pautas C, Toma A, Maury S, Bretagne S, Cordonnier C. Molecular

Demonstration of a *Pneumocystis* Outbreak in Stem Cell Transplant Patients: Evidence for Transmission in the Daycare Center. *Front Microbiol.* 2017; 8:700.

24. Toussaint B, Lanternier F, Woloch C, Fournier D, Launay M, Billaud E, Dannaoui E, Lortholary O, Jullien V. An ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for the therapeutic drug monitoring of isavuconazole and seven other antifungal compounds in plasma samples. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 2017; 1046:26-33.
25. Uzunhan Y, Nunes H, Jeny F, Lacroix M, Brun S, Brillet PY, Martinod E, Carette MF, Bouvry D, Charlier C, Lanternier F, Planes C, Tazi A, Lortholary O, Baughman RP, Valeyre D. Chronic pulmonary aspergillosis complicating sarcoidosis. *Eur Respir J.* 2017; 49:1602396.
26. Kwon-Chung KJ, Bennett JE, Wickes BL, Meyer W, Cuomo CA, Wollenburg KR, Bicanic TA, Castañeda E, Chang YC, Chen J, Cogliati M, Dromer F, Ellis D, Filler SG, Fisher MC, Harrison TS, Holland SM, Kohno S, Kronstad JW, Lazera M, et al (2017) The Case for Adopting the 'Species Complex' Nomenclature for the Etiologic Agents of Cryptococcosis. *mSphere* **2**: e00357–16–7

## 2018

1. Desnos-Ollivier M, Bormida V, Poirier P, Nourrisson C, Pan D, Bretagne S, Puime A, Dromer F, French Mycoses Study G, Uruguayan Invasive Fungal Infection N. Population Structure of *Candida parapsilosis*: No Genetic Difference Between French and Uruguayan Isolates Using Microsatellite Length Polymorphism. *Mycopathologia.* 2018; 183:381-390.
2. Rivoisy C, Vena A, Schaeffer L, Charlier C, Fontanet A, Delahaye F, Bouza E, Lortholary O, Munoz P, Lefort A, French Mycoses Study G, Grupo de Apoyo al Manejo de las Endocarditis en E. Prosthetic Valve *Candida* spp. Endocarditis: New Insights Into Long-term Prognosis-The ESCAPE Study. *Clin Infect Dis.* 2018; 66:825-832.
3. Rouzaud C, Chosidow O, Brocard A, Fraïtag S, Scemla A, Anglicheau D, Bouaziz JD, Dupin N, Bougnoux ME, Hay R, Lortholary O, Lanternier F, French Mycoses Study G. Severe dermatophytosis in solid organ transplant recipients: A French retrospective series and literature review. *Transpl Infect Dis.* 2018; 20:e12799.
4. Temfack E, Kouanfack C, Mossiang L, Loyse A, Fonkoua MC, Molloy SF, Koulla-Shiro S, Delaporte E, Dromer F, Harrison T & Lortholary O. Cryptococcal Antigen Screening in Asymptomatic HIV-Infected Antiretroviral Naïve Patients in Cameroon and Evaluation of the New Semi-Quantitative Biosynex CryptoPS Test. *Front Microbiol* 2018; 9: 555
5. Molloy SF, Kanyama C, Heyderman RS, Loyse A, Kouanfack C, Chanda D, ...Lortholary O, Jaffar S, Harrison TH for the ACTA Trial Study Team. Antifungal Combinations for Treatment of Cryptococcal Meningitis in Africa. *N Engl J Med* 2018; **378**:1004–1017

### Communications nationales

- Fongémies à levures à Paris, données du réseau ODL (O. Lortholary), hôpital Robert Debré, Paris février 2017
- Infections fongiques émergentes (F. Lanternier). Société de Réanimation de Langue Française. Paris 2017
- Médicaments immunosuppresseurs et risque infectieux (F. Lanternier) Société de Réanimation de Langue Française. Paris 2017
- Quel azolé utiliser en 2017 dans l'aspergillose invasive (F. Lanternier). JNI 2017
- Où en est-on des bithérapies ? (F. Lanternier) Journée du RésO-InfectiO-PACA-Est. 2017
- Comment optimiser le traitement antifongique ? (F. Lanternier) RICAI 2017

### Communications internationales

8th Trends in Medical Mycology (TIMM), Belgrade, Serbie, 2017

- Diagnosis of histoplasmosis: switching from microscopy/culture to RNA/DNA detection. Alaino A\*, Lanternier F, Gifs-Muselli M, Benazra M, Sturny-Leclere A, Lortholary O, Dromer F, Bretagne S and the French Mycoses Study Group. *Mycoses* 60: 28–29
- Bretagne S, Desnos-Ollivier M, Sitbon K, Lortholary O, Dromer F and the French Mycoses Study Group (2017) Little impact of changes in antifungal drugs prescription on candidemia prognosis

and epidemiology in adult patients: results from a 12-year survey in the Paris area. *Mycoses* 60: 27–28

- Garcia-Hermoso D, Sitbon K, Lanternier F, Lortholary O, Dromer F, Bretagne S and the French Mycoses Study Group (2017) *Fusarium* species complexes and disease presentation in humans: preliminary analysis of 155 cases from a 5-yr prospective surveillance in France. *Mycoses* 60: 22–23
- Robin C, Bastuji-Garin S, Sitbon K, Raus N, Dromer F, Lortholary O, Maury S, la Tour de RP, Bretagne S, Cordonnier C (2017) Only post-transplant risk factors are associated with the occurrence of invasive aspergillosis after day 100 of allogeneic hematopoietic stem cell transplant. *Mycoses* 60: 176–176
- Hamprecht A, Desnos-Ollivier M, Goettig S, Bader O, Pranada AB, Haas A, Aigner M, Saleh A, Dromer F, Koepfel M (2017) Blood stream infections by *Saprochaete clavata* and *Saprochaete capitata*, two emerging pathogens in immune-compromised patients - results from a multicentre study. *Mycoses* 60: 18–18

ECCMID 2017 : *Scedosporium* observational study. Bronniman D, Dromer F, Garcia-Hermoso D, Lanternier F and the French Mycoses Study Group

### ***Conférences sur invitations***

- Organisation de la surveillance des infections fongiques invasives (S. Bretagne) congrès franco-marocain de parasitologie et mycologie, Faculté de Médecine et de Pharmacie de Rabat, 1-3 février 2018.
- Taxonomie et sensibilité antifongique des complexes d'espèces : que faut-il retenir ? (Dea Garcia-Hermoso et Marie Desnos), Société Française de Mycologie Médicale (SFMM), Toulouse, Mars 2017
- Les moisissures et leurs impacts sanitaires, colloque « moisissures, habitat et santé » (S. Bretagne & D. Caillaud), Ministère de la santé, Paris, octobre 2017
- Epidemiology of mucormycoses (O. Lortholary) ECCMID, avril 2017
- Cryptococcosis in HIV-negative patients (O. Lortholary) 8<sup>th</sup> TIMM, Belgrade 2017
- Pro/con debate: Amphotericin B (not isavuconazole) as primary treatment for mucormycosis. (F. Lanternier) ECCMID 2018 Madrid
- Immunogenetics of fungal infections (F. Lanternier) ECCMID 2018 Madrid

## **7 Coopération avec les laboratoires de santé animale, d'hygiène alimentaire, environnementaux**

*Pas de liens*

## **8 Programme d'activité pour les années suivantes**

Le programme d'activité du CNRMA est en continuité avec celui de l'année qui vient de s'écouler. Les techniques d'identification et de typage seront développées en fonction des isolats envoyés et des questions qui se poseront (épidémie, cas groupés, nouveau pathogène). Notre objectif est de développer les techniques de typage à partir des données de NGS en commençant par les espèces à l'origine de cas groupés ou apparemment groupés.

## **9 Liste des collaborateurs du CNRMA**

### **9.1 CC-CNRMA formant RESSIF**

Amiens (Dr. Taieb Chouaki)  
Angers (Pr. Jean-Philippe Bouchara)  
Besançon (Pr. Laurence Million)  
Caen (Dr. Julie Bonhomme)  
Clermont-Ferrand (Dr. Philippe Poirier)  
Dijon (Pr. Frédéric Dalle)  
Pointe-à-Pitre (Dr. Muriel Nicolas)  
Cayenne (Pr. M. Demar)  
Institut Gustave Roussy (Dr. Elisabeth Chachaty)  
Limoges (Dr. Bernard Bouteille)  
Fort de France (Dr. Nicole Desbois)  
Montpellier (Dr. Nathalie Bourgeois)  
Nantes (Dr. Florent Morio)  
Nice (Dr. Martine Gari-Toussaint)  
Nimes représenté par Dr. Mylène Sasso)  
Paris/Cochin (Dr. André Paugam)  
Paris/Saint Louis (Pr. Stéphane Bretagne)  
Paris/hôpital Necker-Enfants Malades (Dr. Marie-Elisabeth Bougnoux)  
Paris/Hôpital des Quinze-Vingt (Dr. L. Merabet)  
Paris/Robert Debré (Dr. Patricia Mariani)  
Poitiers (Dr. Catherine Kauffmann-Lacroix)  
Reims (Dr. Dominique Toubas)  
Rennes (Pr. Jean-Pierre Gangneux)  
Rouen (Pr. Loïc Favennec)  
Saint Etienne (Dr. Hélène Raberin)  
Strasbourg (Dr. Valérie Letscher-Bru)  
Toulouse (Dr. Sophie Cassaing)  
Tours (Pr. Jacques Chandénier)  
Versailles (Dr. Odile Eloy)

### **9.2 Centres participants à l'ODL**

Bobigny - hôpital Avicenne (Sophie Brun),  
Bondy – hôpital Jean Verdier (Isabelle Poilane),  
Boulogne – hôpital Ambroise Paré (Anne-Laure Roux),  
Créteil - hôpital Henri Mondor (Françoise Botterel),  
Garches – hôpital Raymond Poincaré (Anne-Laure Roux),  
Kremlin-Bicêtre – hôpital du Kremlin Bicêtre (Adela Angouvant),  
Paris – hôpital Cochin (André Paugam),  
Paris - hôpital Necker Enfants Malades (Marie-Elisabeth Bougnoux),  
Paris - hôpital Bichat (Sandrine Houzé), hôpital Saint-Louis (Stéphane Bretagne),  
Paris - hôpital Robert Debré (Patricia Marianni),  
Paris - hôpital Lariboisière (Stéphane Bretagne),  
Le Chesnay-CH de Versailles (Odile Eloy),  
Villejuif - hôpital Paul Brousse (Adela Angouvant)  
Villejuif - Institut Gustave Roussy (Elisabeth Chachaty).

### **9.3 Participants à la surveillance des mycoses invasives en 2017**

Annecy, Laboratoire de Biologie Médicale, Centre Hospitalier Général  
Bordeaux, Laboratoire de Parasitologie-Mycologie, CHR Hôpital Saint-André  
Clamart, Laboratoire de Biologie Médicale, Hôpital des Armées Percy  
Clamart, Service de Bactériologie-Virologie, Hôpital Antoine Bécclère  
Colmar, Laboratoire de Microbiologie, CHG Louis Pasteur  
Eaubonne, Laboratoire d'Immuno-Bactério-Hématologie, Centre Hospitalier Emile Roux  
Grenoble, Laboratoire de Parasitologie-Microbiologie, CHRU Albert Michallon

La Roche-sur-Yon, Laboratoire de Biologie Médicale, CHD Roche-sur-Yon Luçon Montaigu  
Le Mans, Service de Microbiologie Médicale et Hygiène Hospitalière, Centre Hospitalier  
Lyon, Laboratoire de Mycologie, Hôpital de la Croix-Rousse  
Mayotte, Centre Hospitalier  
Marseille, Laboratoire de Biologie Médicale, Hôpital Fondation Saint-Joseph  
Marseille, Laboratoire de Parasitologie-Mycologie, CHU – La Timone  
Mulhouse, Laboratoire de Biologie Médicale, Hôpital Emile Muller  
Neuilly, Laboratoire de Bactériologie, Hôpital Américain  
Nevers, Laboratoire de Bactériologie-Immunologie, Centre Hospitalier  
Orléans, Laboratoire de Biologie Médicale, Centre Hospitalier Régional  
Saint-Denis, La Réunion, Laboratoire de Biologie, CHD Felix Guyon  
Saint-Pierre, La Réunion, Laboratoire de Bactério-Parasito-Virologie et Hygiène, Groupe Hospitalier  
Réunion Sud  
Toulon Armées, Laboratoire de Bactériologie, HIA Sainte-Anne  
Tourcoing, Laboratoire de Biologie Médicale, CH Gustave Dron

## Annexe 1 : Missions & organisation du CNR

### 1.1. Missions du CNR et de ses éventuels laboratoires associés

L'**activité d'expertise** comprend l'identification phénotypique et génotypique des isolats de champignons filamenteux et de levures, avec détermination de leur sensibilité à tous les antifongiques systémiques utilisables, détection reproductible des isolats de moindre sensibilité ou résistants et recherche de mutations dans les gènes avec mise en collection de tous les isolats. Le génotypage de certaines levures fait appel à plusieurs méthodes suivant les espèces (MLST et marqueurs microsatellites essentiellement) réalisé en fonction des questions posées (investigations épidémiologiques, caractérisation d'isolats résistants).

L'**activité de conseil** pour la prise en charge diagnostique et/ou thérapeutique de patients suspects ou atteints de mycoses invasives est importante et croît régulièrement avec des sollicitations quotidiennes. Tout clinicien ou microbiologiste/mycologue peut solliciter l'expertise du CNRMA.

En ce qui concerne l'**activité de surveillance**, la diversité des genres et espèces fongiques en cause et la complexité des pathologies engendrées et des populations à risque compliquent le recueil des données. Nous continuons donc la surveillance passive de toutes les mycoses invasives, mais avons en plus développé une surveillance active grâce à des centres collaborateurs (CC-CNRMA) qui forment le RESeau de Surveillance des Infections Fongiques invasives (RESSIF) dont l'objectif est l'exhaustivité de déclarations aussi bien des pathogènes fongiques rares que fréquents. Cette surveillance active est microbiologique et épidémiologique.

### 1.2. Organisation du CNR et de ses éventuels laboratoires associés

#### Composition de l'équipe

Le CNRMA est situé au sein de l'unité de Mycologie Moléculaire de l'Institut Pasteur. Il n'a pas de laboratoire associé. La diversité des missions du CNRMA et des genres/espèces pathogènes nous a conduit à une organisation dans laquelle les "équipes" composées d'un ingénieur et d'un technicien associés à au moins l'un des responsables ou collaborateurs du CNR se spécialisent dans certaines thématiques (expertise sur les filamenteux, les levures, la détermination de la sensibilité aux antifongiques, génotypage, mise au point de techniques d'identification ou de typage, surveillance, ...).

La continuité de l'expertise globale est bien sûr assurée en cas d'absence de l'un des membres de l'équipe. La composition de l'équipe et l'organisation fonctionnelle du CNRMA sont décrites ci-dessous (**Tableau 16**). Il faut ici noter que certaines activités se font en dehors de l'unité de mycologie moléculaire, soit sur le campus de l'Institut Pasteur (expertise anatomopathologique), soit dans les services des collaborateurs et adjoints hospitalo-universitaires.

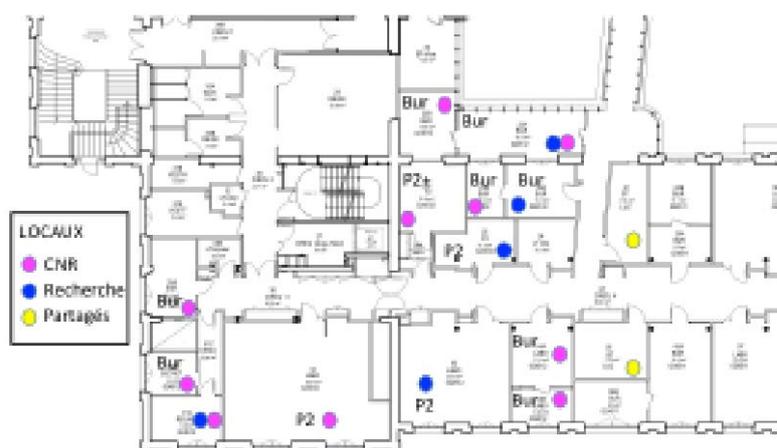
**Tableau 16 : Composition de l'équipe du CNRMA**

Nom	Fonction	ETP	Qualification/statut	Organisme payeur
<b>Alexandre Alanio</b>	Collaborateur scientifique	10%	Docteur en médecine, Thèse d'université, MCU-PH Hôpital Saint Louis	AP-HP / Université Paris Diderot P7
<b>Reine Bouyssié</b>	Secrétaire	40%	Secrétaire de Direction	Institut Pasteur
<b>Stéphane Bretagne</b>	Directeur Adjoint	20%	Docteur en Médecine, Thèse d'université / PUPH Hôpital Saint Louis	AP-HP / Paris Diderot P7
<b>Marie Desnos-Ollivier</b>	Collaborateur technique/scientifique	80%	Thèse d'université / Ingénieur	Institut Pasteur
<b>Françoise Dromer</b>	Directeur du CNRMA	40%	Docteur en Médecine, Thèse d'université / Professeur Institut Pasteur	Institut Pasteur

Nom	Fonction	ETP	Qualification/statut	Organisme payeur
<b>Dea Garcia-Hermoso</b>	Collaborateur technique/scientifique	100%	Thèse d'université / Ingénieur	Institut Pasteur
<b>Cécile Gautier</b>	Technicienne	100%	BTS / Technicien supérieur de laboratoire	Institut Pasteur
<b>Virginie Geolier</b>	Technicienne	100%	BTS / Technicien supérieur de laboratoire	Institut Pasteur
<b>Fanny Lanternier</b>	Collaborateur clinicien	20%	Docteur en médecine, Thèse d'université, MCU-PH Hôpital Necker-Enfants Malades	AP-HP / Paris Descartes P5
<b>Olivier Lortholary</b>	Directeur Adjoint	20%	Docteur en Médecine, Thèse d'université / PUPH Hôpital Necker-Enfants Malades	AP-HP / Paris Descartes P5
<b>Karine Sitbon</b>	Médecin d'Etudes Cliniques	50%	Docteur en Médecine / Cadre Administratif et Technique	Institut Pasteur

### 1.3.Locaux et équipements

Des locaux, entièrement rénovés en 2014, ont été attribués à l'unité de mycologie moléculaire (recherche) dans le bâtiment Duclaux (rez de chaussée haut, l'aile Fourneau) au 28 rue du Dr. Roux (**Figure 26**). Ils comprennent :



**Figure 26 : Locaux du CNRMA**

Des locaux dédiés au CNR : un grand laboratoire P2 et un laboratoire P2+ (total 65m<sup>2</sup>), 4 bureaux séparés pour les responsables et collaborateurs, 4 espaces bureaux partagés avec d'autres membres de l'unité pour les autres membres du CNRMA et des placards fermés à clés pour les dossiers du CNR, 1 bureau partagé pour le secrétariat avec le CNR Listeria et l'unité de recherche correspondante.

Des locaux partagés avec le CNR Listeria au même étage : pièce PCR, pièce d'incubateurs, pièce de pesée, chambre froide, pièce de congélateurs à -80°C

Des locaux partagés avec d'autres unités : pièce de congélateurs à -80°C, pièce de containers à azote

Des locaux partagés avec d'autres structures impliquées dans le diagnostic (CIBU, les CNRs Bordetella et Corynébactéries) et respectant la « marche en avant », situés à l'étage inférieur du même bâtiment.

Les équipements principaux propres comprennent :

- PSM2 et incubateurs à CO2, hottes chimiques
- Thermocycleurs (iCycler et C1000 de Bio-Rad et LCR480 de Roche)
- MagNAlyser
- Extracteur semi-automatique KingFisher
- QUBit (fluoromètre pour quantification d'ADN, ARN et protéines)
- Nanodrop
- Caméras numériques, appareil photo Reflex

- Lecteur ELISA
- Microscopes : optiques, contraste interférentiel, inversé, à épifluorescence
- Loupe binoculaire
- Ordinateurs
- Container d'azote
- Congélateurs à -20°C, à -80°C et réfrigérateurs
- Etuves et incubateurs agités et non agités
- Enceinte illuminée Memmert
- Bioscreen
- Cytométrie en flux (appareil partagé)

Certains appareils sont mutualisés avec l'unité de Biologie des Infections / CNR *Listeria* (Multitron Pro – INFORS, G:Box Syngène).

Les logiciels suivants sont utilisés pour l'édition des séquences, la construction des arbres (Sequencher, Geneious, Bionumerics, MEGA, Archeopteryx) et PeakScanner et GeneMapper (logiciel partagé) pour l'analyse des microsatellites. Les bases de données sont gérées par les logiciels Lagon et VOOZANOO (EpiConcept).

Par ailleurs, le CNRMA utilise un laboratoire de type P3+ dès lors qu'un isolat est annoncé comme ou suspect d'être un pathogène de classe 3. Le séquençage de routine est assuré par la plateforme Eurofins. Le CNRMA bénéficie des "services" disponibles sur le campus de l'Institut Pasteur au sein de la Coordination des Centres Nationaux de Référence (CCR), des animaleries A2 et A3, la plateforme milieu de l'Institut Pasteur (préparation des tampons et milieux), la plateforme « matériels » et la plateforme de microbiologie mutualisée (P2M) pour le séquençage génome entier. Un biotyper Bruker MALDI-TOF y est également disponible. En cas d'urgence, le séquençage est assuré par le pôle de génotypage des pathogènes (PGP) de la CIBU (ABIPrism 3600).

#### **1.4. Collections de matériel biologique**

Les souches cliniques mises en collection au CNRMA sont à la disposition des correspondants qui les ont envoyées s'ils souhaitent les récupérer ultérieurement. En revanche, l'avis du correspondant concerné (si le nombre de souches à envoyer est  $\leq 5$  ou si l'espèce est rare) ou du groupe participant à l'étude est nécessaire pour les demandes concernant un plus grand nombre de souches, en sachant que dans tous les cas, il peut y avoir des restrictions liées à des problèmes techniques, financiers et/ou réglementaires.

Le CNRMA valorise son savoir-faire et son expertise en mettant à disposition de tiers académiques et industriels des duplicatas des souches initialement reçues (à noter que la collection CNR est donc préservée). L'accès au matériel biologique collecté dans le cadre de l'activité du CNR est conditionné :

- à ce que l'utilisation envisagée du matériel biologique réponde à un objectif de santé publique ;
- à la mise en place de documents contractuels spécifiques.

Ainsi, est exigée pour le transfert du matériel biologique et des données associées à des équipes extérieures, la mise en place a minima d'un accord de transfert de matériel biologique (MTA) ou d'un accord de collaboration selon la nature des interactions entre les deux parties. Suivant la nature industrielle ou académique du partenaire, ces accords donneront lieu ou non à une contrepartie financière, contrepartie financière qui reste limitée au remboursement des coûts induits pour l'obtention et la conservation du matériel biologique transféré. Ces accords ont notamment pour objet d'assurer le transfert de la détention physique du matériel au partenaire.

Il est bien entendu que l'utilisation du matériel biologique par le tiers est strictement limitée au projet initial. En termes de valorisation, l'Institut Pasteur s'assure que le CNRMA soit remercié ou associé dans chacune des publications et communications des résultats du projet. L'Institut Pasteur s'assure également dans certaines circonstances de la copropriété des résultats issus des travaux effectués sur le matériel biologique. A tout le moins, les résultats du projet sont systématiquement communiqués au CNRMA.

## Collections de levures

Tous les isolats cliniques de levures adressés au CNRMA sont systématiquement conservés après :

- ✓ vérification de la pureté de la souche (pour les levures sur milieu BBL™ CHROMagar™ Candida, BD ou milieu aux graines de Niger pour les souches des *Cryptococcus sp.*)
- ✓ identification phénotypique par profil MALDI-TOF. Pour les levures rares, détermination de la fermentation du glucose, de la croissance à différentes températures et sur des milieux spéciaux (nitrate, NaCl 10% NaCl 15%, glucose 50%, acide acétique).
- ✓ extraction de l'ADN
- ✓ en cas d'identification de *C. albicans*, recherche systématique de l'espèce *C. dubliniensis* par PCR duplex
- ✓ en cas d'identification de *C. parapsilosis*, recherche systématique de *C. orthopsilosis* et *C. metapsilosis* par séquençage des régions ITS<sup>29</sup>
- ✓ en cas d'identification de *Trichosporon sp.*, séquençage systématique de la région IGS1 de l'ADN ribosomique<sup>30</sup>
- ✓ en cas d'identification de *Debaryomyces sp.* ou de *C. lusitaniae*, séquençage systématique d'une partie du gène codant l'actine<sup>31</sup>
- ✓ en cas d'identification de *M. guilliermondii* ou *M. caribbica*, séquençage systématique d'une partie du gène *RPB1*
- ✓ en cas d'identification de *C. neoformans* détermination du sérotype par amplification de régions des gènes *Gpa1* et *Pak1* avec des amorces spécifiques du sérotype A ou D et/ou séquençage de la région IGS du gène codant l'ARN ribosomique
- ✓ détermination de la sensibilité à 8 antifongiques systémiques (amphotéricine B, 5-fluorocytosine, fluconazole, voriconazole, posaconazole, isavuconazole, caspofungine, micafungine)
- ✓ en cas de moindre sensibilité à la caspofungine (CMI $\geq$ 0,5 mg/L), séquençage systématique partiel des gènes codant la 1,3 beta-glucane synthase pour les isolats de *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. tropicalis*, *C. krusei*, *C. dubliniensis*, *C. kefyr* et *C. lusitaniae*
- ✓ en cas d'espèce non « fréquente » ou de profil MALDI-TOF non valide, séquençage systématique des régions ITS1 – 5.8S – ITS2 par les couples d'amorces V9D/LS266 et depuis 2006 de la région D1/D2 de la sous-unité 26S (couple d'amorces NL1/NL4) du gène codant pour l'ARN ribosomique
- ✓ recherche d'ascospores si c'est pertinent, culture sur lames pour les espèces de *Trichosporon*
- ✓ récupération de données cliniques et épidémiologiques.
- ✓ Stockage des données physiologiques, des profils de sensibilités aux antifongiques, des résultats de typage et des séquences nucléotidiques dans la base de données « Institut Pasteur FungiBank »

La collection du CNRMA comprend ainsi des souches bien caractérisées appartenant à 28 genres et 103 espèces différents (1 à 2983 isolats/espèce) et se répartissant en :

- près de 4939 souches de nombreuses espèces de levures isolées d'hémocultures en région parisienne depuis octobre 2002 dans le cadre de l'Observatoire des Levures (cf. plus bas), stockées congelées en glycérol 40% à -80°C, et depuis 2009 en glycérol 20% dans l'azote liquide.

---

<sup>29</sup> Tavanti A, et al. *Candida orthopsilosis* and *Candida metapsilosis* spp. nov. to replace *Candida parapsilosis* groups II and III. J Clin Microbiol. 2005; 43:284

<sup>30</sup> Sugita T, et al. Sequence Analysis of the Ribosomal DNA Intergenic Spacer 1 Regions of *Trichosporon* Species. J Clin Microbiol. 2002, 40;1826

<sup>31</sup> Martorell P, et al. Sequence-based identification of species belonging to the genus *Debaryomyces* FEMS Yeast research. 2005; 5:1157

- près de 2500 souches de levures provenant d'autres sites profonds ou superficiels, stockées congelées à -20°C entre 2002 et 2006, à -80°C depuis 2007, et en double depuis 2009 dans l'azote liquide.
- plus de 3000 souches de *Cr. neoformans* provenant de la surveillance de la cryptococcose en France depuis 1991. Seules les souches reçues depuis 2001 ont été analysées comme décrit ci-dessus et stockées congelées. Les souches antérieures étaient initialement stockées dans l'eau distillée stérile à 4°C, mais ont été progressivement remises en culture et stockées à -80°C et dans l'azote liquide.
- S'y ajoutent des souches de référence (contrôle de qualité, souches types) importantes pour les activités d'expertise. Elles proviennent des collections internationales (ATCC, CBS) et sont conservées à -80°C. Elles ne peuvent être distribuées.

#### Collection de champignons filamenteux

Tous les isolats cliniques adressés au CNRMA sont systématiquement conservés après :

- ✓ vérification de la pureté de la souche
- ✓ identification phénotypique après culture sur milieux spéciaux, cultures 3 points, cultures sur lame, détermination de la vitesse de croissance, de la température de croissance optimale ...
- ✓ détermination de la sensibilité à 8 antifongiques systémiques (amphotéricine B, itraconazole, voriconazole, posaconazole, isavuconazole, caspofungine, micafungine, terbinafine)
- ✓ extraction de l'ADN
- ✓ séquençage des régions ITS1-5.8S-ITS2 et de la région 28S pour tous les isolats, et de certains gènes pour des genres spécifiques (cf. plus bas)
- ✓ récupération de données cliniques et épidémiologiques
- ✓ stockage des images numériques dans la base de données gérée par le logiciel ACDSsee et des séquences dans une base de données gérée par le logiciel BioloMics.

La collection comprend des souches appartenant à 93 genres et 349 espèces différents, (1 à 313 isolats/espèce) :

- ✓ près de 3000 souches d'origine clinique, y compris des souches de champignons dimorphiques stockées en laboratoire P3+ à -80°C
- ✓ auxquelles s'ajoutent des souches de référence ou des souches type provenant de diverses collections (CBS, ATCC, IP, NRRL) non distribuables.

Les isolats sont stockés à -80°C et dans l'azote liquide.

#### Collection d'images numériques

Elle comprend des milliers d'images de champignons, essentiellement filamenteux, après photographies macroscopiques et microscopiques. Les cultures sur lames, l'utilisation de la loupe et du microscope à contraste interférentiel ont permis d'améliorer considérablement la qualité de l'iconographie. Les images numériques sont envoyées par courriel à la demande (publication, enseignement). Toutes les images sont gérées avec le logiciel ACDSsee.

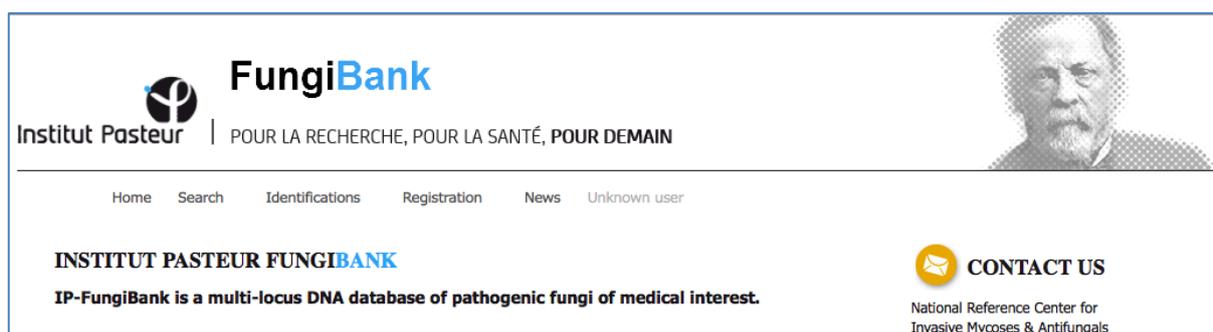
#### Collection d'ADN génomique

L'ADN génomique de tous les isolats de levures et de champignons filamenteux adressés au CNRMA est systématiquement extrait et conservé à -20°C depuis 2003. Cette collection est utilisée à des fins de typage ou d'analyse phylogénique par le CNRMA et n'est pas ouverte à des utilisations extérieures.

#### Base de données de séquences : Institut Pasteur FungiBank

La base de données compilant les données d'identification polyphasique réalisée au CNRMA « Institut Pasteur FungiBank » (<http://fungibank.pasteur.fr/>) a été créée en collaboration avec Vincent Robert ([société BioAware](#)) avec le logiciel BioloMICS (**Figure 27**). Elle est constituée des séquences ADN de pathogènes fongiques (levures et champignons filamenteux) associés aux données de CMI. Cette base de données est

publique, accessible sans mot de passe pour l'utilisateur. Les centres collaborateurs du CNRMA peuvent obtenir des paramètres de connexion qui leur donnent accès à davantage d'information et de séquences.



**Figure 27 : Portail de la base de données de séquences Institut Pasteur FungiBank**

La principale fonction de IP FungiBank est l'identification « moléculaire » en ligne par les biais de recherche de similarité basée sur « pairwise alignments ». IP FungiBank a plusieurs atouts par rapport à d'autres bases de séquences : contrôle de qualité des séquences, mise à jour régulière de la nomenclature fongique, données associées disponibles telles que la sensibilité aux antifongiques, des séquences nucléotidiques et protéiques des gènes *FKS* et *CYP51A* pour les souches résistantes et des profils alléliques de certaines souches (*C. albicans*, *C. parapsilosis*, *C. krusei*, *C. tropicalis* et *A. fumigatus*). Les régions séquencées sont choisies en fonction des différents groupes fongiques rencontrés : le séquençage ITS et 26/28S pour la plupart d'espèces ; factor d'élongation- $\alpha$  ou RPB2 pour *Fusarium* spp.,  $\beta$ -tubuline et/ou calmoduline pour *Aspergillus* spp. ou IGS pour *Trichosporon* spp. et *Cryptococcus* spp, actine pour *Clavispora lusitaniae* et *Debaryomyces* spp.

Les informations disponibles pour chaque isolat comprennent le site et l'année de prélèvement, le nom de la ville/hôpital, les valeurs de CMI (EUCAST), l'espèce identifiée au CNRMA, la(es) séquence(s) utilisées pour l'identification, et éventuellement, les données de génotypage et/ou présence/absence de mutations (résistance aux antifongiques). La base contient actuellement 1860 séquences (ITS, 26S, IGS, actine, FKS) pour 1698 souches de levures et 1952 séquences (18S, 28S, ITS, calmoduline, actine,  $\beta$ -tubuline, EF1- $\alpha$ , RPB1, RPB2, CYP51A) pour 934 souches de champignons filamenteux. La base de données est implémentée régulièrement avec les nouvelles données disponibles.

Les curateurs de IP FungiBank sont Marie Desnos-Ollivier pour les levures et Dea Garcia-Hermoso pour les champignons filamenteux.

### Collection de sérums

Les sérums adressés au CNRMA pour la réalisation des sérologies de mycoses exotiques sont conservés pendant au minimum 3 ans à -20°C. Ils ne sont pas mis à disposition. La collection d'échantillons biologiques humains a été déclarée au ministère de la recherche (Collection n°12, déclaration DC-2008-68 renouvelée en 2014).

Les bases de données du CNR sont déclarées à la Commission Nationale sur l'Informatique et les Libertés (Loi CNIL n°78-17 du 06 janvier 1978) sous la référence N°903395 et au comité de recherche clinique de l'Institut Pasteur sous le numéro 2009-34/IRB. Les collections d'échantillons biologiques du CNRMA sont déclarées sous le numéro DC-2008-68 collection 12.

## **1.5. Démarche qualité du laboratoire**

Le CNRMA fait partie des Centres Nationaux de Référence placés sous la responsabilité de l'Institut Pasteur qui sont au nombre de 14. Ils sont organisés en multisite et constituent, avec la Cellule d'Intervention Biologique d'Urgence (CIBU), le Laboratoire de Référence et d'Expertise Multisite (LREMS). Le LREMS est sous démarche d'accréditation. Le CNRMA a été accrédité selon la **norme NF EN ISO 15189** en mars 2015. La portée d'accréditation est visible [sur le site du COFRAC](#)

(<https://www.cofrac.fr/annexes/sect8/8-2588.pdf>).

Cette accréditation répond à l'ordonnance du 13 janvier 2010 et à la loi du 31 mai 2013 relative aux activités de biologie médicale.

Le projet d'accréditation ISO 15189 de l'Institut Pasteur est une démarche dynamique pilotée par :

- la Direction aux Ressources Techniques et à l'Environnement et son Service Qualité, Environnement et Développement Durable (QEDD) qui apporte ses ressources et son expertise dans l'accompagnement du projet d'accréditation ISO 15189 du LREMS (certifié ISO 9001 v 2015)
- la Direction des Affaires médicales et de Santé Publique ;
- et la Coordination des Centres Nationaux de Référence de l'Institut Pasteur.

Les services supports de l'Institut Pasteur participent également à la démarche d'accréditation du LREMS en apportant les ressources nécessaires au bon déroulement des activités.

Douze CNR et la CIBU du LREMS sont accrédités COFRAC selon la norme ISO 15189 version 2012 sous le n° 8-2588. L'annexe d'accréditation est disponible sur le site du COFRAC [www.cofrac.fr](http://www.cofrac.fr)

Les 2 autres CNR ont déposé leur demande d'extension le 1<sup>er</sup> avril 2016. Leur audit d'extension s'est déroulé du 23 au 25 janvier 2018 et la confiance des évaluateurs a été accordée à ces CNR. Les conclusions officielles de l'évaluation doivent être communiquées au LREMS et publiées sur le site du COFRAC prochainement.

L'ensemble des CNR participent annuellement à des contrôles externes de la qualité. Ceux-ci n'étant pas des programmes pérennes, lorsque ces CQE sont suspendus ou ne sont pas organisés annuellement, les CNR organisent des essais inter laboratoires avec des laboratoires homologues ou confrères européens ou mondiaux.

Étapes clés de l'année 2017	Périodes de réalisation
Audit de surveillance S5	16 au 20 janvier 2017
Revue qualité	7 janvier 2017
Revue de direction LREMS et ajustement de la demande d'extension	16 mai 2017
Audit interne qualité	5 octobre 2017
Audit interne technique	24 juillet 2017

Perspectives pour l'année 2018	Prévision de réalisation
Audit de surveillance ET d'extension	23-25 janvier 2018
Revue qualité LREMS	Janvier-avril 2018
Audits internes qualité et technique	Mai -juillet et septembre - novembre 2018
Revue de direction LREMS	16 mai 2018
Groupe de Travail MALDI TOF – Validation de méthode	Juin ou octobre 2018
Portée d'accréditation complète	Octobre 2020

## **Annexe 2 : Capacités techniques du CNR**

### **2.1. Liste des techniques de référence**

#### Techniques pour le diagnostic, l'identification et l'évaluation de la sensibilité aux antifongiques

- ✓ Identification phénotypique complète des levures et des champignons filamenteux avec profils protéiques par spectrométrie de masse, fermentation de certains sucres, croissance sur milieux spéciaux, réalisation de cultures "3 points", de cultures sur lames, détermination des vitesses et des températures maximales de croissance ...
- ✓ Détermination de la sensibilité aux antifongiques par une technique en milieu liquide standardisée par le comité européen (EUCAST)<sup>32,33</sup>. Les antifongiques testés sont le fluconazole (Triflucan®), l'itraconazole (Sporanox®), la 5-fluorocytosine (Ancotil®), l'amphotéricine B (Fungizone®), le voriconazole (V-fend®), le posaconazole (Noxafil®), l'isavuconazole (Cresemba®), la terbinafine (Lamisil®), la caspofungine (Cancidas®), la micafungine (Mycamine®) et l'anidulafungine (non commercialisée en France).
- ✓ Identification des isolats d'espèces communes de champignons par MALDI-TOF
- ✓ Extraction d'ADN pour les levures et les champignons filamenteux selon des protocoles optimisés.
- ✓ Séquençage nucléotidique des régions ITS et de la région variable de la grande sous-unité 28S de l'ADN ribosomique pour l'identification moléculaire de tous les champignons, et, pour certaines espèces, séquençage d'autres loci (voir plus loin).
- ✓ Identification de *Candida dubliniensis* par PCR duplex en utilisant les amorces spécifiques d'une partie du gène de l'actine<sup>34</sup> et les amorces universelles ITS1/ITS4 (**technique accréditée COFRAC selon la norme 15189**).
- ✓ Diagnostic anatomopathologique / immuno-histochimie
- ✓ Diagnostic moléculaire sur tissus/échantillons frais, congelés ou fixés
- ✓ Détection des mutations dans le gène *Cyp51A* pour les isolats d'*Aspergillus fumigatus* résistants aux antifongiques azolés<sup>35</sup>
- ✓ Détection des mutations dans les gènes *Fks* pour les isolats de *Candida albicans*, *C. glabrata*, *C. tropicalis*, *C. krusei*, *C. lusitaniae*, *C. dubliniensis*, *C. kefyr* ayant des profils de sensibilité anormaux pour les échinocandines.

#### Techniques mises en place en 2017

- Ajout de nouvelles cibles pour l'identification de diverses espèces de levures et de champignons filamenteux
- PCR en temps réel permettant l'identification en urgence de *Candida auris*

### **2.2. Liste des marqueurs épidémiologiques disponibles**

- Pour *C. albicans*, 5 séquences microsatellites (CDC3, HIS3, EF3, STPK, CDR1)<sup>36,37</sup>, et les 7 loci MLST (AAT1a, ACC1, ADP1, MPIb, SYA1, VPS13, ZWF1)<sup>38</sup>

<sup>32</sup> EUCAST Definitive Document EDef 7.1: method for the determination of broth dilution MICs of antifungal agents for fermentative yeasts. Clin Microbiol Infect. 2008; 14:398-405.

<sup>33</sup> EUCAST Technical Note on the method for the determination of broth dilution minimum inhibitory concentrations of antifungal agents for conidia-forming moulds. Clin Microbiol Infect. 2008; 14:982

<sup>34</sup> Donnelly SM, et al. Phylogenetic analysis and rapid identification of *Candida dubliniensis* based on analysis of ACT1 intron and exon sequences. Microbiology. 1999; 45:1871-1882.

<sup>35</sup> Mellado E, et al. Identification of two different 14-alpha sterol demethylase-related genes (*cyp51A* and *cyp51B*) in *Aspergillus fumigatus* and other *Aspergillus* species. J Clin Microbiol. 2001; 39:2431 (erratum p4225).

<sup>36</sup> Foulet F, et al. Microsatellite markers as a typing system for *Candida glabrata*. J Clin Microbiol. 2005; 43:4574-9.

<sup>37</sup> Stephan F, et al. Molecular diversity and routes of colonization of *Candida albicans* in a surgical intensive care unit, as studied using microsatellite markers. Clin Infect Dis. 2002; 35:1477-83.

<sup>38</sup> Bougnoux ME, et al. Collaborative consensus for optimized multilocus sequence typing of *Candida albicans*. J Clin Microbiol. 2003; 41:5265

- Pour *C. glabrata*, 5 séquences microsatellites (RPM2, MTI, ERG, Cg4, Cg6)<sup>39</sup>
- Pour *C. parapsilosis*, 3 séquences microsatellites (CP1, CP4, CP6)<sup>40</sup>
- Pour *Aspergillus fumigatus*, 4 séquences microsatellites A, B, C et D<sup>41</sup>
- Pour *C. tropicalis*, 6 loci MLST (MDR1, XYR1, SAPT4, SAPT2, ZWF1a, ICL1)<sup>42</sup>, et 2 séquences microsatellites (URA3 et CT14)<sup>43</sup>
- Pour *Cr. neoformans*, sérotypage (cytométrie en flux à l'aide d'un anticorps monoclonal anti-polyoside capsulaire<sup>44</sup> et PCR spécifiques (*Pak1* et *Gpa1*)), détermination de la ploïdie (cytométrie en flux), et typage par la technique MLST (7 loci : CAP59, URA5, LAC1, IGS1, GPD1, PLB1 et SOD1)<sup>45</sup>
- Pour *Candida krusei*, 6 loci MLST (ADE2, LYS2, HIS3, LEU2, TRP1 et MPD1)<sup>46</sup>
- Pour *Cryptococcus gattii*, 7 loci MLST (IGS1, CAP59, URA5, PLB1, GPD1, SOD1, LAC1)<sup>47</sup>
- Comparaison de souches de champignons responsables d'épidémies/cas groupés par séquençage génome entier et développement de techniques de typage / d'identification du clone épidémique éventuel

### 2.3. Liste des techniques recommandées par le CNR

Le CNRMA n'est pas en mesure de tester les réactifs commercialisés dans le domaine de la mycologie médicale. En revanche, nous pouvons insister sur la difficulté de réalisation et d'interprétation de deux types de techniques :

#### Identification des champignons

Nous nous sommes attachés depuis plusieurs années à améliorer l'identification phénotypique des champignons (ajout de nouveaux milieux, amélioration des images numériques, développement des cultures sur lame). Cette étape phénotypique est primordiale pour éviter les erreurs d'attribution de séquences déposées dans les banques publiques (on estime à au moins 20% les erreurs d'identification dans GenBank, et probablement plus pour les germes rares comme les champignons filamenteux). De plus, en raison des ambiguïtés non levées par les séquences ITS et 28S de l'ADNr généralement utilisées en taxonomie, nous avons multiplié, selon les genres étudiés, les gènes cibles et les amorces pour une identification moléculaire polygénique.

Le **Tableau 17** récapitule les principales cibles utilisées et les références correspondantes, sachant que certains genres nécessitent une analyse multigénique. Il faut aussi savoir que les changements taxonomiques rendent parfois difficiles les identifications. Il peut être utile pour suivre ces changements de se référer par exemple au site Index Fungorum (<http://www.indexfungorum.org>). La base de données est consultable gratuitement en ligne et fournit la liste des espèces dans chaque genre, avec pour chacune d'elle le taxon correct, la citation d'auteur, la date et le support de publication, voire une image de celui-ci, ainsi qu'un rappel de la position de l'espèce dans la classification traditionnelle.

<sup>39</sup> Foulet F, et al. Microsatellite marker analysis as a typing system for *Candida glabrata*. J Clin Microbiol. 2005;43:4574

<sup>40</sup> Irinyi L, et al. ISHAM-ITS reference DNA barcoding database - the quality controlled standard tool for routine identification of human and animal pathogenic fungi. Med Mycol.

<sup>41</sup> Bart-Delabesse E, et al. Microsatellite markers for typing *Aspergillus fumigatus* isolates. J Clin Microbiol 1998;36:2413

<sup>42</sup> Tavanti A, et al. Multilocus sequence typing for differentiation of strains of *Candida tropicalis*. J Clin Microbiol. 2005; 43: 5593-600.

<sup>43</sup> Desnos-Ollivier M, et al. Clonal population of flucytosine-resistant *Candida tropicalis* from blood cultures, Paris, France. Emerg Infect Dis. 2008; 14:557

<sup>44</sup> Dromer F, et al. Serotyping of *Cryptococcus neoformans* by using a monoclonal antibody specific for capsular polysaccharide. J Clin Microbiol. 1993; 31:359.

<sup>45</sup> Meyer W, et al. Consensus multi-locus sequence typing scheme for *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii*. Med Mycol. 2009; 47:561

<sup>46</sup> Jacobsen MD, et al. Strain Typing and Determination of Population Structure of *Candida krusei* by Multilocus Sequence Typing. J Clin Microbiol. 2007; 45:317

<sup>47</sup> Hagen F, et al. Autochthonous and dormant *Cryptococcus gattii* infections in Europe. Emerging Infect Dis. 2012; 10:1618

**Tableau 17 : Liste des couples d'amorces utilisés en fonction des genres étudiés**  
(en plus des régions ITS)

Espèce	Gène	Amorces
Complexe d'espèces <i>A. fumigatus</i>	$\beta$ -tubuline	Btub1F/ Btub2R <sup>48</sup>
Complexe d'espèces <i>Fusarium spp</i>	Factor d'élongation (TEF1- $\alpha$ )	EF1 / EF2 <sup>49</sup>
	RNA polymérase II (RPB2)	5F2/ 7CR <sup>50</sup>
Complexe d'espèces <i>Pseudallescheria / Scedosporium</i>	$\beta$ -tubuline	TUB-F/ TUB-R <sup>51</sup>
<i>Phaeoacremonium spp</i>	$\beta$ -tubuline	T1 /Bt2b <sup>52</sup>
Coelomycètes	$\beta$ -tubuline	TUB2-F / TUB4-R <sup>53</sup>
<i>Trichosporon spp.</i>	IGS1 / ADNr	26SF/5SR <sup>30</sup>
<i>Debaryomyces spp.</i>	actine	CA21/CA15R <sup>31</sup>
<i>Clavispora lusitaniae</i>	actine	CA16mod/CA5 <sup>54</sup>

### Diagnostic des mycoses endémiques

**La sérologie par électro-synérèse a définitivement été abandonnée par le CNRMA en raison de ses mauvaises performances.** Il s'agissait d'une technique "maison" utilisant des réactifs (antigènes et sérums de référence) commercialisés qui sont de qualité inconstante, obligeant à des mises au point répétées lors des changements de lot. Par ailleurs, la reproductibilité des résultats, indépendamment de ces problèmes de réactifs, est très mauvaise. La contribution de la sérologie au diagnostic des mycoses exotiques est très faible. Ainsi, sur les 3500 sérologies enregistrées dans la base de données du CNRMA en 9 ans, moins de 8% étaient positives, mais avec de grandes différences en fonction du contexte clinique (<4% de positivité de la sérologie histoplasme chez les patients VIH positif vs. 14% chez les sujets séronégatifs pour le VIH par exemple). C'est donc beaucoup plus le contexte épidémiologique et clinique ainsi que les examens mycologiques (examen direct, histologie, culture et détection du galactomannane) qui ont permis dans le passé d'établir le diagnostic.

**La PCR quantitative pour le diagnostic des mycoses endémique se fait sur échantillons frais ou fixés en routine au CNRMA / site Saint-Louis.** La technique permet la recherche sur le sang ou la moelle (tube EDTA rempli au maximum). Des lésions cutanées ou des ulcérations buccales peuvent être prélevées par écouvillonnage, les écouvillons secs ou dans un milieu de préservation peuvent être alors envoyés. Tout échantillon doit être envoyé à 4°C accompagné d'un mail à [cnrma@pasteur.fr](mailto:cnrma@pasteur.fr) ou d'une fiche de demande d'expertise au site SLS du CNRMA

Dr. A. Alanio/Pr. B. Bretagne.  
Laboratoire de Parasitologie- Mycologie  
Plot B, 1er étage  
Hôpital Saint-Louis  
1 avenue Claude Vellefaux  
75475 Paris Cedex 10

<sup>48</sup> Balajee S, et al. *Aspergillus lentulus* sp. nov., a new sibling species of *A. fumigatus*. Eukaryot Cell. 2005; 4:625-32.

<sup>49</sup> O'Donnell K. et al. Phylogenetic diversity and microsphere array-based genotyping of human pathogenic *Fusaria*, including isolates from the multistate contact lens-associated U.S. keratitis outbreaks of 2005 and 2006. J Clin Microbiol. 2007; 45:2235-48.

<sup>50</sup> O'Donnell K, Cigelnik E. Two divergent intragenomic rDNA ITS2 types within a monophyletic lineage of the fungus *Fusarium* are nonorthologous. Mol Phylogenet Evol. 1997; 7:103-16.

<sup>51</sup> Cruse M, et al. Cryptic species in *Stachybotrys chartarum*. Mycologia. 2002; 94:814-22.

<sup>52</sup> Mostert L, et al. Species of *Phaeoacremonium* associated with infections in humans and environmental reservoirs in infected woody plants. J Clin Microbiol. 2005; 43:1752-67.

<sup>53</sup> Aveskamp MM, et al. DNA phylogeny reveals polyphyly of *Phoma* section *Peyronellaea* and multiple taxonomic novelties. Mycologia. 2009; 101:363-82.

<sup>54</sup> Guzman et al. Phylogenetic analysis of the angiosperm-floricolous insect-yeast association: Have yeast and angiosperm lineages co-diversified? *Molecular Phylogenetics and Evolution* 68 (2013) 161–175

### Détermination de la sensibilité aux antifongiques des isolats de champignons pathogènes

La réalisation et l'interprétation des techniques disponibles ne sont pas évidentes. En effet, les techniques standardisées en Europe (EUCAST) ou aux Etats-Unis (CLSI) ne sont pas commercialisées et sont de réalisation difficile en routine. La majorité des techniques commercialisées n'a pas été validée par rapport aux techniques de référence, et le CNRMA ne peut donc qu'encourager les centres à utiliser des techniques standardisées et validées, telles les bandelettes E-test. Cependant, la réalisation pratique demande une certaine habitude (en particulier dans la préparation de l'inoculum, et pour les champignons filamenteux) et la lecture des résultats n'est pas toujours simple, rendant compte des différences de résultats en fonction du lecteur, voire du technicien. De plus, l'interprétation des résultats est difficile car les seuils de sensibilité et de résistance publiés ne s'appliquent qu'à certaines espèces et certains antifongiques et ne sont valables que pour des isolats testés avec l'une ou l'autre des techniques de référence (l'interprétation étant différente pour chacune de ces techniques). En pratique, un laboratoire utilisant les bandelettes E-test ne devrait donc pas rendre un résultat S ou R, mais seulement interpréter le résultat comme conforme ou aberrant (> 2 dilutions en log<sub>2</sub>) par rapport à la base de données dont il dispose pour les isolats de la même espèce testés dans les mêmes conditions localement.

La meilleure solution est toujours de bien identifier l'espèce, car les CMI des isolats sauvages d'une espèce donnée ont une distribution particulière à l'espèce (Tableau 11 Tableau 13 Tableau 12 Tableau 14). Il faut donc considérer qu'en l'absence de pression antifongique, les isolats d'une même espèce ont un profil sauvage et qu'il est donc, par exemple, inutile de tester une souche de *Candida albicans*, même isolée d'une hémoculture, s'il n'y pas eu de pré-exposition à un antifongique. **L'alternative en cas d'espèce rare ou de pression antifongique antérieure, est d'envoyer l'isolat responsable de mycose invasive au CNRMA accompagné d'une justification de la demande** (fiche de demande d'expertise).

### Désinfection des surfaces

La question de l'efficacité du nouvel ANIOS SURFA'SAFE Premium s'est posée pour les champignons que nous recevons et nous avons donc testé les temps de contact efficaces sur quelques espèces fréquemment manipulées au CNR. Les espèces choisies représentent un panel représentatif en termes de classe de risque (1, 2 et 3) et de fréquence de manipulation au CNRMA :

- Pour les principales espèces de levures manipulées au CNRMA, on n'observe aucune croissance résiduelle après un temps de contact inférieur ou égal à 5 minutes.
- Pour les principales espèces de filamenteux manipulées au CNRMA, on observe une croissance résiduelle inférieure à 1% après un temps de contact inférieur ou égal à 15 minutes.
- Pour les champignons de classe 3, un temps de contact de 30 minutes, le produit pulvérisé directement sur la culture de l'agent pathogène fongique de classe 3 (*Histoplasma capsulatum*, *Coccidioides immitis*, *Talaromyces marneffeï*) de façon à recouvrir entièrement la culture est préconisé pour une décontamination totale. A noter pour l'espèce *Cladophialophora bantiana* un temps de contact de 24h est préconisé pour une décontamination totale.

En conclusion, nous préconisons un temps de contact d'au moins 30 min, prolongé sur 24 h pour *Cladophialophora bantiana*.