Rapport annuel d'activité 115 Centre national de référence **Mycoses Invasives et** Antifongiques Responsables Année Pr. Françoise Dromer Pr. Stéphane Bretagne, adjoint d'exercice Pr. Olivier Lortholary, adjoint Collaborateurs M. Alexandre Alanio, médecin mycologue Mme Anne Boullié, technicienne Mme Reine Bouyssié, secrétaire **Mme Marie Desnos-Ollivier, ingénieur** Dea Garcia-Hermoso, ingénieur M. Damien Hoinard, technicien Dr. Charlotte Renaudat, biostatisticienne Dr. Karine Sitbon, médecin d'études cliniques



R	ésumé a	nalytique	5
1	Missic	ons et organisation du CNR	6
2	Activi	tés d'expertise	6
	2.1 Év	olutions des techniques au cours de l'année 2014	6
	2.2 A c	tivités d'expertise de l'année 2014	6
	2.2.1	Expertise 2014 sur les levures	7
	2.2.2	Expertise 2014 sur les champignons filamenteux	9
	2.2.3	Expertise 2014 sur la sensibilité aux antifongiques	. 13
	2.2.4	Expertise 2014 sur les mycoses endémiques	. 13
	2.2.5	Expertise 2014 en anatomopathologie	. 14
3		tés de surveillance	
		rveillance de l'évolution et des caractéristiques des infections	
	3.1.1	Surveillance de la cryptococcose :	
	3.1.2	Observatoire des Levures :	
	3.1.3	RESeau de Surveillance des Infections Fongiques invasives en France (ReSSIF)	
		a spergilloses invasives	
		pneumocystoses	
		s mucormycoses	
	Les	fusarioses	. 27
	3.2 Su	rveillance de la résistance des agents pathogènes aux anti-infectieux	
	3.2.1	Définition de l'échantillon de souches testées	
	3.2.2	Définitions utilisées pour exprimer la résistance	
	3.2.3	Résultats de la surveillance des résistances aux antifongiques pour les levures	
	3.2.4	Résultats de la surveillance des résistances aux antifongiques pour les filamenteux	
	3.2.5	Analyse des tendances	
	3.3 Pa	rticipation aux réseaux de surveillance internationaux, en particulier européens	. 34
4	Alerte)	34
		fections à Saprochaete clavata	
	4.2 F o	ongémies à Trichosporon asahii	. 34
5	Activi	tés d'information, de formation et de conseil	35
	5.1 En	seignements et formation	. 35
		odalités de diffusion des données de surveillance et production du CNRMA	
		tivité de conseil aux professionnels	
		tivité d'expertise	
		plan national	
	Au	plan international	. 36
6		ux de recherche et publications en lien direct avec l'activité du CNR	
	6.1 In	fections à Pneumocystis jirovecii	
	6.1.1	Recommandations internationales	
	6.1.2	Améliorations diagnostiques	
	6.1.3	Génotypage	
		agnostic des infections fongiques	. 39
	6.2.1	Recommandations internationales de diagnostic, prévention ou de traitement des	
		tions fongiques invasives	
	6.2.2	Améliorations diagnostiques	
		orticipation aux groupes de travail internationaux sur le "barcoding of fungi" et créations de democratique de	
		ase de données de séquences	
		ise en place d'une base de données de séquences Institut Pasteur FungiBank nalyse de l'incidence des mycoses invasives grâce à la base PMSI	
	U.J AI	iaryse de i ilicidence des mycoses mivasives grace a la base Pivisi	. +∠

	6.6	Analyse des candidémies en réanimation dans 24 hôpitaux d'Ile-de-France	
	6.7	Etude du délai de positivité des hémocultures au cours des fongémies	
	6.8	Mucormycoses post-traumatiques	
	6.9	Champignons émergents d'importation ou désormais autochtones	
	6.10	•	
		Invitations dans des congrès internationaux	
		Congrès nationaux	
		Publications nationales	
		Publications internationales	
		Chapitre de livres ou publications autres	49
7	Co	opération avec les laboratoires de santé animale, d'hygiène alimentaire,	
eı	nviro	nnementaux	49
8	Pro	ogramme d'activité pour les années suivantes	49
9	۸.	nexe 1 : Missions & organisation du CNR	ΕO
9			
	9.1	Rappel des missions et objectifs majeurs du CNR et des laboratoires associés	
	9.2	Fournir une description détaillée de l'équipe :	
	9.3	Description détaillée des locaux et de l'équipement	
	9.4	Description de la démarche qualité du laboratoire :	52
1() A	nnexe 2 : Capacités techniques du CNR	53
	10.1	Liste des techniques de référence: diagnostic/identification, typage, évaluation de la	
	sens	ibilité aux anti-infectieux :	53
		Techniques disponibles	53
		Techniques mises en place en 2013	
	10.2		
	10.3	, 0	
		Collections de levures	
		Collection de champignons filamenteux	
		Collection d'images numériques	
		Collection d'ADN génomique	
	40.4	Collection de sérums	
	10.4	,,,,,, -	•
	reco	mmandées par le CNR	
		Identification des champignons :	
		Sérologie des mycoses exotiques (électrosynérèse)	
	10.5		
		·	
1:	L A	nnexe 3 : Liste des collaborateurs du CNRMA	59
	Liste	des CC-CNRMA formant RESSIF	59
	Men	nbres du réseau métropolitain	59

Liste des Figures et des Tableaux

Figure 1 : Evolution du volume d'activité d'expertise du CNRMA au cours des 3 dernières années	7
Figure 2 : Candida spp. sur milieu chromogène	
Figure 3 : Aspect macroscopique et microscopique de trois espèces de « Geotrichum »	9
Figure 4 : Aspects microscopiques d'espèces de champignons filamenteux identifiés en 2014	
Figure 5 : Aspects microscopiques de champignons filamenteux identifiés en 2014	11
Figure 6 : Aspects microscopiques de champignons filamenteux identifiés en 2014	11
Figure 7 : Aspects microscopiques de champignons filamenteux identifiés en 2014	12
Figure 8 : Aspects microscopiques de champignons filamenteux identifiés en 2014	12
Figure 9 : Photographies de coupes tissulaires de mycoses invasives	14
Figure 10 : Répartition géographique des 25 CC-CNRMA composant RESSIF	16
Figure 11 : Evolution du nombre de cas de cryptococcose en France (1985-2014)	16
Figure 12 : Proportion de patients séropositifs et de femmes selon la période de diagnostic de	
cryptococcose (1985-2014)	
Figure 13 : Distribution de Candida spp. responsables de fongémies (ODL 2002-2014)	
Figure 14 : Activité sur le serveur RESSIF (2012-2014)	20
Figure 15 : Nombre de déclarations dans chacun des CC-CNRMA	21
Figure 16 : Répartition des 3990 IFI déclarées dans RESSIF depuis 2012	21
Figure 17 : Distribution des Candida spp. au cours des fongémies (RESSIF)	22
Figure 18 : Courbes de survie après fongémie en fonction de l'espèce (RESSIF)	
Figure 19 : Répartition des facteurs de risque en fonction de l'espèce d'Aspergillus	
Figure 20 : Distribution des facteurs de risque de pneumocystose (RESSIF)	
Figure 21 : Survie après pneumocystose en fonction du facteur de risque principal (RESSIF)	
Figure 22 : Répartition des espèces de Mucorales selon le facteur de risque (RESSIF)	
Figure 23 : Courbes de survie selon l'espèce de Mucorales (RESSIF)	
Figure 24 : Répartition de Fusarium spp. en fonction de l'atteinte oculaire ou non (RESSIF)	
Figure 25 : Page d'accueil FungiBank	
Figure 26 : Organigramme fonctionnel du CNRMA	
Figure 27 : Protocole d'amplification des régions ITS utilisé au CNRMA	59
Tableau 1: Devenir des 505 patients atteints de cryptococcose (2006-2013)	
Tableau 2 : Candida sp. EUCAST Antifungal Clinical Breakpoint fungi	
Tableau 3 : Aspergillus sp. EUCAST Antifungal Clinical Breakpoints -Fungi	
Tableau 4 : Profil de sensibilité des levures aux antifongiques	
Tableau 5 : Profil de sensibilité des champignons filamenteux aux antifongiques	32
Tableau 6 : Evolution (%) de la résistance au fluconazole	
Tableau 7 : Evolution (%) de la résistance au voriconazole	
Tableau 8 : Evolution (%) des isolats avec CMI caspofungine hautes	
Tableau 9 : Composition de l'équipe du CNRMA en 2014	
Tableau 10 : Liste des couples d'amorces utilisés en fonction des genres étudiés	- 57

Résumé analytique

Les missions du CNRMA sont l'expertise et la surveillance épidémiologique et microbiologique des mycoses invasives incluant les pneumocystoses.

Le CNRMA a poursuivi les missions d'expertise et de surveillance qui lui étaient assignées auparavant, avec une augmentation sensible de son activité, et développé de nouveaux outils techniques et de surveillance. La surveillance des profils de sensibilité aux antifongiques n'a mis en évidence aucune anomalie en 2014, à l'exception de quelques isolats résistants, non groupés.

Le CNRMA a mis en place le réseau de centres collaborateurs du CNRMA (les CC-CNRMA) au nombre de 25 en 2014, qui 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. L'objectif est de pouvoir analyser les tendances en termes d'espèces impliquées, d'émergence de résistance à un ou plusieurs antifongiques, ou de nouvelles populations à risque, et aussi de calculer les incidences et de suivre les modifications au cours du temps. RESSIF a déjà permis de collecter les informations sur 3390 cas d'infections fongiques invasives, et représente une base unique au plan international.

Le CNRMA a mis en place depuis 2013, avec un renforcement net en 2014, une collaboration avec l'unité d'histopathologie humaine et modèles animaux (Pr. Fabrice Chrétien, Dr. Gregory Jouvion) de l'Institut Pasteur pour développer une expertise spécifique anatomopathologique.

Au cours de l'année 2014, le CNRMA a mis à jour son site internet (http://www.pasteur.fr/cnr/mycologie). Nous avons créé une base de séquences Institut Pasteur FungiBank qui sera accessible en 2015 à tous les mycologues français après une phase de test auprès des CC_CNRMA. Nous avons également participé ou initié des études portant sur les recommandations internationales de prise en charge diagnostique ou thérapeutique au cours d'infections fongiques invasives diverses y compris la pneumocystose, analysé les données épidémiologiques sur les fongémies à levures en Ile-de-France, participé à l'analyse des données sur les infections fongiques invasives de la base PMSI avec l'InVS et contribué à des revues de la littérature à l'occasion de cas cliniques rares.

1 Missions et organisation du CNR

Les missions et l'organisation du CNRMA sont détaillées en annexe. Les réseaux de surveillance mis en place comprennent l'Observatoire des Levures en région parisienne (ODL), et le RESeau de Surveillance des Infections Fongiques invasives (RESSIF) couvrant le territoire national. RESSIF comprend 25 laboratoires (CC-CNRMA) qui ont souhaité participer de façon active et pérenne à cette surveillance. Les isolats des espèces les plus communes (Candida albicans, C. glabrata, C. tropicalis, C. parapsilosis, et Aspergillus fumigatus) ne nous sont pas adressés sauf en cas de profil anormal de sensibilité aux antifongiques.

L'activité de conseil concerne la prise en charge diagnostique et/ou thérapeutique de patients suspects ou atteints de mycoses invasives. Tout clinicien ou microbiologiste/mycologue peut solliciter l'expertise du CNRMA.

2 Activités d'expertise

2.1 Évolutions des techniques au cours de l'année 2014

Le CNRMA continue à développer les outils d'identifications 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.

Le CNRMA utilise désormais le MALDI-TOF (matrix-assisted laser desorption/ionisation-time of flight) avec le Microflex de Bruker pour l'identification des levures Les identifications d'espèces sont systématiquement contrôlées par séquençage nucléotidiques d'au moins deux régions, dès lors qu'il s'agit d'une espèce rare ou d'identification difficile ou incertaine.

Le CNRMA a transféré vers les CC-CNRMA les paramètres d'amplification et les amorces utilisées pour l'identification moléculaire des champignons filamenteux et des levures, pour homogénéiser et permettre le transfert des chromatogrammes d'un centre vers le CNRMA. La base de données de séquences du CNRMA intitulée Institut Pasteur FungiBank a été lancée en octobre 2014 et rendue accessible aux CC-CNRMA dans une version test, avant son ouverture plus large au printemps 2015.

Le CNRMA n'a pas évalué de nouveau test commercial.

2.2 Activités d'expertise de l'année 2014

Le CNRMA a reçu, en 2014, 749 souches et 258 sérums, auxquels se sont ajoutés par le biais de la collaboration avec l'unité d'histopathologie et modèles animaux des expertises sur 43 prélèvements anatomopathologiques.

La quasi-totalité des échantillons était en provenance de France Métropolitaine (94%) ou des DOM-TOM (6%). Aucune demande ne nous est parvenue de l'étranger cette année. Toute demande d'expertise est systématiquement accompagnée d'une fiche de renseignements. 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.

Les souches proviennent majoritairement 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 (50%), d'échantillons pulmonaires (14%), cutanés (8%), liquides céphalorachidiens (5%), échantillons oculaires (7%), ORL (2%), osseux (3%) ou digestifs (4%). Des précisions sont données plus loin en fonction de l'expertise microbiologique requise.

En volume, l'activité de laboratoire du CNRMA est stable (Figure 1). Elle croît de 14% sur l'expertise filamenteux et diminue de 4% sur celles concernant les levures. Le nombre total de séquences analysées (1603 pour 447 souches –soit 40% des levures et 100% des filamenteux) est plus faible que l'an dernier grâce à une meilleure collaboration avec le prestataire (MWG Eurofins). Rappelons ici que 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 36h après réception de l'isolat. Plus de 90% des isolats identifiés sont testés pour leur sensibilité aux antifongiques dans le cadre de nos missions de surveillance de la sensibilité aux antifongiques.

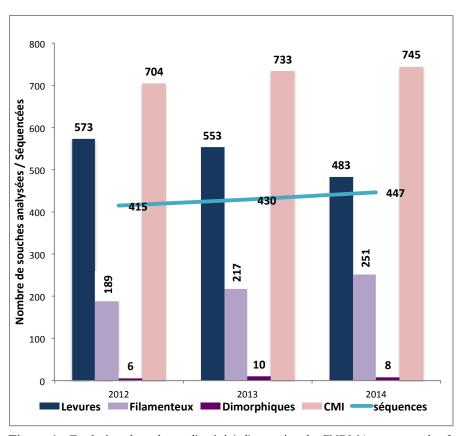


Figure 1 : Evolution du volume d'activité d'expertise du CNRMA au cours des 3 dernières années

2.2.1 Expertise 2014 sur les levures

Les levures provenaient essentiellement d'hémocultures (75%), mais aussi du système nerveux central (6%), des poumons (5%), de l'appareil digestif (5%), de la peau (1,5%), des urines (2%), de lésions ostéo-articulaires (1,7%).



Figure 2 : (A) Mélange de Candida inconspicua et Pichia kudriavzevii sur milieu chromogène; (B) aspects atypique de colonies de Candida parapsilosis sur milieu chromogène

Le niveau de caractérisation pour les 483 levures identifiées (correspondant à 27 genres et espèces différents) est celui décrit précédemment. Nous avons donc réalisé :

- ✓ une analyse phénotypique : pureté sur milieu chromogène (Figure 2), profil protéique par MALDI-TOF, et en fonction du genre ou espèce suspectés, activité uréase, température de croissance, profil d'assimilation des sucres (galeries ID32C ou CH50), 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 d'assimilation des sucres ou un profil protéique inhabituel, et pour toutes les espèces de levures moins fréquentes voire rares, soit 196 isolats avec amplification d'un ou plusieurs loci
 - o régions ITS1-5.8S-ITS2 (173 isolats)
 - o région D1D2 de la sous-unité 26S (68 isolats)
 - o amplification de la région IGS1 (24 isolats de *Trichosporon* spp.)
 - o amplification du gène codant l'actine (18 isolats de Clavispora lusitaniae)
- ✓ Un profil de sensibilité des souches aux 8 antifongiques pour 479 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 18 isolats de *C. tropicalis* résistants à la 5FC (12 souches différentes du clone)
- ✓ le séquençage des gènes *Fks* pour 7 isolats, résistants aux échinocandines ou liés épidémiologiquement à des isolats résistants.
- ✓ le séquençage des régions ITS des isolats adressés comme *Geotrichum* sp., avec identification finale *Saprochaete clavata* (n=14), *Magnusiomyces capitatus* (n=1) ou *Galactomyces candidus* (n=11). Pour les 14 isolats de *S. clavata*, l'analyse des 8 SNP permettant d'identifier le clone A (n=3) ou B (n=5) a été réalisée en urgence (i.e. <48h) (Figure 3).
- ✓ la détermination de la ploïdie et le sérotypage de 67 souches de *Cryptococcus* sp. aboutissant à la caractérisation de 66 souches de *Cr. neoformans* (46 sérotype A, 11 sérotype D, 9 AD) et 1 souche de *Cr. gattii* (1 serotype B).

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.

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 entrainent des changements de noms, y compris pour des espèces courantes. En tant que Centre de Référence, le CNRMA se doit de donner les noms taxonomiques en cours 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 (syn. Candida krusei), Kluyveromyces marxianus var marxianus (syn. Candida kefyr), nous avons identifié ou confirmé l'identification de Candida dubliniensis, Candida duobushaemulonii (syn. Candida haemulonii type II), Candida inconspicua, Candida orthopsilosis,

Candida metapsilosis, Candida pararugosa, Candida quercitrusa, Clavispora lusitaniae (syn.Candida lusitaniae), Cyberlindnera fabianii (syn Pichia fabianii), Kodamaea ohmeri (syn. Pichia ohmeri), Galactomyces candidus (syn. Geotrichum candidum), Kazachstania bovina, Kuyveromyces lactis var. lactis (Candida sphaerica), Magnusiomyces capitatus (syn. Geotrichum capitatum), Saprochaete clavata (syn. Geotrichum clavatum), Meyerozyma caribbica (Candida fermentati), Meyerozyma guilliermondii (Candida guilliermondii), Pichia norvegensis, Saccharomyces cerevisiae. Yarrowia lipolytica (syn. Candida lipolytica), Wickerhamomyces anomalus (syn. Pichia anomala, syn.Candida pelliculosa).

Et parmi les levures basidiomycètes, outre *Filobasidiella neoformans* var. *neoformans* (syn. *Cryptococcus neoformans*), *Filobasidiella neoformans* var. *bacillispora* (syn. *Cryptococcus gattii*), *Cryptococcus uniguttulatus*, *Rhodotorula mucilaginosa*, *Trichosporon asahii*. *Trichosporon dermatis*.

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

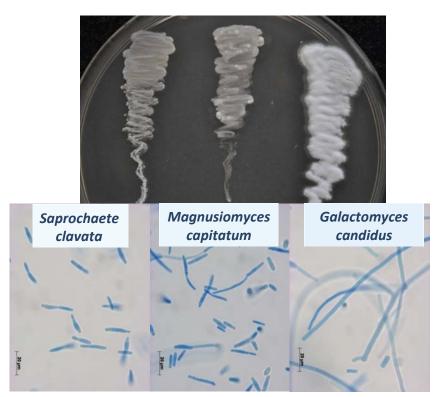


Figure 3: Aspect macroscopique et microscopique de trois espèces de « Geotrichum », facilement confondues à l'examen microscopique Saprochaete clavata (Geotrichum clavatum), Magnusiomyces capitatus (G. capitatum) et Galactomyces candidus (G. candidum)

2.2.2 Expertise 2014 sur les champignons filamenteux

Les champignons filamenteux étaient isolés essentiellement des poumons (34,6%), de la peau (19,9%), de l'œil (19,1%) de la sphère ORL (5,8%), du sang (3,9%), mais aussi des os (6,6%), du tube digestif (2,7%) ou du cerveau (2%).

Le niveau de caractérisation pour les 257 champignons filamenteux identifiés cette année (72 genres et espèces différents incluant quelques souches de champignons dimorphiques classe 3) est celui décrit plus haut. 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 (EF1alpha, RPB2, calmoduline, beta-tubuline, actine pour des filamenteux tels que les Mucorales, *Aspergillus* section *Fumigati*, *Fusarium* spp., *Phaeoacremonium* spp. et le complexe *Pseudallescheria/Scedosporium* ...), ce qui a abouti cette année à l'amplification de EF1alpha (63 isolats) RPB2 (3) betatubuline (109 isolats), calmoduline (34 isolats), actine (14 isolats) et RPB1 (40 isolats)
- ✓ La recherche des mutations CYP51A pour 6 isolats d'A. fumigatus dont 4 avaient les mutations suivantes : G54E M220I (un isolat) ; P216L (un isolat) et TR34/L98H (2 isolats).
- ✓ la détermination du profil de sensibilité à 8 antifongiques pour 204 isolats (sachant que les conditions de réalisation des CMI ne permettent pas une croissance adéquate de certaines espèces et/ou isolats).

Nous avons ainsi identifié ou confirmé l'identification :

- ✓ de plusieurs espèces d'Aspergillus : A. fumigatus, A. terreus, A flavus, A. calidoustus, A. alliaceus, A. alabamensis, A. niger, A. chevalieri, A. puniceus, A. tubingensis, A. parafelis, A. sydowii, Neosartorya hiratsukae, Neosartorya udagawae
- ✓ de plusieurs espèces de *Fusarium* appartenant aux complexes *solani*, *oxysporum*, et *dimerum*, *Gibberella fujikuroi* (Figure 4)

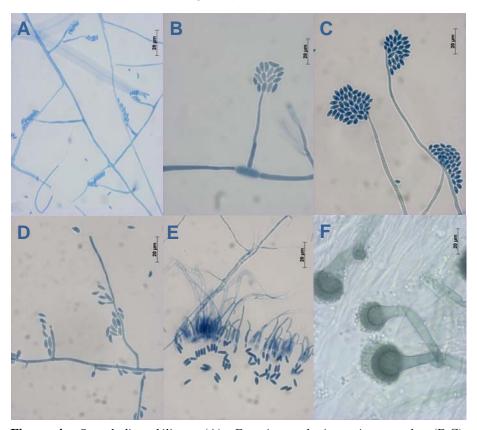


Figure 4: Sarocladium kiliense (A), Fusarium solani species complex (B,C), Fusarium dimerum species complex (D), Metarhizium anisopliae (E) et Aspergillus fumigatus (F)

✓ d'autres hyphomycètes : Arthrographis kalrae, Sarocladium kiliense (syn. Acremonium kiliense), Metarhizium anisopliae (Figure 4), Microascus cirrosus (Figure 7),

Myceliophthora thermophila, Neocosmospora pseudensiformis, Ochroconis sp., Paecilomyces dactylethromorphus, Paecilomyces variotii, Penicillium citrinum, Phialemoniopsis ocularis, Scedosporium aurantiacum, Scedosporium apiospermum, Scedosporium boydii, Scedosporium dehoogii, Lomentospora prolificans (syn. Scedosporium prolificans) (Figure 5), Sporotrichum aurantiacum, Trichoderma longibrachiatum

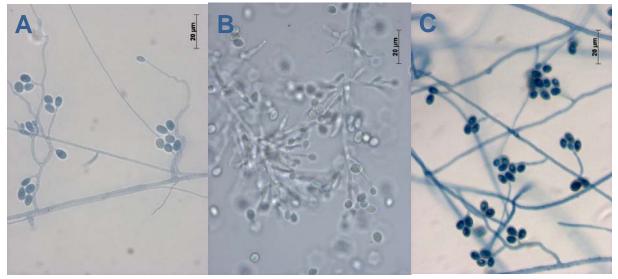


Figure 5: Scedosporium boydii (A), Lomentospora prolificans (syn. Scedosporium prolificans) (B) et Scedosporium aurantiacum (C)

✓ de dématiés : Alternaria alternata, Alternaria infectoria, Chaetomium funicola Cladosporium sphaerospermum (Figure 7), Cladophialophora bantiana (classe 3), Curvularia inaequalis, Curvularia spicifera, Exophiala dermatitidis, Exophiala oligosperma, Exophiala phaeomuriformis, Exophiala spinifera, Fonsecaea nubica, Neoscytalidium dimidiatum, Phaeoacremonium parasiticum, Phaeoacremonium sp., Radulidium subulatum, Syncephalastrum racemosum (Figure 6)

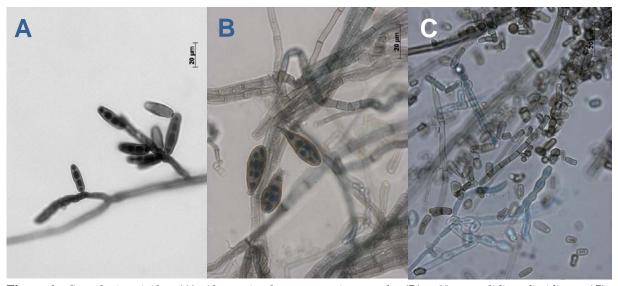


Figure 6 : Curvularia spicifera (A), Alternaria alternata species complex (B) et Neoscytalidium dimidiatum (C)

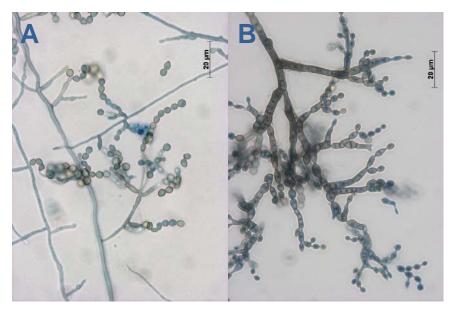


Figure 7: Microascus cirrhosus (A) et Cladosporium sphaerospermum (B)

- ✓ d'agent de mycoses endémiques : *Medicopsis romeroi* (mycétome fongique), *Conidiobolus coronatus* (conidiobolose), *Histoplasma capsulatum* (histoplasmose)
- ✓ De Mucorales : Lichtheimia corymbifera, Lichtheimia ramosa, Mucor circinelloides, Mucor indicus, Rhizomucor pusillus, Rhizopus arrhizus Rhizopus microsporus (Figure 8)

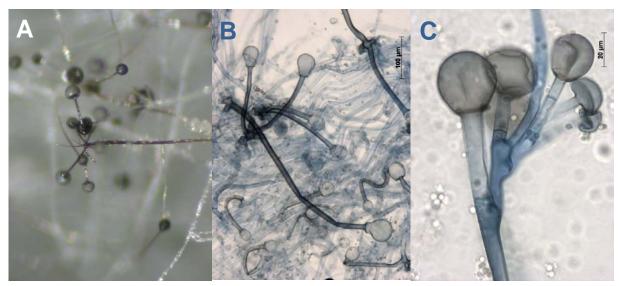


Figure 8: Rhizopus arrhizus (A), Rhizopus microsporus (B) et Rhizomucor pusillus (C)

✓ Quelques isolats de champignons filamenteux ascomycètes et basidiomycètes d'espèces non identifiables sur la morphologie et pour lesquels les séquences disponibles ne permettent pas encore d'identification.

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

2.2.3 Expertise 2014 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 (breakpoint) 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 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, 685 isolats ont été testés en 2014 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) (§3.1.2), 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 de la moindre sensibilité à un antifongique décelée en routine et pour recherche d'une éventuelle mutation dans les gènes cibles. Ainsi, nous avons fait le séquençage des gènes *Fks* pour des isolats de levures résistants aux échinocandines (2 *C. glabrata*, 2 *C.tropicalis*) avec découverte d'une mutation inconnue pour les souches de *C. glabrata*: délétion F658 dans la région HS1 du gène *Fks2* ainsi qu'une mutation non-sens (W1388stop) dans la région HS2 entrainant sans doute la production d'une protéine raccourcie et peut-être une perte de fonction. Nous avons également recherché une mutation dans le gène *Cyp51A* pour des isolats d'*A. fumigatus* résistants aux antifongiques azolés.

2.2.4 Expertise 2014 sur les mycoses endémiques

L'expertise concernant les mycoses endémiques relève davantage des conseils sur la démarche diagnostique ou/et thérapeutique. Le CNRMA a été sollicité deux fois cette année pour explorer des expositions accidentelles groupées à des champignons dimorphiques (classe 3). Ce sont les seuls cas où le CNRMA réalise des sérologies de mycoses exotiques.

Dans un cas, il s'agissait de la potentielle contamination de 126 sujets (techniciens, personnel de ménage, biologistes, internes) potentiellement exposés à une culture de *Coccidioides immitis* (culture de LBA d'un patient transplanté sans antécédent de voyage et ayant développé une coccidioidomycose à partir de l'organe transplanté provenant d'un donneur ayant récemment voyagé au Pérou). Les déclarations ont été faites au service de médecine du travail et aucune séroconversion n'a été détectée. En parallèle, l'Agence de Biomédecine a pris en charge la recherche d'une transmission aux autres receveurs et nous a fait parvenir les sérums qui étaient tous négatifs alors même que certaines infections ont pu être prouvées. Le CNRMA a été sollicité pour la conduite à tenir dans le cadre hospitalier où s'est produite la potentielle contamination de laboratoire et pour la prise en charge des autres receveurs.

Dans l'autre cas, il s'agissait de possibles cas groupés d'histoplasmose en Nouvelle Calédonie après visite d'un lieu contaminé par des fientes d'hirondelles. Après analyse de sérums de 8 sujets prélevés au moment de la potentielle exposition et plusieurs mois plus tard, seul l'un d'entre eux était positif avec un arc M d'emblée signant une exposition antérieure à des antigènes d'*Histoplasma capsulatum*.

2.2.5 Expertise 2014 en anatomopathologie

Les demandes d'expertise mycologique en histopathologie arrivent maintenant directement dans l'unité d'histopathologie humaine et modèles animaux (HHMA) de l'Institut Pasteur dirigée par le Pr. Fabrice Chrétien (PU-PH, Hôpital Sainte Anne, Paris). Une réunion est programmée chaque semaine pour une confrontation des expertises anatomopathologiques et mycologiques (HHMA-CNRMA) sur ces dossiers. Les demandes concernent des patients pour lesquels le diagnostic de mycose a été évoqué ou posé (culture positive ou non). Les informations cliniques sont récupérées, et 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 du Dr. Gregory Jouvion (HHMA) (Figure 9).

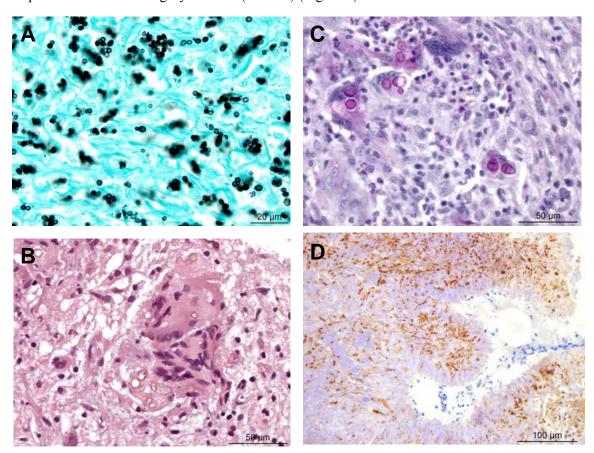


Figure 9 : (A) Histoplasmose ganglionnaire (coloration Gomori Grocott) ; (B) Phaeohyphomycose cutanée (coloration HES) ; (C) Alternariose cutanée (D) Aspergillose pulmonaire (immunohistochimie avec un sérum anti-Aspergillus fumigatus

En 2014, les demandes provenaient à part à peu près égale d'hôpitaux de l'AP-HP ou de centres hospitaliers en province. Quarante-trois dossiers ont été ainsi discutés, aboutissant à un diagnostic de certitude (44%) ou de présomption (26%). Dans 30% des 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.

3 Activités de surveillance

3.1 Surveillance de l'évolution et des caractéristiques des infections

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

Le réseau des partenaires est constitué de trois façons :

- L'un ancien, RESOMYC (surveillance semi-passive) comprend des microbiologistes / mycologues et cliniciens qui, soit connaissent les missions du CNRMA et souhaitent y contribuer, soit sont sollicités pour déclarer l'infection invasive pour laquelle ils ont cherché l'expertise mycologique ou clinique présente au CNRMA. La surveillance de la cryptococcose (depuis 1985), et celle des mycoses exotiques ou rares (depuis 2002) sont effectuées ainsi. Le CNRMA n'a aucun moyen de connaître l'exhaustivité des données à moins d'utiliser d'autres sources de données. Deux études des performances de notre système de surveillance, l'une en 1996 sur les cryptococcoses¹, l'autre plus récemment en 2010 sur les mucormycoses², les deux en collaboration avec l'InVS, ont établi à 50% environ l'exhaustivité de cette surveillance semi-passive. RESOMYC comprend plus de 200 centres qui ont déclaré au moins un épisode de mycose invasive au CNRMA, et ce sur tout le territoire métropolitain et les DOM-TOM (Antilles, Guyane, La Réunion, Nouvelle Calédonie, Mayotte, Tahiti) depuis 10 ans.
- Le deuxième réseau, mis en place en 2002, est l'Observatoire des Levures (ODL) qui 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 récentes font que l'ODL fonctionne actuellement (année 13) avec 15 centres actifs.
- Le troisième réseau est récent. Il a été mis en place en 2012 à l'occasion du renouvellement du mandat du CNRMA et de l'extension de ses missions. C'est le RESeau de Surveillance des Infections Fongiques invasives (RESSIF). Il comprenait, en 2012, 13 centres collaborateurs du CNRMA (CC-CNRMA). Depuis le 1^{er} janvier 2013, après un appel à volontaires parmi tous les correspondants hospitaliers du CNRMA pour le renforcer et améliorer la couverture nationale, RESSIF compte actuellement 25 CC-CCNRMA (Figure 10). 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.

Ces trois réseaux s'appuient en première ligne sur les mycologues/microbiologistes avec des correspondants cliniciens dans chaque service concerné. Les questionnaires standardisés ont été édités grâce au logiciel Voozanoo et sont accessibles au travers d'un site sécurisé hébergé par l'Institut Pasteur (https://epidemio.pasteur.fr/ressif). Les correspondants ont un code d'accès personnel qui leur permet de voir, éditer, analyser et récupérer leurs données. Le site de déclaration en ligne a obtenu l'autorisation de la Commission Nationale de l'Informatique et des Libertés (CNIL).

Aucune des infections fongiques invasives n'est surveillée par l'InVS. 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.

¹ Dromer F, et al. Epidemiology of cryptococcosis in France: a 9-year survey (1985-1993). Clin. Infect. Dis. 1996; 23:82–90.

² Bitar D, *et al.* Estimating the burden of mucormycosis infections in France (2005-2007) through a capture-recapture method on laboratory and administrative data. Rev Epidemiol Santé Publique. 2012; 60:383-7.



Figure 10 : Répartition géographique des 25 CC-CNRMA composant RESSIF

3.1.1 Surveillance de la cryptococcose :

La surveillance de la cryptococcose a débuté en 1985. A ce jour (01/03/2015), 3090 cas de cryptococcoses ont été enregistrés dans la base RESOMYC. Le réseau des correspondants comprend 195 centres qui ont déclaré entre 1 et 211 cas depuis 1985 (63 centres ont déclaré entre 1 et 7 cas en 2013). Le nombre de cas diagnostiqués et notifiés au CNRMA est stable depuis plusieurs années, aux alentours de 70/an avec davantage de patients séronégatifs que de patients séropositifs (Figure 11).

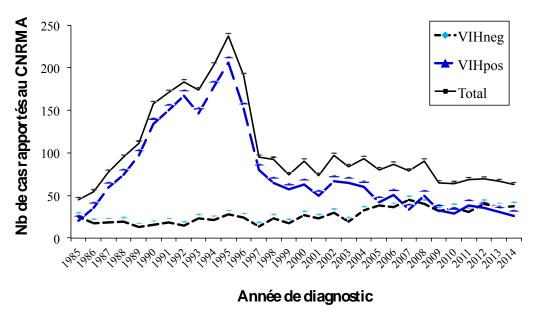


Figure 11 : Evolution du nombre de cas de cryptococcose en France. Tous les cas notifiés au CNRMA depuis 1985 sont représentés en fonction du statut VIH du patient (bilan au 1er mars 2015)

Le nombre de cryptococcoses diagnostiquées chez les sujets séronégatifs pour le VIH a tendance à augmenter depuis 2005 sans qu'on n'ait encore trouvé une explication, avec une augmentation concomitante de la proportion de femmes (Figure 12, p<0,001).

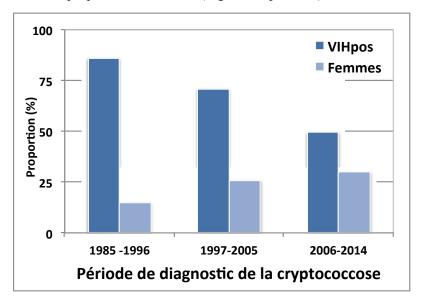


Figure 12 : Evolution de la proportion de patients séropositifs pour le VIH et de celle des femmes parmi les patients pour lesquels le diagnostic de cryptococcose a été établi en France, 1985-2014

En 2014, 63 cas de cryptococcose ont été notifiés au CNRMA dont 37 chez des patients séronégatifs pour le VIH (32% de femmes) et 26 chez des patients séropositifs (35% de femmes).

Si l'on considère l'ensemble des données depuis 1985, on constate que la proportion de sujets originaires d'Afrique est double chez les patients séropositifs par rapport aux patients séronégatifs (25% vs. 13%, p<0,001), et que c'est encore plus vrai depuis l'introduction des anti-rétroviraux hautement actifs (39% vs. 13%, p<0,001). Chez les 841 sujets séronégatifs pour le VIH, la répartition est depuis 1985 : pathologies malignes (35,8%), transplantation d'organes solides (17,8%), autres pathologies ou traitements (26,4%) et pas de facteur de risque identifié (20,1%).

Sur le plan mycologique, une fongémie est retrouvée dans 51% des cas chez les patients séronégatifs et dans 70% des cas chez les patients séropositifs (p<0,001), mais les hémocultures ne sont faites que dans 52% des cas malgré leur valeur pronostique. Une méningoencéphalite est présente chez 75,5% et 88,3% des sujets séronégatifs et séropositifs, respectivement (p<0,001), mais elle n'est pas recherchée chez plus de 37% des patients séronégatifs et près de 16% des patients séropositifs.

Nous ne pouvons ici que regretter que ces bilans d'extension ne soient pas systématiquement réalisés pour une meilleure prise en charge des patients (stratégie antifongique et prise en compte de l'hyperpression d'ouverture du LCR). Rappelons que le pourcentage de décès dans les 3 mois suivant le diagnostic de cryptococcose est encore de 23,5% selon les données de surveillance en France, chiffre qui ne change pas depuis plus de 15 ans. De plus, dans la période 2006-2013, l'évolution était significativement moins bonne chez les patients séronégatifs que chez les patients séropositifs (p = 0,013) (Tableau 1). Dans cette même période, 48% des patients séronégatifs et 66% des patients séropositifs étaient traités par l'association amphotéricine B et 5 fluorocytosine, préconisée cependant pour les cryptococcoses sévères.

Tableau 1: Devenir des 505 patients ayant eu un diagnostic de cryptococcose entre 2006 et 2013 en France (Chi2 p = 0.006)

Evolution à 3 mois	Séronégatif (n = 256)	Séropositif (n=249)
Vivant	70,3%	81,9%
Décès précoce (< 15 jours)	19,5%	10,4%
Décès tardif (15j-3 mois)	10,2%	7,6%

3.1.2 Observatoire des Levures



L'observatoire des levures (ODL) est un système de surveillance exhaustif et pérenne, basé sur un réseau de mycologues hospitaliers volontaires en Ile-de-France. Les objectifs de l'ODL sont de suivre l'épidémiologie des fongémies à levures (incidence, caractéristiques des infections, espèces impliquées et résistance éventuelle aux antifongiques) et de constituer une collection de souches.

L'ODL a été mis en place en 2002. La surveillance concerne tous les patients avec fongémie à levure (définie par au moins une hémoculture positive), sans sélection liée à l'âge, la pathologie sous-jacente, le type de service de prise en charge ou la levure impliquée. Les informations cliniques et épidémiologiques sur les cas sont recueillies sur un questionnaire standardisé papier ou sur un site internet sécurisé (http://resomyc.pasteur.fr) géré par le CNRMA, en conformité avec la réglementation. Le CNRMA assure également la confirmation de l'espèce (analyse des profils d'assimilation des sucres, spectre protéique par MALDI-TOF, séquençage des régions ITS de l'ADN ribosomique), la détermination des CMI, le typage de certaines espèces et la mise en collection de tous les isolats. Les centres concernés étaient initialement au nombre de 27, regroupant tous les hôpitaux de court séjour de l'AP-HP et quelques hôpitaux de la périphérie en Ile-de-France, ce nombre est actuellement de 15 du fait des restructurations et des abandons.

Au 31/12/2014, la collection de l'ODL comportait 4391 isolats de levures (dont 241 reçus au cours de l'année 2014) provenant de 4064 patients ayant présenté 4261 épisodes de fongémie à levure, dont 197 épisodes récurrents (isolement de la même espèce à plus de 10 jours d'intervalle ou d'une autre espèce quel que soit le délai).

Au total, 95% (4176/4391) des isolats étaient des levures du genre *Candida*, mais on dénombrait aussi d'autres genres, dont *Cryptococcus* (*C. neoformans* représentant 68,4% (147/215) des espèces non *Candida* et 3,6% de l'ensemble), mais aussi *Trichosporon*, *Rhodotorula*, *Geotrichum* et *Saccharomyces*. Enfin, 3% (128/4261) des infections étaient mixtes (dues à 2 ou 3 espèces différentes). Les 6 espèces les plus fréquentes représentaient 3958 isolats et leur répartition est indiquée dans la figure suivante (Figure 13).

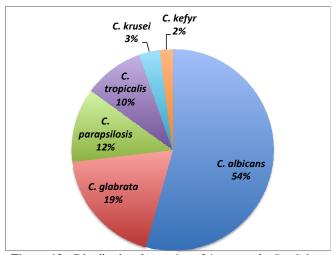


Figure 13 : Distribution des espèces fréquentes de *Candida* responsables de fongémies, ODL 2002-2014

La distribution de ces espèces variait selon l'âge (p<0,001), la pathologie sous-jacente (p<0.001), l'hospitalisation en unité de soins intensifs (USI) (p=0.015) et la pré-exposition à un antifongique (p<0,001) ou le fait que l'épisode soit incident ou récurrent (p<0,001).

Les 4064 patients atteins de fongémie à levure étaient dans 61% des cas des hommes, âgés en moyenne de 56 ans [0 - 98]. On dénombrait 3821 adultes et 243 enfants âgés de moins de 15 ans et 10% des patients étaient âgés de plus de 80 ans. Près de la moitié (45,7%) des patients était hospitalisée en USI et près des trois quarts (72%) avaient un cathéter veineux central à la date de la fongémie. Les principales co-morbidités étaient un acte chirurgical dans les 30 jours précédant la fongémie (35,7%), un cancer (31,2%), une hémopathie maligne (18,5%), une transplantation d'organe solide (5,9%), ou une infection par le VIH (6,4%). Il existait une pré-exposition à un antifongique dans 12% des cas, beaucoup plus souvent lors des épisodes récurrents (58%) que lors des épisodes incidents (10%) (p<0,001). Les patients avaient été pré-exposés au fluconazole (53,2%) ou à la caspofungine (29,4%).

Si l'on considère seulement les épisodes pour lesquels le décès n'était pas survenu avant le résultat de l'hémoculture, soit 81% (3451/4261) des épisodes, les traitements antifongiques se répartissaient en fluconazole seul (48,7%), échinocandine seule (29,3%), ou autre traitement (15,7%). Le type de traitement différait significativement s'il s'agissait d'un épisode incident ou récurrent (p<0.001).

La mortalité à 30 jours est de 37,2% (1489/4004) par épisode, avec une mortalité précoce à 8 jours de 21,3% (850/3985). La mortalité à J30 augmentait avec l'âge (p<0.001), en cas d'hospitalisation en USI (48,6% vs 27,4 %, p<0,001), et lorsqu'aucun traitement n'avait été administré (p<0,001). La présence d'une pathologie cancéreuse sous-jacente n'influençait pas la survie. La mortalité variait selon l'espèce (p<0,001): *C. albicans* (39,9%), *C. glabrata* (40,1%), *C. parapsilosis* (21%), *C. tropicalis* (39,6%), *C. krusei* (50%), *C. kefyr* (45,5%), *Cr. neoformans* (23,9 %) et autre (36,4%).

Nous venons de publier les particularités des fongémies à levures, et en particulier l'augmentation de l'incidence des candidémies et de la mortalité globale des candidémies en USI entre 2002 et 2010³ (voir plus loin). Ceci représente une tendance inquiétante et inexpliquée, alors que les techniques diagnostiques et l'arsenal thérapeutique se sont améliorés en parallèle.

3.1.3 RESeau de Surveillance des Infections Fongiques invasives en France (ReSSIF)



RESSIF s'appuie sur un réseau de laboratoires, au nombre de 25 en 2014⁴, les CC-CNRMA qui ont souhaité participer de façon active et pérenne à la surveillance des infections fongiques invasives en France. Nous considérons que RESSIF permettra de déterminer l'incidence des mycoses invasives en France et, pour la première fois, d'obtenir des données prospectives sur la pneumocystose (VIH+ et VIH-) qu'il serait difficile de chiffrer par le biais d'une surveillance passive.

Les CC-CNRMA se sont engagés à déclarer de façon exhaustive tous les cas de mycoses invasives prouvées et probables diagnostiqués dans leurs centres grâce au serveur sécurisé dédié (https://epidemio.pasteur.fr/ressif) et d'adresser au CNRMA tous les isolats correspondants (à

³ Lortholary O, *et al.* Worrisome trends in incidence and mortality of candidemia in intensive care units (Paris area, 2002-2010). Intensive Care Med. 2014; 40:1303–1312.

⁴ Liste des CC-CNRMA de 2012 par ordre alphabétique des villes, les référents mycologues étant indiqués entre parenthèses: Amiens (Taieb Chouaki), Angers (Jean-Philippe Bouchara), Besançon (Laurence Millon), Caen (Julie Bonhomme), Cayenne (Christine Aznar), Clermont-Ferrand (Philippe Poirier), Fort-de-France (Nicole Desbois), Gustave Roussy (Elisabeth Chachaty), Limoges (Bernard Bouteille), Nantes (Florent Morio), Nice (Martine Gari-Toussaint), Orléans (Didier Poisson), Paris – Hôpital Cochin (André Paugam), Paris – Hôpital Saint Louis (Stéphane Bretagne), Paris – Hôpital des Quinze-Vingt (Christine Chaumeil), 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 Chandenier), Versailles (Odile Eloy).

l'exception de ceux des espèces les plus fréquentes *C. albicans, C. glabrata, C. tropicalis, C. parapsilosis* et *A. fumigatus*, à moins que l'isolat n'ait un profil anormal de sensibilité aux antifongiques). La contribution des collaborateurs dans les CC-CNRMA est majeure car sans eux cette surveillance des mycoses invasives en France n'aurait aucune valeur. Nous leur sommes extrêmement reconnaissants et sommes conscients de la charge de travail que cela représente pour eux.

Le questionnaire en ligne a été construit avec le logiciel ©voozanoo /epiconcept. Il comprend 4 pages et 354 variables, dont certaines, optionnelles, n'apparaissent que si l'information est pertinente dans le contexte. Nous sommes conscients du travail que représente l'enregistrement des données dans les CC-CNRMA. Cependant, le serveur permet aussi d'enregistrer les cas qui ne rentrent pas dans le périmètre de RESSIF (infections "possibles", infections urinaires, péritonéales) pour un usage personnel au niveau de chaque centre. Le médecin d'études cliniques du CNRMA assure le monitorage de la base en continu et réclame les données manquantes ou l'envoi des souches. L'activité sur le serveur est continue (Figure 14) et les CC-CNRMA utilisent davantage les fonctions d'analyse qui leur permettent de comparer les données de leur centre, éventuellement filtrée sur l'année, à celle de la base entière.

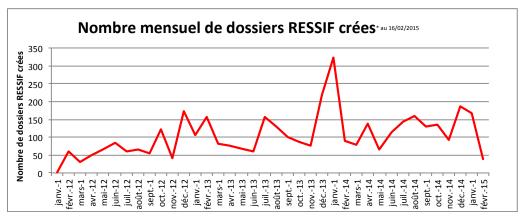


Figure 14: Activité (dossiers enregistrés et dossiers modifiés) sur le serveur RESSIF entre décembre 2012 et janvier 2014

La mise en place de RESSIF a permis également de confirmer l'évolution des techniques utilisées en mycologie médicale, puisque les CC-CNRMA complètent chaque année un questionnaire succinct sur ce thème. Nous ferons une analyse plus détaillée ultérieurement, mais la tendance la plus impressionnante concerne les moyens d'identification des champignons. En effet, plus de 50% (9/14) des centres n'utilisaient pas le MALDI-TOF pour l'identification des levures en 2012, ils ne sont plus que 12% (3/24) en 2014. Cette tendance est décalée dans le temps pour les champignons filamenteux (10% d'utilisation en 2012 et seulement 54% en 2014), ce qui s'explique parfaitement par le fait que les bases de données sont beaucoup moins riches pour les champignons filamenteux. Il faut ici rappeler qu'une identification fiable repose sur la combinaison de plusieurs critères (MALDI-TOF et/ou séquences nucléotidiques à associer aux critères phénotypiques).

Au terme de ces trois années de fonctionnement, et en sachant que le bilan n'est pas définitif en raison des retards de déclaration, et d'un recul insuffisant pour les évolutions cliniques, il est déjà impressionnant avec 3990 dossiers enregistrés dans RESSIF dont 76% d'IFI prouvées et 20% d'IFI probables.

Le nombre de déclarations est très variable évidemment, fonction de la taille du centre hospitalier et des services de prise en charge (hématologie, cancérologie, unité de soins intensifs, transplantation, maladies infectieuses, ...) (Figure 15). Nous ferons des analyses d'incidence dès que nous aurons des données plus précises sur le périmètre d'activité des différents CC-CNRMA et donc sur les populations à risque.

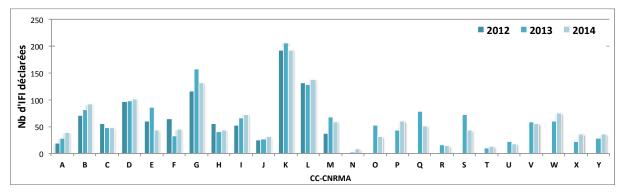


Figure 15 : Nombre de déclarations dans chacun des CC-CNRMA (13 centres n'ont été inclus qu'en 2013, tous les centres sont désignés par des lettres)

La diversité des infections fongiques est impressionnante (Figure 16) avec 3 mycoses constituant 83% du total : les fongémies (48,7%), les pneumocystoses (19,5%) et les aspergilloses invasives (16,4%), cette hiérarchie correspondant à celle qui avait été trouvée lors de l'analyse des données du PMSI réalisée l'an dernier et portant sur une dizaine d'années⁵. Rappelons ici les difficultés diagnostiques de pneumocystose, car la PCR est maintenant très utilisée sur les échantillons respiratoires, sans que les critères de validation et d'interprétation aient été clairement définis. RESSIF devrait fournir une base de données utile pour répondre à cette question.

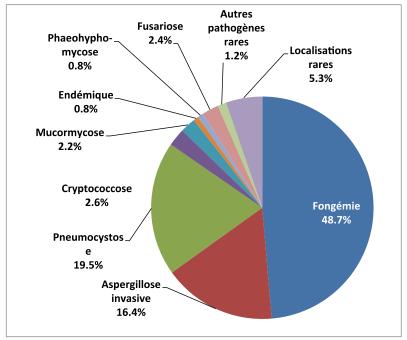


Figure 16 : Répartition des 3990 infections fongiques invasives déclarées dans le cadre de RESSIF depuis 2012

Les patients étaient majoritairement (63%) des hommes âgés de 56 ± 19 ans, mais avec des différences significatives en fonction des mycoses (cf. plus loin). La mortalité globale étaie de 39% avec de grandes variations en fonction du type de mycose évidemment, le pronostic le plus sévère étant associé aux mucormycoses. Le principal facteur de risque correspondait aux pathologies malignes (tumeurs solides, hémopathies malignes, 47%), suivi par la chirurgie récente (17%), les transplantations

-

⁵ Bitar D, *et al.* Population-Based Analysis of Invasive Fungal Infections, France, 2001–2010. Emerging Infect Dis.2014; 20:1163–1169.

d'organe solide (8%). Il faut noter que 32% des patients étaient pris en charge en unité de soins intensifs.

Une analyse préliminaire portant sur les principales mycoses déclarées nous permet d'ores et déjà de dégager des résultats très intéressants qui démontrent l'importance de cette collaboration entre les CC CNRMA et le CNR.

Les fongémies à levures

Elles représentent la première cause de mycose invasive, avec 1913 cas répertoriés sur 3 ans. L'âge moyen était de 58 ans, avec une majorité d'hommes (62,3%) et une minorité d'enfants (5,3%). Les principaux facteurs de risque étaient le séjour en USI (38,6%), une tumeur solide (33,3%), une chirurgie récente (38,7%), une hémopathie (17,6%). Mais les facteurs de risques multiples étaient fréquents puisque un tiers des patients en USI avait subi une chirurgie récente et un tiers avait une pathologie maligne associée. La mortalité globale (39,4%) et la répartition des espèces de *Candida* les plus fréquentes étaient superposables à celle de l'ODL

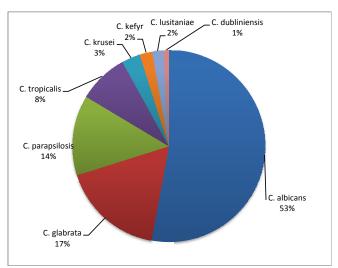


Figure 17 : Distribution des principales espèces de *Candida* au cours des fongémies (RESSIF, 1804 épisodes, 2012-2014)

Nous avons analysé la survie des patients en fonction de l'espèce responsable de la fongémie (Figure 18Figure 17Figure 17). Comme le montre la figure suivante, l'évolution des infections à *S. clavata* est très rapidement fatale, et la seule espèce qui, par ailleurs, se différencie significativement de *C. albicans* est *C. parapsilosis*.

Les données générées dans RESSIF sur 3 ans corroborent donc celles de l'ODL³. Ceci valide donc l'approche antérieure, et l'utilisation d'un observatoire régional (Ile-de-France) qui nous a permis et nous permet encore d'analyser et de stocker tous les isolats avec la même technique, ce qui n'est techniquement pas réalisable pour le CNRMA à l'échelle nationale.

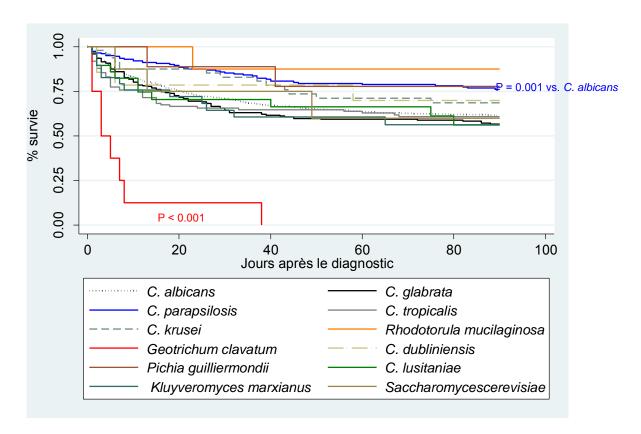


Figure 18 : Courbes de survie des patients en fonction de l'espèce responsable de la fongémie (n >10, RESSIF, 2012-2014, logrank test)

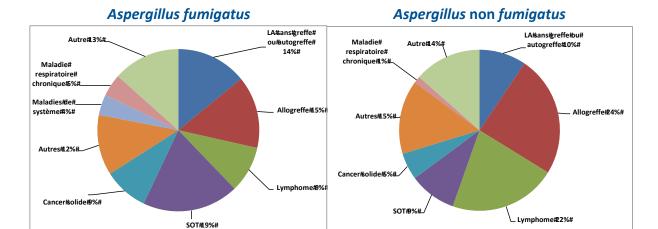
Les aspergilloses invasives

En 3 ans, 642 cas d'AI ont été répertoriés dans RESSIF, dont 85% d'infections probables et 15% d'infections prouvées. L'âge moyen était de 56±17 ans avec 2% d'enfant et une majorité d'hommes (63,8%). Nous avons analysé les facteurs de risque en utilisant les catégories que nous avions utilisées pour l'analyse de SAIF⁶ : lymphomes (25,2%), allogreffes quel qu'en soit le motif (20,3%), leucémies aiguës ± autogreffe (13%), autres hémopathies et déficits immunitaires congénitaux (11,5%), transplantations d'organes (11,3%), cancers (5,7%), pathologie respiratoires chroniques (2,5%), maladies de système (2,3%) et diverses pathologies autres (8,4%). 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.

Le diagnostic d'AI avait été fait sur la détection du galactomannane aspergillaire dans 38% des cas. Même si A. fumigatus était isolé en majorité (79,8% des cas où une culture a été réalisée), il existe des espèces minoritaires dont on connaît la moindre sensibilité à certains antifongiques et des souches d'A. fumigatus résistantes aux azolés même si elles restent encore rares en France dans le cadre des infections aspergillaires invasives. Les espèces isolées dans les centres comprenaient ainsi 14 espèces non-fumigatus: Aspergillus flavus, Aspergillus niger, Aspergillus sydowii, Aspergillus nidulans, Aspergillus terreus, Aspergillus pseudodeflectus, Aspergillus westerdijkiae, Aspergillus calidoustus, Aspergillus tamarii, Emericella quadrilineatus, Aspergillus alabamensis, Aspergillus puniceus, Aspergillus tubingensis, Aspergillus neoniveus, et Neosartorya hiratsukae. La répartition des facteurs de risque différait selon que l'espèce isolée était A. fumigatus ou une autre espèce (Figure 19, p= 0,007). 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.

-

⁶ Lortholary O, et al. Epidemiological trends in invasive aspergillosis in France: the SAIF network (2005-2007). Clin Microbiol Infect. 2011; 17:1882–1889.



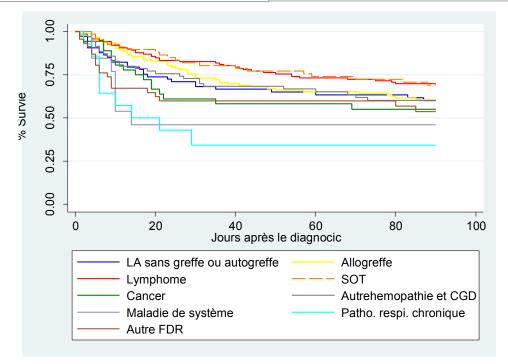


Figure 19 : Répartition des facteurs de risque en fonction de l'espèce d'*Aspergillus* isolée en culture (chi2, P= 0,007), et comparaison des courbes de survie en fonction du principal facteur de risque identifié (logrank test, p = 0,0029)

Les pneumocystoses

En 3 ans, 768 cas de pneumocystose ont été répertoriés dans RESSIF. Il s'agissait majoritairement d'hommes adultes (58±17 ans) avec seulement 2,2% d'enfants. Les patients étaient, dans moins d'un quart des cas, infectés par le VIH. Les conditions prédisposantes pour les patients séronégatifs se répartissaient entre pathologies malignes, maladies de système et transplantation d'organe (Figure 20).

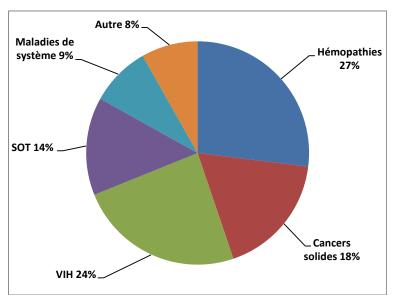


Figure 20 : Distribution des facteurs de risque chez les patients pour lesquels le diagnostic de pneumocystose a été établi (RESSIF, 2012-2014)

Le diagnostic des pneumocystoses continue à poser des problèmes en l'absence de consensus sur les critères. Dans le cadre de RESSIF, un certain nombre de centres ne prennent en compte que les résultats de la PCR quantitative, seuls 34% les interpréteraient en fonction des résultats de l'immunofluorescence. Un travail d'harmonisation des résultats des PCR diagnostiques au niveau des laboratoires a été initié (cf. recommandations ECIL5, §6.1.1). 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.

Le pronostic des pneumocystoses était meilleur chez les patients séropositifs pour le VIH comparé aux autres, et en particulier aux patients atteints d'hémopathie maligne (p < 0.001, logrank test) (Figure 21).

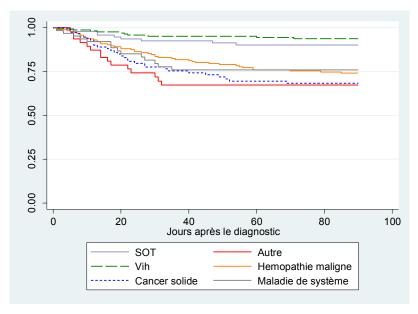


Figure 21 : Courbes de survie chez les patients atteints de pneumocystose en fonction du facteur de risque principal (RESSIF, 2012-2014)

Les mucormycoses

Pour les 88 cas de mucormycose rapportés dans RESSIF, la prépondérance masculine était toujours réelle avec 65,9% d'hommes et un âge moyen de 53±18 ans. Les principaux facteurs de risque se répartissaient en pathologie maligne (61,4%), diabète (15,9%), et traumatisme/brûlures étendues (17,1%). L'infection invasive était prouvée dans 65% des cas. Le diagnostic avait été fait par culture (86,4%), histologie/examen direct (77,3%) et/ou PCR (20,4%). L'identification polyphasique systématique des isolats permet de mettre en évidence une diversité impressionnante en termes de genre et espèces (Figure 22), avec des différences de répartition selon le terrain sous-jacent, 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 23).

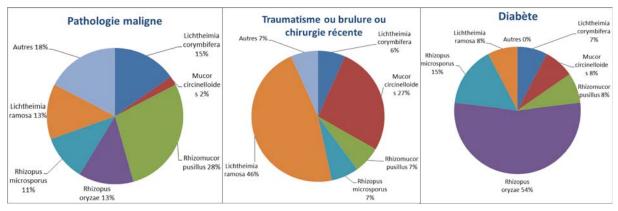


Figure 22 : Répartition des espèces de Mucorales en fonction du principal facteur de risque sous-jacent (RESSIF, 2012-2014)

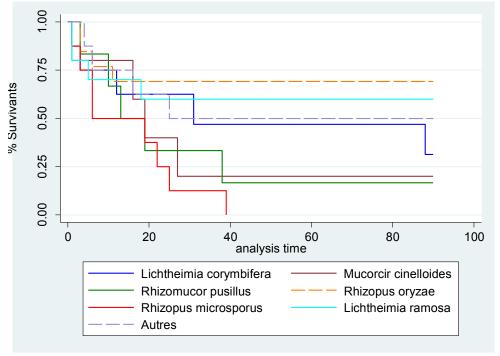


Figure 23 : Courbes de survie selon l'espèce de Mucorales isolée (RESSIF, 2012-2014)

Les fusarioses

Nous avons actuellement répertorié 95 cas d'infection à *Fusarium* spp. Dans le cadre de RESSIF, 48,4% sont des infections prouvées et 67,4% 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 43,2% d'hommes) et l'âge moyen plus jeune (42 ±18 ans). Les autres localisations étaient des infections disséminées avec fongémie (10%), des localisations pulmonaires (6%), cutanées ou articulaires (11%) et autres (4%), avec pour ces localisations non oculaires un terrain favorisant le plus souvent (58%) lié à une hémopathie maligne. On pouvait constater, sans avoir pour l'instant d'explication à ces résultats, que les espèces identifiées variaient en fonction de la localisation. Ainsi, on notait une plus grande fréquence de *Fusarium* du complexe *oxysporum* dans les localisations oculaires (37% vs. 7%), et à l'inverse de *Giberella fujikuroi* dans les localisations non oculaires (43% vs. 12%) (Figure 24).

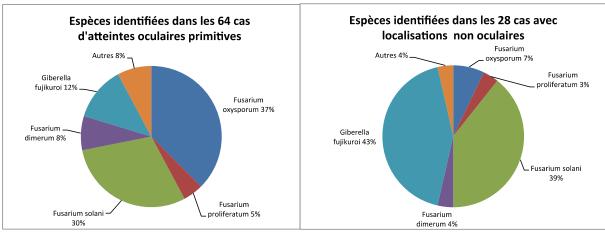


Figure 24 : Répartition des espèces identifiées au cours des fusarioses en fonction de l'atteinte oculaire ou non (RESSIF, 2012-2014).

Près de 19% des patients avaient reçu un antifongique avant le diagnostic de la mycose invasive, plus souvent dans le cadre des mucormycoses (53%) ou des aspergilloses (36%) que dans celui des fongémies (15%) ou des cryptococcoses (13%). Le traitement antifongique avait été prescrit dans 90% des cas après le diagnostic, en monothérapie ou en association. C'était en première intention le voriconazole (74% des AI et 57% des fusarioses), le fluconazole (31% des fongémies et 35% des mycoses rares, 28% des cryptococcoses), la caspofungine (43% des fongémies et 25% des mycoses rares), le posaconazole (18% des mucormycoses), et des formulations diverses d'amphotéricine B (14% des fongémies, 30% des mycoses rares, 72% des fusarioses, 3% des mucormycoses, et 29% des cryptococcoses).

Cette analyse succincte fournit des résultats concordants avec les données obtenues par l'analyse sur 10 ans du PMSI². Elle montre que la base de données RESSIF sera une source pertinente d'information, à la fois sur les pathologies rencontrées en France et leur évolution ainsi que 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.

3.2 Surveillance de la résistance des agents pathogènes aux anti-infectieux

3.2.1 Définition de l'échantillon de souches testées

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 2008^7 , nous recherchons systématiquement une mutation dans le gène *Fks* lorsque la CMI de la caspofungine est $\geq 0,5$ µg/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.

3.2.2 Définitions utilisées pour exprimer la résistance

Nous retranscrivons ici les seuils établis par le comité EUCAST pour *Candida* sp. (Tableau 2) et *Aspergillus* spp. (Tableau 3), 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 au-dessus de 0,5μg/ml 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 2 : Candida sp. EUCAST Antifungal Clinical Breakpoint fungi (Table v.7.0 valid from August 2014) (http://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST files/AFST/Antifungal breakpoints v 7.0.pdf)

EUCAST Antifungal Clinical Breakpoint Table v. 7.0 valid from 2014-08-12

Candida spp.

MIC method (EUCAST standardised broth microdilution method)
Medium: RPMI1640-2% glucose, MOPS buffer
Inoculum: Final 0.5x10⁵ – 2.5x10⁵ cfu/mL

ncubation: 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

							MIC breakp	oint (mg/L)						
Antifungal agent	C. all	oicans	C. glabrata		C. krusei		C. parapsilosis		C. tropicalis		C. guilliermondii		Non-species related breakpoints ¹	
	\$ ≤	R>	\$ ≤	R>	\$ ≤	R >	S≤	R>	S≤	R>	S≤	R>	S≤	R>
Amphotericin E	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	IE	IE	IE	IE
Anidulafungin	0.03	0.03	0.06	0.06	0.06	0.06	0.002	4	0.06	0.06	IE ²	IE ²	IE	IE
Caspofungin	Note ³	IE ²	IE ²	IE	IE									
Fluconazole	2	4	0.002	32	-	-	2	4	2	4	IE ²	IE ²	2	4
Itraconazole	0.06	0.06	IE ²	IE ²	IE ²	IE ²	0.12	0.12	0.12	0.12	IE ²	IE ²	IE	IE
Micafungin	0.016	0.016	0.03	0.03	IE ⁴	IE ⁴	0.002	2	IE ⁴	IE ⁴	IE ⁴	IE ⁴	ΙE	ΙE
Posaconazole	0.06	0.06	IE ²	IE ²	IE ²	IE ²	0.06	0.06	0.06	0.06	IE ²	IE ²	ΙE	ΙE
Voriconazole	0.125	0.125	IF	IF.	IF.	IF	0.125	0.125	0.125	0.125	IF ²	IF ²	IF	IF

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

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 case 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.

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 3 : Aspergillus sp. EUCAST Antifungal Clinical Breakpoints -Fungi (Table v.7.0, August 2014) (http://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST files/AFST/Antifungal breakpoints v 7.0.pdf)

Aspergillus spp.

EUCAST Antifungal Clinical Breakpoint Table v. 7.0 valid from 2014-08-12

MIC method (EUCAST standardised broth microdilution method)

Medium: RPMI1640-2% glucose, MOPS as buffer Inoculum: Final 1x10(5) – 2.5x10(5) cfu/mL

Incubation: 48h

Reading: Visual, complete inhibition for amphotericin B and azoles (MIC), aberrant growth endpoint for echinocandins (MEC)

Quality control: A. furnigatus ATCC 204305, A. flavus ATCC 204304, A. furnigatus F 6919, A. flavus CM 1813, C. parapsilosis ATCC 22019 (read after 18-24 h) or C. krusei ATCC 6258 (read after

Antifungal _		MIC breakpoint (mg/L)													
agent	A. fl	avus	A. fumigatus		A. nidulans		A. niger		A. terreus		Non-species related breakpoints ¹				
	S≤	R >	S≤	R>	S≤	R>	S≤	R >	S≤	R>	S≤	R>			
Amphotericin B	IE ²	IE ²	1	2	Note ³	Note ³	1	2	-	-	IE	IE			
Anidulafungin	ΙE	IE	IE	IE	IE	IE	ΙΕ	IE	ΙΕ	IE	IE	IE			
Caspofungin	ΙE	IE	ΙE	IE	IE	IE	ΙE	ΙE	ΙΕ	IE	IE	IE			
Fluconazole	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-			
Itraconazole4	1	2	1	2	1	2	IE ^{2,5}	IE ^{2,5}	1	2	IE ⁵	IE ⁵			
Micafungin	ΙE	IE	IE	IE	IE	IE	ΙΕ	IE	ΙΕ	IE	IE	IE			
Posaconazole4	IE ²	IE ²	0.12 ⁶	0.25 ⁶	IE ²	IE ²	IE ²	IE ²	0.12 ⁶	0.25 ⁶	IE	IE			
Voriconazole4	IE2	IE2	1	2	<u>IE</u>	<u>IE</u>	IE2	IE2	IE2	IE2	<u>IE</u>	<u>IE</u>			

^{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.

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

Les données du CNRMA concernent actuellement 6700 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 4).

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.

^{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.

Tableau 4 : Profil de sensibilité des levures aux antifongiques (mise à jour 17/02/2015)

Espèces étudiées			Valeurs d	es CMI50 / C	CMI90 μg/ml po	our les antif	ongiques*	
Nom d'usage en clinique	Nom actuel	AMB	5-FC	Fluco	Vori	Posa	Caspo**	Mica**
C. albicans (n =2541)		0.06/0.12	≤0.12/0.5	0.25/0.5	≤0.01/≤0.01	0.03/0.06	0.03/0.06	0.03/0.0
C. dubliniensis $(n = 75)$		0.03/0.06	≤0.12/≤0.12	≤0.12/0.25	≤0.01/≤0.01	0.03/0.06	0.03/0.06	0.03/0.0
C. glabrata (n = 962)		0.12/0.25	≤0.12/≤0.12	16/64	0.25/2	1/2	0.06/0.12	0.03/0.0
C. $parapsilosis$ (n = 578)		0.06/0.12	≤0.12/0.25	0.5/2	≤0.01/0.06	0.06/0.12	0.25/1	0.5/0.5
C. orthopsilosis (n=26)		0.03/0.12	≤0.12/≤0.12	0.5/16	0.03/1	0.12/0.25	0.12/0.25	0.25/0.2
C. metapsilosis (n=22)		0.06/0.12	≤0.12/≤0.12	1/2	0.03/0.06	0.03/0.12	0.12/0.25	0.25/0.2
C. tropicalis $(n = 483)$		0.06/0.12	≤0.12/64	0.5/4	0.03/0.5	0.06/0.25	0.03/0.06	0.03/0.0
C. krusei (n = 227)	Pichia kudriavzevii	0.25/0.25	2/4	32/64	0.25/0.5	0.25/0.5	0.12/0.25	0.06/0.1
C. inconspicua (n=26)		0.12/0.25	2/4	16/32	0.12/0.5	0.12/0.25	0.06/0.12	0.03/0.0
C. kefyr (n = 117)	Kluyveromyce s marxianus	0.12/0.25	0.5/8	0.5/1	≤0.01/≤0.01	0.06/0.12	0.03/0.03	0.06/0.0
C. guilliermondii (n = 77)	Meyerozyma guilliermondii	0.03/0.06	≤0.12/≤0.12	8/32	0.06/0.5	0.25/0.5	0.12/0.25	0.25/0.2
C. fermentati (n = 29)	Meyerozyma caribbica	0.12/0.25	≤0.12/0.5	8/64	0.12/0.5	0.25/0.5	0.12/2	0.25/-
C. lusitaniae (n = 116)	Clavispora lusitaniae	0.12/0.25	≤0.12/1	0.25/1	≤0.01/0.06	0.03/0.06	0.06/0.12	0.06/0.0
C. haemulonii (n = 37)		0.5/4	≤0.12/0.25	32/≥64	≥8/≥8	2/≥8	0.03/0.06	0.06/0.1
C.haemulonii type II (n=35)	Candida duobushaemul onii	2/8	≤0.12/2	32/≥64	≥8/≥8	8/≥8	0.03/0.03	0.06/-
C.palmioleophila (n=18)		0.12/0.5	≤0.12/0.5	16/64	0.12/1	0.12/0.25	0.12/-	0.06/-
Pichia jadinii (n = 18)	Cyberlindnera jadinii	0.06/0.12	≤0.12/2	1/4	0.06/0.12	0.12/0.5	0.007/1	0.03/-
C. pelliculosa (n = 22)	Wickerhamom yces anomalus	0.06/0.12	≤0.12/32	2/4	0.12/0.25	0.25/0.5	0.06/0.06	0.03/0.0
Pichia ohmeri (n = 17)	Kodamaea ohmeri	0.06/0.12	≤0.12/1	8/16	0.03/0.12	0.06/0.12	0.06/4	0.06/ -
Pichia norvegensis (n=13)		0.12/0.12	4/8	32/64	0.25/0.5	0.12/0.25	0.06/0.06	0.03/0.0
S. $cerevisiae$ (n = 35)		0.06/0.12	≤0.12/≤0.12	8/16	0.12/0.25	0.5/1	0.12/0.25	0.12/0.2
C. lipolytica (n=18)	Yarrowia lipolytica	0.25/1	8/≥64	4/8	0.06/0.25	0.25/1	0.25/0.5	0.25/0.2
Geotrichum candidum (n=25)	Galactomyces candidus	0.25/0.5	0.25/1	16/64	0.25/1	0.25/1	1/≥8	0.5/≥8
G. capitatum (n=29)	Magnusiomyc es capitatus	0.25/0.5	≤0.12/0.25	16/32	0.12/1	0. 5/2	≥8/≥8	≥8/≥8
G. clavatum (n=80)	Saprochaete clavata	0.5/0.5	0.25/1	32/64	0.5/2	0.5/1	≥8/≥8	≥8/≥8
Cr. neoformans var. grubii (n=737)		0.25/0.5	4/8	4/8	0.06/0.12	0.12/0.25	≥8/≥8	4/≥8
Cr. neoformans var. neoformans (n=179)		0.12/0.25	4/8	1/4	0.03/0.12	0.03/0.25	≥8/≥8	1/4
Cr. neoformans hybrides AD (n=46)		0.25/0.25	4/16	4/8	0.06/0.12	0.06/0.12	≥8/≥8	2/≥8
Cr. gattii (n = 25)		0.12/0.25	2/8	8/16	0.12/0.5	0.25/0.5	≥8/≥8	8/≥8
Rhodotorula nucilaginosa (n=27)		0.25/0.5	0.25/0.5	≥64/≥64	2/8	1/2	≥8/≥8	≥8/≥8
Trichosporon asahii (n=37)		2/≥8	32/≥64	4/16	0.12/0.25	0.25/0.5	4/≥8	2/≥8
Trichosporon inkin (n=9)		0.5/-	64/-	1/-	≤0.01/-	0.06/-	4/-	1/-

^{*} AMB (amphotéricine B), 5-FC (5-fluorocytosine), Fluco (fluconazole), Vori (voriconazole), Posa (posaconazole), Caspo (caspofungine), 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 caspofungine ou début 2008 pour la micafungine.

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 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.

3.2.4 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 1800 isolats de champignons filamenteux (Tableau 5). 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 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), ce qui explique que certains isolats aient des comportements inhabituels pour l'espèce. 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 dans les tableaux 4 et 5. 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. Plusieurs isolats d'A. *fumigatus* ont des CMI élevées à l'itraconazole avec parfois une résistance croisée pour le voriconazole et le posaconazole. 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 *Scedosporium 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.).

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).

Tableau 5 : Profil de sensibilité des champignons filamenteux aux antifongiques

		Valeurs d	es CMI50 / 0	CMI90 (μg/1	nl) pour le	s antifongiqu	es*
	AMB	Itra	Vori	Posa	Caspo	Terbi	Mica
Mucorales							
Lichtheimia corymbifera (n =44)	0.5/1	1/≥8	≥8/≥8	0.5/1	≥8/≥8	0.5/1	≥8/≥8
Lichtheimia ramosa (n=50)	0.12/0.25	2/≥8	≥8/≥8	0.5/1	≥8/≥8	1/2	≥8/≥8
Lichtheimia ornata (n=5)	0.25/-	0.5/-	≥8/-	0.5/-	≥8/-	0.5/-	≥8/
Rhizopus arrhizus (n =59)	0.12/0.25	0.5/4	8/≥8	0.25/1	≥8/≥8	≥8/≥8	≥8/≥8
Rhizopus microsporus (n=35)	0.06/0.12	1/≥8	8/≥8	0.5/1	≥8/≥8	0.5/1	≥8/≥8
Rhizomucor pusillus (n=44)	0.06/0.12	0.5/1	≥8/≥8	0.25/0.5	≥8/≥8	0.25/0.5	≥8/≥8
Rhizomucor miehei (n=5)	0.03/-	0.06/-	4/-	0.12/-	≥8/-	0.5/-	2/-
Mucor circinelloides (n=33)	0.06/0.06	≥8/≥8	≥8/≥8	0.5/2	≥8/≥8	≥8/≥8	≥8/≥8
Mucor spp. (n=8)	0.03/-	≥8/-	≥8/-	2/-	≥8/-	≥8/-	≥8/-
Cunninghamella bertholletiae (n=6)	0.25/-	0.5/-	≥8/-	0.25/-	≥8/-	0.12/-	4/-
Hyphomycètes							
Sarocladium kiliense (n=8)	8/-	≥8/-	0.5/-	1/-	2/-	0.5/-	2/-
Aspergillus fumigatus (n=231)	0.5/0.5	0.25/≥8	0.25/4	0.12/0.5	0.5/0.5	2/4	0.01/0.06
Aspergillus flavus (n=77)	1/2	0.12/0.5	0.5/0.5	0.12/0.25	0.25/0.5	0.03/0.12	0.01/0.06
Aspergillus fischeri (n=5)	1/-	0.5/-	0.5/-	0.25/-	0.5/-	0.12/-	0.03/-
Aspergillus nidulans (n=25)	2/4	0.12/0.5	0.12/0.25	0.12/0.5	0.5/4	0.12/0.5	0.01/0.06
Aspergillus quadrilineatus (n=10)	0.5/1	0.12/0.5	0.125/0.25	0.12/0.5	2/4	0.12/0.25	≤0.01/0.03
Aspergillus section Usti (n=32)	0.5/1	2/≥8	4/8	≥8/≥8	2/≥8	0.25/0.5	0.25/1
Aspergillus section Nigri (n=20)	0.25/0.5	1/≥8	0.5/2	0.25/0.5	0.25/0.5	0.25/0.5	0.03/0.5
Aspergillus terreus (n=31)	2/8	0.06/0.25	0.5/0.5	0.06/0.12	0.5/2	0.06/0. 25	≤0.01/0.0€
Aspergillus tubingensis (n=7)	0.25/-	1/-	1/-	0.25/-	0.25/-	0.25/-	≤0.01/-
Aspergillus versicolor (n=6)	0.23/-	0.25/-	0.25/-	0.12/-	0.5/-	0.12/-	0.03/-
Fusarium oxysporum complex	2/4	≥8/≥8	4/8	0.12/- 2/≥8	≥8/≥8	2/8	≥8/≥8
Gibberella fujikuroi complex (n=63)	4/8	≥8/≥8 ≥8/≥8	4/8	2/≥8 4/≥8	≥8/≥8	1/2	≥8/≥8 ≥8/≥8
Fusarium solani complex (n=143)	2/8	≥8/≥8			≥8/≥8		≥8/≥8 ≥8/≥8
1 (/			8/≥8	≥8/≥8		≥8/≥8	
Fusarium dimerum complex (n=16) Scedosporium boydii (n=32)	0.5/0.5	≥8/≥8 0.5/2	2/8 0.25/0.5	≥8/≥8	8/≥8	0.5/2	≥8/≥8
* * * /	8/≥8			0.5/1	1/2	≥8/≥8	0.25/1
Scedosporium apiospermum (n=62)	8/≥8	1/≥8	0.5/1	1/2	1/2	≥8/≥8	0.25/0.5
Pseudallescheria ellipsoidea (n=6)	≥8/-	10.5/-	0.5/-	1/-	0.5/-	≥8/-	0.25/-
Lomentospora prolificans (n=24)	8/≥8	≥8/≥8	8/≥8	≥8/≥8	4/8	≥8/≥8	4/≥8
Scedosporium dehoogii (n=7)	≥8/-	0.5/-	0.5/-	0.5/-	2/-	≥8/-	0.25/-
Scopulariopsis brevicaulis (n=12)	8/≥8	≥8/≥8	8/≥8	≥8/≥8	1/2	2/8	0.12/0.25
Purpureocillium lilacinum (n=26)	8/≥8	2/≥8	0.25/0.5	0.25/0.5	≥8/≥8	0.25/0.25	1/≥8
Paecilomyces variotii (n=12)	0.06/0.5	0.25/0.5	≥8/≥8	0.12/0.5	0.5/4	0.5/8	0.03/0.25
Penicillium spp. (n=24)	0.5/4	1/≥8	8/≥8	0.5/≥8	1/≥8	0.25/1	0.06/1
Penicillium chrysogenum (n=7)	0.5/-	0.25/-	1/-	0.25/-	0.5/-	0.25/-	0.03/-
Trichoderma longibrachiatum (n=16)	1/2	≥8/≥8	0.5/1	1/4	0.5/1	1/2	0.06/0.25
Trichoderma spp. (n=8)	1/-	≥8/-	1/-	8/-	0.5/-	2/-	0.06/-
Lecytophora hoffmannii (n=5)	0.25/-	0.25/-	1/-	0.25/-	2/-	0.5/-	2/-
Myceliophtora thermophila (n=6)	1/-	0.12/-	0.12/-	0.12/-	4/-	2/-	0.5/-
Coelomycètes							
Medicopsis romeroi (n=6)	0.5/-	4/-	0.5/-	1/-	4/-	0.12/-	2/-
Phoma spp. (n=7)	0.25/-	0.5/-	0.5/-	0.25/-	4/-	0.12/-	2/-
Dématiés							
Alternaria infectoria complex (n=26)	0.25/0.5	0.5/1	4/≥8	0.12/0.5	0.5/1	0.5/1	0.06/0.12
Alternaria alternata complex (n=26)	0.25/1	0.5/4	2/4	0.25/0.5	0.5/≥8	4/≥8	0.25/≥8
Exophiala dermatitidis (n=25)	0.12/0.25	0.5/1	0.06/0.25	0.25/0.5	4/≥8	0.06/0.12	1/≥8
Exophiala jeanselmei (n=8)	1/-	0.5/-	0.25/-	0.25/-	2/-	0.06/-	2/-
Exophiala spinifera (n=7)	0.25/-	0.25/-	0.25/-	0.25/-	2/-	0.12/-	0.25/-

(suite)	V	aleurs des	CMI50 /	CMI90 (μg	/ml) pour	les antifor	ngiques*
	AMB	Itra	Vori	Posa	Caspo	Terbi	Mica
Curvularia spp. (n=15)	0.06/0.25	0.5/≥8	0.5/2	0.12/0.5	1/2	0.5/2	0.06/0.5
Chaetomium sp. (n=9)	1/-	0.25/-	0.25/-	0.25/-	2/-	2/-	0.5/-
Doratomyces sp. (n=5)	2/-	≥8/-	4/-	1/-	1/-	2/-	0.12/-
Fonsecaea spp. (n=7)	0.25/-	0.12/-	0.06/-	0.06/-	1/-	0.03/-	1/-
Fonseceae nubica (n=5)	0.5/-	0.03/-	0.06/-	0.25/-	1/-	0.03/-	1/-
Phaeoacremonium parasiticum (n=8)	0.5/-	≥8/-	0.25/-	0.25/-	≥8/-	0.12/-	4/-
Pleurostomophora richardsiae (n=5)	0.5/-	0.25/-	0.5/-	0.25/-	4/-	1/-	1/-
Neoscytalidium sp. (n=6)	0.12/-	≥8/-	0.12/-	0.5/-	0.5/-	0.5/-	0.06/-
Aureobasidium pullulans (n=6)	0.25/-	0.03/-	0.12/-	0.06/-	1/-	1/-	1/-
Dimorphiques							
Sporothrix schenckii (n=20)	1/2	0.5/2	8/≥8	1/4	≥8/≥8	0.06/2	≥8/≥8

^{*}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, MAJ 20/02/2015)

3.2.5 Analyse des tendances

En prenant les seuils définis partiellement par l'EUCAST (Tableau 2), on peut étudier les tendances sur les levures collectées dans le cadre de l'observatoire qu'est l'ODL (Tableau 6 à Tableau 8). La surveillance de l'évolution sur 10 ans de la sensibilité *in vitro* des principales levures responsables de fongémie permet de constater une persistance de la très bonne activité du fluconazole et du voriconazole sur les isolats de *C. albicans* (≤ 2% d'isolats avec une sensibilité diminuée). On peut remarquer l'apparition d'isolats de *C. parapsilosis* résistants au fluconazole, atteignant 19% en 2007, mais ce pourcentage varie selon les années (de 2 à 14% entre 2008 et 2014) sans que l'on puisse relier ce phénomène à des épidémies localisées. Par ailleurs, on note une stabilité de la sensibilité des isolats de *Cr. neoformans* au fluconazole et l'absence d'isolat « résistant » au voriconazole. La « résistance » (CMI hautes) à la caspofungine des isolats provenant d'espèces de *Candida* habituellement sensibles reste rare (selon les années, 0-1% des isolats de *C. albicans*, 0-5% pour ceux de *C. glabrata*, 0-3% pour *C. tropicalis*) ou absente (*C. krusei*).

Tableau 6 : Evolution (%) de la résistance au fluconazole (CMI >4 μg/ml)

	0 - 0 - 0 - 0 - 0 - 0 - 0 - 0 - 0 - 0 -		-200000		0.0 (0.	P	-8,)					
		2004	2005	2006	2007	2008	2009	2010	2011	2012	2013	2014
C. albicans	%	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0
	(n testés)	(213)	(178)	(168)	(213)	(200)	(224)	(212)	(158)	(128)	(158)	(93)
C. parapsilosis	%	2	2	5	19	14	8	10	3	0	2	4
	(n testés)	(45)	(42)	(43)	(58)	(36)	(39)	(41)	(32)	(21)	(43)	(23)
C. tropicalis	%	2	6	13	5	16	0	28	0	5	0	0
	(n testés)	(40)	(34)	(31)	(41)	(32)	(35)	(36)	(17)	(19)	(26)	(29)
Cr. neoformans	%	33	50	23	21	30	45	9	25	20	0	25
	(n testés)	(15)	(20)	(22)	(14)	(10)	(11)	(14)	(8)	(5)	(1)	(4)

Tableau 7 : Evolution (%) de la résistance au voriconazole (CMI >0,12 μg/ml)

		2004	2005	2006	2007	2008	2009	2010	2011	2012	2013	2014
C. albicans	%	1	1	0	1	0	0	2	0	0	0	0
	(n testés)	(213)	(178)	(168)	(213)	(200)	(224)	(212)	(158)	(128)	(158)	(93)
C. parapsilosis	%	0	0	0	3	0	0	2	3	0	5	4
	(n testés)	(45)	(42)	(43)	(58)	(36)	(39)	(41)	(32)	(21)	(43)	(23)
C. tropicalis	%	0	12	16	5	22	9	28	6	0	15	14
	(n testés)	(40)	(34)	(31)	(41)	(32)	(35)	(36)	(17)	(19)	(26)	(29)
Cr. neoformans	%	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	(n testés)	(15)	(20)	(22)	(14)	(10)	(11)	(14)	(8)	(5)	(1)	(4)

Tableau 8 : Evolution (%) des isolats avec CMI caspofungine hautes (CMI >0,25 μg/ml)

		1					, 10 /			
		2006	2007	2008	2009	2010	2011	2012	2013	2014
C. albicans	%	1	0	0	0	0	1	0	0	0
	(n testés)	(168)	(213)	(200)	(224)	(212)	(158)	(128)	(158)	(93)
C. parapsilosis	%	7	19	22	15	37	25	0	21	30
	(n testés)	(43)	(58)	(36)	(39)	(41)	(32)	(21)	(43)	(23)
C. tropicalis	%	0	0	0	0	3	0	0	0	3
	(n testés)	(31)	(41)	(32)	(35)	(36)	(17)	(19)	(26)	(29)
C. glabrata	%	0	0	5	1	1	2	2	5	0
	(n testés)	(75)	(75)	(82)	(78)	(79)	(56)	(40)	(41)	(40)
C. krusei	%	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	(n testés)	(10)	(13)	(15)	(12)	(17)	(10)	(7)	(9)	(5)

3.3 Participation aux réseaux de surveillance internationaux, en particulier européens

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 breakpoints ».

4 Alerte

Les relations avec l'InVS se font très simplement par mail (<u>noa-signalement@invs.sante.fr</u>) ou par appel téléphonique à l'unité des infections associées aux soins et Résistance aux antibiotiques, Département des maladies infectieuses (Dr. S. Vaux). Les signalements se font dans les deux sens. Les échanges de 2014 n'ont concerné que des cas d'infections à *Geotrichum* sp.

4.1 Infections à Saprochaete clavata

Il n'y a pas eu en 2014 d'alerte liée à des cas d'infection invasive due au clone épidémique de 2012 de *S. clavata*, mais nous avons géré une alerte déclenchée fin 2013. Le CNRMA a été sollicité plusieurs fois pour identifier ou confirmer l'identification de 26 souches au total, et pour typer les isolats de *S. clavata* (n=14).

4.2 Fongémies à Trichosporon asahii

Nous avons été sollicités par les mycologues de deux centres hospitaliers alertés par l'isolement de *T. asahii* chez plusieurs patients, et qui se demandaient donc s'il pouvait y avoir une source commune. Nous avons dans un premier temps analysé les souches par la seule technique publiée, c'est-à-dire le séquençage de la région IGS1 dans le gène codant l'ARN ribosomique⁸. Dans cette étude, les auteurs décrivent 6 génotypes différents pour 61 isolats provenant de différents pays. Le génotype 1 est majoritaire et aucun des 6 génotypes n'a de spécificité géographique. Ainsi, l'identification de souches ayant un « génotype » IGS1 différent permet de conclure que ces souches ont sans doute une origine différente, mais à l'inverse, partager le même « génotype » IGS1 ne permet pas de conclure à une origine commune.

8

⁸ Rodríguez-Tudela JL. Genotype distribution of clinical isolates of *Trichosporon asahii* based on sequencing of intergenic spacer 1. Diag Microbiol Infect Dis. 2007; 58:435–440.

Dans le premier centre, 3 séries de 2 cas chacun, impliquant une souche de *T. asahii*, espacées de plusieurs mois ont été identifiées. Après analyse, le génotype majoritaire est identifié dans 2 séries alors que dans la 3ème, 2 génotypes sont en cause, excluant *a priori* une source commune. Dans le deuxième centre, il s'agissait de 2 patients différents avec fongémie à plusieurs mois d'intervalle et ayant d'autres sites colonisés (urines, selles, aspiration trachéale). Les 6 souches analysées pour ces 3 patientés étaient toutes du génotype 1 ce qui ne permet pas de conclure. Une technique de typage plus discriminante pour l'analyse de *T. asahii* est en cours.

5 Activités d'information, de formation et de conseil

5.1 Enseignements et formation

Les responsables et collaborateurs du CNRMA sont impliqués dans de nombreuses formations.

Le cours de Mycologie Médicale de l'Institut Pasteur est sous la responsabilité, depuis 2005, de F. Dromer et O. Lortholary (co-directeurs) et de D. Garcia-Hermoso (chef de travaux). L'ensemble des collaborateurs (scientifiques, techniciens et secrétaire) participe à cet enseignement, ainsi que des collègues français et européens. Les étudiants français suivant ce cours sont pour la plupart des médecins ou pharmaciens, se préparant aux concours hospitalo-universitaires en parasitologie-mycologie, le cours de l'Institut Pasteur étant un prérequis à cette carrière. Ce public nous permet donc de sensibiliser chaque année de nouveaux collègues à l'importance de la mycologie médicale et aux missions du CNRMA. Le cours est, depuis 2012, dispensé en anglais (http://www.pasteur.fr/teaching/mycology).

Nous participons aux séminaires de formation du groupe EFISG de l'ESCMID depuis 2006.

Responsables et collaborateurs du CNRMA donnent régulièrement des séminaires dans des centres hospitalo-universitaires ou non en région parisienne et en Province à la demande de collègues. C'est aussi l'occasion de faire connaître le CNRMA et ses missions.

Responsables et collaborateurs du CNRMA co-coordonnent et/ou interviennent aussi dans des DU ou DIU Mycologie Médicale de Paris V, Infection et Transplantation de Paris V, VII, Lyon, Toulouse, DIU de rhinologie (PV-PXII), DIU GISCOH (Gestion des infections et soins courants en hématologie, PXII-PXI), DU ou DIU de thérapeutique anti-infectieux Paris V, VI, VII, Toulouse, Grenoble, Lille, Angers, DESC de maladies infectieuses et Masters 2 Paris VI et Paris VII.

5.2 Modalités de diffusion des données de surveillance et production du CNRMA

Les centres collaborateurs à l'ODL et à RESSIF sont réunis une fois par an pour une discussion autour des données de surveillance spécifiques (fongémies à levures pour les premiers, mycoses invasives sans restriction pour les seconds) et le premier numéro d'une « Newsletter RESSIF » a été envoyé en novembre 2014.

Les serveurs RESOMYC et RESSIF sont par ailleurs le véhicule des informations concernant les données de surveillance. En effet, chaque utilisateur peut récupérer en temps réel les données concernant l'ensemble de la surveillance en utilisant les outils d'analyse disponibles sur le site. Enfin, les études liées à l'activité du CNRMA sont publiées dans des journaux d'accès facile (soit libre d'emblée, soit très rapidement après 6 mois). Le CNRMA ne distribue pas de réactifs.

Par ailleurs, le CNRMA met en ligne son rapport d'activité chaque année sur le site dédié de l'Institut Pasteur. Le dernier rapport en ligne est accessible à l'adresse suivante : http://www.pasteur.fr/cnr/mycologie

5.3 Activité de conseil aux professionnels

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 <u>cnrma@pasteur.fr</u> qui aboutit sur les adresses mail des trois responsables (F. Dromer, S. Bretagne et O. Lortholary).

5.4 Activité d'expertise

Au plan national

- Françoise Dromer a été nommée expert rapporteur auprès de la Commission nationale de matériovigilance de l'AFFSAPS (J.O n° 127 du 2 juin 2006).
- Olivier Lortholary a été nommé expert dans un groupe de travail sur la prise en charge médicale des personnes infectées par le VIH (infections fongiques) piloté par la DGS (J.O n° 250 du 27 octobre 2006) et membre de l'intercommission «Essais thérapeutiques AC5 » de l'ANRS jusqu'en septembre 2011. Il a coordonné le groupe de travail sur les infections opportunistes survenant chez les patients VIH (Rapport d'Experts, Morlat, Septembre 2013).
- Olivier Lortholary et Stéphane Bretagne sont experts auprès de l'AFFSAPS (J.O n° 36 du 12 février 2005). Ils sont impliqués dans l'expertise des dossiers d'enregistrement européens des nouveaux antifongiques systémiques, soit à la demande des industriels auprès de l'AFSSAPS pour aider à la conception d'études permettant de démontrer l'intérêt d'un nouveau médicament, soit par le Groupe de Travail Anti-infectieux pour expertiser un dossier déposé par un industriel.

Au plan international

- **IDSA**: F. Dromer et O. Lortholary font partie du panel d'experts de "Infectious Diseases Society of America" (IDSA) chargés de mettre à jour les recommandations pour la prise en charge des cryptococcoses (article publié en 2010 dans Clinical Infectious Diseases).

- **ISHAM**:

- O Dea Garcia-Hermoso représente le CNRMA dans le groupe de travail sur les infections à Pseudallescheria boydii au sein de la Confédération Européenne de Mycologie Médicale (ECMM) et de l'International Society for Human and Animal Mycology (ISHAM) et dans le groupe de travail sur « Barcoding and identification of fungi ».
- 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 de l'ISHAM.
- O Devant la non-incorporation de la PCR dans les critères diagnostiques de l'aspergillose invasive, un groupe constitué de paires clinicien-microbiologiste a été constitué en 2006. Stéphane Bretagne est partie prenante depuis cette date du groupe biologique (EAPCRI pour European Aspergillus PCR Initiative) dont l'objectif est l'harmonisation des procédures entre les différents centres européens à l'aide de contrôles de qualité (http://www.eapcri.eu/). Une étude clinique européenne est en cours incluant la PCR quantitative selon ces recommandations.

- **ESCMID**: Olivier Lortholary est membre du Groupe de travail des ESCMID Candida Guidelines 2009-2011, du Groupe de travail des ESCMID mucormycosis, phaeohyphomycoses, emerging hyalohyphomycoses Guidelines 2011-2013 et co-coordinateur de l'ESCMID rare yeasts guidelines (2011-2013).
- **EUCAST**: Nous participons activement en tant que représentants pour la France à l'AFST (AntiFungal Susceptibility Testing) subcommittee 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 du groupe de travail sur les recommandations pour les mucormycoses (2010-2012) et Stéphane Bretagne de celui concernant le diagnostic de l'aspergillose (ECIL3). Stéphane Bretagne a participé avec Alexandre Alanio (AHU, Hôpital Saint Louis) à la 5éme European Conference on Infections in Leukaemia (ECIL5, 19-20 septembre 2013) sur *Pneumocystis jirovecii* [*Pneumocystis jirovecii* infections in (non HIV-infected) hematology patients: biological aspects].
- **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 (ECSMID), 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.
- Les industriels: de nombreux contacts se développent avec les industriels développant des antifongiques systémiques en raison des vastes missions d'expertise et de surveillance du CNRMA. Ce dernier aspect nous permet d'apprécier l'évolution de la résistance aux antifongiques et de tester un grand nombre de souches sauvages vis-à-vis des nouveaux antifongiques. Les données générées représentent une des meilleures sources d'informations au niveau européen avec la technique EUCAST. A la suite des travaux portant sur la contribution de la 5-fluorocytosine dans le traitement de la cryptococcose, nous avons suscité un groupe de réflexion avec les industriels commercialisant ce produit afin d'assurer sa distribution dans les pays en voie de développement où la cryptococcose liée à l'infection par le VIH représente un problème majeur de santé publique. Olivier Lortholary a participé en 2013-2014 à l'analyse des données issues du protocole de phase III testant l'efficacité de l'isavuconazole en comparaison à celle du voriconazole dans le traitement de l'aspergillose invasive.

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

6.1 Infections à Pneumocystis jirovecii

6.1.1 Recommandations internationales

Le cahier des charges du CNRMA inclut la surveillance de la pneumocystose qui se confirme comme la deuxième infection fongique après les candidémies. Elle pose de nombreux problèmes diagnostiques, car comme toute infection opportuniste, la simple détection du champignon ne signe pas une pathologie.

Stéphane Bretagne et Alexandre Alanio ont participé, dans le cadre du 5th European Conference on Infections in Leukemia (ECIL5) comprenant un groupe d'experts émanant de l'EBMT, EORTC, ICHS, et ELN, à des recommandations sur l'interprétation des résultats dans les maladies hématologiques. Nous avions plus particulièrement en charge l'analyse des moyens diagnostiques, tout en étant associés à la réflexion sur la prise en charge thérapeutique.

Le jeu de diapositives résumant nos principales conclusions est disponible depuis avril 2014 sur le site suivant (http://www.kobe.fr/ecil/telechargements2013/ECIL5 - PjP guidelines- Biology.pdf). Une version complète rédigée est en cours de soumission. Les principales conclusions sont les suivantes avec la gradation habituelle des recommandations :

RECOMMANDATIONS

- Immunofluorescence assays are recommended as the most sensitive microscopic method (**A-II**).
- Real-time PCR is recommended for the routine diagnosis of PCP (**A-II**) although there is presently no threshold for distinguishing carriage from disease.
- Bronchoalveolar lavage (BAL) fluid is recommended as the best specimen as it yields good negative predictive value (**A-II**).
- If bronchoscopy is not an option, induced sputum, nasopharyngeal aspirate, oral wash, and nasal swab can be suitable alternatives (**B-II**) acknowledging that PCP cannot be ruled out in case of a PCR negative result (**A-II**).
- Detecting beta-D-glucan (BG) in serum can contribute to the diagnosis but not the follow-up of PCP (**A-II**). A negative serum BG result can exclude PCP in a patient at risk for the disease (**A-II**) whereas a positive test result may indicate other fungal infections.
- Genotyping using multilocus sequence markers can be used to investigate suspected outbreaks (A-II). The routine detection of dihydropteroate synthase mutations in case of treatment failure is not recommended (B-II) since these mutations do not affect response to high dose cotrimoxazole.
- The clinical utility of these diagnostic tests for the early management of PCP should be further assessed in prospective, randomized interventional studies

6.1.2 Améliorations diagnostiques

Nous avons en parallèle évalué la possibilité de rechercher de l'ADN de *P. jirovecii* sur les aspirations nasales⁹. Nous avons testé 324 aspirations de 324 patients (61% d'immunodéprimés) prélevées en 2012 pour suspicion de grippe et déjà testées pour 18 virus et 4 bactéries. En utilisant notre PCR diagnostique, 16 aspirations (4.9%) étaient positives (4e rang des 23 pathogènes testés). Six patients avaient eu un autre test sur des expectorations et la charge fongique était toujours moindre dans l'aspiration nasale que dans l'expectoration, confirmant notre recommandation de ne pas exclure un diagnostic sur une aspiration PCR-négative. D'un autre côté, comme 5 des 6 patients évalués avec

⁹ Guigue N, *et al.* Utility of adding *Pneumocystis jirovecii* DNA detection in nasopharyngeal aspirates in immunocompromised adult patients with febrile pneumonia. Med Mycol. 2015; 53: 241-247.

un autre test diagnostique ont eu in fine un diagnostic de pneumocystose, cela souligne l'intérêt de la recherche d'ADN de *Pneumocystis* dans le cadre de bilan d'une pneumopathie chez des patients immunodéprimés, ne serait-ce que pour instaurer une prophylaxie anti-*Pneumocystis*. Sachant que cela peut être réalisé à peu de frais puisque l'ADN est déjà extrait pour la recherche de virus et de bactérie, notre étude souligne l'intérêt de recherches couplées mieux intégrées dans le cadre d'évaluation par syndrome (ici pneumopathie) plutôt que par discipline.

6.1.3 **Génotypage**

De nombreuses méthodes de génotypage de *P. jirovecii* ont été rapportées. Le champignon n'étant pas cultivable, la plupart reposent sur des amplifications et un séquençage Sanger des produits de PCR. Cette méthode est notoirement peu sensible pour détecter les génotypes minoritaires dans les prélèvements biologiques.

Nous avons dans un premier temps développé un test SNaPshot ne comportant que l'extension d'un SNP (single nucleotide polymorphism) au cours d'une réaction de polymérisation. Le SNP testé était le mt85 du gène mtLSU rRNA. En évaluant 133 LBA de deux hôpitaux différents [Henri Mondor (n=95) et CHU de Besançon (n=38)] dont la charge fongique avait été évaluée par PCR quantitative, nous avons observé beaucoup plus de mélanges qu'attendus avec la méthode Sanger. En particulier les mélanges de génotypes étaient associés aux fortes charges fongiques. A l'opposé, les faibles charges fongiques étaient associées au génotype mt85A, observation qui n'aurait pas été possible si on n'avait considéré que les LBA positifs en microscopie, soulignant ainsi les biais sur l'épidémiologie du champignon si seuls les prélèvements microscopie positifs sont considérés. Nous avons également retrouvé une association de génotypes avec l'hôpital d'origine, confirmant la circulation interhumaine du champignon. Plus innovant pour la physiopathologie de l'infection, en testant des LBA itératifs chez un patient donné, la variation des proportions des différents génotypes est plus fréquente que le remplacement d'un génotype par un autre. Les hypothèses de remplacement de génotypes avancées quand seule la méthode Sanger était disponible doit donc être nuancées et les deux phénomènes, i.e. variations des pourcentages de génotypes et constantes réinfections, sont probablement la règle. L'étude vient d'être publiée¹⁰.

Pour poursuivre dans le développement d'outils de génotypage et approfondir la question des mélanges, nous avons développé une méthode NGS (Next-Generation Sequencing) et un typage par marqueurs microsatellites. Les analyses comparant en particulier marqueurs mitochondriaux et marqueurs nucléaires sont en cours. En parallèle, une étude validant ces marqueurs au niveau européen et incluant plusieurs centres RESSIF est en cours.

6.2 Diagnostic des infections fongiques

6.2.1 Recommandations internationales de diagnostic, de prévention ou de traitement des infections fongiques invasives

A la suite de notre participation au 2nd ESCMID Conference on Invasive Fungal Infections, 16-18 January 2013, Rome, Italy et de notre conférence « Update on molecular diagnostic tests for yeast and mould infections: where do we stand? (Stéphane Bretagne, 2nd ESCMID Conference on Invasive Fungal Infections, Rome, Italy), nous avons détaillé nos analyses dans deux articles. Le premier reprend les problèmes techniques des PCR en temps réel, avec leur validation, et suggère qu'elles devraient arriver à maturité, du moins pour la recherche dans le sérum pour le diagnostic de l'aspergillose invasive, lors des prochaines définitions des infections fongiques¹¹. Le deuxième

Alanio A, et al. S, Correlation between Pneumocystis jirovecii Mitochondrial Genotype and Fungal Load Assessed by SNaPshot Assay and Quantitative Real-Time PCR. J Eukaryotic Microbiol. 2015 (in press).

Alanio A, Bretagne S. Difficulties with molecular diagnostic tests for mould and yeast infections: where do we stand? Clin Microbiol Infect. 2014; 20(6):27-35. doi: 10.1111/1469-0691.12428.

reprend la question du traitement pré-emptif, qui certes réduit la consommation et le coût des antifongiques, mais dont la pertinence clinique et la sûreté restent à confirmer¹².

Nous avons co-coordonné la conférence de consensus européenne (ECMM/ESCMID) sur la prise en charge des infections à levures rares¹³ et coordonné les recommandations nationales sur la prévention des infections (fongiques) survenant au cours des déficits immunitaires primitifs. Ces dernières recommandations ont fait l'objet d'un article invité par le comité éditorial de Clinical Infectious Diseases¹⁴.

Nous avons par ailleurs activement participé aux conférences de consensus européens (ECMM/ESCMID) sur la prise en charge des mucormycoses, hyalohyphomycoses rares et phaeohyphomycoses ^{15,16,17} et au consensus européen sur la prévention et la prise en charge des infections fongiques invasives survenant chez les transplantés d'organes solides ¹⁸.

6.2.2 Améliorations diagnostiques

En raison des difficultés d'identification des *Mucorales* dans les prélèvements cliniques, nous avons mis à profit la disponibilité à l'hôpital St Louis d'un nouvel appareil de séquençage (Plex ID) basé sur l'analyse des produits d'amplification par spectrométrie de masse (PCR electrosprayionization mass spectrometry) et la collection d'échantillons disponibles adossée à l'étude Ambyzygo. Les isolats correspondants, quand la culture avait été positive, avaient tous été re-identifiées au CNRMA. L'étude a montré une excellente sensibilité et spécificité du Plex-ID, en particulier par rapport aux autres méthodes publiées. En particulier, le Plex-ID est supérieur aux méthodes publiées utilisant les amplifications ITS¹⁹.

Le CNRMA a également participé activement à l'identification et la caractérisation des isolats d'*Aspergillus fumigatus* résistants aux azolés, dont la prévalence en hématologie reste pour l'instant de bien moindre envergure que rapportée dans d'autres pays européens, ainsi qu'à la description de nouvelles espèces en pathologie humaine^{20,21}.

En parallèle des méthodes moléculaires, le CNRMA poursuit ses investigations sur d'autres méthodes diagnostiques. La recherche du galactomannane (GM) sérique par un test ELISA (Platelia Aspergillus fumigatus, Bio-Rad) est un élément majeur du diagnostic et du suivi thérapeutique des aspergilloses invasives. Ce test est connu pour avoir un fort taux de faux positifs. Cependant, ces faux positifs sont d'origines diverses, soit opérationnels (due à l'extraction du galactomannane ou à la réaction ELISA elle-même), soit due au sérum lui-même (e.g. contamination d'antibiotiques perfusés par du GM). Nous avons entrepris une étude sur 550 sérums consécutifs en comparant les résultats de routine avec ceux obtenus par un technicien Bio-Rad dédié à cette étude. Nous montrons que le taux de positifs non reproductibles opérationnels représente jusqu'à 30% des tests positifs, justifiant

¹² Cordonnier C, *et al.* Antifungal pre-emptive strategy for high-risk neutropenic patients: why the story is still ongoing. Clin Microbiol Infect. 2014; 20 Suppl 6:27-35.

¹³ Arendrup MC, *et al.* ESCMID and ECMM joint clinical guidelines for the diagnosis and management of rare invasive yeast infections. Clin. Microbiol. Infect. 2014; 20 Suppl 3:76–98.

¹⁴ Aguilar C, *et al.* Prevention of infections during primary immunodeficiency. Clin Infect Dis 2014. 59:1462–1470.

¹⁵ Cornely OA, *et al.* ESCMID and ECMM joint clinical guidelines for the diagnosis and management of mucormycosis 2013. Clin. Microbiol Infect. 2014; 20 (Suppl. 3): 5–26

¹⁶ Tortorano AM, *et al.* ESCMID and ECMM joint guidelines on diagnosis and management of hyalohyphomycosis: Fusarium spp., Scedosporium spp. and others. Clin Microbiol Infect. 2014; 20 Suppl 3:27–46.

¹⁷ Chowdhary A, *et al.* ESCMID and ECMM joint clinical guidelines for the diagnosis and management of systemic phaeohyphomycosis: diseases caused by black fungi. Clin Microbiol Infect. 2014; 20 Suppl 3:47–75.

¹⁸ Gavaldà J, *et al.* Invasive fungal infections in solid organ transplant recipients. Clin Microbiol Infect. 2014; 20 Suppl 7:27–48.

¹⁹ Alanio A, *et al.* Molecular identification of Mucorales in human tissues: contribution of PCR electrospray-ionization mass spectrometry. Clin Microbiol Infect. 2015 [Epub ahead of print]

de Fontbrune FS, et al. Iterative breakthrough invasive aspergillosis due to TR(34) /L98H azole-resistant Aspergillus fumigatus and Emericella sublata in a single hematopoietic stem cell transplant patient. Transpl Infect Dis. 2014; 16(4):687-91.

²¹ Rocchi S, *et al.* Azole-resistant Aspergillus fumigatus isolate with the TR34/L98H mutation in both a fungicide-sprayed field and the lung of a hematopoietic stem cell transplant recipient with invasive aspergillosis. J Clin Microbiol. 2014; 52(5):1724-6

amplement la recommandation du fabricant de retester le même prélèvement, ou de tester un deuxième prélèvement dans les plus brefs délais pour éviter des investigations ou des traitements inutiles. Cette étude permet également de clore la question de la conservation du GM à -20°C. Certaines études rapportaient la diminution du GM après passage à -20°C, alors que les sérums n'avaient pas été contrôlés avant stockage. Nous montrons ici clairement que la conservation à -20°C ne modifie pas le taux de GM, pour autant que seuls les sérums confirmés positifs soient considérés et que les faux positifs opérationnels soient exclus²². D'autres études pour élucider cette fois les faux positifs dus au sérum sont en cours.

Nous avons contribué à l'écriture de trois articles de synthèse de la littérature sur des entités de mycologie médicale mal connues : une mise au point sur l'utilisation des antifongiques au cours de la grossesse²³ et deux autres sur le diagnostic et la prise en charge des atteintes ostéo-articulaires au cours des aspergilloses invasives²⁴ et au cours des infections à champignons dimorphiques²⁵.

6.3 Participation aux groupes de travail internationaux sur le "barcoding of fungi" et création d'une base de données de séquences

Le CNRMA a donc fourni les séquences de 227 espèces fongiques (93 filamenteux et 134 levures) pour implémenter la base de données "ISHAM ITSdatabase" hébergée à l'université de Sydney (http://its.mycologylab.org/). La publication correspondant à ce gros travail collaboratif international vient d'être acceptée dans Medical Mycology²⁶.

6.4 Mise en place d'une base de données de séquences Institut Pasteur FungiBank

Nous évoquons depuis 2 ans la création d'une base de données compilant les données d'identification polyphasique réalisée au CNRMA. C'est chose faite avec la création de « Institut Pasteur FungiBank », en collaboration avec Vincent Robert (société BioAware). Cette base de données a été construite avec le logiciel Biolomics. Elle est constituée des séquences ADN de pathogènes fongiques (levures et champignons filamenteux) associés aux données morphologiques et physiologiques des souches reçues au CNRMA. Une phase pilote (novembre 2104-Juin 2015) avec un accès limité aux laboratoires participants à RESSIF a pour but de tester la fonctionnalité du site, de détecter des bugs et de susciter des commentaires. Le site sera ouvert ensuite http://fungibank.pasteur.fr/. Les curateurs de FungiBank sont Marie DESNOS-OLLIVIER (levures) et Dea GARCIA-HERMOSO (champignons filamenteux) (Figure 25).

La principale fonction de FungiBank est l'identification « moléculaire » en ligne par les biais de recherche de similarité basé sur « pairwise alignments ». 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*).

²² Guigue N, *et al.* Importance of operational factors in the reproducibility of *Aspergillus* galactomannan enzyme immune assay, Plos One Pone (in press), + e-poster 54th ICAAC Washington, Sept 2014 (e-poster#1863).

²³ Pilmis B, *et al.* Antifungal drugs during pregnancy: an updated review. J. Antimicrob Chemother. 2015; 70:14–22.

²⁴ Gamaletsou MN, et al. Aspergillus osteomyelitis: Epidemiology, clinical manifestations, management, and outcome. J Infect. 2014; 68(5):478-493

²⁵ Rammaert B, et al. Dimorphic fungal osteoarticular infections. Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. 33:2131–2140.

²⁶ 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. 2015;001-25

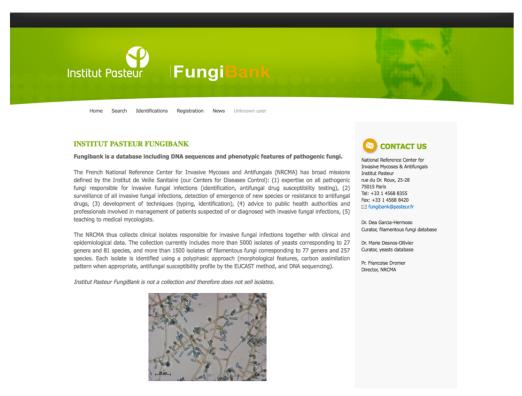


Figure 25 : Page d'accueil de la nouvelle base de données d'identification des champignons pathogènes

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-α ou RPB2 pour *Fusarium* spp., β-tubuline pour *Aspergillus* spp. ou IGS pour *Trichosporon* spp. et *Cryptococcus* spp.

Les informations disponibles pour chaque « souche » 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 116 séquences (ITS, 26S, IGS, actine, FKS) pour 978 souches de levures et 855 séquences (18S, ITS, 28S, calmoduline, Beta tubuline, EF1alpha, RPBA, CYP51) pour 491 souches de champignons filamenteux. Elle est implémentée chaque mois avec les nouvelles données disponibles.

6.5 Analyse de l'incidence des mycoses invasives grâce à la base PMSI

Nous avons mené avec l'InVS une étude en population afin d'étudier l'épidémiologie et les tendances évolutives des infections fongiques invasives (IFI) en utilisant les données de la base hospitalière PMSI entre 2001 et 2010². Pour cela, nous avons analysé leur incidence, les facteurs de risque et la mortalité hospitalière des IFI les plus fréquentes en France. Nous avons identifié 35,876 cas d'IFI, incluant les candidémies (43,4%), les pneumopathies à Pneumocystis jirovecii (26,1%), l'aspergillose invasive (23,9%), la cryptococcose (5,2%) et la mucormycose (1,5%). L'incidence globale des IFI était de 5,9/100,000 patients années et le taux de mortalité était de 27,6%, les deux paramètres augmentant au cours de la période respectivement de 1,5% et 2,9%/an. L'augmentation d'incidence était significative pour les candidémies, l'aspergillose invasive et la mucormycose. L'incidence de la pneumocystose augmentait chez les sujets séronégatifs pour le VIH de 13,3% par an et diminuait de 14,3% par an chez les patients infectés par le VIH. L'incidence des candidémies et des aspergilloses invasives augmentait de 4% par an au cours des hémopathies malignes et chez les patients atteints d'insuffisance rénale chronique (4 et 10% par an, respectivement). La mortalité hospitalière

augmentait chez les patients atteints d'hémopathie maligne. L'analyse de ces données démontre que les IFI représentent désormais une authentique priorité de santé publique en France.

6.6 Analyse des candidémies en réanimation dans 24 hôpitaux d'Ile-de-France

Grâce à l'ODL mis en place en 2002, nous avons analysé les tendances évolutives d'incidence et de mortalité des candidémies liées aux espèces les plus fréquentes chez les patients hospitalisés en réanimation et précisé les facteurs de risque d'observer une espèce particulière et de décès.

Nous avons inclus 2507 cas avec un total de 2571 isolats de Candida dont les espèces étaient C. albicans (56%), C. glabrata (18,6%), C. parapsilosis (11,5%), C. tropicalis (9,3%), C. krusei (2,9%) et C. kefyr (1,8%). Les candidémies survenaient en réanimation chez 1206 patients (48,1%). En comparant les patients hospitalisés en réanimation aux autres patients, les premiers avaient plus souvent un antécédent chirurgical récent, étaient plus souvent pré-exposés au fluconazole et traités de première intention par une échinocandine et moins souvent infectés par C. parapsilosis. Une augmentation significative de l'incidence était observée dans la population globale et en réanimation. Le risque d'être infecté par une espèce particulière était influencé par les facteurs de risque et la préexposition au fluconazole ou à la caspofungine. Un traitement initial par échinocandine était plus fréquemment utilisé (4,6% la 1^{ere} année d'étude à 48,5% la dernière année). Le risque de décès à J30 était plus élevé chez les patients de réanimation (OR [IC 95%]= 2,12 [1,66-2,72]). Le risque de décès augmentait significativement au cours du temps, en réanimation, (de 41,5% la 1^{ere} année à 56,9% la dernière année pour la mortalité globale à J30, et de 28,7% à 38,8% pour la mortalité précoce avant J8). Les facteurs de risque indépendants associés au décès à J30 en réanimation étaient l'âge, un cathéter artériel, l'espèce de Candida, la pré-exposition à la caspofungine et l'absence de traitement antifongique au moment du résultat des hémocultures. Ces résultats démontrent que malgré la mise à disposition de nouveaux antifongiques et les nombreuses recommandations de prise en charge, l'incidence et la mortalité des candidoses à Paris augmente de manière préoccupante²⁷.

6.7 Etude du délai de positivité des hémocultures au cours des fongémies

Afin d'étudier les facteurs influençant le délai d'incubation dans les laboratoires de microbiologie utilisant le système BacT/ALERT, nous avons analysé 1741 épisodes de fongémie à levures dans 12 hôpitaux d'Île-de-France entre 2002 et 2009, en utilisant la base de données de l'ODL. Le délai moyen d'incubation était globalement de $2,17 \pm 1,10$ j et de $2,97 \pm 1,18$ j pour les 289 épisodes liés à C. glabrata. Il était ≤ 2 j pour 1221 (70%) et ≥ 2 jours pour 520 (30%) des 1741 épisodes. La proportion de certaines espèces variait en fonction du délai d'incubation. Ainsi, l'isolement de C. glabrata augmentait de 8,9% (108/1221) à 34,8% (181/520) selon que l'on considérait les hémocultures positives en ≤ 2 j ou ≥ 2 jours, respectivement. De manière analogue, les fongémies à Cr. neoformans représentaient seulement 0,9% (11/1221) des fongémies ≤ 2 j et 8,6% (45/520) ensuite²⁸.

6.8 Mucormycoses post-traumatiques

Le CNRMA a initié et coordonné une étude rétrospective nationale sur la description et le pronostic des mucormycoses post-traumatiques (PTM) à partir de la base de données « RétroZygo" et entrepris une analyse de la littérature entre 1993 to 2013. Les PTM (n =16) différaient des autres formes (n=85) par la rareté des pathologies immunodéprimantes sous-jacentes (31,2% vs. 81%), la fréquence des localisations cutanées (87% vs. 7%), le délai bref précédant le diagnostic (4,5 vs. 21 j), les espèces en cause (ici plus fréquemment *Apophysomyces elegans* complex et *Saksenaea vasiformis*), le recours plus important à la chirurgie (93,7% vs. 47%) et une meilleure survie (87,5% vs. 47,6% à J90). Cent vingt-deux cas de PTM publiés ont été analysés. Ils étaient survenus après accident de la circulation

²⁷ Lortholary O, *et al.* Worrisome trends in incidence and mortality of candidemia in intensive care units (Paris area, 2002-2010). Intensive Care Med 2014; 40:1303–1312.

Paugam A, et al. Longer incubation times for yeast fungemia: importance for presumptive treatment. Diag Microbiol Infect Dis. 2014; 80:119–121.

(37%) ou accidents domestiques (15.1%) ou après désastre naturel (13,4%). Une prise de conscience de la gravité de ces infections et de leur potentiel survenue dans ce contexte de blessures souillées est donc nécessaire²⁹.

6.9 Champignons émergents d'importation ou désormais autochtones

Nous avons conduit une étude thérapeutique rétrospective concernant onze cas de mycétomes fongiques traités par voriconazole ou posaconazole pendant au moins 6 mois au Centre d'Infectiologie Necker-Pasteur. Pour la première fois, la réponse au traitement a été appréciée par l'évolution clinique couplée à celle de l'IRM. La mesure des concentrations de (1→3) β-D-glucanes (BG) et la tomographie par émission de positron utilisant le [18F] fluorodeoxyglucose (PET/CT). Les patients ont été traités en moyenne pendant 25,9±18 mois. Une réponse complète était observée chez 5/11 patients, partielle chez 5 avec un seul échec et un suivi moyen de 73±39 [6-132] mois. De manière intéressante, la négativation du BG et la normalisation du PET/CT étaient associées à un pronostic favorable³⁰.

Le CNRMA a permis le diagnostic de kératite sévère d'importation à *Pythium insidiosum*, oomycète aquatique endémique en Asie, chez une femme de 30 ans qui s'est baignée avec ses lentilles de contact en piscine en Thaïlande³¹, celui d'histoplasmose africaine pulmonaire cavitaire à *Histoplasma capsulatum* var *duboisii* acquise en Angola quarante ans auparavant chez un immunocompétent³² et le diagnostic d'abcès cérébral à *Cladophialophora bantiana*, champignon filamenteux noir très virulent, chez un immunodéprimé de 74 ans de la région de Pau³³. Pour ces trois observations, le CNRMA a par ailleurs guidé la stratégie thérapeutique.

6.10 Les publications et communications en lien avec les activités du CNR

<u>Invitations dans des congrès internationaux</u>

- AFRAVIH (congrès africain sur l'infection par le VIH), Montpellier 28 avril 2014 : « Management of cryptococcal meningitis in AIDS » (O. Lortholary)
- Transplant Infectious Diseases Society Meeting, May 9th 2014, Barcelona, « Fungal infections in the returning solid organ transplant traveler/immigrant from the tropics » (O. Lortholary)
- European Congress Clinical Microbiology Infectious Diseases, May 12th 2014, Barcelona, Spain : « Advances in antifungal therapy of cryptococcal infections in HIV-infected pts » (O. Lortholary)
- Organizer and chairman of the International Congress on Cryptococcus and Cryptococcosis Clinical Master Class, May 19th, 2014, Amsterdam, Netherlands. « Hot topics in the management of cryptococcal meningitis » (O. Lortholary)
- Congress of the Nordic Medical Mycology Society, Oslo, May 21st, 2014 « Fungal infections in the returning immunosuppressed traveler from the tropics » and « Pulmonary mucormycosis » (O. Lortholary)
- Joint Annual Meeting of the Swiss Society for Infectious Diseases, the Swiss Society for Hospital
 Hygiene and the Swiss Specialists for Tropical and Travel Medicine, 28-29 August 2014, Aarau,
 Switzerland: « Invasive fungal infections in solid organ and hematopoietic stem cell transplant
 recipients » (O. Lortholary)
- 24th ECCMID. Barcelona. A. Alanio et al. Ultra Deep PyroSequencing reveals a large diversity of

²⁹ Lelievre L, *et al.* Posttraumatic mucormycosis: a nationwide study in France and review of the literature. Medicine (Baltimore) 2014; 93:395–404.

Crabol Y, et al. Last generation triazoles for imported eumycetoma in eleven consecutive adults. PLoS Negl Trop Dis 2014; 8:e3232.

³¹ Lelievre L, *et al.* Imported *Pythium insidiosum* Keratitis After a Swim in Thailand by a Contact Lens-Wearing Traveler. Am J Trop Med Hyg 2015; 92:270–273.

³² Richaud C, *et al.* Imported African histoplasmosis in an immunocompetent patient 40 years after staying in a disease-endemic area. Am J Trop Med Hyg. 2014; 91:1011–1014.

Bonnet C, *et al.* [Cladophialophora bantiana brain abscess: a case with long survival in metropolitan France]. Rev Neurol. 2014; 170:146–148.

- Pneumocystis jirovecii in clinical samples (A. Alanio)
- 24th ECCMID. Barcelona. M. Gits-Muselli, J. Menotti, N. Guigue, S. Bretagne, A. Alanio. Microsatellite-based molecular typing method for *Pneumocystis jirovecii* (A. Alanio)
- International workshop on opportunistic protists (IWOP). Séville. 13-15 Novembre 2014. A. Alanio *et al.* Ultra Deep PyroSequencing of *Pneumocystis jirovecii* reveals higher diversity than previously stated (A. Alanio)
- IWOP. Séville. 13-15 Novembre 2014. A. Alanio, M. Olivi, O. Cabaret, F. Foulet, A-P. Bellanger, L. Millon, A. Berceanu, C. Cordonnier, J-M. Costa, and S. Bretagne. Association between *Pneumocystis jirovecii* mitochondrial genotypes and fungal load and renal transplant patients using a SNaPshot assay and quantitative real-time PCR (A. Alanio)
- IWOP. Séville 13-15 Novembre 2014. A. Alanio *et al.* Microsatellite-based molecular typing method for *Pneumocystis jirovecii* (A. Alanio)
- IWOP. Séville. 13-15 Novembre 2014. A. Alanio *et al.* Short tandem repeat genotyping for *P. jirovecii* is more sensitive to mixed genotype than MLST (S. Bretagne)

Congrès nationaux

- CHU de Cayenne/Institut Pasteur de Guyane, 11-13 janvier 2014 : « Invasive fungal infections in our hospitals today » ; « Antifongiques » ; « Histoplasmose » (O. Lortholary)
- Société Française d'Hématologie, La Défense, Paris 26 mars 2014 : « L'utilisation à large échelle des antifongiques impacte-t-elle l'épidémiologie des infections fongiques invasives ? » (O. Lortholary)
- Organisateur et modérateur du symposium lors des 15é Journées Nationales d'Infectiologie, Bordeaux, 11-13 juin 2014 : « Quoi de neuf dans la prise en charge des infections à levures » ? (O. Lortholary)
- Journées de Médecine Interne de Lyon, 26 juin 2014 : « Granulomatose septique chronique » (O. Lortholary)
- Journées d'endocrinologie de l'hôpital Bicêtre, 19 septembre 2014 : « Urgences infectieuses chez le diabétique » (O. Lortholary)
- Journée de Claude Bernard, Paris 9 novembre 2014 : « Candidémies en Ile de France » (O. Lortholary)
- Réunion de pneumologie de l'hôpital Tenon, Paris 18 novembre 2014 : « Mucormycoses pulmonaires ». (O. Lortholary)
- Diplôme d'Université « Transplantation pulmonaire », Centre Chirurgical Marie Lannelongue, Paris 22 novembre 2014 : « Infections fongiques en transplantation pulmonaire » (O. Lortholary)
- RICAI 2014, La Défense, Paris 27-28 novembre 2014 : « Associations antifongiques » et « Traitement optimal des candidémies en réanimation » (O. Lortholary)
- Journée P Bourgeois de Pneumologie, Paris 29 novembre 2014 : « Complications infectieuses pulmonaires des biothérapies » (O. Lortholary)

Publications nationales

- Develoux M, Bretagne S. Candidoses et autres levuroses EMC Maladies infectieuses 2014 http://dx.doi.org/10.1016/S1166-8598(14)60178-2
- Alanio A, Bretagne S. Emergence de la résistance aux azolés d'Aspergillus fumigatus: du risque individuel au risque environnemental Journal de Biologie Médicale / Volume 3-Numéro 9 / Avr-Juin 2014; 15-19

- Alanio A, Renaudat C, Bretagne S. Épidémiologie de la résistance des champignons : impact de nos prescriptions d'antifongiques. Journal des Anti-infectieux (2014) 16, 2—7. http://dx.doi.org/10.1016/j.antinf.2014.01.006
- Alanio A, Bretagne S Difficultés de diagnostic et d'expertise microbiologique des infections fongiques invasives (*). Feuillets de Biologie VOL LV N° 318 - Mai 2014
- Desoubeaux G, Leperlier M, Chaussade H, Schneider C, Roriz M, Houssin C, Rogez C, De Muret A, Garcia-Hermoso D, Bailly E, Le Fourn E, Machet L, Chandenier J, Bernard L. [Cutaneous mucormycosis caused by Rhizopus microsporus]. Ann Dermatol Venereol. 2014; 141:201-5.

Publications internationales

- 1. Alanio A, Bretagne S. Difficulties with molecular diagnostic tests for mould and yeast infections: where do we stand? Clin. Microbiol. Infect. 2014.;20 Suppl 6:36–41.
- 2. Alanio A, Olivi, M Cabaret O, Foulet F, Bellanger A-P, Millon L, Berceanu A, Cordonnier C, Costa J-M, Bretagne S, Correlation between *Pneumocystis jirovecii* Mitochondrial Genotype and Fungal Load Assessed by SNaPshot Assay and Quantitative Real-Time PCR. J Eukaryotic Microbiol. 2015 (in press).
- 3. Aguilar C, Malphettes M, Donadieu J, Chandesris O, Coignard-Biehler H, Catherinot E, Pellier I, Stephan J-L, Le Moing V, Barlo et al. Prevention of infections during primary immunodeficiency. Clin Infect Dis. 2014; 59:1462–1470.
- 4. Arendrup MC, Boekhout T, Akova M, Meis JF, Cornely OA, Lortholary O, group EEs, ECMM. ESCMID and ECMM joint clinical guidelines for the diagnosis and management of rare invasive yeast infections. Clin Microbiol Infect. 2014; 20 Suppl 3:76-98.
- 5. Bitar D, Lortholary O, Le Strat Y, Nicolau J, Coignard B, Tattevin P, Che D, Dromer F. Population-Based Analysis of Invasive Fungal Infections, France, 2001–2010. Emerging Infect. Dis. 2014; 20:1163–1169.
- 6. Cabaret O, Puel O, Botterel F, Delaforge M, Bretagne S. Metabolic detoxification pathways for 5-methoxy-sterigmatocystin in primary tracheal epithelial cells. Xenobiotica. 2014; 44:1-9.
- 7. Chowdhary A, Meis JF, Guarro J, de Hoog GS, Kathuria S, Arendrup MC, Arikan-Akdagli S, Akova M, Boekhout T, Caira M, Guinea J, Chakrabarti A, Dannaoui E, van Diepeningen A, Freiberger T, Groll AH, Hope WW, Johnson E, Lackner M, Lagrou K, Lanternier F, Lass-Florl C, Lortholary O, Meletiadis J, Munoz P, Pagano L, Petrikkos G, Richardson MD, Roilides E, Skiada A, Tortorano AM, Ullmann AJ, Verweij PE, Cornely OA, Cuenca-Estrella M. ESCMID and ECMM joint clinical guidelines for the diagnosis and management of systemic phaeohyphomycosis: diseases caused by black fungi. Clin Microbiol Infect. 2014; 20 Suppl 3:47-75.
- 8. Cordonnier C, Robin C, Alanio A, Bretagne S. Antifungal pre-emptive strategy for high-risk neutropenic patients: why the story is still ongoing. Clin Microbiol Infect. 2014; 20 Suppl 6:27-35.
- 9. Cornely OA, Arikan-Akdagli S, Dannaoui E, Groll AH, Lagrou K, Chakrabarti A, Lanternier F, Pagano L, Skiada A, Akova M, Arendrup MC, Boekhout T, Chowdhary A, Cuenca-Estrella M, Freiberger T, Guinea J, Guarro J, de Hoog S, Hope W, Johnson E, Kathuria S, Lackner M, Lass-Florl C, Lortholary O, Meis JF, Meletiadis J, Munoz P, Richardson M, Roilides E, Tortorano AM, Ullmann AJ, van Diepeningen A, Verweij P, Petrikkos G. ESCMID and ECMM joint clinical guidelines for the diagnosis and management of mucormycosis 2013. Clin Microbiol Infect. 2014; 20 Suppl 3:5-26.
- 10. Crabol Y, Poiree S, Bougnoux ME, Maunoury C, Barete S, Zeller V, Arvieux C, Pineau S, Amazzough K, Lecuit M, Lanternier F, Lortholary O, French Mycosis Study G. Last

- generation triazoles for imported eumycetoma in eleven consecutive adults. PLoS Negl Trop Dis. 2014; 8:e3232.
- 11. de Fontbrune FS, Denis B, Meunier M, Garcia-Hermoso D, Bretagne S, Alanio A. Iterative breakthrough invasive aspergillosis due to TR /L98H azole-resistant *Aspergillus fumigatus* and Emericella sublata in a single hematopoietic stem cell transplant patient. Transpl Infect Dis. 2014; 16: 687-691
- 12. Denis B, Guiguet M, de Castro N, Mechai F, Revest M, Mahamat A, Gregoire GM, Lortholary O, Costagliola D. Critical importance of long-term adherence to care in HIV infected patients in the cART era: new insights from *Pneumocystis jirovecii* pneumonia cases over 2004-2011 in the FHDH-ANRS CO4 cohort. PLoS One. 2014; 9:e94183.
- 13. Desnos-Ollivier M, Blanc C, Garcia-Hermoso D, Hoinard D, Alanio A, Dromer F. Misidentification of *Saprochaete clavata* as *Magnusiomyces capitatus* in clinical isolates: utility of internal transcribed spacer sequencing and matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry and importance of reliable databases. J Clin Microbiol. 2014; 52:2196-8. 11.
- 14. Desoubeaux G, Garcia D, Bailly E, Augereau O, Bacle G, De Muret A, Bernard L, Cano-Lira JF, Garcia-Hermoso D, Chandenier J. Subcutaneous phaeohyphomycosis due to *Phialemoniopsis ocularis* successfully treated by voriconazole. Med Mycol Case Rep. 2014; 5:4-8.
- Gamaletsou MN, Rammaert B, Bueno MA, Moriyama B, Sipsas NV, Kontoyiannis DP, Roilides E, Zeller V, Prinapori R, Taj-Aldeen SJ, Brause B, Lortholary O, Walsh TJ. 2014. Aspergillus osteomyelitis: epidemiology, clinical manifestations, management, and outcome. J. Infect. 68:478–493.
- 16. Gavalda J, Meije Y, Fortun J, Roilides E, Saliba F, Lortholary O, Munoz P, Grossi P, Cuenca-Estrella M. Invasive Fungal Infections in SOT Recipients. Clin Microbiol Infect. 2014;
- 17. Guigue N, Alanio A, Menotti J, Castro ND, Hamane S, Peyrony O, LeGoff J, Bretagne S. 2015. Utility of adding *Pneumocystis jirovecii* DNA detection in nasopharyngeal aspirates in immunocompromised adult patients with febrile pneumonia. Med. Mycol. 53:241–247.
- 18. Irinyi L, Serena C, Garcia-Hermoso D, Arabatzis M, Desnos-Ollivier M, Vu D, Cardinali G, Arthur I, Normand A-C, Giraldo A, da Cunha KC, Sandoval-Denis M, Hendrickx M, Nishikaku AS, de Azevedo Melo AS, Merseguel KB, Khan A, Rocha JAP, Sampaio P, da Silva Briones MR, Carmona E Ferreira R, Muniz M de M, Castañón-Olivares LR, Estrada-Barcenas D, Cassagne C, Mary C, Duan SY, Kong F, Sun AY, Zeng X, Zhao Z, Gantois N, Botterel F, Robbertse B, Schoch C, Gams W, Ellis D, Halliday C, Chen S, Sorrell TC, Piarroux R, Colombo AL, Pais C, de Hoog S, Zancopé-Oliveira RM, Taylor ML, Toriello C, de Almeida Soares CM, Delhaes L, Stubbe D, Dromer F, Ranque S, Guarro J, Cano-Lira JF, Robert V, Velegraki A, Meyer W. 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. 2015. myv008.
- 19. Jamilloux Y, Valeyre D, Lortholary O, Bernard C, Kerever S, Lelievre L, Neel A, Broussolle C, Seve P. The spectrum of opportunistic diseases complicating sarcoidosis. Autoimmun Rev. 2014; 14:64-74.
- 20. Lanternier F, Barbati E, Meinzer U, Liu L, Pedergnana V, Migaud M, Heritier S, Chomton M, Fremond ML, Gonzales E, Galeotti C, Romana S, Jacquemin E, Angoulvant A, Bidault V, Canioni D, Lachenaud J, Mansouri D, Mahdaviani SA, Adimi P, Mansouri N, Jamshidi M, Bougnoux ME, Abel L, Lortholary O, Blanche S, Casanova JL, Picard C, Puel A. Inherited

- CARD9 Deficiency in 2 Unrelated Patients With Invasive *Exophiala Infection*. J Infect Dis. 2015; 211 (8): 1241-1250
- 21. Lelievre L, Borderie V, Garcia-Hermoso D, Brignier AC, Sterkers M, Chaumeil C, Lortholary O, Lanternier F. Imported Pythium insidiosum Keratitis After a Swim in Thailand by a Contact Lens-Wearing Traveler. Am J Trop Med Hyg. 2015; 92:270-3.
- 22. Lelievre L, Garcia-Hermoso D, Abdoul H, Hivelin M, Chouaki T, Toubas D, Mamez AC, Lantieri L, Lortholary O, Lanternier F, French Mycosis Study Group. Posttraumatic mucormycosis: a nationwide study in France and review of the literature. Medicine (Baltimore). 2014; 93:395-404.
- 23. Lortholary O, Renaudat C, Sitbon K, Madec Y, Denoeud-Ndam L, Wolff M, Fontanet A, Bretagne S, Dromer F, French Mycosis Study G. Worrisome trends in incidence and mortality of candidemia in intensive care units (Paris area, 2002-2010). Intensive Care Med. 2014; 40:1303-12.
- 24. Michot JM, Gubavu C, Fourn E, Maigne G, Teicher E, Angoulvant A, Blanche S, Lortholary O, Coilly A, Duclos-Vallee JC, Sebagh M, Guettier C, Aumont C, Delfraissy JF, Lambotte O. Very prolonged liposomal amphotericin B use leading to a lysosomal storage disease. Int J Antimicrob Agents. 2014; 43:566-9.
- 25. Nucci M, Marr KA, Vehreschild MJ, de Souza CA, Velasco E, Cappellano P, Carlesse F, Queiroz-Telles F, Sheppard DC, Kindo A, Cesaro S, Hamerschlak N, Solza C, Heinz WJ, Schaller M, Atalla A, Arikan-Akdagli S, Bertz H, Galvao Castro C, Jr., Herbrecht R, Hoenigl M, Harter G, Hermansen NE, Josting A, Pagano L, Salles MJ, Mossad SB, Ogunc D, Pasqualotto AC, Araujo V, Troke PF, Lortholary O, Cornely OA, Anaissie E. Improvement in the outcome of invasive fusariosis in the last decade. Clin Microbiol Infect. 2014; 20:580-5.
- 26. Paugam A, Ancelle T, Lortholary O, Bretagne S, French Mycosis Study G. Longer incubation times for yeast fungemia: importance for presumptive treatment. Diagn Microbiol Infect Dis. 2014; 80:119-21.
- 27. Pilmis B, Jullien V, Sobel J, Lecuit M, Lortholary O, Charlier C. Antifungal drugs during pregnancy: an updated review. J. Antimicrob. Chemother. 2015. 70:14–22.
- 28. Richaud C, Chandesris MO, Lanternier F, Benzaquen-Forner H, Garcia-Hermoso D, Picard C, Catherinot E, Bougnoux ME, Lortholary O. Imported African Histoplasmosis in an Immunocompetent Patient 40 Years after Staying in a Disdease-Endemic Area. Am J Trop Med Hyg. 2014;
- 29. Rocchi S, Daguindau E, Grenouillet F, Deconinck E, Bellanger AP, Garcia-Hermoso D, Bretagne S, Reboux G, Millon L. Azole-resistant Aspergillus fumigatus isolate with the TR34/L98H mutation in both a fungicide-sprayed field and the lung of a hematopoietic stem cell transplant recipient with invasive aspergillosis. J Clin Microbiol. 2014; 52:1724-6.
- 30. Tavernier E, Desnos-Ollivier M, Honeyman F, Srour M, Fayard A, Cornillon J, Augeul-Meunier K, Guyotat D, Raberin H. Development of echinocandin resistance in *Candida krusei* isolates following exposure to micafungin and caspofungin in a BM transplant unit. Bone Marrow Transplant. 2015; 50:158-60.
- 31. Tortorano AM, Richardson M, Roilides E, van Diepeningen A, Caira M, Munoz P, Johnson E, Meletiadis J, Pana ZD, Lackner M, Verweij P, Freiberger T, Cornely OA, Arikan-Akdagli S, Dannaoui E, Groll AH, Lagrou K, Chakrabarti A, Lanternier F, Pagano L, Skiada A, Akova M, Arendrup MC, Boekhout T, Chowdhary A, Cuenca-Estrella M, Guinea J, Guarro J, de Hoog S, Hope W, Kathuria S, Lortholary O, Meis JF, Ullmann AJ, Petrikkos G, Lass-Florl C. ESCMID and ECMM joint guidelines on diagnosis and management of hyalohyphomycosis: Fusarium spp., Scedosporium spp. and others. Clin Microbiol Infect. 2014; 20 Suppl 3:27-46.

- 32. Vaux S, Criscuolo A, Desnos-Ollivier M, Diancourt L, Tarnaud C, Vandenbogaert M, Brisse S, Coignard B, Dromer F, The Geotrichum Investigation G. Multicenter Outbreak of Infections by *Saprochaete clavata*, an Unrecognized Opportunistic Fungal Pathogen. mBio. 2014; 5
- 33. Vironneau P, Kania R, Morizot G, Elie C, Garcia-Hermoso D, Herman P, Lortholary O, Lanternier F, French Mycosis Study G. Local control of rhino-orbito-cerebral mucormycosis dramatically impacts survival. Clin Microbiol Infect. 2014; 20:O336-9.
- 34. Walsh TJ, Skiada A, Cornely OA, Roilides E, Ibrahim A, Zaoutis T, Groll A, Lortholary O, Kontoyiannis DP, Petrikkos G. Development of new strategies for early diagnosis of mucormycosis from bench to bedside. Mycoses. 2014; 57 Suppl 3:2-7.
- 35. Yang ZT, Wu L, Liu XY, Zhou M, Li J, Wu JY, Cai Y, Mao EQ, Chen EZ, Lortholary O. Epidemiology, species distribution and outcome of nosocomial *Candida* spp. bloodstream infection in Shanghai. BMC Infect Dis. 2014; 14:241.

Chapitre de livres ou publications autres

- 1. Bonnet C, Garcia-Hermoso D, Bertandeau E, Lortholary O, Kervinio C, Bonnan M. [Cladophialophora bantiana brain abscess: a case with long survival in metropolitan France]. Rev Neurol (Paris). 2014; 170:146-8.
- 2. Bretagne S, Cabaret O, Costa JM. Molecular Biology of Food and Water Borne Mycotoxigenic and Mycotic Fungi. Recommendations for Quantitative PCR Aspergillus Assays, Chapter 8. Edited byRobert Russell Monteith Paterson, Nelson Manuel Viana Silva Lima (in press)
- 3. Alanio A, Bretagne S. Diagnosis of *Pneumocystis jirovecii* Pneumonia: Role of β-D-Glucan Detection and PCR Current Fungal Infection Reports; on-line 14 August 2014; DOI 10.1007/s12281-014-0198-6.
- 4. Crabol Y, Lortholary O. Invasive mold infections in solid organ transplant recipients. Scientifica (Cairo). 2014; 2014:821969.
- 5. Robin C, Alanio A, Cordonnier C. 2014. Mucormycosis: a new concern in the transplant ward? Curr. Opin. Hematol. 21:482–490.

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

RAS

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 Annexe 1: Missions & organisation du CNR

9.1 Rappel des missions et objectifs majeurs du CNR et des laboratoires associés

Le nouveau 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 champ des missions du CNRMA ne couvre plus les mycoses animales, mais s'est donc étendu aux pneumocystoses.

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 croit 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, 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, dès le début du nouveau mandat, 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.

9.2 Fournir une description détaillée 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 contraint 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 (Tableau 9) et l'organisation fonctionnelle du CNRMA (Figure 26) sont décrites ci-dessous.

Tableau 9 : Composition de l'équipe du CNRMA en 2014

Nom	Fonction	ETP	Qualification/statut	Organisme payeur
Alexandre Alanio	Collaborateur scientifique	10%	Docteur en médecine, Thèse d'université, AHU, internat en biologie	AP-HP / Université Paris Diderot P7
Anne Boullié	Technicien	100%	BTS / Technicien supérieur de laboratoire	Institut Pasteur
Reine Bouyssié	Secrétaire	40%	Secrétaire de Direction	Institut Pasteur
Stéphane Bretagne	Directeur Adjoint	50%	Docteur en Médecine, Thèse d'université, HDR / PUPH hôpital Saint Louis	AP-HP / Paris Diderot P7
Marie Desnos-Ollivier	Collaborateur technique/scientifique	100%	Thèse d'université / Ingénieur	Institut Pasteur
Françoise Dromer	Directeur du CNRMA	40%	Docteur en Médecine, Thèse d'université, HDR / Professeur Institut Pasteur	Institut Pasteur
Dea Garcia-Hermoso	Collaborateur technique/scientifique	100%	Thèse d'université / Ingénieur	Institut Pasteur
Damien Hoinard	Technicien	100%	BTS / Technicien supérieur de laboratoire	Institut Pasteur
Olivier Lortholary	Directeur Adjoint	20%	Docteur en Médecine, Thèse d'université, HDR / PUPH Hôpital Necker-Enfants Malades,	AP-HP / Paris Descartes P5
Charlotte Renaudat	Biostatisticienne	50%	Docteur en Médecine, diplôme PROFET, DU de l'ISPED / Cadre Administratif et Technique	Institut Pasteur
Karine Sitbon	Médecin d'Etudes Cliniques	50%	Docteur en Médecine / Cadre Administratif et Technique	Institut Pasteur

CNR MYCOSES INVASIVES ET ANTIFONGIQUES

Directeur: F. Dromer,

Adjoints: O. Lortholary, S. Bretagne

Collaborateur : **A. Alanio** Secrétariat : R. Bouyssié

Expertise Levures / Développements technologiques (FD/SB/AA)

- Marie Desnos-Ollivier
- Anne Boullié

Surveillance épidémiologique (FD/SB/OL)

- Karine Sitbon
- Charlotte Renaudat

Expertise Filamenteux / Développements technologiques (SB/FD/AA)

- Dea Garcia-Hermoso
- Damien Hoinard

Activité de conseil (OL/SB/FD)

- Dea Garcia-Hermoso
- Marie Desnos-Ollivier

Figure 26: Organigramme fonctionnel du CNR Mycoses Invasives et Antifongiques en 2014

9.3 Description détaillée des locaux et de l'équipement

Depuis le 18 novembre 2013, l'unité de mycologie moléculaire a déménagé dans de nouveaux locaux au bâtiment Duclaux (Bât 03, Rez-de-chaussée Haut; 28 rue du Dr Roux). Le CNRMA dispose au sein de l'unité de mycologie de locaux propres : un laboratoire (03RH02), un P2+ (03RH26), une pièce microscope (03RH33b), deux bureaux (03RH01 et 04) et des locaux partagés avec l'unité de Biologie des Infections située au même étage : le secrétariat (03RH33A), une pièce de PCR (03RH05), une pièce d'équipements moyens (-20°C, Infors) (03RH21), une pièce de pesée (03RH17), une chambre froide (03 niveau intermédiaire RH et RB), une pièce pour les congélateurs -80°C (sous-sol) ainsi que de locaux communs à toute l'aile du bâtiment 03 (2 laboratoires de préparation (03-1er et 03-2ème).

Les équipements principaux propres comprennent :

- PSM2 et incubateurs à CO2, hottes chimiques
- Thermocycleurs (iCycler de Bio-Rad et LCR480 de Roche)
- MagNAlyser
- Extracteur semi-automatique KingFisher
- 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

Le CNRMA utilise le laboratoire de type P2+ (03RH26) dès lors qu'un isolat est suspect d'être un pathogène de classe 3, et un laboratoire P3 dès lors que l'isolat est identifié comme classe 3. 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, du pôle de génotypage des pathogènes pour les urgences. Depuis juillet 2013, tous les séquençages de type Sanger, hors urgence, sont externalisés (Société MWG Eurofins).

9.4 Description de la démarche qualité du laboratoire :

En 1996, les Centres Nationaux de Référence (CNR) de l'Institut Pasteur ont entrepris une démarche qualité pour suivre le référentiel GBEA et, depuis 2008, dans le cadre des inspections ANSM, les exigences des arrêtés du 30 juillet 2004 et du 16 juillet 2007 liés aux Micro-Organismes et Toxines (MOT). C'est le projet ISO 15189 du LREMS de l'Institut Pasteur.

Le Service Qualité, Environnement et Développement Durable (QE-DD) apporte ses ressources et son expertise dans l'accompagnement du projet d'accréditation ISO 15189 des Laboratoires de Références et d'Expertise (CNR et CIBU) conformément à l'ordonnance du 13 janvier 2010 et à la loi du 31 mai 2013 relative aux activités de biologie médicale. Le CNRMA entrera dans la vague 3 d'accréditation. L'implication de l'équipe du CNRMA et le temps dédié par l'encadrement pour l'assurance qualité a permis d'atteindre un niveau qualité satisfaisant, avec mise en place dès 2012 d'une gestion documentaire de la qualité (procédures, modes opératoires et enregistrement) et d'une gestion du

matériel, pour ses activités de diagnostic. La gestion du matériel permet en outre de garantir l'utilisation d'équipements fiables, appropriés aux besoins et surveillés en temps réel. La gestion des réactifs et consommables (sélection et évaluation des fournisseurs, distribution et évaluation des produits) est assurée par le département Achats et le service Logistique.

10 Annexe 2 : Capacités techniques du CNR

10.1 Liste des techniques de référence: diagnostic/identification, typage, évaluation de la sensibilité aux anti-infectieux :

Techniques disponibles

- ✓ Identification phénotypique complète des levures et des champignons filamenteux avec assimilation des sucres, profils protéique 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)^{34,35}. 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®), la terbinafine (Lamisil®), la caspofungine (Cancidas®), la micafungine (Mycamine®) et l'anidulafungine (non commercialisée en France).
- ✓ 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 ³⁶ et les amorces universelles ITS1/ITS4.
- ✓ Détection des mutations dans le gène *Cyp51A* pour les isolats d'*Aspergillus fumigatus* résistants aux antifongiques azolés³⁷
- ✓ Détection des mutations dans les gènes *Fks* pour les isolats de *Candida albicans*, *C. glabrata*, *C. tropicalis*, *C. krusei*, *C. lusitaniae* résistants aux échinocandines.

Techniques mises en place en 2013

Aigut de pouvelles aibles pour

- Ajout de nouvelles cibles pour l'identification de diverses espèces de levures et de champignons filamenteux
- Mise en place du génotypage de *Candida parapsilosis* par étude du polymorphisme de séquences microsatellites
- Mise en place du génotypage partiel de *S. clavata*.
- Mise en place de l'identification des espèces de *Trichosporon* spp. par le séquençage de la région IGS du gène codant l'ARNribosomique. Incrémentation de la base de données de séquences du

³⁴ 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.

³⁵ 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

³⁶ 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.

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).

CNRMA après séquençage de la région IGS des souches types des 44 espèces de *Trichosporon* (actuellement 24 espèces).

10.2 Liste des marqueurs épidémiologiques disponibles

- Pour C. albicans, 5 séquences microsatellites (CDC3, HIS3, EF3, STPK, CDR1) ^{38,39}, et les 7 loci MLST (AAT1a, ACC1, ADP1, MPIb, SYA1, VPS13, ZWF1) ⁴⁰
- Pour C. glabrata, 5 séquences microsatellites (RPM2, MTI, ERG, Cg4, Cg6)⁴¹
- Pour C. parapsilosis, 3 séquences microsatellites (CP1, CP4, CP6)⁴²
- Pour Aspergillus fumigatus, 4 séquences microsatellites A, B, C et D⁴³
- Pour *C. tropicalis*, 4 loci MLST (MDR1, XYR1, SAPT4, SAPT2)⁴⁴, et 2 séquences microsatellites (URA3 et CT14) ⁴⁵
- Pour *Cr. neoformans*, sérotypage (cytométrie en flux à l'aide d'un anticorps monoclonal antipolyoside capsulaire⁴⁶ 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 SOD1⁴⁷)
- Pour Candida krusei, 6 loci MLST (ADE2, LYS2, HIS3, LEU2, TRP1 et MPD1)⁴⁸
- Pour Cryptococcus gattii, 7 loci MLST (IGS1, CAP59, URA5, PLB1, GPD1, SOD1, LAC1)⁴⁹
- Pour *Saprochete clavata*, séquençage des 8 régions autour des SNPs permettant d'identifier l'appartenance au clone A ou B

10.3 Collections de souches, antigènes ou immun-sérums de référence :

Collections de levures

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

- ✓ vérification de la pureté de la souche
- ✓ identification phénotypique avec profil d'assimilation des composés carbonés sur 31 (ID32C, BioMérieux), voire 49 (50CH, BioMérieux) composés en cas d'espèce non fréquente, ainsi que, dans ce dernier cas, détermination de la fermentation du glucose, de la croissance à différentes températures et sur des milieux spéciaux (nitrate, NaCl 10%

³⁸ Foulet F, et al. Microsatellite markers as a typing system for Candida glabrata. J Clin Microbiol. 2005; 43:4574-9.

³⁹ 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.

⁴⁰ Bougnoux ME, et al. Collaborative consensus for optimized multilocus sequence typing of Candida albicans. J Clin Microbiol. 2003; 41:5265

⁴¹ Foulet F, et al. Microsatellite marker analysis as a typing system for Candida glabrata. J Clin Microbiol. 2005;43:4574

⁴² 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.

⁴³ Bart-Delabesse E, et al. Microsatellite markers for typing Aspergillus fumigatus isolates. J Clin Microbiol 1998;36:2413

⁴⁴ Tavanti A, *et al.* Multilocus sequence typing for differentiation of strains of *Candida tropicalis*. J Clin Microbiol. 2005; 43: 5593-600.

⁴⁵ Desnos-Ollivier M, et al. Clonal population of flucytosine-resistant Candida tropicalis from blood cultures, Paris, France. Emerg Infect Dis. 2008; 14:557

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

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

⁴⁸Jacobsen MD, et al. Strain Typing and Determination of Population Structure of Candida krusei by Multilocus Sequence Typing. J Clin Microbiol. 2007; 45:317

⁴⁹ Hagen F, *et al.* Autochthonous and dormant *Cryptococcus gattii* infections in Europe. Emerging Infect Dis. 2012; 10:1618

- NaCl 15%, glucose 50%, acide acétique), profil protéique par spectrométrie de masse depuis Juillet 2014,
- ✓ 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 ITS⁵⁰
- ✓ en cas d'identification de *Trichosporon* sp., séquençage systématique de la région IGS1 de l'ADN ribosomique⁵¹
- ✓ en cas d'identification de *Debaryomyces* sp., séquençage systématique d'une partie du gène codant l'actine⁵²
- ✓ 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'ARNribosomique
- ✓ détermination de la sensibilité à 8 antifongiques systémiques (amphotéricine B, 5-fluorocytosine, fluconazole, voriconazole, posaconazole, caspofungine, micafungine et anidulafungine)
- ✓ en cas de « résistance » à la caspofungine (CMI ≥ 0,5 μg/ml), séquençage systématique partiel des gènes codant la 1,3 beta-glucane synthase pour les isolats de C. albicans, C. glabrata, C. tropicalis, C. krusei et C. lusitaniae
- ✓ en cas d'espèce non « fréquente » ou de profil d'assimilation des sucres inhabituels pour les espèces fréquentes, 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, les profils de sensibilités aux antifongiques, les résultats de typage et les séquences dans une base de données gérée par le logiciel BioloMics

La collection du CNRMA comprend ainsi des souches bien caractérisées appartenant à 27 genres et 87 espèces différents (1 à 2547 isolats/espèce) et se répartissant en :

- près de 4100 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.
- plus de 1800 souches de levures provenant d'autres sites profonds ou superficiels, stockées congelées en glycérol 40% à -80°C, et depuis 2009 en glycérol 20% dans l'azote liquide.
- plus de 2200 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 cidessus 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.

⁵⁰ 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

⁵¹ Sugita T, et al. Sequence Analysis of the Ribosomal DNA Intergenic Spacer 1 Regions of Trichosporon Species. J Clin Microbiol. 2002, 40;1826

⁵² Martorell P, *et al.* Sequence-based identification of species belonging to the genus *Debaryomyces* FEMS Yeast research. 2005; 5:1157

• 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, caspofungine, micafungine, anidulafungine, 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 ACDSee et des séquences dans une base de données gérée par le logiciel BioloMics.

La collection comprend des souches appartenant à 82 genres et 285 espèces différents, (1 à 243 isolats/espèce) :

- ✓ près de 2000 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.

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 ≤ 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.

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. Une sélection des images est envoyée aux correspondants avec le résultat écrit de l'identification lorsqu'il s'agit d'une espèce rare. Les images numériques sont envoyées par courriel à la demande (publication, enseignement). Toutes les images sont gérées avec le logiciel ACDSee.

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.

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).

10.4 Liste des techniques (diagnostic/identification, typage, sensibilité aux anti-infectieux...) 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 :

<u>Identification des champignons</u>

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 (Tableau 10). Le tableau ci-dessous 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.

Tableau 10 : Liste des couples d'amorces utilisés en fonction des genres étudiés (en plus des régions ITS)

Espèce	Gène	Amorces	
Complexe d'espèces A. fumigatus	β-tubuline	Btub1F/Btub2R ⁵³	
Complexe d'espèces Fusarium spp	Factor d'élongation (TEF1-α)	EF1 / EF2 ⁵⁴	
Complexe a especes Fusarium spp	RNA polymerase II (RPB2)	5F2/ 7CR ⁵⁵	
Complexe d'espèces	β-tubuline	TUB-F/ TUB-R ⁵⁶	
Pseudallescheria / Scedosporium	p-tuounne	10 D- 17 10 D- K	
Phaeoacremonium spp	β-tubuline	T1 /Bt2b ⁵⁷	
Coelomycètes Phoma-like	β-tubuline	TUB2-F / TUB4-R ⁵⁸	
Trichosporon spp.	IGS1 / ADNr	26SF/5SR ⁵¹	
Debaryomyces spp.	actine	CA21/CA15R ⁵²	

⁵³ Balajee S, et al. Aspergillus lentulus sp. nov., a new sibling species of A. fumigatus. Eukaryot Cell. 2005; 4:625-32.

⁵⁷ 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.

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.

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.

⁵⁶ Cruse M, et al. Cryptic species in Stachybotrys chartarum. Mycologia. 2002; 94:814-22.

⁵⁸ Aveskamp MM, *et al.* DNA phylogeny reveals polyphyly of *Phoma* section *Peyronellaea* and multiple taxonomic novelties. Mycologia. 2009; 101:363-82.

Sérologie des mycoses exotiques (électrosynérèse)

Cette technique est définitivement abandonnée par le CNRMA (depuis le 1^{er} janvier 2013) 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 depuis 9 ans, moins de 8% étaient positives, mais avec de grandes différences en fonction du contexte clinique (<4% de positivité de la sérologie histoplasmose 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 d'établir le diagnostic dans la quasi-totalité des cas d'histoplasmose disséminée.

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 log2) par rapport à la base de données dont il dispose pour les isolats de la même espèce testées dans les mêmes conditions localement.

La meilleure solution est toujours de bien identifier l'espèce et de 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.

10.5 Techniques transférées par le CNRMA

Le CNRMA transfert vers les CC-CNRMA les techniques d'identification moléculaire et en particulier la technique d'extraction de l'ADN, les amorces⁵⁹ et paramètres d'amplification utilisées pour le séquençage des régions ITS de l'ADN ribosomique des levures et champignons filamenteux (Figure 27). Voici résumé le protocole d'amplification utilisé pour amplifier ces régions avec les couples d'amorces V9D/LS266 ou ITS5/LS266.

⁵⁹ White TJ, *et al.* Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: Innis MA, Gelfland DH, Sninsky JJ, White TJ (eds), PCR Protocols. San Diego: Academic.1990; 315.

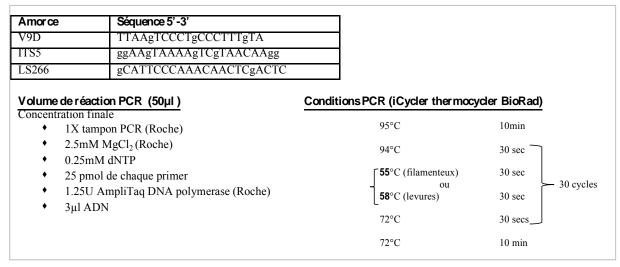


Figure 27 : Protocole d'amplification des régions ITS utilisé au CNRMA (V9D et ITS5 = amorces sens ; LS266 = amorce antisens)

11 Annexe 3 : Liste des collaborateurs du CNRMA

Liste des CC-CNRMA formant RESSIF

CHU d'Amiens représenté par le Dr. Taieb Chouaki

CHU d'Angers représenté par le Dr. Jean-Philippe Bouchara

CHU de Besançon représenté par le Pr. Laurence Millon

CHU de Caen représenté par le Dr. Julie Bonhomme

CHU de Clermont-Ferrand représenté par le Dr. Philippe Poirier

CHU de Guadeloupe représenté par le Dr. Muriel Nicolas

CHU de Guyane représenté par le Dr. Christine Aznar

Institut Gustave Roussy représenté par le Dr. Elisabeth Chachaty

CHU de Limoges représenté par le Dr. Bernard Bouteille

CHU de Martinique représenté par le Dr. Nicole Desbois

CHU de Nantes représenté par le Dr. Florent Morio

CHU de Nice représenté par le Dr. Martine Gari-Toussaint

CH d'Orléans représenté par le Dr. Didier Poisson

CHU de Paris/Cochin représenté par le Dr. André Paugam

CHU de Paris/Saint Louis représenté par le Pr. Stéphane Bretagne

CHU de Poitiers représenté par le Dr. Catherine Kauffmann-Lacroix

Hôpital des Quinze-Vingt représenté par le Dr. Christine Chaumeil

CHU de Reims représenté par le Dr. Dominique Toubas

CHU de Rennes représenté par le Pr. Jean-Pierre Gangneux

CHU de Rouen représenté par le Pr. Loïc Favennec

CH de Saint Etienne représenté par le Dr. Hélène Raberin

CH de Strasbourg représenté par le Dr. Valérie Letscher-Bru

CHU de Toulouse représenté par le Dr. Sophie Cassaing

CHU de Tours représenté par le Pr. Jacques Chandenier

CH de Versailles représenté par le Dr. Odile Eloy

Membres du réseau métropolitain

Agen, Laboratoire de Biochimie, Centre Hospitalier

Aix-en-Provence, Laboratoire de Bactériologie-Virologie, Centre Hospitalier Général

Albi, Laboratoire de Biologie Médicale, Centre Hospitalier Général

Alençon, Laboratoire de Microbiologie-Sérologie, Centre Hospitalier

Amiens, Laboratoire de Parasitologie-Mycologie, CHRU Hôpital Sud et Hôpital Sud

Angers, Laboratoire de Parasitologie-Mycologie, Centre Hospitalier Universitaire

Angoulême, Laboratoire de Microbiologie, Centre Hospitalier

Annecy, Laboratoire de Biologie Médicale, Centre Hospitalier Général

Annemasse, Laboratoire de Biologie Médicale, Centre Hospitalier

Antibes, Laboratoire de Biologie Médicale, Centre Hospitalier Général

Argenteuil, Laboratoire de Biologie Clinique, Centre Hospitalier Victor Dupouy

Arles, Laboratoire d'Hématologie-Microbiologie, Centre Hospitalier Général

Arpajon, Laboratoire de Biologie Médicale, Centre Hospitalier Général

Arras, Laboratoire de Bactériologie-Immunologie, Centre Hospitalier

Aubervilliers, Laboratoire de Biologie Médicale, Polyclinique d'Aubervilliers

Aulnay, Laboratoire de Biologie Médicale, Centre Hospitalier Général Robert Ballanger

Avignon, Laboratoire de Biologie A, Centre Hospitalier de la Durance

Bayonne, Laboratoire de Bactériologie-Sérologie, Centre Hospitalier de la Côte Basque

Besançon, Laboratoire de Parasitologie-Mycologie, CHRU Jean Minjoz

Blois, Laboratoire de Biologie Médicale, Centre Hospitalier Général

Bobigny, Laboratoire de Parasitologie-Mycologie, Hôpital Avicenne

Bondy, Laboratoire de Bactériologie, Hôpital Jean Verdier

Bordeaux, Laboratoire de Parasitologie-Mycologie, CHR Hôpital Saint-André

Boulogne Billancourt, Laboratoire de Microbiologie-Hygiène, Hôpital Ambroise Paré

Bourg en Bresse, Laboratoire de Bactériologie, Centre Hospitalier Général

Bourges, Laboratoire de Biologie Médicale, Centre Hospitalier Général

Brest, Laboratoire de Microbiologie, Centre Hospitalier Régional

Brive la Gaillarde, Laboratoire de Biologie Médicale, Centre Hospitalier Général

Bry sur Marne, Laboratoire de Microbiologie, Hôpital Sainte Camille

Caen, Laboratoire de Microbiologie, Centre Hospitalier Universitaire

Cahors, Hôpital de Gourdon, Centre Hospitalier

Chalon sur Saône, Laboratoire de Biologie Médicale, Centre Hospitalier

Chambéry, Laboratoire de Microbiologie, Centre Hospitalier

Chartres, Laboratoire de Microbiologie, Centre Hospitalier

Cherbourg, Laboratoire de Biologie Médicale, Centre Hospitalier des Armées René-le-Bas

Cholet, Laboratoire de Biologie Médicale, Centre Hospitalier

Clamart, Laboratoire de Biologie Médicale, Hôpital des Armées Percy

Clamart, Service de Bactériologie-Virologie, Hôpital Antoine Béclère

Clermont-Ferrand, Laboratoire de Bactériologie-Virologie, Centre Hospitalier

Clichy, Laboratoire de Microbiologie, Hôpital Beaujon

Colmar, Laboratoire de Microbiologie, CHG Louis Pasteur

Colombes, Unité de Parasitologie-Mycologie, Hôpital Louis Mourier

Corbeil-Essonnes, Laboratoire de Microbiologie, Centre Hospitalier

Coulommiers, Laboratoire de Biologie, Centre Hospitalier René Arbeltier

Creil, Laboratoire d'Hématologie, Centre Hospitalier Général

Créteil, Laboratoire de Microbiologie, Centre Hospitalier Intercommunal

Créteil, Laboratoire de Parasitologie-Mycologie, Hôpital Henri Mondor

Dax, Laboratoire, Centre Hospitalier Général

Dieppe, Laboratoire de Biologie Médicale, Centre Hospitalier Général

Dreux, Laboratoire, Centre Hospitalier Général

Eaubonne, Laboratoire d'Immuno-Bactério-Hématologie, Centre Hospitalier Emile Roux

Elbeuf, Laboratoire de Microbiologie, Hôpital Feugrais

Evry, Laboratoire Central de Biologie, Centre Hospitalier Louise-Michel

Flers, Laboratoire de Chimie Biologique, CHG Jacques Monod

Fréjus, Laboratoire de Biologie Médicale, CHI de Fréjus-Saint-Raphaël

Fresnes, Laboratoire de Biologie Médicale, Hôpital Pénitentiaire

Gap, Laboratoire de Biologie Médicale, CHI des Alpes du Sud

Garches, Laboratoire de Microbiologie, Hôpital Raymond Poincaré

Gonesse, Laboratoire de Bactério-Virologie-Hygiène Hospitalière, Centre Hospitalier

Grenoble, Laboratoire de Parasitologie-Microbiologie, CHRU Albert Michallon

La Roche-sur-Yon, Laboratoire de Biologie Médicale, CHD Roche-sur-Yon Lucon Montaigu

Lagny sur Marne, Laboratoire de Biologie Médicale, Centre Hospitalier

Laval, Laboratoire de Bactério-Parasito-Virologie, Centre Hospitalier

Le Chesnay, Laboratoire de Bactériologie, Centre Hospitalier Mignot

Le Havre, Laboratoire de Bactériologie-Virologie, Centre Hospitalier Général

Le Kremlin Bicêtre, Laboratoire de Parasitologie-Microbiologie, Hôpital Bicêtre

Le Mans, Service de Microbiologie Médicale et Hygiène Hospitalière, Centre Hospitalier

Libourne, Laboratoire de Microbiologie, CHG Hôpital Garderose

Limoges, Laboratoire de Parasitologie-Mycologie, Centre Hospitalier Dupuytren

Longjumeau, Laboratoire de Biologie Médicale, Centre Hospitalier Général

Lons le saunier, Laboratoire, Centre Hospitalier Général

Lyon 4, Laboratoire de Microbiologie, Hôpital de la Croix-Rousse

Mantes la Jolie, Laboratoire de Microbiologie, CH de Mantes-la-Jolie

Marseille 8, Laboratoire de Biologie Médicale, Hôpital Fondation Saint-Joseph

Marseille, Laboratoire de Parasitologie-Mycologie, CHU – La Timone

Martigues, Laboratoire de Biologie Médicale, Centre Hospitalier Général

Meaux, Laboratoire de Microbiologie, Centre Hospitalier

Montargis, Laboratoire de Biologie Médicale, Centre Hospitalier

Montbéliard, Laboratoire Bactériologie-Immunologie, CHG André Boulloche

Montfermeil, Laboratoire de Biologie, Centre Hospitalier

Montpellier, Laboratoire de Parasitologie-Mycologie, CHU – Institut Botanique

Montreuil, Laboratoire de Biologie Médicale, Centre Hospitalier Intercommunal

Mulhouse, Laboratoire de Biologie Médicale, Hôpital Emile Muller

Nancy, Laboratoire de Mycologie Médicale, CHR Hôpital Fournier

Nantes, Laboratoire de Parasitologie-Mycologie, CHRU Hôtel-Dieu

Neuilly, Laboratoire de Bactériologie, Hôpital Américain

Nevers, Laboratoire de Bactériologie-Immunologie, Centre Hospitalier

Nice, Laboratoire de Parasitologie-Mycologie, Centre Hospitalier de l'Archet

Nîmes, Laboratoire de Bactério-Parasitologie, Centre Hospitalier Universitaire

Niort, Laboratoire de Biologie Médicale, Centre Hospitalier

Orléans, Laboratoire de Biologie Médicale, Centre Hospitalier Régional

Paris 5, Laboratoire de Microbiologie, Institut Curie

Paris 10, Laboratoire de Bactériologie, Groupe Hospitalier Lariboisière - Fernand Widal

Paris 10, Laboratoire de Parasitologie-Microbiologie, Hôpital Saint-Louis

Paris 12, Laboratoire de Biologie Médicale, Hôpital des Quinze-Vingts

Paris 12, Laboratoire de Microbiologie, Hôpital Trousseau

Paris 14, Laboratoire de Biologie Médicale, Institut Mutualiste Montsouris

Paris 14, Laboratoire de Parasitologie-Mycologie, Groupe Hospitalier Cochin Port-Royal

Paris 18, Laboratoire de Parasitologie-Mycologie, CHU Bichat-Claude-Bernard

Paris 19, Service de Bactériologie, Hôpital Robert Debré

Pau, Laboratoire de Bactériologie, Centre Hospitalier Général

Perpignan, Laboratoire de Biologie Médicale, CHG Maréchal Joffre

Poissy, Laboratoire de Biologie Médicale, Centre Hospitalier Intercommunal

Poitiers, Laboratoire de Parasito-Mycologie et Sérologie, CHRU de la Milétrie

Pontoise, Laboratoire de Bactériologie, Centre Hospitalier René Dubos

Provins, Laboratoire de Biologie M. Maugerie, Centre Hospitalier Léon Binet

Reims, Laboratoire de Parasitologie-Mycologie, CHRU Hôpital Maison Blanche

Rennes, Laboratoire de Parasitologie-Mycologie, CHU Hôpital de Pontchaillou

Roanne, Laboratoire de Séro-Hémato-Bactériologie, Centre Hospitalier Général

Rodez, Laboratoire de Biologie Médicale, Centre Hospitalier

Rouen, Laboratoire de Parasitologie-Mycologie, Hôpital Charles-Nicolle

Saint-Cloud, Laboratoire de Biologie Médicale, Centre Hospitalier

Saint-Denis, Laboratoire de Microbiologie-Sérologie-Parasitologie, Centre Hospitalier Général

Saint-Etienne, Laboratoire de Parasitologie-Mycologie, CHU Hôpital Nord

Saint-Germain-en-Laye, Laboratoire de Biologie Médicale, Centre Hospitalier Général

Saint-Julien-en-Genevois, Laboratoire de Biologie Médicale, Centre Hospitalier

Saint-Mandé, Laboratoire de Biologie Médicale, HIA Begin

Saint-Maurice, Laboratoire de Biologie Médicale, Hôpital National

Saint-Nazaire, Laboratoire de Biologie Médicale, Centre Hospitalier Général

Sens, Laboratoire de Biologie Médicale, Centre Hospitalier

Strasbourg, Laboratoire de Biochimie, CHRU Hôpital de Hautepierre

Thonon les Bains, Service de Biologie, Centre Hospitalier

Toul, Laboratoire de Parasitologie-Mycologie, CHU de Nancy Hôpital Jeanne d'Arc

Toulon Armées, Laboratoire de Bactériologie, HIA Sainte-Anne

Toulouse, Laboratoire de Microbiologie, CHU Hôpital Purpan

Tourcoing, Laboratoire de Biologie Médicale, CH Gustave Dron

Tours, Laboratoire de Parasitologie-Mycologie, CHRU Hôpital Bretonneau

Troyes, Laboratoire de Bactériologie-Virologie, Centre Hospitalier

Tulle, Laboratoire d'Analyses, Centre Hospitalier

Valence, Laboratoire de Biologie, Centre Hospitalier

Valenciennes, Laboratoire de Biologie Clinique, Centre Hospitalier

Vannes, Service de Bactériologie, Centre Hospitalier Bretagne Atlantique

Vernon, Laboratoire, Centre Hospitalier Général Saint-Louis

Versailles, Département de Biologie, Hôpital Richaud

Villejuif, Laboratoire de Bactériologie, Hôpital Paul Brousse

Villejuif, Laboratoire de Biologie Clinique, Institut Gustave Roussy

Villeneuve Saint-Georges, Laboratoire de Bactériologie, Centre Hospitalier Intercommunal

Membres du réseau dans les DOM-TOM

Basse-Terre, Guadeloupe, Laboratoire de Biologie Médicale, Centre Hospitalier Général

Cayenne, Guyane, Laboratoire, Centre Hospitalier

Cayenne, Guyane, Laboratoire, Institut Pasteur

Fort-de-France, Laboratoire de Microbiologie, CHRU Pierre Zobda Quitman

Kourou, Guyane, Laboratoire, Centre Hospitalier

Le Lamentin, Martinique, Laboratoire de Biologie Médicale, Centre Hospitalier Général

Mamoudzou, Mayotte, Laboratoire, Centre Hospitalier de Mayotte

Noumea, Laboratoire de Biologie Médicale, CHT G. Bouret

Noumea, Laboratoire de Biologie Médicale, Institut Pasteur

Papeete, Tahiti, Laboratoire de Biologie Médicale, Centre Hospitalier Territorial

Papeete, Tahiti, Laboratoire de Biologie Médicale, HIA J. Prince

Pointe-à-Pitre, Guadeloupe, Laboratoire de Parasitologie-Mycologie, CHR de Pointe-à-Pitre-Abymes

Saint-Denis, La Réunion, Laboratoire de Biologie, CHD Felix Guyon

Saint-Laurent du Maroni, Guyane, Laboratoire, CH Ouest Guyanais « Franck Joly »

Saint-Pierre, La Réunion, Laboratoire de Bactério-Parasito-Virologie et Hygiène, Groupe Hospitalier Réunion Sud