

**Rapport annuel d'activité**

**2014**

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

**Responsables**

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

**Collaborateurs**

Mme Anne Boullié, technicienne  
Mme Reine Bouyssié, secrétaire  
Mme Marie Desnos-Ollivier, ingénieur  
Mme Dea Garcia-Hermoso, ingénieur  
M. Damien Hoinard, technicien  
Dr. Charlotte Renaudat, biostatisticienne  
Dr. Karine Sitbon, médecin d'études cliniques

**Année  
d'exercice**

**2013**



Résumé analytique .....	5
<b>1 Missions et organisation du CNR .....</b>	<b>6</b>
<b>2 Activités d'expertise.....</b>	<b>6</b>
2.1 Évolutions des techniques au cours de l'année 2013.....	6
2.2 Activités d'expertise de l'année 2013 .....	6
2.2.1 Expertise 2013 sur les levures.....	7
2.2.2 Expertise 2013 sur les champignons filamenteux.....	9
2.2.3 Expertise 2013 sur la sensibilité aux antifongiques .....	11
2.2.4 Expertise 2013 sur les mycoses endémiques.....	11
2.2.5 Expertise 2013 en anatomopathologie.....	12
<b>3 Activités de surveillance.....</b>	<b>13</b>
3.1 Surveillance de l'évolution et des caractéristiques des infections .....	13
3.1.1 Surveillance de la cryptococcose : .....	14
3.1.2 Observatoire des Levures : .....	15
3.1.3 RESeau de Surveillance des Infections Fongiques invasives en France (ReSSIF).....	16
3.2 Surveillance de la résistance des agents pathogènes aux anti-infectieux .....	20
3.2.1 Définition de l'échantillon de souches testées .....	20
3.2.2 Définitions utilisées pour exprimer la résistance.....	20
3.2.3 Résultats de la surveillance des résistances aux antifongiques pour les levures.....	21
3.2.4 Résultats de la surveillance des résistances aux antifongiques pour les filamenteux .....	23
3.2.5 Analyse des tendances.....	25
3.3 Participation aux réseaux de surveillance internationaux, en particulier européens .....	26
<b>4 Alerte.....</b>	<b>26</b>
4.1 Alerte sur des cas groupés d'infection à <i>S. clavata</i> .....	26
4.2 Cas groupés de fongémies dues à <i>C. parapsilosis</i> dans un service de réanimation.....	27
<b>5 Activités d'information, de formation et de conseil.....</b>	<b>27</b>
5.1 Enseignements et formation .....	27
5.2 Modalités de diffusion des données de surveillance et production du CNRMA .....	28
5.3 Activité de conseil aux professionnels .....	28
5.4 Activité d'expertise .....	28
Au plan national.....	28
Au plan international.....	29
<b>6 Travaux de recherche et publications en lien direct avec l'activité du CNR .....</b>	<b>30</b>
6.1 Etude du franchissement de la barrière épithéliale pulmonaire par trois champignons pathogènes .....	30
6.2 Etude des pneumocystoses .....	30
6.3 Participation aux groupes de travail internationaux sur le "barcoding of fungi" et création d'une base de données de séquences .....	31
6.4 Mise en place d'un essai thérapeutique randomisé sur la cryptococcose au cours du SIDA: "ACTA" .....	31
6.5 Epidémiologie de la cryptococcose associée à l'infection par le VIH au Cameroun .....	31
6.6 Infections à <i>Fusarium spp</i> .....	32
6.7 Mucormycoses .....	32
6.8 Tolérance des antifongiques.....	32
6.9 Immunodéprimés voyageurs et risque fongique .....	32
6.10 Les publications et communications réalisées ou prévues en lien avec les activités du CNR	32
Publications nationales.....	32
Publications internationales .....	33
Chapitre de livres ou publications autres .....	34

<b>7</b>	<b>Coopération avec les laboratoires de santé animale, d'hygiène alimentaire, environnementaux.....</b>	<b>35</b>
<b>8</b>	<b>Programme d'activité pour les années suivantes.....</b>	<b>35</b>
<b>9</b>	<b>Annexe 1 : Missions &amp; organisation du CNR .....</b>	<b>35</b>
9.1	Rappel des missions et objectifs majeurs du CNR et des laboratoires associés.....	35
9.2	Fournir une description détaillée de l'équipe :.....	36
9.3	Description détaillée des locaux et de l'équipement.....	37
9.4	Description de la démarche qualité du laboratoire : .....	37
<b>10</b>	<b>Annexe 2 : Capacités techniques du CNR.....</b>	<b>38</b>
10.1	Liste des techniques de référence: diagnostic/identification, typage, évaluation de la sensibilité aux anti-infectieux : .....	38
	Techniques disponibles.....	38
	Techniques mises en place en 2013 .....	38
10.2	Liste des marqueurs épidémiologiques disponibles .....	39
10.3	Collections de souches, antigènes ou immun-sérums de référence :.....	39
	Collections de levures.....	39
	Collection de champignons filamenteux .....	41
	Collection d'images numériques.....	41
	Collection d'ADN génomique.....	41
	Collection de sérums .....	42
	Identification des champignons :.....	42
	Sérologie des mycoses exotiques (électrosynérèse) .....	43
	Détermination de la sensibilité aux antifongiques des isolats de champignons pathogènes : .....	43
10.4	Techniques transférées par le CNRMA.....	43
<b>11</b>	<b>Annexe 3 : Liste des collaborateurs du CNRMA .....</b>	<b>44</b>
	Liste des CC-CNRMA formant RESSIF .....	44
	Membres du réseau métropolitain .....	44
	Membres du réseau dans les DOM-TOM .....	47

## Liste des figures

Figure 1: Evolution de l'activité d'expertise du CNRMA en volume depuis 2011 .....	7
Figure 2: <i>Cryptococcus neoformans</i> (aspect des colonies sur milieu de Niger (A), capsule visible en négatif dans l'encre de chine (B)).....	8
Figure 3 : <i>Fusarium solani</i> complexe (A), <i>Purpureocillium lilacinum</i> (B), <i>Aspergillus alabamensis</i> (C), <i>Rhizomucor pusillus</i> (D) .....	10
Figure 4: <i>Pleurostomophota richardsiae</i> (A), <i>Fonsecaea monophora</i> (B), <i>Curvularia lunata</i> (C), <i>Chaetomium globosum</i> (D).....	10
Figure 5: Aspect macroscopique (A) et microscopique (B) de la forme mycélienne d' <i>H. capsulatum</i> visible en bordure d'une culture en nappe de <i>Candida albicans</i> (A).....	10
Figure 6: (A) Phaeohyphomycose cutanée (coloration HES); (B) Lobomycose cutanée (coloration Gomori Grocott); (C) Mucormycose hépatique (coloration PAS); (D) Mycétome (coloration HES) - Pas d'isolat disponible au CNRMA pour ces quatre cas.....	12
Figure 7: Répartition géographique des 25 CC-CCNRMA .....	13
Figure 8: 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 du 22/02/2014) .....	14
Figure 9: Activité (dossiers enregistrés et dossiers modifiés) sur le serveur RESSIF entre décembre 2012 et janvier 2014 .....	17
Figure 10: Nombre de déclarations dans les CC-CNRMA (13 centres n'ont été inclus qu'en 2013).....	17
Figure 11: Répartition des 2258 infections fongiques invasives déclarées dans le cadre de RESSIF en 2013 (et 2012 pour la moitié des centres), en pourcentage global (panel de gauche) et en fonction du principal facteur de risque (panel de droite).....	18
Figure 12: Contribution de la clinique et de la mycologie dans le diagnostic des principales mycoses invasives répertoriées .....	19
Figure 13: Nombre de cas de fongémies dus à <i>M. capitatus</i> ou <i>S. clavata</i> déclarés dans l'ODL entre janvier 2013 et décembre 2013.....	27
Figure 14: Organigramme fonctionnel du CNR Mycoses Invasives et Antifongiques en 2013 .....	36
Figure 15: Protocole d'amplification des régions ITS utilisé au CNRMA .....	44

## Liste des tableaux

Tableau 1: Evolution (%) pour les 476 patients ayant eu un diagnostic de cryptococcose entre 2006 et 2013 en France .....	15
Tableau 2: Principales caractéristiques des mycoses invasives répertoriées dans RESSIF (2012-2013) .....	18
Tableau 3: <i>Candida</i> sp. EUCAST Antifungal Clinical Breakpoint (Table v.6.0 valid from mars 2013) .....	20
Tableau 4: <i>Aspergillus</i> sp. EUCAST Antifungal Clinical Breakpoint (Table v.6.1, mars 2013) .....	21
Tableau 5: Profil de sensibilité des levures aux antifongiques (mise à jour 13/02/2014).....	22
Tableau 6: Profil de sensibilité des filamenteux aux antifongiques (mise à jour 23/02/2014) .....	24
Tableau 7 : Evolution de la résistance des levures au fluconazole.....	25
Tableau 8 : Evolution de la résistance des levures au voriconazole.....	25
Tableau 9 : Evolution du pourcentage de levures ayant des CMI caspofungine hautes .....	26
Tableau 10: Profil génétique des souches cliniques de <i>Candida parapsilosis</i> .....	27
Tableau 11: Composition de l'équipe du CNR Mycoses Invasives et Antifongiques en 2013 .....	36
Tableau 12 : Liste des couples d'amorces utilisés en fonction des genres étudiés .....	42

## 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 mise en place d'un réseau de centres collaborateurs du CNRMA (les CC-CNRMA) dont le nombre a doublé en fin d'année 2012 pour atteindre 25 en 2013. Ces CC-CNRMA forment le RESeau de Surveillance des Infections Fongiques invasives (RESSIF) qui 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 près de 2500 cas d'infections fongiques invasives, et représente une base unique en Europe.

Nous avons observé une ré-émergence du clone responsable de l'épidémie d'infection invasive à *Geotrichum clavatum* (*Saprochaete clavata*). Le clone a été détecté dans 3 centres différents éloignés géographiquement, là encore sans que d'autres pays soient impliqués. Cette épidémie a été l'occasion à nouveau d'un partenariat étroit entre l'InVS, les CCLIN, les mycologues et cliniciens dans les centres hospitaliers et le CNRMA. La source de l'infection n'a pas encore été identifiée bien que des hypothèses tangibles aient été soulevées.

La surveillance des profils de sensibilité aux antifongiques n'a mis en évidence aucune anomalie en 2013, à l'exception de quelques isolats isolés non groupés résistants.

Enfin, l'arrêt de la réalisation des sérologies de mycoses exotiques a été l'occasion de discussions avec des cliniciens et microbiologistes sur la prise en charge de patients suspects de mycoses endémiques.

## 1 Missions et organisation du CNR

**Les missions et l'organisation du CNRMA** n'ont pas évolué en 2013. Cependant, le RESeau de Surveillance des Infections Fongiques invasives (**RESSIF**) qui comprend des laboratoires (CC-CNRMA) qui ont souhaité participer de façon active et pérenne à cette surveillance s'est agrandi, passant de 13 CC-CNRMA en 2012 à 25 en 2013. L'activité de monitoring a donc augmenté de façon très importante. Pour des raisons évidentes de limitation de nos capacités techniques, 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** pour la prise en charge diagnostique et/ou thérapeutique de patients suspects ou atteints de mycoses invasives s'est accrue significativement. 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 2013

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 a mis au point l'identification, en routine, du clone de *Saprochaete clavata* responsable de l'épidémie de 2012.

Le CNRMA a transféré vers les CC-CNRMA les paramètres d'amplification et les amorces utilisées pour l'identification moléculaire des champignons filamenteux pour homogénéiser et permettre le transfert des chromatogrammes d'un centre vers le CNRMA. En effet, la base de données de séquences du CNRMA est en cours de finition et devrait être accessible aux CC-CNRMA dès mai 2014 dans une version test, avant son ouverture plus large.

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

### 2.2 Activités d'expertise de l'année 2013

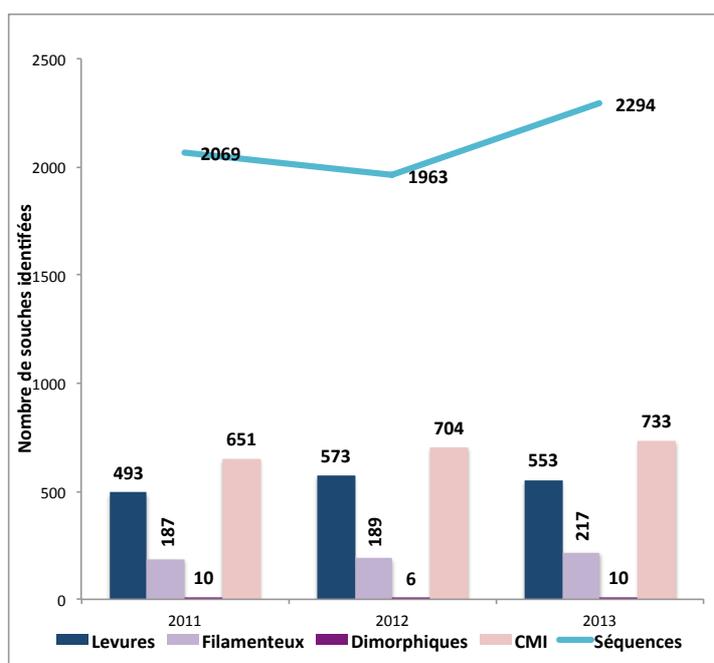
Le CNRMA a reçu, en 2013, 919 souches ou prélèvements correspondant dans 91% des cas à des souches déjà isolées, et rarement à des échantillons cliniques. Dans de rares cas, l'expertise concernait des prélèvements d'origine environnementale, dans le cadre d'investigations de sources de contamination.

La quasi-totalité des échantillons étaient en provenance de France Métropolitaine (95%) ou des DOM-TOM (4%). Quelques souches (n=10) nous sont parvenues de l'étranger dans le cadre d'investigation d'infections invasives à *Geotrichum* spp. 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 (5%), liquides céphalo-

rachidiens (4%), échantillons oculaires (6%), ORL (2%) ou digestifs (2%). Des précisions sont données plus loin en fonction de l'expertise microbiologique requise.

En volume, l'activité de laboratoire du CNRMA s'accroît légèrement depuis 2012 (Figure 1). Cela correspond néanmoins à une réelle augmentation du débit des techniques mises en œuvre, avec en particulier une augmentation de séquences analysées (2294 pour 499 souches), avec augmentation du nombre de loci séquencés, en particulier pour les champignons filamenteux. Plus de 90% des isolats identifiés sont testés pour leur sensibilité aux antifongiques (cf. plus loin). De plus, le nombre de fiches cliniques à valider correspondant aux déclarations de mycoses invasives a largement augmenté en particulier sur la base RESSIF (cf. plus loin).



**Figure 1:** Evolution de l'activité d'expertise du CNRMA en volume depuis 2011

### 2.2.1 Expertise 2013 sur les levures

Les levures provenaient essentiellement d'hémocultures (78%), mais aussi du système nerveux central (5%), des poumons (6%), de l'appareil digestif (3%), de la peau (1,5%), des urines, de la sphère ORL ou de lésions ostéo-articulaires (1% chacun).

Le niveau de caractérisation pour les 553 levures identifiées (correspondant à 38 genres et espèces différents) est celui décrit précédemment. Nous avons donc réalisé :

- ✓ une analyse phénotypique : assimilation des sucres ID32C pour toutes, et en fonction de l'orientation, activité uréase, température de croissance, complément sur le profil d'assimilation des sucres (galeries CH50), fermentation de certains sucres, croissance en milieux hyperosmolaires, croissance sur milieu CGB
- ✓ une identification moléculaire pour tous les isolats d'espèces communes ayant un profil d'assimilation des sucres inhabituels et pour toutes les espèces de levures moins fréquentes voire rares, soit 200 isolats appartenant à 33 espèces différentes :
  - amplification des régions ITS1-5.8S-ITS2 (146 isolats)
  - amplification de la région D1D2 de la sous-unité 26S (54 isolats)
  - amplification de la région IGS1 (isolats de 5 *Cryptococcus* et de 3 *Trichosporon* spp.)
- ✓ Un profil de sensibilité des souches aux 8 antifongiques pour 532 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 par analyse du polymorphisme des séquences microsattellites de quelques souches de *C. albicans* et de *C. glabrata*
  - ✓ un typage MLST pour rechercher le clone 5FC-R pour 11 isolats de *C. tropicalis* résistants à la 5FC (9 souches différentes du clone)
  - ✓ le séquençage des gènes *Fks* pour 31 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=15), *Magnusiomyces capitatus* (n=2) ou *Galactomyces candidus* (n=3). Pour les 15 isolats de *S. clavata*, analyse des 8 SNP permettant d'identifier le clone A ou B.
  - ✓ la détermination de la ploïdie et le sérotypage de 67 souches de *Cryptococcus* sp. aboutissant à la caractérisation de 64 souches l'espèce *neoformans* (47 sérotype A, 13 sérotype D, 3 AD) et *gattii* (3 serotype B).
  - ✓ la poursuite de la constitution d'une base de données complète (caractères phénotypiques CMI et séquences) dans BioloMICS.

Outre les espèces fréquentes (*Candida albicans*, *Candida glabrata*, *Candida parapsilosis*, *Candida tropicalis*, *Pichia kudriavzei* (syn. *Candida krusei*), *Kluyveromyces marxianus* var *marxianus* (syn. *Candida kefyri*), nous avons identifié ou confirmé l'identification de *Candida catenulata*, *Meyerozyma guilliermondii* (syn. *Candida guilliermondii*), *Meyerozyma caribbica* (*Candida fermentati*), *Candida haemulonii*, *Candida duobushaemulonii* (syn. *Candida haemulonii* type II), *Candida inconspicua*, *Candida palmiophila*, *Candida orthopsilosis*, *Candida metapsilosis*, *Candida dubliniensis*, *Clavispora lusitaniae* (syn. *Candida lusitaniae*), *Debaryomyces hansenii* (syn. *Candida famata*), *Kodamaea ohmeri* (syn. *Pichia ohmeri*), *Wickerhamomyces anomalus* (syn. *Candida pelliculosa*), *Cyberlindnera jadinii* (syn. *Pichia jadinii*), *Yarrowia lipolytica* (syn. *Candida lipolytica*), *Debaryomyces nepalensis*, *Galactomyces candidus* (syn. *Geotrichum candidum*), *Magnusiomyces capitatus* (syn. *Geotrichum capitatum*), *Saprochaete clavata* (syn. *Geotrichum clavatum*), *Lodderomyces elongisporus*, *Saccharomyces cerevisiae*.

Et parmi les levures basidiomycètes, outre *Filobasidiella neoformans* var. *neoformans* (anamorphe *Cryptococcus neoformans*) (Figure 2), *Filobasidiella neoformans* var. *bacillispora* (anamorphe *Cryptococcus gattii*), *Cryptococcus aerius*, *Cryptococcus heimaeyensis*, *Malassezia furfur*, *Malassezia pachydermatis*, *Rhodotorula mucilaginosa*, *Trichosporon asahii*.



**Figure 2:** *Cryptococcus neoformans* (aspect des colonies sur milieu de Niger (A), capsule visible en négatif dans l'encre de chine (B))

### 2.2.2 Expertise 2013 sur les champignons filamenteux

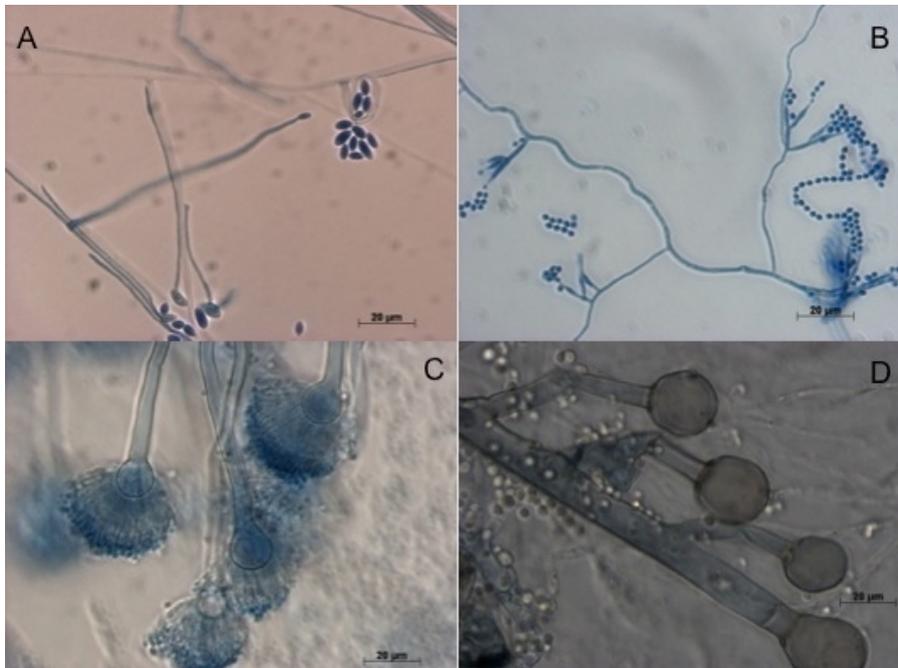
Les champignons filamenteux étaient isolés essentiellement des poumons (37%), de la peau (15,5%), de la sphère ORL (6%), des yeux (23,5%), du sang (5%), mais aussi des os (7%), ou du cerveau (2%). Le niveau de caractérisation pour les 226 champignons filamenteux identifiés cette année (64 genres et espèces 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 (Figure 1, Figure 2).

Nous avons ainsi réalisé :

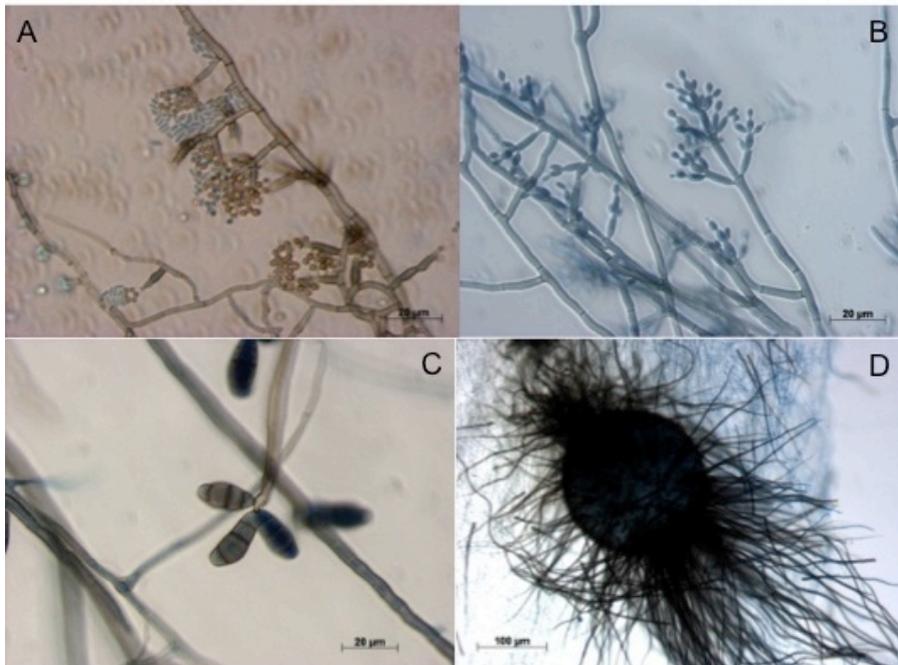
- ✓ une identification phénotypique complète et la constitution d'un fichier numérique complet (macroscopie et microscopie) pour toutes les souches étudiées
- ✓ une caractérisation moléculaire avec séquençage des régions ITS1-5.8S-ITS2 et de la région 28S pour tous les isolats, et de certains gènes (EF1alpha, 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 (74 isolats), RPB2 (26 isolats), beta-tubuline (11 isolats), calmoduline (53 isolats) et actine (19 isolats).
- ✓ La recherche d'une mutation dans le gène *Cyp51A* pour 15 isolats d'*A. fumigatus* résistants ou non aux antifongiques azolés et génotypage par microsatellites lorsqu'il s'agissait d'isolats séquentiels.
- ✓ la détermination du profil de sensibilité à 8 antifongiques pour 198 isolats (sachant que les conditions de réalisation des CMI empêchent la croissance de certaines espèces et/ou isolats).

Nous avons ainsi identifié ou confirmé l'identification :

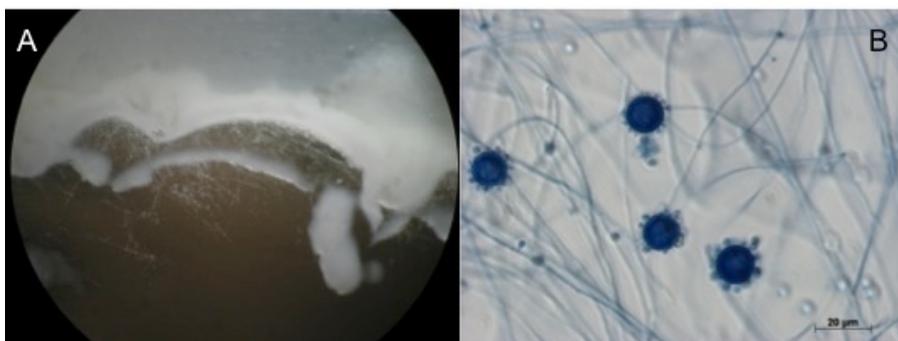
- ✓ de plusieurs espèces d'*Aspergillus* : *A. fumigatus*, *A. terreus*, *A. flavus*, *A. luchuensis*, *A. calidoustus*, *A. alabamensis* (Figure 3), *A. neoniveus*, *A. niger*, *A. puniceus*, *A. tamarii*, *A. tubingensis*, *A. calidoustus*, *A. nidulans*), *A. quadrilineatus*, *A. sublatus*
- ✓ de plusieurs espèces appartenant aux complexes *oxysporum*, *solani* (Figure 3), et *dimerum*, et aussi *dimerum* et *Gibberella fujikuroi*
- ✓ d'autres hyphomycètes : *Beauveria bassiana*, *Diaporthe raonikayaporum*, *Eutypella scoparia*, *Botryosphaeria* sp., *Sarocladium kiliense* (*Acremonium kiliense*), *Neocosmospora vasinfecta*, *Neocosmospora hiratsukae*, *Scedosporium boydii*, *Scedosporium prolificans*, *Lecythophora hoffmanii*, *Microascus cirrosus*, *Purpureocillium lilacinum* (ancien, *Paecilomyces lilacinus*) (Figure 3), *Pleurostomophora ootheca*, *Pleurostomophora richardsiae*, *Scopulariopsis brevicaulis*, *Trichoderma longibrachiatum*
- ✓ de dématiées (Figure 4) : *Alternaria alternata*, *Alternaria infectoria*, *Aureobasidium pullulans*, *Chaetomium globosum*, *Curvularia lunata*, *Curvularia aerea*, *Exophiala dermatitidis*, *Fonsecaea monophora*, *Fonsecaea nubica*, *Phaeoacremonium parasiticum*, *Rhinochrysiella mackenziei*
- ✓ d'un coelomycète : *Paraconiothyrium cyclothyrioides*
- ✓ des agents de mycétome : *Madurella mycetomatis* et une espèce encore inconnue



**Figure 3 :** *Fusarium solani* complexe (A), *Purpureocillium lilacinum* (B), *Aspergillus alabamensis* (C), *Rhizomucor pusillus* (D)



**Figure 4:** *Pleurostomophota richardsiae* (A), *Fonsecaea monophora* (B), *Curvularia lunata* (C), *Chaetomium globosum* (D)



**Figure 5:** Aspect macroscopique (A) et microscopique (B) de la forme mycélienne d'*H. capsulatum* visible en bordure d'une culture en nappe de *Candida albicans* (A)

- ✓ De Mucorales : *Lichtheimia corymbifera*, *Lichtheimia ramosa*, *Mucor circinelloides*, *Rhizomucor miehei*, *Rhizomucor pusillus* (Figure 3), *Rhizopus microsporus*, *Rhizopus arrhizus*
- ✓ Des champignons dimorphiques (*Coccidioides immitis*, *Histoplasma capsulatum* var. *capsulatum* (Figure 5), *Talaromyces marneffeii*)
- ✓ Quelques isolats de champignons filamenteux ascomycètes et basidiomycètes d'espèces non identifiables sur la morphologie et les séquences disponibles

### 2.2.3 Expertise 2013 sur la sensibilité aux antifongiques

La détermination de la sensibilité aux antifongiques se fait par la technique mise au point par l'EUCAST. La technique est adaptée pour les antifongiques et les espèces non étudiés dans les documents EUCAST. L'absence de seuil défini pour toutes les espèces et tous les antifongiques et l'absence de corrélation *in vivo/in vitro* dans la plupart des situations cliniques justifie l'utilisation que nous faisons de ces données au CNRMA. Les résultats 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, 731 isolats ont été testés en 2013 pour leur sensibilité aux antifongiques. Le nombre très important d'antifongiques testés, de genres et d'espèces différents rend impossible une analyse détaillée, certaines espèces n'étant représentées que par un très petit nombre d'isolats. Nous présenterons 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. albicans*, 7 *C. glabrata*, 2 *C.tropicalis*) avec découverte de :

- ✓ mutation S645P dans la région HS1 du gène *Fks1* chez *C. albicans*
- ✓ S663P, délétion F658 dans la région HS1 du gène *Fks2* et/ou HS1 du gène *Fks3* chez *C. glabrata*
- ✓ mutation non connues (en cours de publications) dans la région HS1 du gène *Fks* chez *C. tropicalis*

Nous avons également recherché une mutation dans le gène *Cyp51A* pour des isolats d'*A. fumigatus* résistants aux antifongiques azolés (découverte de 5 mutations TR34/L98H).

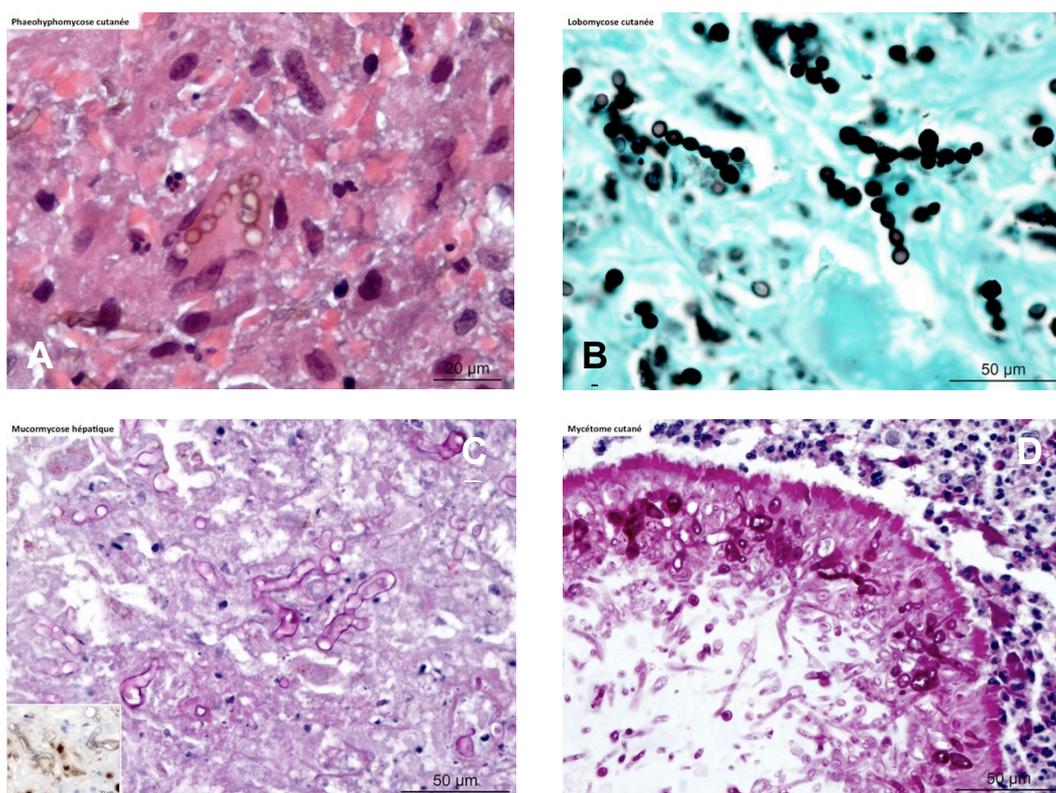
### 2.2.4 Expertise 2013 sur les mycoses endémiques

Le CNRMA a été sollicité deux fois cette année par des responsables de laboratoire hospitalier à la suite de l'exposition accidentelle des personnels de leur laboratoire à des champignons dimorphiques (classe 3). Dans un cas, il s'agissait d'*Histoplasma capsulatum* avec 4 sujets potentiellement exposés

(culture à partir de la moelle osseuse d'un patient séropositif pour le VIH). Dans l'autre cas, il s'agissait de 8 sujets potentiellement exposés à une culture de *Coccidioides immitis* (culture de LBA d'un patient pour lequel le diagnostic de coccidioidomycose avait été fait dans un autre centre hospitalier, mais non communiqué au laboratoire). Dans les deux cas, les déclarations ont été faites au service de médecine du travail et aucune séroconversion n'a été détectée. Ce sont les seuls cas où le CNRMA réalise des sérologies de mycoses exotiques.

### 2.2.5 Expertise 2013 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). En 2013, les demandes provenaient à part à peu près égale d'hôpitaux de l'AP-HP ou de centres hospitaliers en province. Trente-huit dossiers ont été ainsi discutés, aboutissant à un diagnostic de certitude (46%) ou de présomption (13%). Dans 40% 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.



**Figure 6:** (A) Phaeohyphomycose cutanée (coloration HES); (B) Lobomyycose cutanée (coloration Gomori Grocott); (C) Mucormycose hépatique (coloration PAS); (D) Mycétome (coloration HES) - Pas d'isolat disponible au CNRMA pour ces quatre cas.

### 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 cryptococcoses<sup>1</sup>, l'autre plus récemment en 2010 sur les mucormycoses<sup>2</sup>, 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 12) avec 15 centres actifs.



**Figure 7:** Répartition géographique des 25 CC-CCNRMA

actuellement 25 CC-CCNRMA (Figure 7). 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

<sup>1</sup> Dromer *et al.* Epidemiology of cryptococcosis in France: a 9-year survey (1985-1993). Clin. Infect. Dis. 1996;23:82-90.

<sup>2</sup> Bitar *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.

mycoses invasives et d'obtenir des données sur la pneumocystose qu'il serait difficile de chiffrer par le biais d'une surveillance passive.

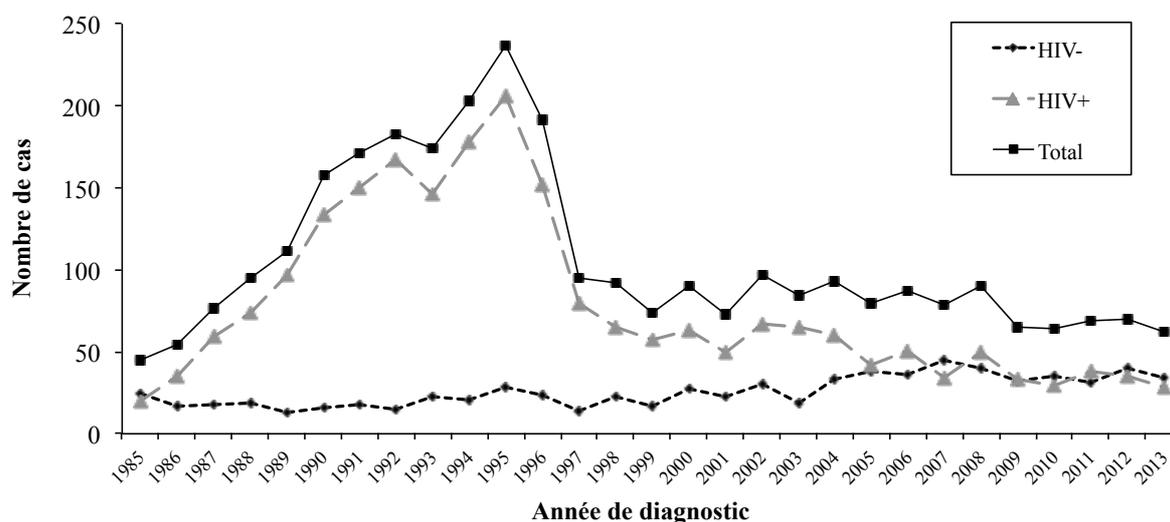
Ces trois réseaux s'appuient en première ligne sur les mycologues/microbiologistes avec des correspondants cliniciens dans chaque service concerné. Les questionnaires standardisés ont été édités grâce au logiciel Voozано et sont accessibles au travers d'un site sécurisé hébergé par l'Institut Pasteur (<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 de confrontation de données en cours d'année, sauf en cas de phénomènes anormaux ce qui a été le cas en décembre 2013 avec la survenue de quelques cas groupés d'infections sévères à *Geotrichum clavatum* (*Saprochaete clavata*).

### 3.1.1 Surveillance de la cryptococcose :

La surveillance de la cryptococcose a débuté en 1985. A ce jour (23/02/2014), 3063 cas de cryptococcoses ont été enregistrés dans la base RESOMYC. Le réseau des correspondants comprend 193 centres qui ont déclaré entre 1 et 218 cas depuis 1985 (62 centres ont déclaré entre 1 et 9 cas en 2013). Le nombre de cas diagnostiqués et notifiés au CNRMA est stable depuis plusieurs années, aux alentours de 70/an avec une proportion désormais égale de sujets séropositifs pour le VIH et séronégatifs (Figure 8).

Le nombre de cryptococcoses diagnostiquées chez les sujets séronégatifs pour le VIH a tendance à augmenter depuis 2004 sans qu'on n'ait encore trouvé une explication, avec une augmentation concomitante de la proportion de femmes (14,9% des 1680 patients diagnostiqués entre 1985 et 1996 vs. 27,6% des 1376 patients diagnostiqués depuis,  $p < 0,001$ ).



**Figure 8:** 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 du 22/02/2014)

En 2013, 62 cas de cryptococcose ont été notifiés au CNRMA dont 34 chez des patients séronégatifs pour le VIH (32% de femmes) et 28 chez des patients séropositifs (35% de femmes).

Il n'est pas très intéressant de faire le bilan sur une année seulement. En revanche, 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 HAART (37% vs. 13%,  $p < 0,001$ ). Chez les 841 sujets séronégatifs pour le VIH, la répartition est depuis 1985 : pathologies malignes (33,5%), transplantation d'organes solides (15,5%), autres pathologies ou traitements (27%) et pas de facteur de risque identifié (24%).

Sur le plan mycologique, une fongémie est retrouvée dans 50% 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 la moitié des cas malgré leur valeur pronostique. Une méningoencéphalite est présente chez 72% et 88% 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. 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:** Evolution (%) pour les 476 patients ayant eu un diagnostic de cryptococcose entre 2006 et 2013 en France

Evolution à 3 mois	Séronégatif (n = 236)	Séropositif (n=240)
Vivant	71,2%	82,1%
Décès précoce (< 15 jours)	18,6%	10,0%
Décès tardif (<3 mois)	10,2%	7,9%

### 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 atteints de fongémie à levure (définie par 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, 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 de participation).

Au 31/12/2013, la collection de l'ODL comportait 4136 isolats de levures (dont 249 reçus au cours de l'année 2013), provenant de 3824 patients ayant présenté 4011 épisodes de fongémie à levure, dont 187 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, 95,1% (3932/4136) des isolats étaient des levures du genre *Candida*, mais on dénombrait aussi d'autres genres dont *Cryptococcus* (*C. neoformans* représentant 69,6% des 204 espèces non *Candida*), mais aussi *Trichosporon*, *Rhodotorula*, *Geotrichum* et *Saccharomyces*. Enfin, 3,1% des infections étaient mixtes (dues à 2 ou 3 espèces différentes). Les 7 espèces de *Candida* fréquentes

(définies par un nombre d'isolats  $\geq 1.5\%$  des isolats) se répartissaient en *C. albicans* (51,4%), *C. glabrata* (17,6%), *C. parapsilosis* (11,2%) (complexe d'espèces comprenant également les espèces très minoritaires *C. metapsilosis* (0,53%) et *C. orthopsilosis* (0,25%), *C. tropicalis* (8,9%), *C. krusei* (3,0%), de *C. kefyr* (1,8%) et *C. lusitaniae* (1,5%). La distribution des espèces variait selon l'âge ( $p < 0,001$ ), la pathologie sous-jacente ( $p < 0,001$ ), l'hospitalisation en unité de soins intensifs (USI) ( $p = 0,004$ ), la pré-exposition à un antifongique ( $p < 0,001$ ) ou le fait que l'épisode soit incident ou récurrent.

Les patients étaient dans 61% des cas des hommes, âgés en moyenne de 56 ans [0 - 98]. On dénombrait 3599 adultes et 225 enfants âgés de moins de 15 ans et 10% des patients étaient âgés de plus de 80 ans. Près de la moitié (45,5%) des patients étaient hospitalisée en USI et près des trois quarts (72%) avaient un cathéter veineux central à la date de la fongémie. Les principales comorbidités étaient un acte chirurgical dans les 30 jours précédant la fongémie (35,7%), un cancer (31,1%), une hémopathie maligne (18,5%), une transplantation d'organe solide (6,1%), ou une infection par le VIH (6,6%). Il existait une pré-exposition à un antifongique dans 12% des cas, beaucoup plus souvent lors des épisodes récurrents (57%) que lors des épisodes incidents (10%) ( $p < 0,001$ ). Les patients avaient été pré-exposés au fluconazole (52,8%) ou à la caspofungine (29,2%). Si l'on considère seulement les épisodes pour lesquels le décès n'était pas survenu avant le résultat de l'hémoculture, soit 81% des épisodes, les traitements antifongiques se répartissaient en fluconazole seul (50,1%), échinocandine seule (27,7%) ou autre traitement (15,9%). Le type de traitement différait significativement s'il s'agissait d'un épisode incident ou récurrent ( $p < 0,001$ ). Il faut aussi noter que 6.3% des épisodes n'ont pas été traités.

La mortalité à 30 jours était de 37,1% avec une mortalité précoce à 8 jours de 21,3%. La mortalité à J30 augmentait avec l'âge ( $p < 0,001$ ), en cas d'hospitalisation en USI (48.7% vs 27.3 %,  $p < 0,001$ ), et lorsqu'aucun traitement n'avait été administré ( $p < 0,001$ ). La pathologie cancéreuse sous-jacente n'influait pas la survie. La mortalité variait selon l'espèce ( $p < 0,001$ ): *C. albicans* (40%), *C. glabrata* (40,3%), *C. parapsilosis* (21%), *C. tropicalis* (38.6%), *C. krusei* (50,4%), *C. kefyr* (42%), *C. lusitaniae* (21,8%), *Cr. neoformans* (24 %) et autre (40,4%).

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

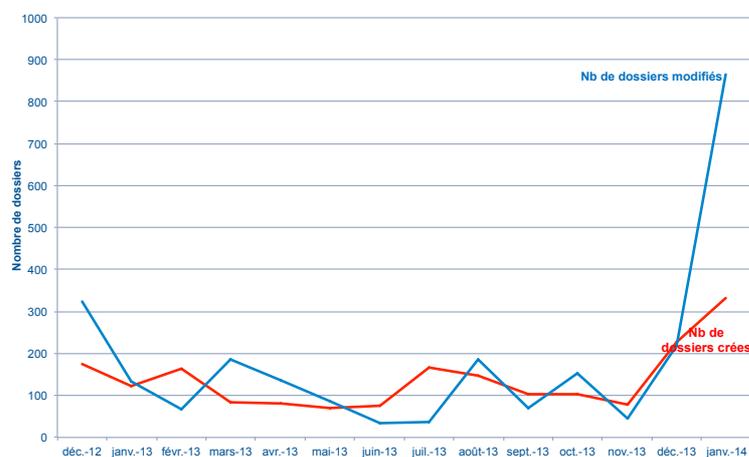
RESSIF s'appuie donc sur un réseau de laboratoires, au nombre de 25 en 2013<sup>3</sup>, les CC-CNRMA qui ont souhaité participer de façon active et pérenne à la surveillance des infections fongiques invasives en France. Nous considérons que RESSIF permettra de déterminer l'incidence des mycoses invasives 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 diagnostiquées dans leurs centres grâce au serveur sécurisé dédié (<https://epidemiopasteur.fr/ressif>) et d'adresser au CNRMA tous les isolats correspondants (à 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).

Le questionnaire en ligne a été construit avec le logiciel ©voozoo /epiconcept. Il comprend 4 pages et 354 variables, certaines variables, optionnelles, n'apparaissant que si l'information est pertinente

<sup>3</sup> liste des CC-CNRMA de 2012 par ordre alphabétique des villes, les référents mycologues étant indiquées 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).

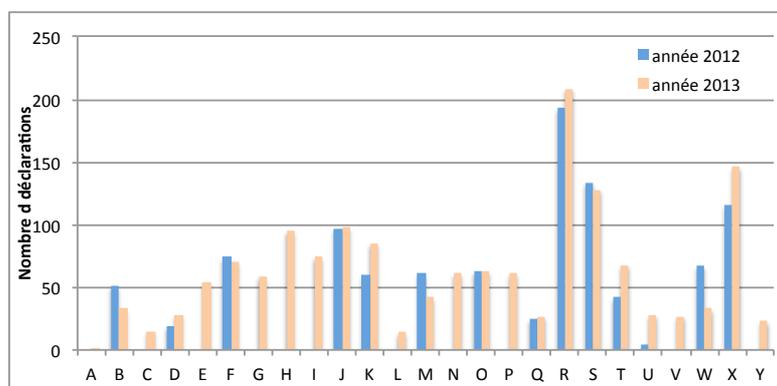
dans le contexte. Nous sommes conscients du travail que représente l'enregistrement des données dans les CC-CNRMA. Cependant, le serveur permet aussi d'enregistrer les cas qui ne rentrent pas dans le périmètre de RESSIF (infections "possibles", infections urinaires, péritonéales) pour un usage personnel au niveau de chaque centre. De plus, le médecin d'études cliniques du CNRMA assure le monitoring de la base en continu et réclame les données manquantes ou l'envoi des souches. L'activité sur le serveur est continue avec des pics impressionnants d'enregistrement et de mise à jour des fiches en fin d'année (Figure 9).



**Figure 9:** Activité (dossiers enregistrés et dossiers modifiés) sur le serveur RESSIF entre décembre 2012 et janvier 2014

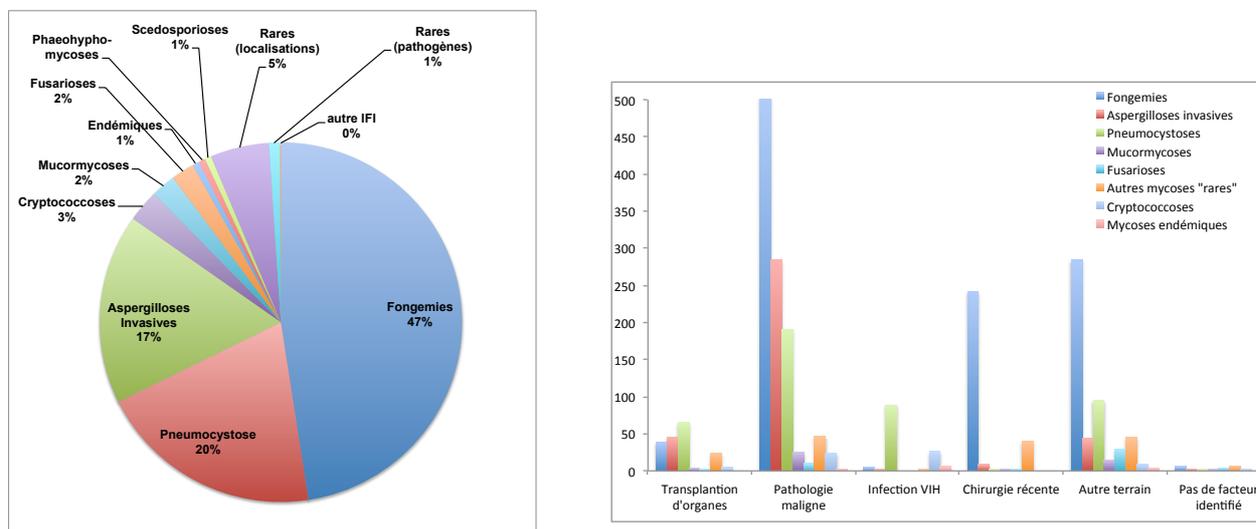
Au terme de ces deux années de fonctionnement, et en sachant que le bilan n'est pas définitif en raison des retards de déclaration, et d'un recul insuffisant pour les évolutions cliniques, il est déjà impressionnant avec 2482 dossiers enregistrés dans RESSIF dont 76% d'IFI prouvées et 20% d'IFI probables et 4% de non classables.

Le nombre de déclarations est très variable évidemment, fonction de la taille du centre hospitalier et des services (hématologie, cancérologie, unité de soins intensifs, transplantation, maladies infectieuses, ...) (Figure 10). 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 10:** Nombre de déclarations dans les 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 11) avec 3 mycoses constituant 85% du total : les fongémies (47%), les pneumocystoses (20%) et les aspergilloses invasives (17%), 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'années. Rappelons ici les difficultés diagnostiques de pneumocystose, car la PCR est maintenant très utilisée 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 11:** Répartition des 2258 infections fongiques invasives déclarées dans le cadre de RESSIF en 2013 (et 2012 pour la moitié des centres), en pourcentage global (panel de gauche) et en fonction du principal facteur de risque (panel de droite)

Les patients étaient majoritairement (63%) des hommes âgés de  $56 \pm 19$  ans, mais avec des différences significatives en fonction des mycoses, et en particulier dans le cas des infections liées à un traumatisme (infections oculaires à *Fusarium* sp. par exemple) pour lesquels le ratio H/F s'équilibre et les patients sont plus jeunes (moyenne de 43 ans). Le principal facteur de risque correspond aux pathologies malignes (tumeurs solides, hémopathies malignes, 48%), suivi par la chirurgie récente (13%), les transplantations d'organe solide (8%) (Figure 11). Il faut noter que 33% des patients étaient pris en charge en unité de soins intensifs.

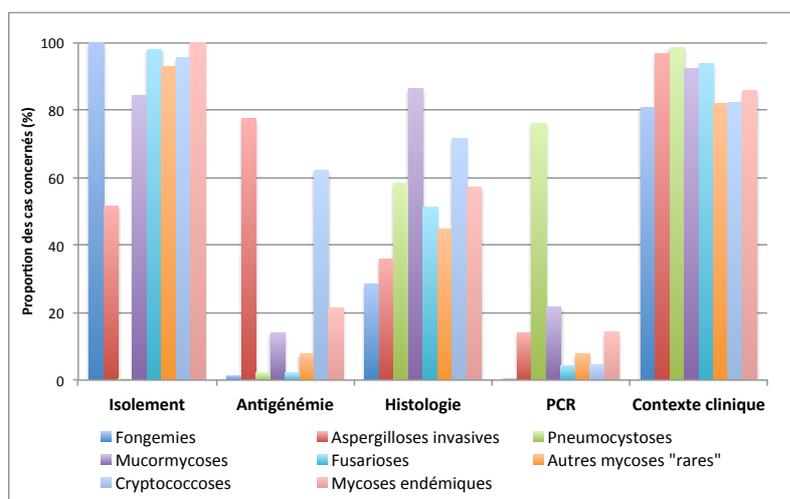
Les caractéristiques des patients changent aussi en fonction des infections avec une quasi-parité hommes/femmes, un âge moyen plus jeune et un bon pronostic vital au cours des fusarioses, reflets du fait que la plupart sont oculaires (Tableau 1). A l'inverse, le pronostic des mucormycoses est très sévère (74% de mortalité). De façon surprenante, dans cet échantillon, le pronostic des fongémies est également plus sévère que celui rapporté au cours de l'ODL, mais la différence porte sur les patients hospitalisés en USI en comparaison des autres services d'hospitalisation (66% vs. 40%,  $p < 0,001$ ).

**Tableau 2:** Principales caractéristiques des mycoses invasives répertoriées dans RESSIF (2012-2013)

	N	Hommes*	Age moyen $\pm$ SD	Décès à 3 mois**
Fongémies	1115	63%	$58 \pm 21$	48%
Aspergilloses Invasives	404	59%	$55 \pm 17$	42%
Pneumocystoses	474	66%	$58 \pm 17$	22%
Mucormycoses	52	71%	$56 \pm 19$	74%
Fusarioses	49	43%	$44 \pm 17$	14%
Autres mycoses rares	174	66%	$56 \pm 18$	19%
Cryptococcoses	68	65%	$53 \pm 18$	30%
Mycoses endémiques	14	71%	$53 \pm 13$	20%

\*  $p = 0,03$  et \*\* $p < 0,001$  (test du Chi2)

Les moyens ayant permis d'établir le diagnostic différaient évidemment selon les mycoses (Figure 12). On peut noter que le diagnostic d'aspergillose invasive a reposé davantage sur la détection du galactomannane aspergillaire que sur l'isolement d'une souche. Si cette pratique découle logiquement des critères de définition préconisés par le MSG et l'EORTC<sup>4</sup>, elle limite l'identification de l'espèce causale. Même si *A. fumigatus* est isolé en majorité (78,5% 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 c'est encore rare 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*, *Emericella nidulans*, *Aspergillus terreus*, *Aspergillus pseudodeflectus*, *Aspergillus westerdijkiae*, *Aspergillus calidoustus*, *Aspergillus tamarii*, *Emericella quadrilineata*, *Aspergillus alabamensis*, *Aspergillus puniceus*, *Aspergillus tubingensis*, *Aspergillus neoniveus*, et *Neosartorya hiratsukae*.



**Figure 12:** Contribution de la clinique et de la mycologie dans le diagnostic des principales mycoses invasives répertoriées

Près de 20% des patients avaient reçu un antifongique avant le diagnostic de la mycose invasive, plus souvent dans le cadre des mucormycoses (57%) ou des aspergilloses (37%) que dans celui des fongémies (18%) ou des cryptococcoses (11%). Le traitement antifongique avait été prescrit dans 90% des cas après le diagnostic était en monothérapie ou en association. C'était en première intention le voriconazole (74% des AI et 61% des fusarioses), le fluconazole (30% des fongémies et des mycoses rares, 78% des cryptococcoses), la caspofungine (41% des fongémies et 25% des mycoses rares), le posaconazole (17% des mucormycoses), et des formulations diverses d'amphotéricine B (16% des fongémies, 28% des mycoses rares, 79% des fusarioses, 8% des mucormycoses, et 37% des cryptococcoses).

Cette analyse encore succincte montre que la base de données RESSIF sera une source importante 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.

<sup>4</sup> De Pauw B et al. Revised definitions of invasive fungal disease from the European Organization for Research and Treatment of Cancer/Invasive Fungal Infections Cooperative Group and the National Institute of Allergy and Infectious Diseases Mycoses Study Group (EORTC/MSG) Consensus Group. Clin Infect Dis. 2008;46:1813

## 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<sup>5</sup>, 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 3Tableau 1) et *Aspergillus* spp. (Tableau 4), 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 0,5mg/L pour une espèce de *Candida* autre que celles du complexe *C. parapsilosis/orthopsilosis/metapsilosis*, était habituellement associée à une mutation dans le hot spot d'un ou plusieurs gènes *fkS*.

**Tableau 3:** *Candida* sp. EUCAST Antifungal Clinical Breakpoint (Table v.6.0 valid from mars 2013) ([http://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST\\_files/AFST/Antifungal\\_breakpoints\\_v\\_6.1.pdf](http://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/AFST/Antifungal_breakpoints_v_6.1.pdf))

*Candida* spp.

EUCAST Antifungal Clinical Breakpoint Table v. 6.1, valid from 2013-03-11

Antifungal agent	MIC breakpoint (mg/L)														Notes		
	<i>C. albicans</i>		<i>C. glabrata</i>		<i>C. krusei</i>		<i>C. parapsilosis</i>		<i>C. tropicalis</i>		<i>C. guilliermondii</i>		Non-species related breakpoints <sup>1</sup>				
	S ≤	R >	S ≤	R >	S ≤	R >	S ≤	R >	S ≤	R >	S ≤	R >	S ≤	R >			
<b>Amphotericin B</b>	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	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.
<b>Anidulafungin</b>	0.03	0.03	0.06	0.06	0.06	0.06	0.002	4	0.06	0.06	IE <sup>2</sup>	IE <sup>2</sup>	IE <sup>2</sup>	IE <sup>2</sup>	IE <sup>2</sup>	IE <sup>2</sup>	
<b>Caspofungin</b>	Note <sup>3</sup>	Note <sup>3</sup>	Note <sup>3</sup>	Note <sup>3</sup>	Note <sup>3</sup>	Note <sup>3</sup>	-	-	Note <sup>3</sup>	Note <sup>3</sup>	IE <sup>2</sup>	IE <sup>2</sup>	IE <sup>2</sup>	IE <sup>2</sup>	IE <sup>2</sup>	IE <sup>2</sup>	3. Due to significant inter-laboratory variation in MIC ranges for caspofungin, EUCAST breakpoints have not yet been established.
<b>Fluconazole</b>	2	4	0.002	32	-	-	2	4	2	4	IE <sup>4</sup>	IE <sup>4</sup>	2	4	2	4	
<b>Itraconazole</b>	IP	IP	IP	IP	IP	IP	IP	IP	IP	IP	IP	IP	IP	IP	IP	IP	5. Strains with MIC values above the S/I breakpoint are rare or not yet reported. The identification and antimicrobial 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 (in italics) they should be reported resistant.
<b>Micafungin</b>	0.016	0.016	0.03	0.03	IE <sup>4</sup>	IE <sup>4</sup>	0.002	2	IE <sup>4</sup>	IE <sup>4</sup>	IE <sup>4</sup>	IE <sup>4</sup>	IE	IE	IE	IE	
<b>Posaconazole</b>	0.06	0.06	IE <sup>2</sup>	IE <sup>2</sup>	IE <sup>2</sup>	IE <sup>2</sup>	0.06	0.06	0.06	0.06	IE <sup>2</sup>	IE <sup>2</sup>	IE	IE	IE	IE	
<b>Voriconazole</b>	0.12 <sup>5</sup>	0.12 <sup>5</sup>	IE	IE	IE	IE	0.12 <sup>5</sup>	0.12 <sup>5</sup>	0.12 <sup>5</sup>	0.12 <sup>5</sup>	IE <sup>2</sup>	IE <sup>2</sup>	IE	IE	IE	IE	

MIC method (EUCAST standardised broth microdilution method)  
 Medium: RPMI1640-2% glucose, MOPS buffer  
 Inoculum: Final 0.5x10<sup>8</sup> - 2.5x10<sup>7</sup> cfu/ml  
 Incubation: 18-24h  
 Reading: Spectrophotometric, full inhibition for amphotericin B but 50% growth inhibition for other compounds  
 Quality control: *C. parapsilosis* ATCC 22019 or *C. krusei* ATCC 6258

<sup>5</sup> Desnos-Ollivier, M., S. Bretagne, D. Raoux, D. Hoinard, F. Dromer, and E. Dannaoui. 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. *Antimicrobial Agents Chemother.* 2008;52:3092-3098.

**Tableau 4: Aspergillus sp. EUCAST Antifungal Clinical Breakpoint (Table v.6.1, mars 2013)**  
 ([http://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST\\_files/AFST/Antifungal\\_breakpoints\\_v\\_6.1.pdf](http://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/AFST/Antifungal_breakpoints_v_6.1.pdf))

*Aspergillus* spp.

EUCAST Antifungal Clinical Breakpoint Table v. 6.1, valid from 2013-03-11

MIC method (EUCAST standardised broth microdilution method)  
 Medium: RPM1640-2% glucose, MOPS as buffer  
 Inoculum: Final 1x10<sup>5</sup> – 2.5x10<sup>5</sup> cfu/mL  
 Incubation: 48h  
 Reading: Visual  
 Quality control: *A. fumigatus* ATCC 204305, *A. flavus* ATCC 204304, *A. fumigatus* F 6919, *A. flavus* CM 1813, *C. parapsilosis* ATCC 22019 (read after 18-24 h) or *C. krusei* ATCC 6258 (read after 18-24 h)

Antifungal agent	MIC breakpoint (mg/L)												Notes
	<i>A. flavus</i>		<i>A. fumigatus</i>		<i>A. nidulans</i>		<i>A. niger</i>		<i>A. terreus</i>		Non-species related breakpoints <sup>1</sup>		
	S ≤	R >	S ≤	R >	S ≤	R >	S ≤	R >	S ≤	R >	S ≤	R >	
Amphotericin B	IE <sup>2</sup>	IE <sup>2</sup>	1	2	Note <sup>3</sup>	Note <sup>3</sup>	1	2	-	-	IE	IE	1. Non-species related breakpoints have been determined mainly on the basis of PK/PD data and are independent of MIC distributions of specific species. They are for use only for organisms that do not have specific breakpoints. 2. The ECOFFs for these species are in general one step higher than for <i>A. fumigatus</i> . 3. There are too few MIC data to establish ECOFFs and hence to suggest any breakpoints.
Anidulafungin	IE	IE	IE	IE	IE	IE	IE	IE	IE	IE	IE	IE	
Caspofungin	IE	IE	IE	IE	IE	IE	IE	IE	IE	IE	IE	IE	
Fluconazole	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Itraconazole <sup>4</sup>	1	2	1	2	1	2	IE <sup>2,5</sup>	IE <sup>2,5</sup>	1	2	IE <sup>5</sup>	IE <sup>5</sup>	
Micafungin	IE	IE	IE	IE	IE	IE	IE	IE	IE	IE	IE	IE	
Posaconazole <sup>4</sup>	IE <sup>2</sup>	IE <sup>2</sup>	0.12 <sup>6</sup>	0.25 <sup>6</sup>	IE <sup>2</sup>	IE <sup>2</sup>	IE <sup>2</sup>	IE <sup>2</sup>	0.12 <sup>6</sup>	0.25 <sup>6</sup>	IE	IE	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.
Voriconazole <sup>4</sup>	IE <sup>2</sup>	IE <sup>2</sup>	1	2	IE	IE	IE <sup>2</sup>	IE <sup>2</sup>	IE <sup>2</sup>	IE <sup>2</sup>	IE	IE	

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

Les données du CNRMA concernent actuellement 6130 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 5).

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 du genre *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. L'analyse rétrospective des échecs thérapeutiques, répertoriés au CNRMA entre 2002 et 2009, comme liés à des infections à *Candida* spp. ayant acquis une résistance aux échinocandines a récemment été publiée<sup>6</sup>.

<sup>6</sup> Dannaoui E, Desnos-Ollivier M, Garcia-Hermoso D, Grenouillet F, Cassaing S, Baixench MT, Bretagne S, Dromer F, Lortholary O, and the French Mycoses Study Group. *Candida* spp. with Acquired Echinocandin Resistance, France, 2004-2010. Emerg Infect Dis. 2012;18:86-90.

**Tableau 5:** Profil de sensibilité des levures aux antifongiques (mise à jour 13/02/2014)

Espèces étudiées <sup>§</sup>	Valeurs des CMI50 / CMI90 (µg/ml) pour les antifongiques*						
	AMB	5-FC	Fluco	Vori	Posa	Caspo**	Mica**
<i>C. albicans</i> (n =2430)	0.06/0.12	≤0.12/0.5	0.25/0.5	≤0.01/≤0.01	0.03/0.06	0.03/0.06	0.03/0.03
<i>C. dubliniensis</i> (n = 70)	0.03/0.125	≤0.12/≤0.12	≤0.12/0.25	≤0.01/≤0.01	0.03/0.06	0.03/0.06	0.03/0.03
<i>C. glabrata</i> (n = 902)	0.12/0.25	≤0.12/≤0.12	16/≥64	0.25/2	1/2	0.06/0.12	0.03/0.03
<i>C. parapsilosis</i> (n = 542)	0.06/0.12	≤0.12/0.25	0.5/4	≤0.01/0.06	0.06/0.12	0.25/1	0.5/0.5
<i>C. orthopsilosis</i> (n=23)	0.03/0.12	≤0.12/≤0.12	0.5/8	0.03/1	0.12/0.25	0.12/0.5	0.25/0.25
<i>C. metapsilosis</i> (n=18)	0.06/0.25	≤0.12/≤0.12	1/4	0.03/0.06	0.03/0.12	0.12/0.25	0.25/0.25
<i>C. tropicalis</i> (n = 438)	0.06/0.12	≤0.12/64	0.5/4	0.03/0.5	0.06/0.25	0.03/0.06	0.03/0.03
<i>C. krusei</i> (n = 200)	0.25/0.25	2/4	32/≥64	0.25/0.5	0.25/0.5	0.12/0.25	0.06/0.12
<i>C. inconspicua</i> (n=24)	0.25/0.25	2/4	16/32	0.12/0.5	0.12/0.25	0.06/0.12	0.03/0.03
<i>C. kefyr</i> (n = 98)	0.12/0.25	0.5/8	0.5/1	≤0.01/≤0.01	0.06/0.12	0.03/0.06	0.06/0.06
<i>C. guilliermondii</i> (n = 70)	0.03/0.06	≤0.12/≤0.12	8/64	0.06/0.5	0.25/0.5	0.06/0.25	0.25/0.25
<i>C. fermentati</i> (n = 28)	0.12/0.25	≤0.12/0.5	8/64	0.12/2	0.25/0.5	0.12/2	0.25/-
<i>C. lusitaniae</i> (n = 98)	0.12/0.25	≤0.12/1	0.25/1	≤0.01/0.06	0.03/0.06	0.06/0.12	0.06/0.12
<i>C. haemulonii</i> (n = 37)	0.5/4	≤0.12/0.25	32/≥64	≥8/≥8	2/≥8	0.03/0.06	0.06/0.12
<i>C. haemulonii</i> type II (n=33)	2/8	≤0.12/0.25	32/≥64	≥8/≥8	8/≥8	0.03/0.03	0.03/-
<i>Candida palmioleophila</i> (n=18)	0.12/0.5	≤0.12/0.5	16/64	0.12/1	0.12/0.25	0.12/-	0.06/-
<i>Pichia jadinii</i> (n = 18)	0.06/0.12	≤0.12/2	1/4	0.06/0.12	0.12/0.5	0.007/1	0.03/-
<i>Pichia anomala</i> (n = 18)	0.06/0.12	≤0.12/32	4/4	0.12/0.25	0.25/0.5	0.06/0.06	0.03/0.03
<i>Pichia ohmeri</i> (n = 14)	0.06/0.12	≤0.12/0.5	4/16	0.03/0.12	0.06/0.12	0.06/4	0.012/-
<i>Pichia norvegensis</i> (n=12)	0.12/0.12	4/8	32/64	0.25/0.5	0.12/0.25	0.06/0.06	0.03/0.06
<i>S. cerevisiae</i> (n = 28)	0.06/0.12	≤0.12/≤0.12	8/16	0.12/0.25	0.5/2	0.12/0.25	0.12/0.25
<i>Yarrowia lipolytica</i> (n=11)	1/1	16/64	4/8	0.06/0.25	0.5/1	0.25/-	-
<i>Geotrichum candidum</i> (n=14)	0.25/0.5	0.25/1	32/64	0.12/1	0.5/1	4/8	2/-
<i>Magnusiomyces capitatus</i> ( <i>G. capitatum</i> ) (n=28)	0.25/1	≤0.12/0.25	16/32	0.12/1	0.25/2	≥8/≥8	≥8/≥8
<i>Saprochaete clavata</i> ( <i>G. clavatum</i> ) (n=65)	0.5/0.5	0.25/1	32/64	0.5/2	0.5/1	≥8/≥8	≥8/≥8
<i>Cr. neoformans</i> var. <i>grubii</i> (n=683)	0.25/0.5	4/16	4/16	0.06/0.12	0.12/0.25	≥8/≥8	4/≥8
<i>Cr. neoformans</i> var. <i>neoformans</i> (n=166)	0.12/0.25	4/8	1/4	0.03/0.06	0.03/0.25	≥8/≥8	1/4
<i>Cr. neoformans</i> hybrides AD (n=36)	0.25/0.5	4/16	4/8	0.06/0.12	0.06/0.12	≥8/≥8	2/≥8
<i>Cr. gattii</i> (n = 24)	0.12/0.25	2/8	8/16	0.12/0.25	0.25/0.5	≥8/≥8	≥8/≥8
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i> (n=25)	0.5/0.5	0.25/0.5	≥64/≥64	4/8	1/2	≥8/≥8	≥8/≥8
<i>Trichosporon asahii</i> (n=18)	2/≥8	32/≥64	4/32	0.06/0.25	0.25/1	≥8/≥8	2/≥8
<i>Trichosporon inkin</i> (n=8)	0.5/-	64/-	1/-	≤0.01/-	0.06/-	4/-	1/-

§ les noms d'espèces d'usage courant en clinique sont utilisés dans ce tableau

\* 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 1600 isolats de champignons filamenteux (Tableau 6). 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 comme l'Observatoire des Levures, ce qui explique que certains isolats ont 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 le tableau 6. 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 6:** Profil de sensibilité des filamentueux aux antifongiques (mise à jour 23/02/2014)

	Valeurs des CMI50 / CMI90 (µg/ml) pour les antifongiques*						
	AMB	Itra	Vori	Posa	Caspo	Terbi	Mica
<b>Mucorales</b>							
<i>Lichtheimia corymbifera</i> (n=41)	0.5/1	1/4	≥8/≥8	0.5/1	8/≥8	0.5/1	≥8/≥8
<i>Lichtheimia ramosa</i> (n=41)	0.12/0.25	2/≥8	≥8/≥8	0.5/1	≥8/≥8	1/2	≥8/≥8
<i>Lichtheimia ornata</i> (n=5)	0.25/-	0.5/-	≥8/-	0.5/-	≥8/-	0.5/-	≥8/-
<i>Rhizopus arrhizus</i> (n=55)	0.12/0.25	0.5/4	8/≥8	0.25/1	≥8/≥8	≥8/≥8	≥8/≥8
<i>Rhizopus microsporus</i> (n=33)	0.06/0.12	1/≥8	8/≥8	0.5/1	≥8/≥8	0.5/1	≥8/≥8
<i>Rhizomucor pusillus</i> (n=36)	0.06/0.12	0.5/1	≥8/≥8	0.25/0.5	≥8/≥8	0.25/1	≥8/≥8
<i>Rhizomucor miehei</i> (n=5)	0.03/-	0.06/-	4/-	0.12/-	≥8/-	0.5	2/-
<i>Mucor circinelloides</i> (n=15)	0.06/0.06	4/≥8	≥8/≥8	1/1	≥8/≥8	≥8/≥8	≥8/≥8
<i>Mucor velutinosus</i> (n=5)	0.06/-	0.5/-	≥8/-	0.25/-	≥8/-	≥8/-	≥8/-
<i>Mucor</i> spp. (n=7)	0.03/-	≥8/-	≥8/-	2/-	≥8/-	≥8/-	≥8/-
<i>Cunninghamella bertholletiae</i> (n=6)	0.25/-	0.5/-	≥8/-	0.5/-	8/-	0.12/-	≥8/-
<b>Hyphomycètes</b>							
<i>Sarocladium kiliense</i> (n=5)	≥8/-	≥8/-	0.5	1/-	1/-	0.5/-	~
<i>Aspergillus fumigatus</i> (n=203)	0.5/0.5	0.25/≥8	0.25/4	0.06/0.5	0.52/0.25	2/4	0.01/0.06
<i>Aspergillus flavus</i> (n=61)	1/2	0.12/0.5	0.5/0.5	0.12/0.25	0.25/0.5	0.06/0.12	0.01/0.06
<i>Aspergillus fischeri</i> (n=5)	1/-	0.5/-	0.5/-	0.25/-	0.5/-	0.12/-	0.03/-
<i>Aspergillus nidulans</i> (n=22)	1/4	0.12/0.5	0.12/0.25	0.12/0.5	0.5/4	0.12/0.5	0.01/0.06
<i>Aspergillus quadrilineatus</i> (n=7)	0.5/-	0.25/-	0.25/-	0.12/-	2/-	0.12/-	0.01/-
<i>Aspergillus</i> section <i>Usti</i> (n=28)	0.5/1	2/≥8	4/8	≥8/≥8	2/8	0.25/0.5	0.25/≥8
<i>Aspergillus</i> section <i>Nigri</i> (n=15)	0.25/0.5	1/2	0.5/1	0.25/0.5	0.25/0.5	0.12/0.25	0.01/0.03
<i>Aspergillus terreus</i> (n=28)	2/8	0.06/0.25	0.5/0.5	0.06/0.25	0.5/2	0.06/0.25	0.015/0.06
<i>Aspergillus versicolor</i> (n=6)	0.5/-	0.25/-	0.25/-	0.12/-	0.5/-	0.12/-	0.03/-
<i>Fusarium oxysporum</i> complex (n=91)	2/4	≥8/≥8	4/8	2/≥8	≥8/≥8	2/8	≥8/≥8
<i>Gibberella fujikuroi</i> complex (n=93)	4/8	≥8/≥8	4/8	4/≥8	≥8/≥8	1/2	≥8/≥8
<i>Fusarium solani</i> complex (n=125)	4/8	≥8/≥8	8/≥8	≥8/≥8	8/≥8	≥8/≥8	≥8/≥8
<i>Fusarium dimerum</i> complex (n=13)	0.5/0.5	≥8/≥8	4/8	≥8/≥8	8/≥8	0.5/2	≥8/≥8
<i>Scedosporium boydii</i> (n=30)	8/≥8	0.5/≥8	0.25/0.5	0.5/1	1/2	≥8/≥8	0.25/1
<i>Scedosporium apiospermum</i> (n=60)	8/≥8	1/≥8	0.5/1	1/2	1/2	≥8/≥8	0.25/0.5
<i>Pseudallescheria ellipsoidea</i> (n=6)	≥8/-	0.5/-	0.5/-	1/-	0.5/-	≥8/≥8	0.25/-
<i>Scedosporium prolificans</i> (n=19)	≥8/≥8	≥8/≥8	≥8/≥8	≥8/≥8	4/8	≥8/≥8	4/≥8
<i>Scedosporium dehoogii</i> (n=6)	≥8/-	0.5/-	0.25/-	0.5/-	2/-	≥8/-	0.25/-
<i>Scopulariopsis brevicaulis</i> (n=12)	8/≥8	≥8/≥8	8/≥8	≥8/≥8	1/2	2/8	0.12/0.25
<i>Purpureocillium lilacinum</i> (n=26)	8/≥8	2/≥8	0.25/0.5	0.25/0.5	≥8/≥8	0.25/0.25	1/≥8
<i>Paecilomyces variotii</i> (n=10)	0.06/0.5	0.25/1	≥8/≥8	0.12/0.5	0.5/4	0.5/8	0.03/0.06
<i>Penicillium</i> spp. (n=30)	0.5/4	1/≥8	2/≥8	0.5/≥8	0.5/≥8	0.25/1	0.03/1
<i>Trichoderma longibrachiatum</i> (n=15)	1/2	≥8/≥8	0.5/1	1/4	0.5/1	1/2	0.06/0.25
<i>Trichoderma</i> spp. (n=8)	1/-	≥8/-	1/-	8/-	0.5/-	2/-	0.06/-
<i>Lecytophora hoffmannii</i> (n=5)	0.25/-	0.25/-	1/-	0.25/-	2/-	0.5/-	2/-
<i>Myceliophthora thermophila</i> (n=5)	1/-	0.12/-	0.12/-	0.12/-	4/-	2/-	0.5/-
<b>Coelomycètes</b>							
<i>Medicopsis romeroi</i> (n=6)	0.5/-	4/-	0.5/-	1/-	4/-	0.12/-	2/-
<i>Phoma</i> spp. (n=7)	0.25/-	0.5/-	0.5/-	0.25/-	4/-	0.12/-	2/-
<b>Dématiés</b>							
<i>Alternaria infectoria</i> complex (n=26)	0.25/0.5	0.5/1	8/≥8	0.12/0.5	0.5/1	0.5/1	0.06/0.12
<i>Alternaria alternata</i> complex (n=23)	0.25/1	0.5/2	2/4	0.25/0.5	0.5/2	4/≥8	0.25/2
<i>Bipolaris</i> spp. (n=5)	0.03/-	0.25/-	0.5/-	0.06/-	0.5/-	1/-	0.06/-
<i>Exophiala dermatitidis</i> (n=23)	0.12/0.25	0.5/1	0.06/0.25	0.12/0.25	8/≥8	0.06/0.12	1/≥8
<i>Exophiala jeanselmei</i> (n=8)	1/-	0.5/-	0.25/-	0.25/-	2/-	0.06/-	2/-
<i>Exophiala spinifera</i> (n=6)	0.12/-	0.25/-	0.12/-	0.25/-	1/-	-	0.25/-

(suite)	Valeurs des CMI50 / CMI90 (µg/ml) pour les antifongiques*						
	AMB	Itra	Vori	Posa	Caspo	Terbi	Mica
<i>Curvularia</i> spp. (n=10)	0.12/0.25	0.5/≥8	0.5/1	0.12/0.5	1/2	0.5/2	0.06/0.5
<i>Chaetomium</i> sp. (n=8)	0.5/-	0.25/-	0.25/-	0.25/-	1/-	1/-	0.5/-
<i>Doratomyces</i> sp. (n=5)	2/-	≥8/-	4/-	1/-	1/-	2/-	0.12/-
<i>Fonsecaea</i> spp. (n=11)	0.5/1	0.06/0.5	0.06/0.12	0.06/0.5	1/2	0.03/0.06	1/-
<i>Phaeoacremonium parasiticum</i> (n=5)	1/-	≥8/-	0.25/-	0.25/-	8/-	0.25/-	≥8/-
<i>Neoscytalidium</i> sp. (n=5)	0.12/-	≥8/-	0.12/-	1/-	0.5/-	0.5/-	0.06/-
<i>Aureobasidium pullulans</i> (n=6)	0.25/-	-	0.12/-	0.06/-	1/-	-	1/-
<b>Dimorphiques</b>							
<i>Sporothrix schenckii</i> (n=20)	1/2	0.5/2	8/≥8	1/2	≥8/≥8	0.06/2	≥8/≥8

\*AMB (amphotéricine B), Itra (itraconazole), Vori (voriconazole), Posa (posaconazole), Caspo (casprofingine), Terbi (terbinafine), Mica (micafungine) ; - : non déterminable pour moins de 10 isolats testés - (filamenteux testés au CNRMA depuis 2003, MAJ 03/03/2014)

### 3.2.5 Analyse des tendances

En prenant les seuils définis partiellement par l'EUCAST (Tableau 3, Tableau 4), on peut étudier les tendances sur les levures collectées dans le cadre de l'observatoire qu'est l'ODL (Tableau 7, Tableau 8, Tableau 9). 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* ( $\leq 2\%$  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 2013) 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 à la casprofingine 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 7** : Evolution de la résistance des levures au fluconazole (% d'isolats dont la CMI fluconazole est  $>4 \mu\text{g/ml}$  ; ODL)

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

**Tableau 8** : Evolution de la résistance des levures au voriconazole (% d'isolats dont la CMI voriconazole est  $>0,12 \mu\text{g/ml}$ )

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

**Tableau 9** : Evolution du pourcentage de levures ayant des CMI caspofungine hautes (% d'isolats dont la CMI caspofungine est >0,25 µg/ml, ODL)

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

### 3.3 Participation aux réseaux de surveillance internationaux, en particulier européens

Il n'existe pas de réseaux de surveillance internationaux, 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.

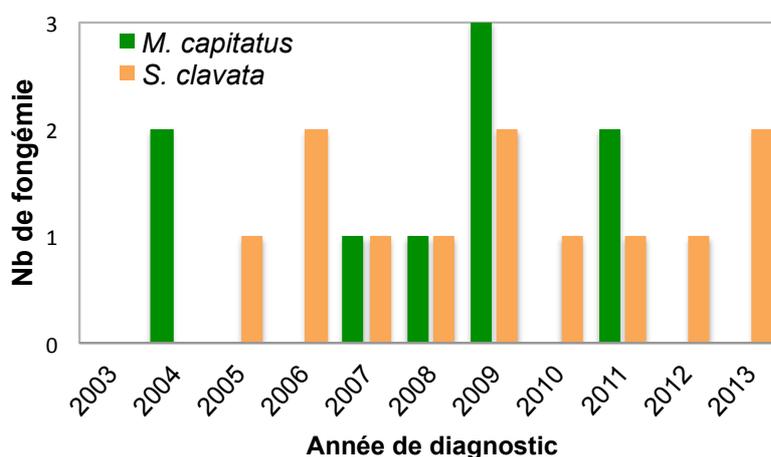
## 4 Alerte

Les relations avec l'InVS se font très simplement par mail ([noa-signallement@invs.sante.fr](mailto:noa-signallement@invs.sante.fr)) ou par appel téléphonique à l'unité des infections associées aux soins et Résistance aux antibiotiques, Département des maladies infectieuses (Dr. S. Vaux; Dr. B. Coignard). Les signalements se font dans les deux sens. Les échanges de 2013 n'ont concerné que des cas d'infections à *Geotrichum* sp.

### 4.1 Alerte sur des cas groupés d'infection à *S. clavata*

Le CNRMA n'a pas signalé à l'InVS de cas d'infection à *S. clavata* clone A (clone épidémique de 2012) avant la caractérisation de 3 cas groupés dans le temps (novembre et décembre 2013) et survenus dans 2 centres différents. Dans la mesure où quelques cas sporadiques avaient été identifiés mais aucun du au clone A depuis juin 2012, la situation pouvait faire redouter une nouvelle épidémie comme en 2012. Il faut savoir que *S. clavata* et *M. capitatus* sont des pathogènes rares et mal identifiés dans les bases de données de séquence ou les profils MALDI-TOF. Si l'on regarde l'observatoire des levures, on constate que chacune de ces espèces ne représente que 2 cas par an dans l'ODL (soit 2 pour 450 cas de fongémies répertoriés annuellement entre 2003 et 2010) (Figure 13).

Une cinquantaine de correspondants du CNRMA a donc été contactée par mail avec demande de signalement des infections à *Geotrichum* spp. et envoi des souches récentes pour identification et typage au CNRMA. Après analyse des souches reçues dont certaines isolées en début d'année 2013, nous avons donc identifié, 8 souches de *Galactomyces candidus* (correspondant à des colonisation digestive ou respiratoire), 2 souches invasives de *M. capitatus* et 10 cas d'infections invasives dues à *S. clavata*, dont une autre due au clone épidémique, portant à 4 cas et 3 centres la nouvelle épidémie. L'alerte a cependant été levée en février 2014 sans que la source de l'infection ait été identifiée avec certitude, mais le CNRMA reste vigilant et a demandé à ses correspondants d'adresser en temps réel toutes les souches de *Geotrichum* spp. invasives.



**Figure 13:** Nombre de cas de fongémies dus à *M. capitatus* ou *S. clavata* déclarés dans l'ODL entre janvier 2013 et décembre 2013

#### 4.2 Cas groupés de fongémies dues à *C. parapsilosis* dans un service de réanimation

Durant l'été 2013, 7 patients soignés dans un même service ont eu des fongémies dues à *Candida parapsilosis* sur une courte période de temps, laissant penser à une épidémie. Nous avons précédemment évalué l'intérêt d'une technique de génotypage par 3 marqueurs microsatellites publiée en analysant 161 isolats cliniques épidémiologiquement indépendants. Nous avons donc une base de données démontrant en plus la diversité des profils obtenus sur ces 161 isolats (104 profils alléliques). Nous avons donc effectué le génotypage des 8 souches cliniques (Tableau 10) et conclu que 5 patients (#2, 3, 5, 6 et 7) étaient infectés par des souches génétiquement liées (identiques pour les 3 marqueurs CP1, CP4, CP6 ou appartenant au même cluster) suggérant une contamination par une source commune et pouvant permettre la mise en place de mesure d'hygiène dans le centre concerné. La source de l'épidémie n'a pas été trouvée.

**Tableau 10:** Profil génétique des souches cliniques de *Candida parapsilosis*

Patient	date		allèles microsatellites					
	prélèvement	service	CP1a	CP1b	CP4a	CP4b	CP6a	CP6b
1	07/06/2013	Rea	245	245	275	311	264	264
2	02/07/2013	Chir	224	245	374	<b>389</b>	306	306
3	12 et 18/09/2013	Rea	224	245	374	374	306	306
4	26/08/2013	Rea	224	245	371	395	270	270
5	16/09/2013	Rea	224	<b>218</b>	374	374	306	306
6	14/09/2013	Rea	224	245	374	374	306	306
7	23/09/2013	Rea	224	245	374	374	306	306

## 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, 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).

Le serveur RESOMYC est 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. Par ailleurs, les rapports et diaporamas concernant l'analyse des données annuelles sont mis en ligne sur le serveur, et donc accessibles aux participants. 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 via le "flash code" ci-joint ou 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 [cnrma@pasteur.fr](mailto:cnrma@pasteur.fr) 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'AFSSAPS (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 ».
  - o Françoise Dromer et Marie Desnos-Ollivier sont membres du groupe de travail sur le génotypage des souches cliniques et environnementales de *C. neoformans* et *C. gattii* 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-coordonateur 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 5ème 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.

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

### 6.1 Etude du franchissement de la barrière épithéliale pulmonaire par trois champignons pathogènes

Une thèse d'université (Dr Blandine Rammaert) est actuellement en cours sur un poste d'accueil AP-HP-Pasteur, sous la direction conjointe de S. Bretagne et F. Dromer. Ses objectifs sont d'élucider les différences de franchissement de la barrière épithéliale pulmonaire pour trois champignons dont la contamination se fait par inhalation (*A. fumigatus*, *Lichtheimia corymbifera* et *Cr. neoformans*) et ceci dans trois conditions expérimentales (souris neutropéniques, diabétiques, ou sous stéroïdes). Cette problématique découle directement des observations sur l'épidémiologie des aspergilloses (augmentation des stéroïdes comme facteurs de risque par rapport à la neutropénie) et des infections à mucorales (patients diabétiques et sous stéroïdes), obtenues notamment au CNRMA en collaboration avec l'InVS (étude SAIF, 2005-2010 ; étude RétroZygo, 2005-2007). Cette thèse est réalisée en collaboration avec trois unités de l'Institut Pasteur, l'unité d'Histopathologie humaine et modèles animaux (G. Jouvion et F. Chrétien), l'unité d'Analyse d'images biologiques (F. de Chaumont, J-C Olivo-Marin), et l'unité de Pathogénie des toxi-infections bactériennes (J-N Tournier, P. Goossens). Les modèles animaux ont été validés, les analyses en microscopie optique et électronique sont en cours et les expériences de passage transépithélial sur poumon ex vivo sont programmées.

### 6.2 Etude des pneumocystoses

En s'appuyant sur le recrutement hospitalier (Hôpital St Louis), Alexandre Alanio, Jean Menotti et S. Bretagne développent des systèmes de typage de *Pneumocystis jirovecii* basés sur la caractérisation de marqueurs microsatellites et l'analyse de la variation des génotypes par une méthode de séquençage de nouvelle génération. Les perspectives sont de proposer ces méthodes pour l'analyse des cas de pneumocystose recensés au CNRMA dans le cadre du réseau collaboratif RESSIF, en particulier pour décrire l'épidémiologie au niveau moléculaire en fonction des centres et recenser les cas d'acquisition

nosocomiale, décrits en particulier dans les centres prenant en charge les transplantés rénaux. Des communications sur le sujet seront faites au prochain congrès de l'ECCMID 2014, Barcelone<sup>7,8</sup>.

En s'appuyant sur la base de données nationale FHDH-ANRS CO4, Olivier Lortholary et Dominique Costagliola (Institut Pierre Louis d'Epidémiologie et de Santé Publique, UMR\_S 1136 INSERM), ont dirigé le travail de Blandine Denis sur l'épidémiologie actuelle de la pneumocystose associée à l'infection par le VIH en France. Ce travail a souligné la gravité de l'infection chez les patients en échec de traitement virologique (publication en cours).

Enfin, l'analyse des données du PMSI menée par l'InVS en lien avec le CNRMA a montré sur la période 2001-2010 que la pneumocystose était la deuxième infection fongique en France en termes d'incidence et que sa fréquence et sa létalité augmentaient chez les sujets séronégatifs pour le VIH (hématologie, transplantation) (publication soumise).

### **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 "ITSdatabase" hébergée à l'université de Sydney.

Par ailleurs, le CNRMA est en train de finaliser la base de données de séquences (ITS et autres séquences) des champignons filamenteux et des levures identifiés au CNRMA depuis 2003. Elle sera, dans un premier temps, testée par les CC-CNRMA puis rendue publique. Dea Garcia-Hermoso et Marie Desnos-Ollivier en seront les curateurs pour les filamenteux et les levures, respectivement.

### **6.4 Mise en place d'un essai thérapeutique randomisé sur la cryptococcose au cours du SIDA: "ACTA"**

En collaboration avec le St Georges Hospital, University of London (primary investigator Pr Tom Harrison), le "medical research council" et l'Agence Nationale de Recherches sur le SIDA (ANRS) financent un essai thérapeutique dans trois pays (Malawi, Zambie, Cameroun) "ACTA". ACTA est une étude de phase III randomisée sur le traitement de la méningoencéphalite cryptococcique dans le contexte de l'infection VIH. ACTA prévoit l'inclusion d'un total de 680 patients et ambitionne de valider un traitement oral de l'infection reposant sur l'association de fluconazole à posologie élevée et de la flucytosine et d'un traitement raccourci à une semaine par amphotéricine B et fluconazole ou flucytosine en comparaison au traitement de référence par amphotéricine B et flucytosine pendant 14 jours. Les résultats de cet essai permettront l'actualisation des recommandations internationales sur la prise en charge de la méningite à *Cr. neoformans*. Des études ancillaires seront également réalisées au Royaume Uni et en France (pharmacocinétiques/dynamiques, coût efficacité, géotypage des isolats, analyses protéomiques et immunologiques et études sur la susceptibilité de l'hôte). Olivier Lortholary est l'Investigateur Principal (nord) pour la partie financée par l'ANRS.

### **6.5 Epidémiologie de la cryptococcose associée à l'infection par le VIH au Cameroun**

Une thèse d'Université (Dr Elvis Temfack) vient de débiter sur une bourse d'étude doctorale de 3 ans (appel d'offre ANRS) sous la direction d'Olivier Lortholary. Ses objectifs sont d'élucider la prévalence de la cryptococcose associée à l'infection par le VIH à Yaoundé en utilisant le concept de screening systématique de tous les patients sévèrement immunodéprimés par un outil sensible et spécifique qu'est la détection de l'antigène cryptococcique avec traitement préemptif antifongique (projet

---

<sup>7</sup> Maud Gits-Muselli, Jean Menotti, Nicolas Guigue, Stéphane Bretagne, and Alexandre Alanio. Microsatellite-based molecular typing method for *Pneumocystis jirovecii*

<sup>8</sup> Alexandre Alanio, Jean Menotti, Séverine Mercier-Delarue, and Stéphane Bretagne Ultra Deep PyroSequencing of *Pneumocystis jirovecii* reveals higher diversity than previously stated

également financé par l'ANRS), le poids de la cryptococcose parmi les causes de méningite chez l'adulte au Cameroun et la diversité (espèces, génotypes, hybrides) des isolats de *Cryptococcus* spp.

### 6.6 Infections à *Fusarium* spp.

Le CNRMA a participé à une analyse internationale de 233 cas de fusarioses invasives provenant de 11 pays dont 92% de patients atteints d'hémopathies malignes. Les facteurs de mauvais pronostic individualisés étaient l'administration de corticoïdes, neutropénie persistante à la fin du traitement antifongique et un traitement par amphotéricine B deoxycholate. La survie de cette infection encore redoutable a augmenté de 21% entre 1985-2000 et 2001-2011<sup>9</sup>.

En collaboration avec le Centre Hospitalier National d'Ophthalmologie des XV/XX, le CNRMA a étudié l'efficacité du voriconazole dans les infections oculaires à *Fusarium* spp. et montré le bénéfice de cet antifongique dans 73% des kératites et 56% des endophtalmies parmi un total de 24 patients<sup>10</sup>.

### 6.7 Mucormycoses

Grâce à la base de données RETROZYGO constituée en collaboration avec l'InVS, nous avons pu montrer rétrospectivement la relation existant entre persistance de la nécrose muqueuse ORL et le pronostic vital des mucormycoses<sup>11</sup>. Ce travail est la base d'un PHRC accepté, étude MICCA, qui évaluera prospectivement en France en 2014 l'importance d'un « second look » chirurgical systématique comme en cancérologie pour le contrôle des mucormycoses. Cette étude sera menée en partenariat avec l'équipe ORL référente sur le sujet à Lariboisière.

### 6.8 Tolérance des antifongiques

Nous avons mené en partenariat avec les centres français de pharmacovigilance une étude rétrospective sur dix ans montrant la relation séquentielle entre phototoxicité, kératose actinique et carcinome épidermoïde cutané sous traitement très prolongé par le voriconazole<sup>12</sup>.

### 6.9 Voyageurs immunodéprimés et risque fongique

Nous avons réalisé une analyse de la littérature et proposé des recommandations de prévention de l'acquisition d'infections fongiques chez les voyageurs immunodéprimés<sup>13</sup>.

### 6.10 Les publications et communications réalisées ou prévues en lien avec les activités du CNR

#### Publications nationales

1. Lortholary O. [Mucorales and mucormycosis]. Med Sci (Paris). 2013; 29 Spec No 1:3-4.
2. Pilmis B, Lanternier F, Lortholary O. [Mucormycosis: therapeutic news]. Med Sci (Paris). 2013; 29 Spec No 1:25-30.

<sup>9</sup> Nucci M et al. Improvement in the outcome of invasive fusariosis in the last decade. Clin Microbiol Infect. 2013

<sup>10</sup> Troke P et al. The efficacy of voriconazole in 24 ocular *Fusarium* infections. Infection. 2013;41:15-20

<sup>11</sup> Vironneau P et al. Local control of rhino-orbito-cerebral mucormycosis dramatically impacts survival. Clin Microbiol Infect. 2013;DOI: 10.1111/1469-0691.12408

<sup>12</sup> Epaulard O et al. A multistep voriconazole-related phototoxic pathway may lead to skin carcinoma: results from a French nationwide study. Clin Infect Dis. 2013;57:e182-8

<sup>13</sup> Lortholary O et al. Fungal infections in immunocompromised travelers. Clin Infect Dis. 2013;56:861-9

## Publications internationales

3. Arendrup MC, Boekhout T, Akova M, Meis JF, Cornely OA, Lortholary O, Arikan-Akdagli S, Cuenca-Estrella M, Dannaoui E, van Diepeningen AD, Groll AH, Guarro J, Guinea J, Hope W, Lackner M, Lagrou K, Lanternier F, Lass-Flörl C, Meletiadis J, Muñoz P, Pagano L, Richardson MD, Roilides E, Tortorano AM, Ullmann AJ. ESCMID/ECMM Joint Clinical Guideline for the Diagnosis and Management of Rare Invasive Yeast Infections. *Clin Microbiol Infect.* 2013; 7:351-360.
4. Bernard C, Maucourt-Boulch D, Varron L, Charlier C, Sitbon K, Freymond N, Bouhour D, Hot A, Masquelet AC, Valeyre D, Costedoat-Chalumeau N, Etienne M, Gueit I, Jouneau S, Delaval P, Mouthon L, Pouget J, Serratrice J, Brion JP, Vaylet F, Bremont C, Chennebault JM, Jaffuel S, Broussolle C, Lortholary O, Seve P. Cryptococcosis in sarcoidosis: cryptOsarc, a comparative study of 18 cases. *QJM.* 2013; 106:523-39.
5. Bugault F, Benati D, Mouthon L, Landires I, Rohrlisch P, Pestre V, Theze J, Lortholary O, Chakrabarti LA. Altered responses to homeostatic cytokines in patients with idiopathic CD4 lymphocytopenia. *PLoS One.* 2013; 8:e55570.
6. 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.* 2013; DOI: 10.1111/1469-0691.12428.
7. Desoubeaux G, Millon A, Freychet B, de Muret A, Garcia-Hermoso D, Bailly E, Rosset P, Chandenier J, Bernard L. Eumycetoma of the foot caused by *Exophiala jeanselmei* in a Guinean woman. *J Mycol Med.* 2013; 23:168-75.
8. Epaulard O, Villier C, Ravaud P, Chosidow O, Blanche S, Mamzer-Bruneel MF, Thiebaut A, Leccia MT, Lortholary O. A multistep voriconazole-related phototoxic pathway may lead to skin carcinoma: results from a French nationwide study. *Clin Infect Dis.* 2013; 57:e182-8.
9. Gamaletsou MN, Rammaert B, Bueno MA, Moriyama B, Sipsas NV, Kontoyiannis DP, Roilides E, Zeller V, Prinapori R, Tajaldeen SJ, Brause B, Lortholary O, Walsh TJ. *Aspergillus* osteomyelitis: Epidemiology, clinical manifestations, management, and outcome. *J Infect.* 2013; DOI: 10.1016/j.jinf.2013.12.008
10. Irtan S, Lamerain M, Lesage F, Verkarre V, Bougnoux ME, Lanternier F, Zahar JR, Salvi N, Talbotec C, Lortholary O, Lacaille F, Chardot C. Mucormycosis as a rare cause of severe gastrointestinal bleeding after multivisceral transplantation. *Transpl Infect Dis.* 2013; 15:E235-8.
11. Lanternier F, Cypowyj S, Picard C, Bustamante J, Lortholary O, Casanova JL, Puel A. Primary immunodeficiencies underlying fungal infections. *Curr Opin Pediatr.* 2013; 25:736-47.
12. Launay E, Thomas C, Gras-Le Guen C, Geffroy L, Moreau A, Lortholary O. Photo quiz. Generalized pain in a 20-year-old man with chronic granulomatous disease. *Clin Infect Dis.* 2013; 57:562-3, 616-7.
13. Lortholary O, Charlier C, Lebeaux D, Lecuit M, Consigny PH. Fungal infections in immunocompromised travelers. *Clin Infect Dis.* 2013; 56:861-9.
14. Loyse A, Dromer F, Day J, Lortholary O, Harrison TS. Flucytosine and cryptococcosis: time to urgently address the worldwide accessibility of a 50-year-old antifungal. *J Antimicrob Chemother.* 2013; 68:2435-44.
15. Nacher M, Adenis A, Mc Donald S, Do Socorro Mendonca Gomes M, Singh S, Lopes Lima I, Malcher Leite R, Hermelijn S, Wongsokarijo M, Van Eer M, Marques Da Silva S, Mesquita Da Costa M, Silva M, Calvacante M, do Menino Jesus Silva Leitao T, Gomez BL, Restrepo A, Tobon A, Canteros CE, Aznar C, Blanchet D, Vantilcke V, Vautrin C, Boukhari R, Chiller

T, Scheel C, Ahlquist A, Roy M, Lortholary O, Carne B, Couppie P, Vreden S. Disseminated Histoplasmosis in HIV-Infected Patients in South America: A Neglected Killer Continues on Its Rampage. *PLoS Negl Trop Dis*. 2013; 7:e2319.

16. 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, Arikian-Akdagli S, Bertz H, Galvão Castro C Jr, Herbrecht R, Hoenigl M, Härter 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*. 2013 doi: 10.1111/1469-0691.12409. [Epub ahead of print]
17. Pilmis B, Coignard-Biehler H, Jullien V, Hermine O, Touraine P, Lecuit M, Lortholary O. Iatrogenic Cushing's syndrome induced by posaconazole. *Antimicrob Agents Chemother*. 2013;57(11):5727-8
18. Riviere S, Lortholary O, Michon J, Bougnoux ME, Mainardi JL, Sendid B, Bretagne S, Lefort A. *Aspergillus* endocarditis in the era of new antifungals: major role for antigen detection. *J Infect*. 2013; 67:85-8.
19. Schwarzinger M, Sagaon-Teyssier L, Cabaret O, Bretagne S, Cordonnier C. Performance of serum biomarkers for the early detection of invasive aspergillosis in febrile, neutropenic patients: a multi-state model. *PLoS One*. 2013; 8:e65776.
20. Shoai Tehrani M, Sicre de Fontbrune F, Roth P, Allisy C, Bougnoux ME, Hermine O, Lecuit M, Lortholary O, Charlier C. Case report of exposure to voriconazole in the second and third trimesters of pregnancy. *Antimicrob Agents Chemother*. 2013; 57:1094-5.
21. Skiada A, Lanternier F, Groll AH, Pagano L, Zimmerli S, Herbrecht R, Lortholary O, Petrikos GL. Diagnosis and treatment of mucormycosis in patients with hematological malignancies: guidelines from the 3rd European Conference on Infections in Leukemia (ECIL 3). *Haematologica*. 2013; 98:492-504.
22. Troke P, Obenga G, Gaujoux T, Goldschmidt P, Bienvenu AL, Cornet M, Grenouillet F, Pons D, Ranque S, Sitbon K, Chaumeil C, Borderie V, Lortholary O. The efficacy of voriconazole in 24 ocular *Fusarium* infections. *Infection*. 2013; 41:15-20.
23. Vironneau P, Kania R, Morizot G, Elie C, Garcia-Hermoso D, Herman P, Lortholary O, Lanternier F. Local control of rhino-orbito-cerebral mucormycosis dramatically impacts survival. *Clin Microbiol Infect*. 2013; DOI: 10.1111/1469-0691.12408
24. 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.
25. Rocchi S, Daguindau E, Grenouillet F, Deconinck E, Bellanger AP, Garcia-Hermoso D, Bretagne S, Reboux G, Millon L. Azole-resistant TR34/L98H *Aspergillus fumigatus* in both fungicide-sprayed field and lung of a hematopoietic stem cell transplant recipient with invasive aspergillosis. *J Clin Microbiol*. 2014;

#### Chapitre de livres ou publications autres

1. Garcia-Hermoso D. [Laboratory diagnosis of mucormycosis]. *Med Sci (Paris)*. 2013; 29 Spec No 1:13-8.
2. Alanio A, Renaudat C, Bretagne S. Epidemiology of fungal resistance: Impact of antifungal treatments. *J Anti-Infect*. 2014; <http://dx.doi.org/10.1016/j.antinf.2014.01.006>:2—7.

## 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).

Nous avons deux projets principaux: l'un est de faire l'analyse des deux ans de fonctionnement de RESSIF et de susciter des travaux collaboratifs à l'intérieur du réseau. L'autre est de finaliser la mise en ligne de la base de données de séquences associées aux données phénotypiques. Ceci se fera, dans un premier temps, avec un groupe d'utilisateurs-testeurs qui sera composé des CC-CNRMA, puis le site sera rendu public.

## 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. Tout clinicien ou microbiologiste/mycologue peut solliciter l'expertise du CNRMA.

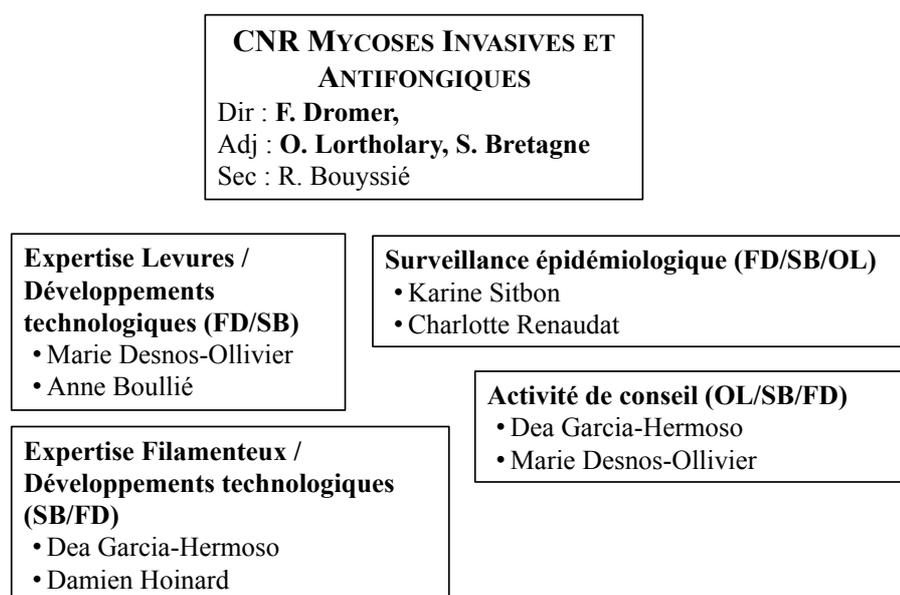
En ce qui concerne **l'activité de surveillance**, la diversité des genres et espèces fongiques en cause, la complexité des pathologies engendrées et des populations à risque compliquent le recueil des données. Nous continuons donc la surveillance passive de toutes les mycoses invasives, mais avons en 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 11) et l'organisation fonctionnelle du CNRMA (Figure 14) sont décrites ci-dessous.

**Tableau 11:** Composition de l'équipe du CNR Mycoses Invasives et Antifongiques en 2013

Nom	Fonction	ETP	Qualification/statut	Organisme payeur
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



**Figure 14:** Organigramme fonctionnel du CNR Mycoses Invasives et Antifongiques en 2013

### 9.3 Description détaillée des locaux et de l'équipement

Jusqu'au 18 novembre 2013, le CNRMA avait des locaux dans le bâtiment Roux (Bât. 53 ; 25 rue du Dr Roux) et disposait de locaux propres (1 laboratoire, une pièce noire, un bureau) et de locaux partagés avec l'unité de Mycologie Moléculaire qui l'hébergeait (1 bureau) et l'unité des *Aspergillus* située au même étage (1 bureau, 1 chambre froide, 2 laboratoires de préparation).

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 CO<sub>2</sub>, hottes chimiques
- Thermocycleurs (iCycler de Bio-Rad et LCR480 de Roche)
- MagNAlyser
- Caméras numériques
- Lecteur ELISA
- Microscopes : optiques, contraste interférentiel, inversé, à épifluorescence
- 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 :

- 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, fermentation de certains sucres, croissance sur milieux spéciaux, réalisation de cultures "3 points", de cultures sur lames, détermination des vitesses et des températures maximales de croissance ...
- ✓ Détermination de la sensibilité aux antifongiques par une technique en milieu liquide standardisée par le comité européen (EUCAST)<sup>14,15</sup>. Les antifongiques testés sont le fluconazole (Triflucan®), l'itraconazole (Sporanox®), la 5-fluorocytosine (Ancotil®), l'amphotéricine B (Fungizone®), le voriconazole (V-fend®), le posaconazole (Noxafil®), 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<sup>16</sup> et les amorces universelles ITS1/ITS4.
- ✓ Détection des mutations dans le gène *Cyp51A* pour les isolats d'*Aspergillus fumigatus* résistants aux antifongiques azolés<sup>17</sup>
- ✓ 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

- 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*.

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

<sup>15</sup> EUCAST Technical Note on the method for the determination of broth dilution minimum inhibitory concentrations of antifungal agents for conidia-forming moulds. Clin Microbiol Infect. 2008;14:982

<sup>16</sup> Donnelly SM et al. Phylogenetic analysis and rapid identification of *Candida dubliniensis* based on analysis of ACT1 intron and exon sequences. Microbiology. 1999;45:1871-1882.

<sup>17</sup> Mellado E et al. Identification of two different 14-alpha sterol demethylase-related genes (*cyp51A* and *cyp51B*) in *Aspergillus fumigatus* and other *Aspergillus* species. J Clin Microbiol. 2001;39:2431 (erratum p4225).

- Mise en place de l'identification des espèces de *Trichosporon* spp. par le séquençage de la région IGS du gène codant l'ARN ribosomique. Incrémentation de la base de données de séquences du 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)<sup>18,19</sup>, et les 7 loci MLST (AAT1a, ACC1, ADP1, MPIb, SYA1, VPS13, ZWF1)<sup>20</sup>
- Pour *C. glabrata*, 5 séquences microsatellites (RPM2, MTI, ERG, Cg4, Cg6)<sup>21</sup>
- Pour *C. parapsilosis*, 3 séquences microsatellites (CP1, CP4, CP6)<sup>22</sup>
- Pour *Aspergillus fumigatus*, 4 séquences microsatellites A, B, C et D<sup>23</sup>
- Pour *C. tropicalis*, 4 loci MLST (MDR1, XYR1, SAPT4, SAPT2)<sup>24</sup>, et 2 séquences microsatellites (URA3 et CT14)<sup>25</sup>
- Pour *Cr. neoformans*, sérotypage (cytométrie en flux à l'aide d'un anticorps monoclonal anti-polyoside capsulaire<sup>26</sup> et PCR spécifiques (*Pak1* et *Gpa1*)), détermination de la ploïdie (cytométrie en flux), et typage par la technique MLST (7 loci : CAP59, URA5, LAC1, IGS1, GPD1, PLB1 et SOD1<sup>27</sup>)
- Pour *Candida krusei*, 6 loci MLST (ADE2, LYS2, HIS3, LEU2, TRP1 et MPD1)<sup>28</sup>
- Pour *Cryptococcus gattii*, 7 loci MLST (IGS1, CAP59, URA5, PLB1, GPD1, SOD1, LAC1)<sup>29</sup>
- 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

<sup>18</sup> Foulet F et al. Microsatellite markers as a typing system for *Candida glabrata*. J. Clin. Microbiol. 2005;43:4574-9.

<sup>19</sup> Stephan F et al. Molecular diversity and routes of colonization of *Candida albicans* in a surgical intensive care unit, as studied using microsatellite markers. Clin Infect Dis. 2002;35:1477-83.

<sup>20</sup> Bognoux M E et al. Collaborative consensus for optimized multilocus sequence typing of *Candida albicans*. J Clin Microbiol. 2003;41:5265

<sup>21</sup> Foulet F et al. Microsatellite marker analysis as a typing system for *Candida glabrata*. J Clin Microbiol. 2005;43:4574

<sup>22</sup> Sabino et al. New polymorphic microsatellite markers able to distinguish among *Candida parapsilosis* sensu stricto isolates. J Clin Microbiol. 2010;48:1677

<sup>23</sup> Bart-Delabesse E et al. Microsatellite markers for typing *Aspergillus fumigatus* isolates. J Clin Microbiol 1998;36:2413

<sup>24</sup> Tavanti A et al. Multilocus sequence typing for differentiation of strains of *Candida tropicalis*. J Clin Microbiol. 2005;43:5593-600.

<sup>25</sup> Desnos-Ollivier M et al. Clonal population of flucytosine-resistant *Candida tropicalis* from blood cultures, Paris, France. Emerg Infect Dis. 2008;14:557

<sup>26</sup> Dromer, F et al. Serotyping of *Cryptococcus neoformans* by using a monoclonal antibody specific for capsular polysaccharide. J Clin Microbiol. 1993;31:359.

<sup>27</sup> Meyer W et al. Consensus multi-locus sequence typing scheme for *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii*. Med Mycol. 2009;47:561

<sup>28</sup> Jacobsen MD et al. Strain Typing and Determination of Population Structure of *Candida krusei* by Multilocus Sequence Typing. J Clin Microbiol. 2007;45:317

<sup>29</sup> Hagen F et al. Autochthonous and dormant *Cryptococcus gattii* infections in Europe. Emerging Infect Dis. 2012;10:1618

la croissance à différentes températures et sur des milieux spéciaux (nitrate, NaCl 10% NaCl 15%, glucose 50%, acide acétique)

- ✓ extraction de l'ADN
- ✓ en cas d'identification de *C. albicans*, recherche systématique de l'espèce *C. dubliniensis* par PCR duplex
- ✓ en cas d'identification de *C. parapsilosis*, recherche systématique de *C. orthopsilosis* et *C. metapsilosis* par séquençage des régions ITS et d'une partie du gène *SYA1*<sup>30</sup>
- ✓ en cas d'identification de *Trichosporon* sp., séquençage systématique de la région IGS1 de l'ADN ribosomique<sup>31</sup>
- ✓ en cas d'identification de *Debaryomyces* sp., séquençage systématique d'une partie du gène codant l'actine<sup>32</sup>
- ✓ en cas d'identification de *C. neoformans* détermination du sérotype par amplification de régions des gènes *Gpa1* et *Pak1* avec des amorces spécifiques du sérotype A ou D et/ou séquençage de la région IGS du gène codant l'ARN ribosomique
- ✓ détermination de la sensibilité à 8 antifongiques systémiques (amphotéricine B, 5-fluorocytosine, fluconazole, voriconazole, posaconazole, caspofungine, micafungine et anidulafungine)
- ✓ en cas de « résistance » à la caspofungine (CMI  $\geq$  0,5  $\mu$ g/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 28S (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 BioMics

La collection du CNRMA comprend ainsi des souches bien caractérisées appartenant à 27 genres et 84 espèces différents (1 à 2421 isolats/espèce) et se répartissant en :

- près de 3900 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 1500 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 2000 souches de *Cr. neoformans* provenant de la surveillance de la cryptococcose en France depuis 1991. Seules les souches reçues depuis 2001 ont été analysées comme décrit ci-dessus et stockées congelées. Les souches antérieures étaient initialement stockées dans l'eau distillée stérile à 4°C, mais ont été progressivement remises en culture et stockées à -80°C et dans l'azote liquide.

<sup>30</sup> Tavanti A et al. *Candida orthopsilosis* and *Candida metapsilosis* spp. nov. to replace *Candida parapsilosis* groups II and III. J Clin Microbiol. 2005;43:284

<sup>31</sup> Sugita T et al. Sequence Analysis of the Ribosomal DNA Intergenic Spacer 1 Regions of *Trichosporon* Species. J Clin Microbiol. 2002;40:1826

<sup>32</sup> Martorell 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 ACDSsee et des séquences dans une base de données gérée par le logiciel BioloMics.

La collection comprend des souches appartenant à 80 genres et 276 espèces différents, (1 à 216 isolats/espèce) :

- ✓ plus de 1800 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  $\leq 5$  ou si l'espèce est rare) ou du groupe participant à l'étude est nécessaire pour les demandes concernant un plus grand nombre de souches, en sachant que dans tous les cas, il peut y avoir des restrictions liées à des problèmes techniques, financiers et/ou réglementaires.

#### 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 ACDSsee.

#### Collection d'ADN génomique

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

## 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).

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 :

### Identification des champignons :

Nous nous sommes attachés depuis plusieurs années à améliorer l'identification phénotypique des champignons (ajout de nouveaux milieux, amélioration des images numériques, développement des cultures sur lame). Cette étape phénotypique est primordiale pour éviter les erreurs d'attribution de séquences déposées dans les banques publiques (on estime à au moins 20% les erreurs d'identification dans GenBank, et probablement plus pour les germes rares comme les champignons filamenteux). De plus, en raison des ambiguïtés non levées par les séquences ITS et 28S de l'ADNr généralement utilisées en taxonomie, nous avons multiplié, selon les genres étudiés, les gènes cibles et les amorces pour une identification moléculaire polygénique (Tableau 12). 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 12 : Liste des couples d'amorces utilisés en fonction des genres étudiés**  
(en plus des régions ITS)

Espèce	Gène	Amorces
Complexe d'espèces <i>A. fumigatus</i>	$\beta$ -tubuline	Btub1F/ Btub2R <sup>33</sup>
Complexe d'espèces <i>Fusarium spp</i>	Factor d'élongation (TEF1- $\alpha$ )	EF1 / EF2 <sup>34</sup>
	RNA polymérase II (RPB2)	5F2/ 7CR <sup>35</sup>
Complexe d'espèces <i>Pseudallescheria / Scedosporium</i>	$\beta$ -tubuline	TUB-F/ TUB-R <sup>36</sup>
<i>Phaeoacremonium spp</i>	$\beta$ -tubuline	T1 /Bt2b <sup>37</sup>
Coelomycètes <i>Phoma</i> -like	$\beta$ -tubuline	TUB2-F / TUB4-R <sup>38</sup>
<i>Trichosporon spp.</i>	IGS1 / ADNr	26SF/5SR <sup>31</sup>
<i>Debaryomyces spp.</i>	actine	CA21/CA15R <sup>32</sup>

<sup>33</sup> Balajee S et al. *Aspergillus lentulus* sp. nov., a new sibling species of *A. fumigatus*. Eukaryot Cell. 2005;4:625-32.

<sup>34</sup> O'Donnell K. et al. Phylogenetic diversity and microsphere array-based genotyping of human pathogenic *Fusaria*, including isolates from the multistate contact lens-associated U.S. keratitis outbreaks of 2005 and 2006. J Clin Microbiol. 2007;45:2235-48.

<sup>35</sup> O'Donnell K., Cigelnik E. Two divergent intragenomic rDNA ITS2 types within a monophyletic lineage of the fungus *Fusarium* are nonorthologous. Mol Phylogenet Evol. 1997;7:103-16.

<sup>36</sup> Cruse M et al. Cryptic species in *Stachybotrys chartarum*. Mycologia. 2002;94:814-22.

<sup>37</sup> Mostert L et al. Species of *Phaeoacremonium* associated with infections in humans and environmental reservoirs in infected woody plants. J Clin Microbiol. 2005;43:1752-67.

<sup>38</sup> 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<sup>er</sup> janvier 2013) **en raison de ses mauvaises performances.** Il s'agit 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 histoplasmoses 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'histoplasmoses disséminées.

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

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

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

#### **10.4 Techniques transférées par le CNRMA**

Le CNRMA transfère vers les CC-CNRMA les techniques d'identification moléculaire et en particulier la technique d'extraction de l'ADN, les amorces<sup>39</sup> et paramètres d'amplification utilisées pour le séquençage des régions ITS de l'ADN ribosomique des levures et champignons filamenteux (Figure 15). Voici résumé le protocole d'amplification utilisé pour amplifier ces régions avec les couples d'amorces V9D/LS266 ou ITS5/LS266.

---

<sup>39</sup> White TJ, Bruns T, Lee S, Taylor JW. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, White TJ (eds), PCR Protocols. San Diego: Academic.1990;315

Amorce	Séquence 5'-3'
V9D	TTAAgTCCCTgCCCTTgTA
ITS5	ggAAgTAAAAGTCgTAACAagg
LS266	gCATTCCCAACAACCTgACTC

Volume de réaction PCR (50µl)	Conditions PCR (iCycler thermocycler BioRad)	
Concentration finale		
♦ 1X tampon PCR (Roche)	95°C	10min
♦ 2.5mM MgCl <sub>2</sub> (Roche)	94°C	30 sec
♦ 0.25mM dNTP	{ 55°C (filamenteux) ou 58°C (levures)	30 sec
♦ 25 pmol de chaque primer		30 sec
♦ 1.25U AmpliTaq DNA polymerase (Roche)		30 sec
♦ 3µl ADN	72°C	30 secs
	72°C	10 min

**Figure 15:** Protocole d'amplification des régions ITS utilisé au CNRMA

## 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 Minjot  
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 Béchère  
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 Arbelletier  
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 Luçon 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  
Martignes, 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 Bouulloche  
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