

Rapport annuel d'activité

2013

**Centre National de
Référence
Mycoses Invasives et
Antifongiques**

Responsables

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

Collaborateurs

Dea Garcia-Hermoso
Marie Desnos-Ollivier
Karine Sitbon
Charlotte Renaudat
Catherine Blanc
Damien Hoinard

**Année
d'exercice**

2012

| | |
|--|-----------|
| Résumé analytique..... | 5 |
| 1. Mission et organisation du CNR..... | 6 |
| 1.1. Rappel des missions et objectifs majeurs du CNR et des laboratoires associés..... | 6 |
| 1.2. Description détaillée de l'équipe..... | 6 |
| 1.3. Description détaillée des locaux et de l'équipement..... | 8 |
| 1.4. Description de la démarche qualité du laboratoire..... | 8 |
| 2. Activités d'expertise..... | 9 |
| 2.1. Capacités techniques du CNR..... | 9 |
| 2.1.1. Listes des techniques..... | 9 |
| Techniques disponibles..... | 9 |
| Techniques mises en place en 2012..... | 9 |
| 2.1.2. Liste des marqueurs épidémiologiques disponibles..... | 9 |
| 2.1.3. Collections de souches, antigènes ou immun-sérums de référence..... | 10 |
| Collections de levures..... | 10 |
| Collection de champignons filamenteux..... | 11 |
| Collection d'images numériques..... | 12 |
| Collection d'ADN génomique..... | 12 |
| Collection de sérums..... | 12 |
| 2.1.4. Liste des techniques recommandées par le CNR..... | 12 |
| Identification des champignons :..... | 12 |
| Sérologie des mycoses exotiques (électrosynérèse)..... | 13 |
| Détermination de la sensibilité aux antifongiques des isolats de champignons pathogènes :..... | 13 |
| 2.1.5. Techniques transférées vers d'autres laboratoires..... | 14 |
| 2.2. Activité d'expertise du CNRMA..... | 14 |
| 2.2.1. Bilan 2012 pour les levures..... | 15 |
| 2.2.2. Bilan 2012 pour les champignons filamenteux..... | 16 |
| 2.2.3. Bilan 2012 de la sensibilité aux antifongiques..... | 17 |
| 2.2.4. Bilan 2012 des sérologies de mycoses exotiques..... | 19 |
| 2.2.5. Déclarations de mycoses invasives colligées en 2012..... | 19 |
| 2.2.6. Evolution de l'activité depuis 2006..... | 19 |
| 3. Activités de surveillance..... | 20 |
| 3.1. Surveillance de l'évolution et des caractéristiques des infections..... | 20 |
| 3.1.1. Surveillance de la cryptococcose :..... | 21 |
| 3.1.2. Observatoire des Levures :..... | 22 |
| 3.1.3. Surveillance de l'aspergillose invasive (SAIF)..... | 23 |
| 3.1.4. RESeau de Surveillance des Infections Fongiques invasives, RESSIF :..... | 24 |
| 3.2. Surveillance de la résistance des champignons aux antifongiques..... | 26 |
| 3.2.1. Définition de l'échantillon de souches testées..... | 26 |
| 3.2.2. Résultats de la surveillance des résistances aux antifongiques pour les levures..... | 28 |
| 3.2.3. Résultats de la surveillance des résistances aux antifongiques pour les filamenteux (Tableau 7)..... | 30 |
| 3.2.4. Analyse des tendances..... | 32 |
| 3.3. Détection et investigation des cas groupés et des phénomènes anormaux..... | 33 |
| 3.4. Contribution aux réseaux de surveillance internationaux, en particulier européens..... | 36 |
| 3.5. Enquêtes ou études ponctuelles concourant à la surveillance..... | 36 |
| 3.5.1. Analyse des sources de données sur les mucormycoses par la méthode de capture- recapture..... | 36 |
| 3.5.2. Analyse du poids des infections fongiques invasives en France par l'étude des données du PMSI..... | 36 |
| 4. Alerte..... | 37 |
| 5. Activités d'information, de formation et de conseil..... | 37 |
| 5.1. Enseignements et formation..... | 37 |
| 5.2. Modalités de diffusion des données de surveillance et production du CNRMA..... | 38 |
| 5.3. Activité de conseil aux professionnels..... | 38 |

| | |
|---|-----------|
| 5.4. Activité d'expertise..... | 38 |
| Au plan national..... | 38 |
| Au plan international..... | 38 |
| 6. Travaux de recherche et publications en lien direct avec l'activité du CNR..... | 40 |
| 6.1. Activités de recherche ayant un lien direct avec les missions et activités du CNR. | 40 |
| 6.1.1. Participation à des groupes de travail sur les recommandations nationales ou internationales de prise en charge des infections fongiques | 40 |
| 6.1.2. Travaux sur les techniques de détermination de la sensibilité aux antifongiques – Comité EUCAST-AFST..... | 41 |
| 6.1.3. Travaux originaux sur les Mucormycoses | 41 |
| 6.1.4. Travaux originaux sur <i>Candida</i> : | 41 |
| 6.1.5. Travaux sur la résistance d' <i>Aspergillus fumigatus</i> aux azolés | 42 |
| 6.1.6. Diagnostic de la pneumocystose..... | 42 |
| 6.1.7. Autres travaux sur des problématiques fongiques en lien avec le CNRMA | 42 |
| 6.2. Les publications et communications réalisées ou prévues en lien avec les activités du CNR | 43 |
| Publications dans des journaux à comité de lecture | 43 |
| Chapitre de livres ou publications autres..... | 45 |
| 7. Programme d'activité N+1 et N+2 | 46 |
| 8. Annexes | 46 |
| Liste des CC-CNRMA formant RESSIF..... | 46 |
| Membres du réseau métropolitain | 46 |
| Membres du réseau dans les DOM-TOM | 49 |

Liste des figures

| | |
|---|----|
| Figure 1 : Organigramme fonctionnel du CNRMA | 7 |
| Figure 2 : Protocole d'amplification des régions ITS utilisé au CNRMA..... | 14 |
| Figure 3 : Aspects micro et macroscopiques de champignons identifiés au CNRMA (1)..... | 16 |
| Figure 4 : Aspects macro et microscopiques de champignons identifiés au CNRMA (2)..... | 17 |
| Figure 5 : Représentation schématique du gène <i>Cyp51A</i> d' <i>A. fumigatus</i> | 18 |
| Figure 6 : Composition de RESSIF (février 2013) | 21 |
| Figure 7 : Evolution du nombre de cas de cryptococcose en France | 22 |
| Figure 8 : Répartition des principales infections fongiques invasives (RESSIF 2012) | 25 |
| Figure 9 : Agents de phaeohyphomycoses et de mucormycoses | 25 |
| Figure 10 : Variabilité du principal facteur de risque en fonction de l'IFI | 26 |
| Figure 11 : Evolution de la résistance à la 5FC de <i>C. tropicalis</i> | 29 |
| Figure 12 : Distribution des cas d'infections dues à <i>Saprochaete clavata</i> depuis 2011..... | 33 |
| Figure 13 : Aspect microscopique de <i>M. capitatus</i> (A) et <i>S. clavata</i> (B) | 34 |
| Figure 14 : Profils RAPD (amorce OPE4) de <i>S. clavata</i> , <i>M. capitatus</i> et <i>G. candidum</i> | 35 |
| Figure 15 : Distribution du clone épidémique de <i>S. clavata</i> | 36 |

Liste des tableaux

| | |
|--|----|
| Tableau 1 : Composition de l'équipe du CNR Mycoses et Antifongiques en 2012..... | 7 |
| Tableau 2 : Liste des couples d'amorces utilisés en fonction des genres étudiés | 13 |
| Tableau 3 : Evolution de l'activité du CNRMA depuis 2008..... | 19 |
| Tableau 4 : <i>Candida</i> sp. EUCAST Antifungal Clinical Breakpoint..... | 27 |
| Tableau 5 : <i>Aspergillus</i> sp. EUCAST Antifungal Clinical Breakpoint..... | 28 |
| Tableau 6 : Profil de sensibilité des levures aux antifongiques | 30 |
| Tableau 7 : Profil de sensibilité des filamenteux aux antifongiques..... | 31 |
| Tableau 8 : Evolution de la résistance des levures au fluconazole | 32 |
| Tableau 9 : Evolution de la résistance des levures au voriconazole | 32 |
| Tableau 10 : Evolution du pourcentage de levures ayant des CMI caspofungine hautes | 32 |

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. Deux faits méritent d'être soulignés en 2012.

Le premier fait marquant est la mise en place d'un réseau de centres collaborateurs du CNRMA (les CC-CNRMA) dont le nombre a doublé en fin d'année pour atteindre 26 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. La première année de RESSIF a permis de collecter les informations sur plus de 1000 cas d'IFI. Le deuxième fait marquant est l'épidémie d'infection invasive à *Geotrichum clavatum* (*Saprochaete clavata*). C'est la première fois qu'une épidémie d'infection fongique invasive est signalée en France sans que d'autres pays ne soient impliqués. Cette épidémie a été l'occasion d'un partenariat étroit et efficace entre l'InVS, les CCLIN, les mycologues et cliniciens dans les centres hospitaliers, la PF-8 (Plate-forme de Génotypage des Pathogènes et Santé Publique) et le CNRMA. Aux termes des différentes analyses, les caractéristiques des patients et de l'épidémie ont été cernées, un clone épidémique a été découvert bien que la source de l'infection n'ait pas été identifiée avec certitude.

Enfin, après une analyse rétrospective des sérologies des mycoses exotiques réalisées depuis 2002, les responsables du CNRMA ont décidé d'arrêter ces sérologies en 2013 et de proposer aux cliniciens et microbiologistes qui le souhaitent de discuter des autres tests disponibles pour la prise en charge des patients suspects de mycoses endémiques.

1. MISSION ET ORGANISATION DU CNR

1.1. 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.

1.2. 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 1**) et l'organisation fonctionnelle du CNRMA (**Figure 1**) sont décrites ci-dessous.

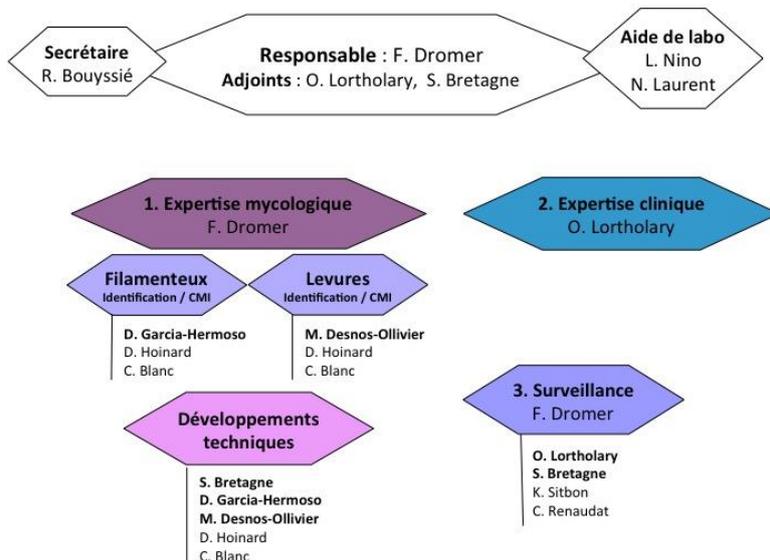


Figure 1 : Organigramme fonctionnel du CNRMA

Tableau 1 : Composition de l'équipe du CNR Mycoses et Antifongiques en 2012

| Nom | Fonction | ETP | Qualification/statut | Organisme payeur |
|-----------------------|--------------------------------------|------|---|---------------------------|
| Catherine Blanc | Technicien | 100% | BTS / Technicien supérieur de laboratoire | Institut Pasteur |
| Reine Bouyssié | Secrétaire | 40% | Secrétaire de Direction | Institut Pasteur |
| Stéphane Bretagne | Directeur Adjoint | 50% | Docteur Médecine, Thèse d'université, HDR / PUPH hôpital Saint Louis | APHP / Paris Diderot P7 |
| Marie Desnos-Ollivier | Collaborateur technique/scientifique | 100% | Thèse d'université / Ingénieur | Institut Pasteur |
| Françoise Dromer | Directeur du CNRMA | 40% | Docteur 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 |
| Nathalie Laurent | Aide de laboratoire | 25% | Aide de Laboratoire | Institut Pasteur |
| Olivier Lortholary | Directeur Adjoint | 20% | Docteur Médecine, Thèse d'université, HDR / PUPH Hôpital Necker-Enfants Malades, | APHP / Paris Descartes P5 |
| Lucile Nino | Aide de laboratoire | 50% | Aide de Laboratoire | Institut Pasteur |
| Charlotte Renaudat | Biostatisticienne | 80% | 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 |

1.3. Description détaillée des locaux et de l'équipement

Le CNRMA a des locaux dans le bâtiment Roux (bât. 53; 25 rue du Dr. Roux) et dispose de locaux propres (1 laboratoire, une pièce noire, un bureau) et de locaux partagés avec l'unité de Mycologie Moléculaire qui l'héberge (1 bureau) et l'unité des *Aspergillus* située au même étage (1 bureau, 1 chambre froide, 2 laboratoires de préparation). Le déménagement du CNRMA dans l'aile Fourneau du Bâtiment Duclaux (bât 03; 28 rue du Dr. Roux) est prévu à l'automne 2013, le plan des locaux actuels est donc sans grand intérêt.

Les équipements principaux propres comprennent :

- PSM2 et incubateurs à CO₂, hottes chimiques
- Thermocycleurs (iCycler de Bio-Rad et LCR480 de Roche)
- Lecteur de gels d'agarose Versadoc (Bio-Rad)
- 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
- Cytométrie en flux (appareil partagé)

Par ailleurs, le CNRMA utilise un laboratoire de type P3+ dès lors qu'un isolat est annoncé comme ou suspect d'être un pathogène de classe 3. Le 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, et de la plate-forme "Génotypage des pathogènes et Santé Publique" (PF-8) pour le séquençage et le typage des champignons pathogènes (microsatellites, MLST).

1.4. Description de la démarche qualité du laboratoire

Depuis 1996, les Centres Nationaux de Référence (CNR) de l'Institut Pasteur ont initié une démarche qualité suivant le référentiel GBEA. Par ailleurs, en réponse aux inspections AFSSAPS relatives à la conformité aux exigences des arrêtés du 30 juillet 2004 et du 16 juillet 2007 liés aux micro-organismes et toxines, une démarche d'harmonisation des systèmes de management qualité des CNR, a été réalisée.

Une politique Qualité, Sécurité, Environnement pour l'Institut Pasteur a été formalisée, validée par la Direction Générale et communiquée à l'ensemble du personnel en 2008 et mise à jour en 2011. En septembre 2010, un état des lieux des dispositions qualité des CNR et des services supports de l'Institut assurant un appui efficace et maîtrisé aux CNR a été effectué. En effet, dans le cadre des démarches qualité des CNR et d'autres entités, plusieurs services supports (pôle Equipement, RH, logistique, QSE, Prévention des risques,...) ont mis en place des dispositions qualité permettant de répondre aux exigences des référentiels Qualité (ISO 9001, ISO 17025, ISO 15189,...) mis en place à l'Institut Pasteur. Plus particulièrement, la Direction déléguée Environnement-Sécurité-Logistique (ESL) a formalisé et mis à disposition des CNR les procédures qualité d'organisation, de pilotage et d'amélioration nécessaires dans le cadre des démarches selon les référentiels ISO. Elle apporte également ses ressources et son expertise pour accompagner le CNR dans son projet d'accréditation conformément à l'ordonnance du 13 janvier 2010 relative aux activités de biologie médicale. Un manuel qualité des CNR a été rédigé et a pour objectif la description du système de « management » de la qualité commun à l'ensemble des CNR.

L'implication de l'équipe du CNR Mycoses Invasives et Antifongiques 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.

2. ACTIVITÉS D'EXPERTISE

2.1. Capacités techniques du CNR

2.1.1. Listes des techniques

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)^{1,2}. 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'actine³ et les amorces universelles ITS1/ITS4.

Techniques mises en place en 2012

- Détection des mutations dans le gène *Cyp51A* pour les isolats d'*Aspergillus fumigatus* résistants aux antifongiques azolés⁴
- Détection des mutations dans les gènes *Fks* pour les isolats de *Candida albicans*, *C. glabrata*, *C. tropicalis*, *C. krusei*, *C. lusitaniae* résistants aux échinocandines
- Ajout de nouvelles cibles pour l'identification de diverses espèces de levures et de champignons filamenteux

2.1.2. Liste des marqueurs épidémiologiques disponibles

- ✓ Pour *C. albicans*, 5 séquences microsatellites (CDC3, HIS3, EF3, STPK, CDR1)^{5,6}, et les 7 loci MLST (AAT1a, ACC1, ADP1, MPIb, SYA1, VPS13, ZWF1)⁷

¹ 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.

² 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

³ 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.

⁴ 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).

⁵ Foulet F et al. Microsatellite markers as a typing system for *Candida glabrata*. J. Clin. Microbiol. 2005; 43:4574-9.

- ✓ Pour *C. glabrata*, 5 séquences microsatellites (RPM2, MTI, ERG, Cg4, Cg6)⁸
 - ✓ Pour *Aspergillus fumigatus*, 4 séquences microsatellites A, B, C et D⁹
 - ✓ Pour *C. tropicalis*, 4 loci MLST (MDR1, XYR1, SAPT4, SAPT2)¹⁰, et 2 séquences microsatellites (URA3 et CT14)¹¹
 - ✓ Pour *Cr. neoformans*, sérotypage (cytométrie en flux à l'aide d'un anticorps monoclonal anti-polyoside capsulaire¹² 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 SOD1¹³)
- Au cours de l'année, nous avons également mis en place de nouveaux outils d'identification ou de typage :
- ✓ *Candida krusei*, 6 loci MLST (ADE2, LYS2, HIS3, LEU2, TRP1 et MPD1)¹⁴
 - ✓ *Cryptococcus gattii*, 7 loci MLST (IGS1, CAP59, URA5, PLB1, GPD1, SOD1, LAC1)¹⁵

2.1.3. Collections de souches, antigènes ou immun-sérums de référence

Collections de levures

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

- ✓ vérification de la pureté de la souche
- ✓ identification phénotypique avec profil d'assimilation des composés carbonés sur 31 (ID32C, BioMérieux), voire 49 (50CH, BioMérieux) composés en cas d'espèce non fréquente, ainsi que, dans ce dernier cas, détermination de la fermentation du glucose, de la croissance à différentes températures et sur des milieux spéciaux (nitrate, NaCl 10% 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*¹⁶
- ✓ en cas d'identification de *Cryptococcus* sp., séquençage systématique de la région IGS1 de l'ADN ribosomique

⁶ 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.

⁷ Bounoux M E et al. Collaborative consensus for optimized multilocus sequence typing of *Candida albicans*. J. Clin. Microbiol. **2003** ; 41:5265

⁸ Foulet F et al. Microsatellite marker analysis as a typing system for *Candida glabrata*. J Clin Microbiol. 2005;43:4574

⁹ Bart-Delabesse E et al. Microsatellite markers for typing *Aspergillus fumigatus* isolates. J Clin Microbiol 1998 ; 36:2413

¹⁰ Tavanti A et al. Multilocus sequence typing for differentiation of strains of *Candida tropicalis*. J Clin Microbiol. 2005; 43: 5593-600.

¹¹ Desnos-Ollivier M et al. Clonal population of flucytosine-resistant *Candida tropicalis* from blood cultures, Paris, France. Emerg Infect Dis. 2008 ;14:557

¹² Dromer, F. et al. Serotyping of *Cryptococcus neoformans* by using a monoclonal antibody specific for capsular polysaccharide. J. Clin. Microbiol. 1993; 31:359.

¹³ Meyer W et al. Consensus multi-locus sequence typing scheme for *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii*. Med Mycol ; 2009 47:561

¹⁴ Jacobsen MD et al. Strain Typing and Determination of Population Structure of *Candida krusei* by Multilocus Sequence Typing. J Clin Microbiol. 2007;45:317

¹⁵ Hagen F et al. Autochthonous and dormant *Cryptococcus gattii* infections in Europe. Emerging Infect. Dis. 2012;10:1618

¹⁶ 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

- ✓ 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 $\mu\text{g/ml}$), séquençage systématique partiel des gènes codant pour la 1,3 beta-glucane synthase
- ✓ 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 BioloMics

La collection du CNRMA comprend ainsi des souches bien caractérisées appartenant à 27 genres et 81 espèces différents (1 à 2215 isolats/espèce) et se répartissant en :

- près de 3500 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 sont stockées dans l'eau distillée stérile à 4°C, mais sont progressivement remises en culture et stockées à -80°C et dans l'azote liquide.
- S'y ajoutent des souches de référence (contrôle de qualité, souches types) importantes pour les activités d'expertise. Elles proviennent des collections internationales (ATCC, CBS) et sont conservées à -80°C. Elles ne peuvent être distribuées.

Collection de champignons filamenteux

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

- ✓ vérification de la pureté de la souche
- ✓ identification phénotypique après culture sur milieux spéciaux, cultures 3 points, cultures sur lame, détermination de la vitesse de croissance, de la température de croissance optimale ...
- ✓ détermination de la sensibilité à 8 antifongiques systémiques (amphotéricine B, itraconazole, voriconazole, posaconazole, caspofungine, micafungine, anidulafungine, terbinafine)
- ✓ 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 77 genres et 257 espèces différents, (1 à 116 isolats/espèce) :

- ✓ près de 1500 souches d'origine clinique, y compris des souches de champignons dimorphiques stockées en laboratoire P3+ à -80°C

- ✓ auxquelles s'ajoutent des souches de référence ou des souches type provenant de diverses collections (CBS, ATCC, IP, NRRL) non distribuables.

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

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

Collection d'images numériques

Elle comprend des milliers d'images de champignons, essentiellement filamenteux, après photographies macroscopiques et microscopiques. Les cultures sur lames, l'utilisation de la loupe et du microscope à contraste interférentiel ont permis d'améliorer considérablement la qualité de l'iconographie. Une sélection des images est envoyée aux correspondants avec le résultat écrit de l'identification lorsqu'il s'agit d'une espèce rare. Les images numériques sont envoyées par courriel à la demande (publication, enseignement). Toutes les images sont gérées avec le logiciel ACDSec.

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 en 2008 (Collection n°12, déclaration DC-2008-68).

2.1.4. Liste des techniques recommandées par le CNR

Le CNRMA n'est pas en mesure de tester les réactifs commercialisés dans le domaine de la mycologie médicale. En revanche, nous pouvons insister sur la difficulté de réalisation et d'interprétation de quelques techniques¹⁷.

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 2**). 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 difficile 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

¹⁷ Alanio A. et Bretagne S ; Difficultés de diagnostic et d'expertise microbiologique des infections fongiques invasives. BEH 2013 ;12-13) : 115

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 2 : 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> | β -tubuline | Btub1F/ Btub2R ¹⁸ |
| Complexe d'espèces <i>Fusarium spp</i> | Factor d'élongation (TEF1- α) | EF1 / EF2 ¹⁹ |
| | RNA polymérase II (RPB2) | 5F2/ 7CR ²⁰ |
| Complexe d'espèces <i>Pseudallescheria / Scedosporium</i> | β -tubuline | TUB-F/ TUB-R ²¹ |
| <i>Phaeoacremonium spp</i> | β -tubuline | T1 /Bt2b ²² |
| Coelomycètes <i>Phoma-like</i> | β -tubuline | TUB2-F / TUB4-R ²³ |
| <i>Trichosporon spp.</i> | IGS1 / ADNr | 26SF/5SR ²⁴ |

Sérologie des mycoses exotiques (électrosynérèse)

Cette technique est définitivement abandonnée par le CNRMA (à partir du 1^{er} 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 histoplasmosse 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'histoplasmosse disséminée.

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

La réalisation et l'interprétation des techniques disponibles ne sont pas évidentes. En effet, les techniques standardisées en Europe (EUCAST) ou aux Etats-Unis (CLSI) ne sont pas commercialisées et sont de réalisation difficile en routine. La majorité des techniques commercialisées n'a pas été validée par rapport aux techniques de référence, et le CNRMA ne peut donc qu'encourager les centres à utiliser des techniques standardisées et validées, telles les bandelettes E-test. Cependant, la réalisation pratique demande une certaine habitude (en particulier dans la préparation de l'inoculum, et pour les champignons filamenteux) et la lecture des résultats n'est pas toujours simple, rendant compte des différences de résultats en fonction du lecteur, voire du technicien. De plus, l'interprétation des

¹⁸ Balajee S et al. *Aspergillus lentulus* sp. nov., a new sibling species of *A. fumigatus*. Eukaryot Cell 2005; 4:625-32.

¹⁹ 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.

²⁰ 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.

²¹ Cruse M et al. Cryptic species in *Stachybotrys chartarum*. Mycologia 2002; 94:814-22.

²² 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.

²³ Aveskamp MM et al. DNA phylogeny reveals polyphyly of *Phoma* section *Peyronellaea* and multiple taxonomic novelties. Mycologia 2009 ; 101:363-82.

²⁴ Sugita T et al. Sequence Analysis of the Ribosomal DNA Intergenic Spacer 1 Regions of *Trichosporon* Species. J. Clin. Microbiol. 2002, 40; 1826

résultats est difficile car les seuils de sensibilité et de résistance publiés ne s'appliquent qu'à certaines espèces et certains antifongiques et ne sont valables que pour des isolats testés avec l'une ou l'autre des techniques de référence (l'interprétation étant différente pour chacune de ces techniques). En pratique, un laboratoire utilisant les bandelettes E-test ne devrait donc pas rendre un résultat S ou R, mais seulement interpréter le résultat comme conforme ou aberrant (> 2 dilutions en log2) par rapport à la base de données dont il dispose pour les isolats de la même espèce testées dans les mêmes conditions localement.

La meilleure solution est toujours de bien identifier l'espèce et de considérer qu'en l'absence de pression antifongiques, les isolats d'une même espèce ont un profil sauvage et qu'il est donc, par exemple, inutile de tester une souche de *Candida albicans*, même isolée d'une hémoculture, s'il n'y pas eu de pré-exposition à un antifongique. L'alternative en cas d'espèce rare ou de pression antifongique antérieure, est d'envoyer l'isolat responsable de mycose invasive au CNRMA.

2.1.5. Techniques transférées vers d'autres laboratoires

Le CNRMA transfère vers les CC-CNRMA les techniques d'identification moléculaire et en particulier la technique d'extraction de l'ADN, les amorces²⁵ et paramètres d'amplification utilisées pour le séquençage des régions ITS de l'ADN ribosomique des levures et champignons filamenteux (**Figure 2**). Voici résumé le protocole d'amplification utilisé pour amplifier ces régions avec les couples d'amorces V9D/LS266 ou ITS5/LS266.

| Amorce | Séquence 5'-3' |
|--------|------------------------|
| V9D | TTAAgTCCCTgCCCTTTgTA |
| ITS5 | ggAAgTAAAAGTCgTAACAAgg |
| LS266 | gCATTCCCAACAACgACTC |

| Volume de réaction PCR (50µl) | Conditions PCR (iCycler thermocycler BioRad) | |
|---|--|---------|
| Concentration finale | | |
| ♦ 1X tampon PCR (Roche) | 95°C | 10min |
| ♦ 2.5mM MgCl ₂ (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) | 72°C | 30 secs |
| ♦ 3µl ADN | 72°C | 10 min |

} 30 cycles

Figure 2 : Protocole d'amplification des régions ITS utilisé au CNRMA

2.2. Activité d'expertise du CNRMA

Les échantillons et les souches proviennent majoritairement des laboratoires hospitaliers, en raison même des missions du CNRMA qui couvrent uniquement les mycoses invasives. Très peu d'échantillons/souches (<2%) nous sont parvenus de l'étranger. Les isolats reçus avaient été en majorité cultivés à partir d'échantillons sanguins (52%), pulmonaires (13%), cutanés (7%), liquides céphalo-rachidiens (7%), prélèvements ORL (5%) ou digestifs (4%). Des précisions sont données plus loin en fonction de l'expertise microbiologique requise.

Le CNRMA a reçu, en 2012, 1318 souches ou prélèvements correspondant dans 61% des cas à des souches déjà isolées, et dans 39% des cas à des sérums. Dans de rares cas (<1%), l'expertise concernait des prélèvements d'origine environnementale, dans le cadre d'investigations de sources de contamination.

²⁵ 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

La quasi-totalité des échantillons étaient en provenance de France Métropolitaine (83%) ou des DOM-TOM (15%), avec 30 souches venant de l'étranger dans le cadre de l'investigation de l'épidémie d'infections invasives à *Geotrichum* spp.

Toutes les souches étaient envoyées par les laboratoires hospitaliers, puisque nous refusons les souches provenant de mycoses superficielles (onychomycoses, mycoses cutanées isolées). A l'inverse, les sérums proviennent en grande majorité de laboratoires spécialisés (Pasteur-Cerba, Pasteur Lille, Bio-Mérieux), qui nous confiaient la réalisation des sérologies de mycoses exotiques qui leur étaient adressées.

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 sérums sont alors congelés. Environ 10% des demandes de sérologie ont ainsi été refusées. C'est exceptionnel pour les demandes d'expertise sur des souches.

2.2.1. Bilan 2012 pour les levures

Les levures provenaient essentiellement d'hémocultures (79%), mais aussi du système nerveux central (6%), des poumons, de matériel étranger, des urines, de l'appareil digestif, de la peau (1-3% chacun), de la sphère ORL, des os-articulations ou des yeux (< 1% chacun).

Le niveau de caractérisation pour les 511 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, formation de filaments et/ou de chlamydospores, température de croissance, complément sur le profil d'assimilation des sucres (galeries CH50), fermentation de certains sucres, croissance en milieux hyperosmolaires, température extrême de croissance
- ✓ 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 223 isolats appartenant à 37 espèces différentes :
 - amplification des régions ITS1-5.8S-ITS2 (194 isolats)
 - amplification de la région D1D2 de la sous-unité 26S (80 isolats)
 - amplification de la région IGS1 (12 isolats de *Cryptococcus* ou *Trichosporon* spp.)
- ✓ Un profil de sensibilité des souches aux 8 antifongiques pour 492 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 microsatellites de 59 souches de *C. albicans*, et de 7 souches de *C. glabrata*
- ✓ un typage MLST pour rechercher le clone 5FC-R parmi 4 isolats de *C. tropicalis* résistants à la 5FC (4 souches différentes du clone) et de 4 souches de *C. krusei*
- ✓ le séquençage des gènes *Fks* pour des isolats résistants aux échinocandines
- ✓ la détermination de la ploïdie et le sérotypage de souches de *Cryptococcus* sp. aboutissant à la caractérisation de 87 souches haploïdes de l'espèce *neoformans* (63 sérotype A, 21 sérotype D) et *gattii* (1 sérotype B) et 14 souches diploïdes (3 A, 2 D et 9 hybrides AD).
- ✓ la poursuite de la constitution d'une base de données complète (caractères phénotypiques et séquences) dans BioMICS.

Outre les espèces fréquentes (*Candida albicans*, *Candida glabrata*, *Candida parapsilosis*, *Candida tropicalis*, *Pichia kudriavzevii* (syn. *Issatchenkia orientalis* , anamorphe *Candida krusei*), *Kluyveromyces marxianus* var *marxianus* (anamorphe *Candida kefyr*), nous avons identifié ou confirmé l'identification de *Candida catenulata*, *Meyerozyma caribbica* (anamorphe *Candida*

fermentati), *Candida haemulonii*, *Candida duobushaemulonii* (syn. *Candida haemulonii* type II), *Candida inconspicua*, *Candida rugosa*, *Candida africana*, *Candida carpophila*, *Candida orthopsilosis*, *Candida metapsilosis*, *Candida dubliniensis*, *Candida nivariensis*, *Clavispora lusitaniae* (*Candida lusitaniae*), *Kodamaea ohmeri* (syn. *Pichia ohmeri*), *Wickerhamomyces anomalus* (syn. *Pichia anomala*, anamorphe *Candida pelliculosa*), *Yarrowia lipolytica* (*Candida lipolytica*), *Debaryomyces nepalensis*, *Galactomyces candidus* (anamorphe *Geotrichum candidum*), *Magnusiomyces capitatus* (anamorphe *Geotrichum capitatum*), *Saprochaete clavata* (syn. *Geotrichum clavatum*), *Hyphozyma variabilis* var. *odora*, *Pseudozyma parantartica*, *Saccharomyces cerevisiae*.

Et parmi les levures basidiomycètes, outre *Filobasidiella neoformans* var. *neoformans* (anamorphe *Cryptococcus neoformans*), *Filobasidiella neoformans* var. *bacillispora* (anamorphe *Cryptococcus gattii*), *Malassezia pachydermatis*, *Rhodotorula mucilaginosa*, *Trichosporon* sp., *Trichosporon asahii*, *Trichosporon veenhuisii*.

2.2.2. Bilan 2012 pour les champignons filamenteux

Les champignons filamenteux étaient isolés essentiellement des poumons (37%), de la peau (22%), de la sphère ORL (11%), des yeux (15%), du sang (6%), mais aussi des os, ou de l'appareil digestif (3% chacun).

Le niveau de caractérisation pour les 194 champignons filamenteux identifiés cette année (62 genres et espèces différents) est celui décrit plus haut. En 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 3** ; **Figure 4**). 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* ...). Au total, 238 isolats ont été séquencés, avec amplification de EF1alpha (148 isolats), RPB2 (86 isolats), beta-tubuline (180 isolats), calmoduline (32 isolats) et actine (22 isolats).
- ✓ La recherche d'une mutation dans le gène *Cyp51A* pour des 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 168 isolats (sachant que les conditions de réalisation des CMI empêchent la croissance de certaines espèces et/ou isolats).



Figure 3 : Aspects micro et macroscopiques de champignons identifiés au CNRMA (1)
 (A) Conidiophore et tête aspergillaire d'*Aspergillus westerdijkiae*; (B) Synanamorphe *Graphium* sp. de *Pseudallescheria minutispora* ; (C) Aspect à loupe binoculaire de sporocystophores, sporocystes et rhizoïdes de *Rhizopus oryzae*

Nous avons ainsi identifié ou confirmé l'identification de :

- ✓ Plusieurs espèces d'*Aspergillus* : *A. fumigatus*, *A. terreus*, *A. flavus*, *Aspergillus giganteus*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus pseudodeflectus*, *Aspergillus tamarisii*, *Aspergillus westerdijkiae*, *Aspergillus calidoustus*, *Emericella nidulans* (*Aspergillus nidulans*), *Emericella quadrilineata* (*Aspergillus tetrazonus*). Plusieurs espèces appartenant aux complexes *oxysporum*, *solani*, et *dimerum*, et aussi *Fusarium incarnatum-equiseti*, *Fusarium redolens*
- ✓ D'autres hyphomycètes : *Arthrographis kalrae*, *Microascus cirrosus*, *Ochroconis gallopava*, *Purpureocillium lilacinum* (ancien, *Paecilomyces lilacinus*), *Paecilomyces variotii*, *Paecilomyces formosa*, *Penicillium piceum*, *Phialemonium* sp., *Pleurostomophora richardsiae*, *Pseudallescheria boydii*, *Pseudallescheria minutispora*, *Pseudallescheria apiosperma* (*Scedosporium apiospermum*), *Scedosporium prolificans*, *Scedosporium aurantiacum*, *Scopulariopsis flava*, *Trichoderma citrinoviride*, *Trichoderma longibrachiatum*



Figure 4 : Aspects macro et microscopiques de champignons identifiés au CNRMA (2)

(A) Conidiophores et cellules conidiogènes de *Fonsecaea pedrosoi* responsable de chromomycoses; (B) Aspect à loupe binoculaire d'*Aspergillus niger*; (C) Cellules conidiogènes et conidies de *Scedosporium prolificans*

- ✓ Quelques basidiomycètes d'espèces non identifiables sur la morphologie et les séquences disponibles
- ✓ De dématiées : *Alternaria alternata*, *Alternaria infectoria*, *Chaetomium atrobrunnueum*, *Chaetomium senegalense*, *Curvularia* sp., *Exophiala dermatitidis*, *Exophiala jeanselmei*, *Exophiala lecanii-corni*, *Exophiala spinifera*, *Fonsecaea pedrosoi*, *Nodulisporium* sp., *Phaeoacremonium* sp., *Phaeoacremonium parasiticum*, *Rhinocladiella mackenziei*
- ✓ Un coelomycète : *Phoma herbarum*
- ✓ D'agent de mycétome : *Madurella mycetomatis*
- ✓ De Mucorales : *Lichtheimia corymbifera* (nouvelle dénomination d'*Absidia corymbifera*), *Lichtheimia ornata*, *Lichtheimia ramosa*, *Actinomucor elegans*, *Mucor* sp., *Mucor velutinosus*, *Rhizomucor miehei*, *Rhizomucor pusillus*, *Rhizopus microsporus*, *Rhizopus oryzae*.
- ✓ De plusieurs champignons dimorphiques (*Coccidioides immitis*, *Histoplasma capsulatum* var. *capsulatum*).

2.2.3. Bilan 2012 de 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 le document 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, 703 isolats ont été testés en 2012 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 isolées dans le cadre de l'ODL, pour éviter le biais lié à l'envoi de souches isolées dans un contexte connu d'échec thérapeutique.

En effet, nous recevons des isolats pour confirmation 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 (11 *C. albicans*, 5 *C. glabrata*, 4 *C. krusei*) avec découverte de :

- ✓ mutation homo ou hétérozygote S645P dans la région HS1 du gène *Fks1* chez *C. albicans*
- ✓ mutations connues ou non (en cours de publication) dans la région HS1 du gène *Fks2* et/ou HS1 du gène *Fks3* chez *C. glabrata*
- ✓ mutation hétérozygote non décrite dans la région HS1 du gène *Fks1* chez *C. krusei* (en cours de publication)

Nous avons également recherché une mutation dans le gène *Cyp51A* (**Figure 5**) pour des isolats d'*A. fumigatus* résistants aux antifongiques azolés (découverte de 5 mutations dont 4 décrites - TR34/L98H, G54R, associées ou non à S297T ou F495I).

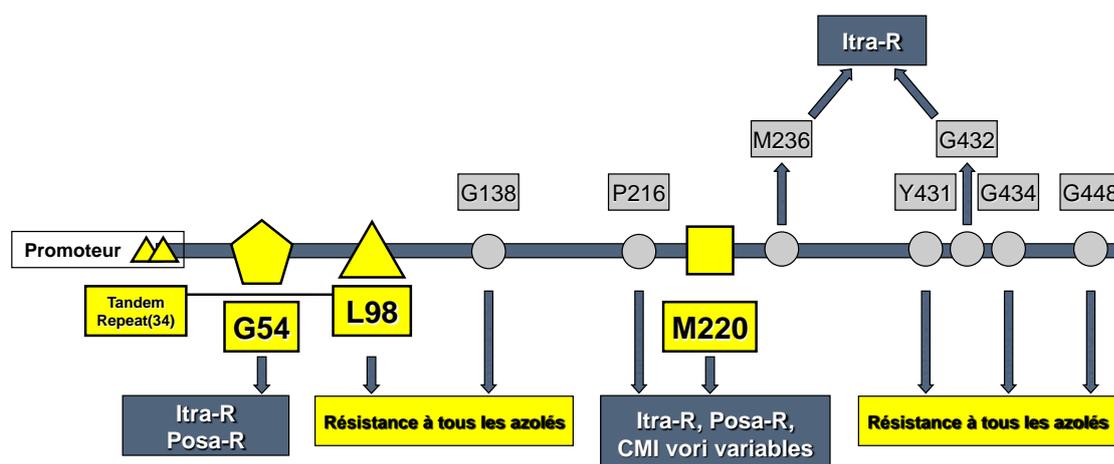


Figure 5 : Représentation schématique du gène *Cyp51A* d'*A. fumigatus*

Ce schéma reprend les substitutions, responsables d'un phénotype de résistance aux antifongiques azolés, les plus fréquemment rencontrées chez les isolats cliniques (modifié de Alanio A. et al.²⁶) Itra: itraconazole ; Vori : voriconazole ; Posa : posaconazole, R : résistant

²⁶ Alanio A, Cordonnier C, Bretagne S. Azole Resistance in *Aspergillus fumigatus*—Current Epidemiology and Future Perspectives. Curr Fungal Infect Rep 2011; 5, 168

2.2.4. Bilan 2012 des sérologies de mycoses exotiques

En 2012, 428 échantillons ont été analysés en sérologie (sans compter les sérums repris pour contrôle d'un résultat antérieur) :

- ✓ Sur les 4 sérologies de paracoccidioidomycose, aucune n'était positive
- ✓ Sur les 13 sérologies de blastomycose, aucune n'était positive
- ✓ Parmi les 32 sérologies de coccidioidomycose, aucune n'était positive
- ✓ Sur les 408 sérologies d'histoplasmosse, seuls 10 échantillons étaient positifs avec dans 8 cas un arc M suggérant un contact antérieur avec *Histoplasma capsulatum*. chez des patients pour lesquels le diagnostic d'histoplasmosse était déjà établi ou fortement suspecté par le contexte épidémiologique (DOM-TOM, exposition à du guano de chauve-souris) et clinique (toux, syndrome grippal dans les 2 semaines suivant l'exposition)

Rappelons ici que cette technique est arrêtée depuis le 1^{er} janvier 2013.

2.2.5. Déclarations de mycoses invasives colligées en 2012

Par ailleurs, le CNRMA a colligé les déclarations dans le cadre de la surveillance des mycoses invasives dont il est chargé. Ont donc été enregistrés en 2012 sur le serveur RESOMYC :

- ✓ 235 cas de fongémie à levures
- ✓ 127 cas de "mycoses rares"
- ✓ 12 cas de "mycoses exotiques"
- ✓ 74 cas de cryptococcose.

Par ailleurs, 821 cas d'infections invasives ont été enregistrés en 2012 sur le serveur RESSIF par les 13 CC-CNRMA composant le réseau 2012.

Etant donné le décalage entre certaines déclarations et l'enregistrement en ligne, ces chiffres ne correspondent pas au nombre de cas diagnostiqués dans l'année, mais bien au nombre de cas enregistrés en 2012. Le nombre de cas déclarés à ce jour pour l'année 2012 est détaillé plus loin dans chaque chapitre.

2.2.6. Evolution de l'activité depuis 2006

L'activité du CNRMA a augmenté en 2012 (**Tableau 3**) sur les aspects microbiologiques et épidémiologiques, avec en particulier une caractérisation moléculaire des isolats en augmentation et un nombre important de déclarations de cas par le biais du RESSIF (cf. plus loin).

Tableau 3 : Evolution de l'activité du CNRMA depuis 2008

| | 2008 | 2009 | 2010 | 2011 | 2012 |
|--|------|------|------|------|------|
| Expertise | | | | | |
| Identification de levures | 640 | 621 | 638 | 492 | 574 |
| Identification de champignons filamenteux | 214 | 169 | 165 | 186 | 194 |
| Détermination de CMI | 802 | 756 | 762 | 650 | 703 |
| Echantillons testés pour recherche d'anticorps | 430 | 359 | 384 | 336 | 428 |
| Echantillons séquencés* | 993 | 1276 | 1338 | 1668 | 1963 |
| Année d'enregistrement des données de surveillance (année d'enregistrement ≠ année de diagnostic) | | | | | |
| Fongémies à levures (ODL) | 390 | 448 | 422 | 304 | 235 |
| Cryptococcoses | 83 | 77 | 71 | 60 | 74 |
| Mycoses rares | 248 | 194 | 189 | 143 | 127 |
| Mycoses exotiques | 98 | 40 | 22 | 40 | 12 |
| Aspergilloses invasives (SAIF 2008 - 2010)** | 167 | 417 | 310 | 245 | 71 |
| RESSIF | - | - | - | - | 821 |

* sans comptabiliser les séquences liées à des projets particuliers ou des développements de techniques de typage (et en sachant qu'un nombre double de chromatogrammes est analysé) ; ** retard de déclarations et utilisation du serveur pour traçabilité locale après arrêt de l'étude et pour les déclarations d'aspergilloses possibles

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'un en 1996 sur les cryptococcoses²⁷, l'autre plus récemment en 2010 sur les mucormycoses²⁸, 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 11) avec 15 centres actifs.
- Le troisième réseau est récent. Il a été mis en place en 2012 à l'occasion du renouvellement du mandat du CNRMA et de l'extension de ses missions. C'est le RESeau de Surveillance des Infections Fongiques invasives (RESSIF). Il comprenait, en 2012, 14 centres collaborateurs du CNRMA (CC-CNRMA). Depuis le 1^{er} janvier 2013, après un appel à volontaires parmi tous les correspondants hospitaliers du CNRMA pour le renforcer et améliorer la couverture nationale, RESSIF compte 26 CC-CCNRMA (**Figure 6**). La particularité de RESSIF est de s'appuyer sur une charte de fonctionnement, signée par tous les partenaires et définissant le rôle de chacun et ses engagements. RESSIF permettra de déterminer avec plus de précision l'incidence de certaines mycoses invasives et d'obtenir des données sur la pneumocystose qu'il serait difficile de chiffrer par le biais d'une surveillance passive.

Ces trois réseaux s'appuient en première ligne sur les mycologues/microbiologistes avec des correspondants cliniciens dans chaque service concerné. Les questionnaires standardisés ont été édités grâce au logiciel Voozано et sont accessibles au travers d'un site sécurisé hébergé par l'Institut Pasteur (<https://epidemiopasteur.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).

²⁷ Dromer *et al.* Epidemiology of cryptococcosis in France: a 9-year survey (1985-1993). Clin. Infect. Dis. 1996; 23:82-90.

²⁸ 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.

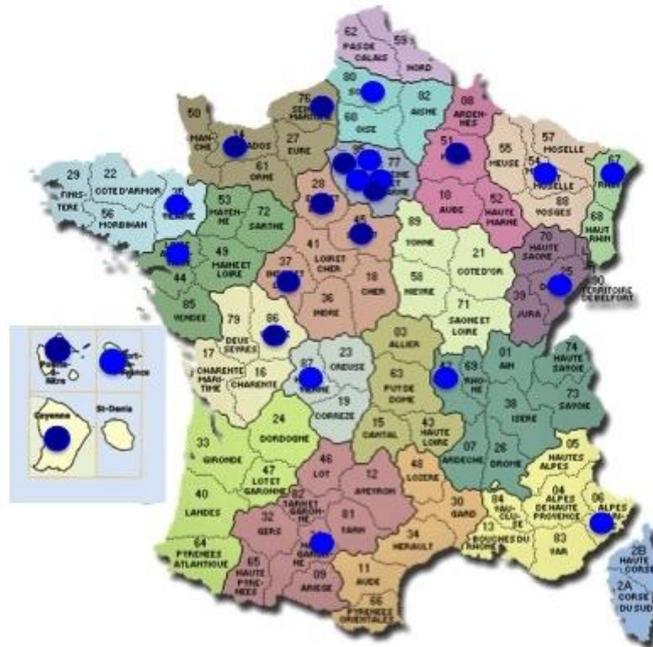


Figure 6 : Composition de RESSIF (février 2013)
 Les ronds bleu clair correspondent aux CC-CNRMA de 2012, les ronds bleu foncé à ceux de 2013

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 au printemps 2012 avec une épidémie d'infections sévères à *Geotrichum clavatum* (*Saprochaete clavata*) (voir plus loin).

Nous ferons ici une analyse succincte des différentes surveillances.

3.1.1. Surveillance de la cryptococcose :

La surveillance de la cryptococcose a débuté en 1985. Nous ne répertorions que les cas humains. A ce jour (18/02/2013), 2961 cas de cryptococcoses ont été enregistrés dans la base RESOMYC. Le réseau des correspondants comprend 189 centres qui ont déclaré entre 1 et 208 cas depuis 1985 (73 centres ont déclaré entre 1 et 7 cas en 2012). Le nombre de cas diagnostiqués et notifiés au CNRMA est stable depuis plusieurs années, aux alentours de 70/an avec une proportion égale de sujets séropositifs pour le VIH et séronégatifs (**Figure 7**). 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 vs. 1996 vs. 27,4% des 1314 patients diagnostiqués depuis, $p < 0,001$).

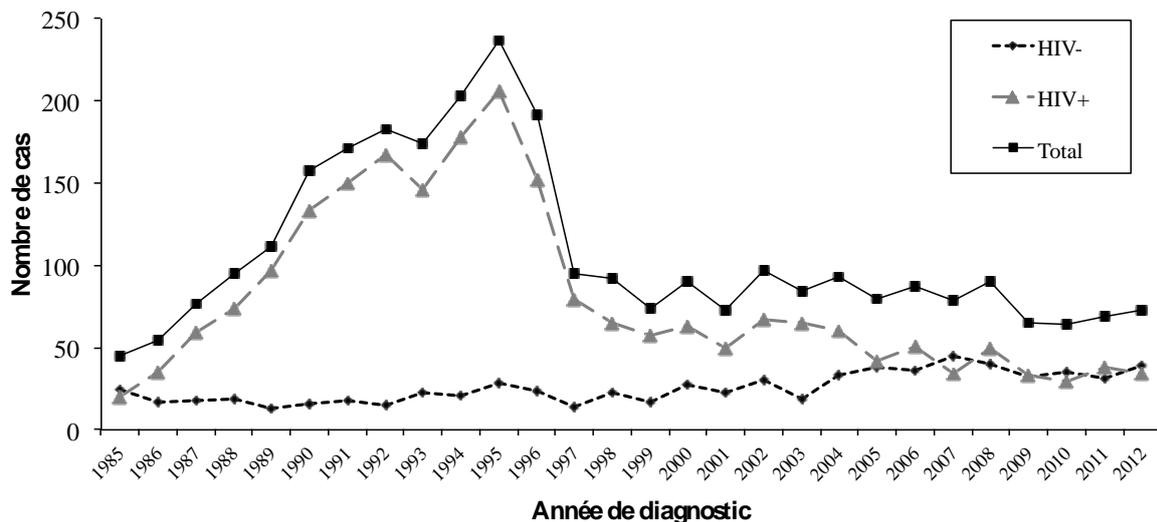


Figure 7 : Evolution du nombre de cas de cryptococcose en France

Tous les cas notifiés au CNRMA depuis 1985 sont représentés en fonction du statut VIH du patient (bilan du 05/03/2013)

En 2012, 73 cas de cryptococcose ont été notifiés au CNRMA dont 39 chez des patients séronégatifs pour le VIH (38,5% de femmes) et 34 chez des patients séropositifs (20,6% de femmes). La proportion de patients originaires d'Afrique différait selon le statut VIH (36% chez les sujets VIH^{pos} vs. 7% chez les sujets VIH^{neg}, $p = 0,009$). La cryptococcose était révélatrice de l'infection VIH dans un tiers des cas pour lesquels l'information était disponible.

Le diagnostic de cryptococcose a été fait sur la base de l'isolement d'une souche dans 97% des cas déclarés au CNRMA. Il s'agissait essentiellement de méningo-encéphalites (71%) et d'infections disséminées (67%). Cependant, le bilan d'extension préconisé dans les recommandations internationales²⁹ n'avait pas été fait dans au moins 20% des cas. Ainsi, LCR, sang ou urines n'avaient pas été testés pour les sujets VIH^{pos} dans respectivement 9%, 25% et 53% des cas, et pour les sujets VIH^{neg} dans 31%, 31% et 51% des cas.

Le traitement d'induction par l'association amphotéricine B+ 5 fluorocytosine avait été prescrit dans 80% des cas de méningo-encéphalites et d'infections disséminées, ce qui correspond aux recommandations internationales. L'évolution à 3 mois, connue actuellement pour 49 patients, avait été défavorable dans 26,5% des cas (30,8% chez les patients VIH^{neg} et 21,7% chez les patients VIH^{pos}). Les souches étaient essentiellement de l'espèce *Cr. neoformans* (64% sérotype A, 22% sérotype D, 12% sérotype AD) avec un cas lié à *Cr. gattii* (sérotype B) chez un sujet VIH^{pos}.

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 octobre 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 (https://epidemiopasteur.fr/resomyc_portail) géré par le CNRMA, en conformité avec la réglementation. Le CNRMA assure la confirmation de l'espèce (analyse des profils

²⁹ Perfect, J. R., Dismukes, W. E., Dromer, F. et al. Clinical practice guidelines for the management of cryptococcal disease: 2010 update by the infectious diseases society of america. *Clin Infect Dis* 2010 doi:10.1086/649858

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.

Lors du bilan de fin janvier 2012, la collection de l'ODL comportait 3864 isolats de levures (dont 223 reçus au cours de l'année 2012), provenant de 3573 patients ayant présenté 3748 épisodes de fongémie à levure, dont 175 épisodes récurrents (isolement de la même espèce à plus de 10 jours d'intervalle ou d'une autre espèce quel que soit le délai)³⁰.

Au total, 94,9% (3666/3864) des isolats étaient des levures du genre *Candida*, mais on dénombrait aussi d'autres genres, dont *Cryptococcus* (*C. neoformans* représentant 71,2% (141/198) des espèces non *Candida*), mais aussi *Trichosporon*, *Rhodotorula*, *Geotrichum* et *Saccharomyces*. Enfin, 3% des infections étaient mixtes (dues à 2 ou 3 espèces différentes). Les 6 espèces de *Candida* non rares (la non rareté étant définie par un nombre d'isolats $\geq 1,5\%$ des isolats de *Candida* dans l'ODL) représentaient au total 3478 isolats. Elles se répartissaient en 54% de *C. albicans* (1880/3478), 19% de *C. glabrata*, 13% de *C. parapsilosis* (complexe d'espèces comprenant également les espèces très minoritaires *C. metapsilosis* et *C. orthopsilosis*), 9% de *C. tropicalis*, 3% de *C. krusei*, et 2% de *C. kefyr*. 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 ($p < 0.001$) et la préexposition à un antifongique ($p < 0.001$) ou le fait que l'épisode soit incident ou récurrent.

Les 3573 patients atteints de fongémie à levure étaient dans 61% des cas des hommes, âgés en moyenne de 56 ans [0 – 98]. On dénombrait 3370 adultes et 203 enfants âgés de moins de 15 ans et 10% des patients sont âgés de plus de 80 ans. Près de la moitié (45%) des patients était hospitalisée en unité de soins intensifs (USI) et près des trois quarts (72%) avaient un cathéter veineux central à la date de la fongémie. Les principales co-morbidités étaient un acte chirurgical dans les 30 jours précédant la fongémie (36%), un cancer (31,1%), une hémopathie maligne (18,3%), une transplantation d'organe solide (6,1%), ou une infection par le VIH (6,7%). Il existait une préexposition à un antifongique dans 11,8% des cas, beaucoup plus souvent lors des épisodes récurrents (56%) que lors des épisodes incidents (9,7%) ($p < 0.001$). Les patients avaient été pré-exposés au fluconazole (52,8%) ou à la caspofungine (28,9%).

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 (3029/3748), les traitements antifongiques se répartissaient en fluconazole seul (51,7%), échinocandine seule (25,6%), ou autre traitement (16,3%). Le type de traitement différait significativement s'il s'agissait d'un épisode incident ou récurrent ($p < 0.001$).

La mortalité à 30 jours est de 37,2% (1309/3523) des épisodes, 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 (48,8% vs 27,4%, $p < 0.001$), et lorsqu'aucun traitement n'avait été administré ($p < 0.001$). La pathologie cancéreuse sous-jacente n'influçait pas la survie. La mortalité variait selon l'espèce ($p < 0.001$) (*C. albicans* (40,2%), *C. glabrata* (39,6%), *C. parapsilosis* (21%), *C. tropicalis* (38,2%), *C. krusei* (50%), *C. kefyr* (42,6%), *Cr. neoformans* (24,4%), et autres (35%).

3.1.3. Surveillance de l'aspergillose invasive (SAIF)

En collaboration avec le Dr Bruno Coignard de l'InVS, une surveillance prospective des aspergilloses invasives (1ère cause d'infection fongique en hématologie) survenant en France a été mise en place à partir de 2005 dans quatre régions de France métropolitaine (Ouest, Lyon, Grenoble, Ile-de-France), quels que soient la pathologie sous-jacente et l'âge (adultes et enfants). Les données correspondant aux 393 cas d'AI chez des patients adultes ont récemment été publiées (SAIF 2005-2007)^{31, 32}.

³⁰ Renaudat C. et al. Candidémies en Île-de-France : données de l'Observatoire des levures (2002-2010). BEH 2013 ;12-13: 125

³¹ Lortholary O et al. Epidemiological trends in invasive aspergillosis in France: the SAIF network (2005-2007). Clin. Microbiol Infect. 2011;17:1882

³² Lortholary et al. Épidémiologie de l'aspergillose invasive en France : résultat du réseau SAIF (2005-2007). BEH 2013 ;12-13 : 121

La surveillance s'est poursuivie dans 7 régions françaises pour une analyse des cas diagnostiqués entre 2008 et 2010 selon les critères de définition actualisés de l'EORTC/MSG en 2008. Les centres impliqués sont dans la région Rhône-Alpes (Lyon, Grenoble), l'est (Strasbourg, Besançon, Nancy), l'ouest (Brest, Caen, Nantes, Rennes, Tours), le sud-est (Marseille, Nice), le sud-ouest (Limoges, Poitiers), et l'Île-de-France (Saint Louis, Necker, Cochin, Henri-Mondor, Hôpital Européen Georges Pompidou, Saint Antoine, Tenon).

Une analyse préliminaire succincte de la base de données SAIF 2008-2010 est présentée pour ce rapport. Elle sera affinée après une nouvelle phase de "nettoyage". La base de données comprend près de 700 cas d'AI dont 85% d'AI probables. La majorité des cas était survenue chez des adultes (96%), d'âge moyen de 55 ans, hospitalisés au moment du diagnostic (89%). En reprenant la classification précédente³¹, les principaux facteurs de risque étaient par ordre de fréquence, une leucémie aiguë avec ou sans autogreffe de moelle (38%), une hémopathie lymphoïde (21%), une allogreffe (16%), une transplantation d'organe solide (8%), un cancer (4%), une pathologie respiratoire chronique ((3%), essentiellement BPCO), ou une maladie de système (2%). La moitié des patients était neutropénique et 30% avaient reçu un traitement corticoïde prolongé. Le motif d'hospitalisation était dans la majorité des cas la pathologie sous-jacente (59%) ou une pneumopathie (21%).

La quasi-totalité des patients (96%) avait des signes évocateurs d'AI au scanner thoracique (signe du halo, croissant, nodule) et une moindre proportion une atteinte des sinus (13%) ou du système nerveux central (14%). L'infection était disséminée chez 11% d'entre eux.

Le premier critère permettant d'évoquer le diagnostic d'AI était l'imagerie (53%), la détection du galactomannane aspergillaire (44%) ou l'isolement d'une souche d'*Aspergillus* (20%). L'isolement d'une souche a été obtenu dans 67% des cas avec dans plus de 80% l'espèce *A. fumigatus* suivi de *A. flavus* (7%), *Emericella nidulans* (3%), et *A. terreus* (2%). Rappelons ici qu'une analyse centralisée des isolats fongiques n'était pas incluse dans les objectifs de SAIF en raison du surcoût que cela aurait occasionné, et que nous n'avons donc pas établi la prévalence de résistance aux azolés parmi les isolats d'*A. fumigatus*, ni caractérisé les espèces rares mais phénotypiquement proches des espèces énumérées ci-dessus. Ces initiatives ont été laissées à chaque centre participant³³.

Le traitement de première intention comprenait essentiellement le voriconazole (70%), l'amphotéricine B liposomale (17%) ou la caspofungine (18%) seuls ou en association, mais en majorité le voriconazole seul (60%). L'évolution, connue pour la grande majorité des patients, était fatale à 3 mois et 12 mois dans 42% et 56% des cas, respectivement.

3.1.4. RESeau de Surveillance des Infections Fongiques invasives, RESSIF :

RESSIF s'appuie donc sur un réseau de laboratoires, les CC-CNRMA, au nombre de 13 en 2012³⁴ (26 depuis le 1^{er} janvier 2013) qui ont souhaité participer de façon active et pérenne à la surveillance des infections fongiques invasives en France. RESSIF permettra de déterminer avec précision l'incidence des mycoses invasives en France et d'obtenir des données sur la pneumocystose qu'il serait difficile de chiffrer par le biais d'une surveillance passive. Rappelons ici que les critères de diagnostic de la pneumocystose ne sont pas standardisés, que l'agent de la pneumocystose *Pneumocystis jiroveci* n'est pas cultivable, et que les critères diagnostiques comprennent les signes cliniques, le contexte épidémiologique (terrain, présence de cas groupés éventuels), et des techniques mycologiques diversement mises en œuvre et interprétées. Ainsi, selon les centres, l'examen direct est seul pris en

³³ Alanio A et al. Low prevalence of resistance to azoles in *Aspergillus fumigatus* in a French cohort of patients treated for haematological malignancies. J. Antimicrob. Chemother. 2011;66:371.

³⁴ Liste des CC-CNRMA de 2012 par ordre alphabétique des villes, les référents mycologues étant indiqués entre parenthèses: Amiens (Taieb Chouaki), Besançon (Laurence Millon), Clermont-Ferrand (Hélène Raberin), Fort de France (Nicole Desbois), Nantes (Florent Morio), Nice (Martine Gari-Toussaint), Paris – Hôpital Cochin (André Paugam), Paris – Hôpital Saint Louis (Stéphane Bretagne), Poitiers (Catherine Kauffman-Lacroix), Rennes (Jean-Pierre Gangneux), Strasbourg (Valérie Bru), Toulouse (Sophie Cassaing), Tours (Jacques Chandenier).

compte (examen direct avec des colorations standard ou immunofluorescence) alors que dans d'autres les résultats d'une PCR quantitative sont interprétés selon des seuils définis dans le centre et que dans d'autres encore c'est la positivité des deux examens (qPCR et examen direct) qui est requise.

Pour cette première année de fonctionnement, le bilan sera succinct en raison d'un recul insuffisant pour les évolutions cliniques et des retards de déclaration, mais il est déjà impressionnant avec 1001 dossiers enregistrés dans RESSIF pour 2012, dont 17% de d'IFI prouvées et 83% d'IFI probables.

L'âge moyen des patients était de 56 ans (extrême 0-98 ans), avec une majorité d'hommes (61%) et une minorité (4,3%) d'enfants (âge < 15 ans).

Il s'agissait par ordre de fréquence de fongémies (49,5%), pneumocystoses (18,7%), aspergilloses invasives (17,3%), cryptococcoses (3,3%), mucormycoses (2,8%), infections à *Fusarium* spp. (1,5%), infections à *Pseudallescheria/Scedosporium* complexe (1,1%), et autres pathogènes rares (4,8%) (**Figure 8** ; **Figure 9**). Nous validons ainsi sur des données de surveillance active l'analyse faite dans le cadre du PMSI où l'ordre d'incidence des IFI était : candidémies, pneumocystoses et aspergillose invasives. Comme on peut le noter sur la **Figure 8**, la proportion des principales IFI et le nombre de cas répertoriés varie de centre à centre en fonction des populations prises en charge et de la taille de l'établissement.

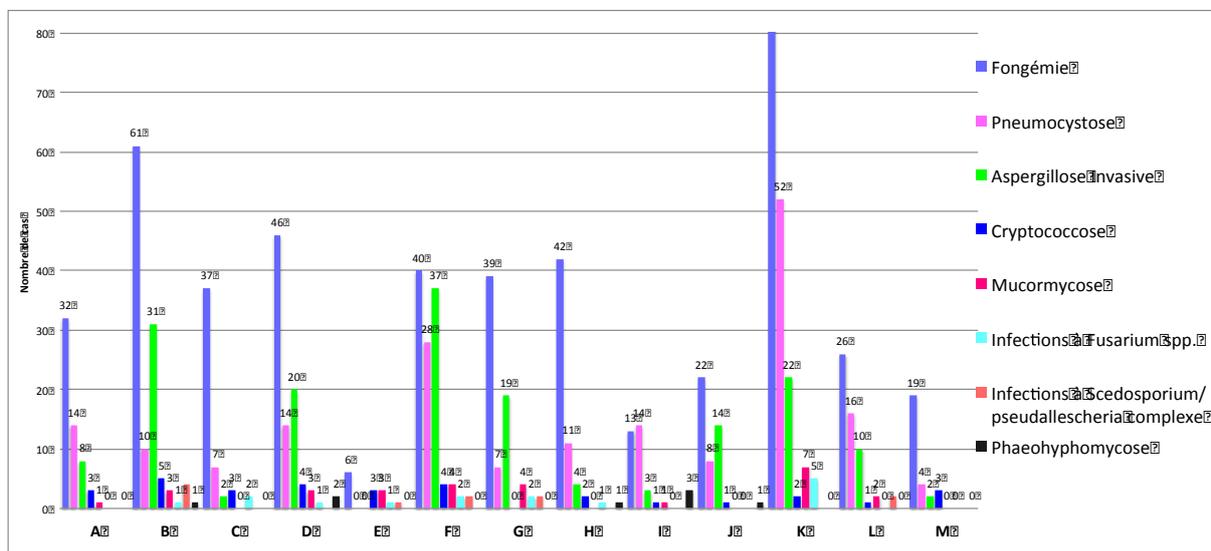


Figure 8 : Répartition des principales infections fongiques invasives (RESSIF 2012)

Le nombre de cas diagnostiqués pour les principales IFI dans les 13 CC-CNRMA faisant partie de RESSIF en 2012 est indiqué.



Figure 9 : Agents de phaeohyphomycoses et de mucormycoses

(A) Phragmospores d'*Alternaria infectoria* responsable des phaeohyphomycoses; (B) Sporocyste et sporocystospores de *Mucor* sp.; (C) Collumelle de *Rhizopus microsporus*

Les facteurs de risque habituels étaient identifiés, se répartissant différemment en fonction des infections (**Figure 10**) avec globalement des pathologies malignes (46,5%), une chirurgie récente (12,4%), une transplantation d'organe solide (9,3%), une infection par le VIH (8,9%), diverses

pathologies (21,3%) dont des maladies de systèmes, des pathologies respiratoires chroniques, un diabète ...

Le CNRMA ne pouvant recevoir tous les isolats, il a été convenu avec les CC-CNRMA que, pour les espèces fréquentes (*A. fumigatus*, *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*), seuls les isolats résistants sont envoyés alors que tous les isolats des autres espèces le sont quel que soit leur profil de sensibilité. Cela représentait donc en 2012, 30% des isolats dont la moitié de levures.

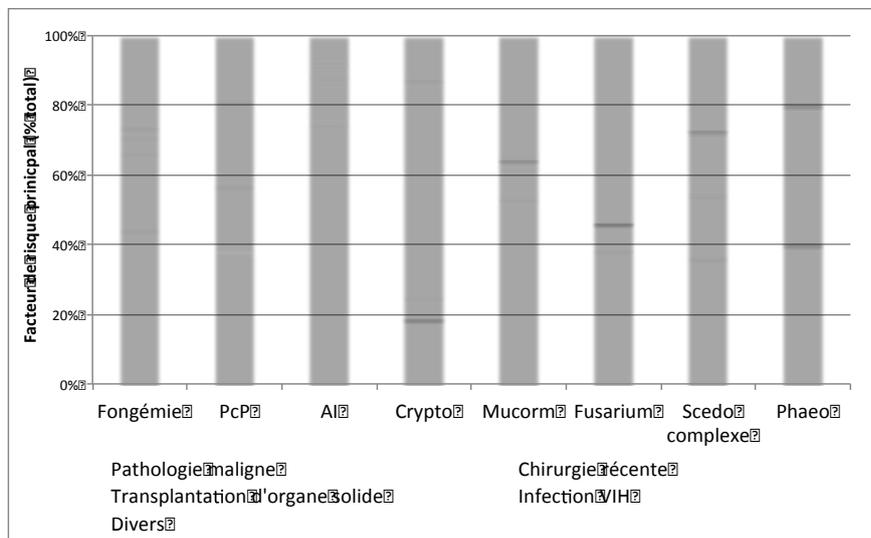


Figure 10 : Variabilité du principal facteur de risque en fonction de l'IFI
PcP : pneumocystose, AI : aspergillose invasive, Crypto : cryptococcose, Mucorm : mucormycose, Fusarium : infections à *Fusarium* spp., Scedo complexe : infections à *Scedosporium/Pseudallescheria* complexe, Phaeo : phaeohyphomycose

RESSIF va donc représenter un outil unique pour la surveillance des infections fongiques invasives. Il permettra d'analyser les tendances, de détecter l'émergence de nouveaux pathogènes ou de résistance anormale, de calculer des incidences ... Il se distingue déjà des outils mis en place dans d'autres pays comme les Etats-Unis ou certains pays européens par le fait que les isolats seront étudiés avec une technique de référence (identification par séquençage des régions ITS ou par analyse multigénique, et CMI déterminées par la technique EUCAST), et qu'ils seront mis en collection pour des études ultérieures éventuelles.

3.2. Surveillance de la résistance des champignons aux antifongiques

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 2008³⁵, nous recherchons systématiquement une mutation dans le gène *Fks* lorsque la CMI de la caspofungine est $\geq 0,5$ $\mu\text{g/ml}$ en AM3 (sauf pour les isolats de *C. parapsilosis*). En pratique, nous interprétons donc les résultats des CMI en fonction du profil de sensibilité obtenu pour les isolats de la même espèce testés dans les mêmes conditions au CNRMA, en

³⁵ 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.

sachant que cette interprétation est d'autant plus fiable, bien sûr, que le nombre d'isolats déjà testés est grand. Pour améliorer la lisibilité de ce rapport, nous avons choisi de présenter les données cumulées des profils de CMI obtenus depuis 2003 pour les levures et les champignons filamenteux séparément.

Définitions utilisées pour exprimer la résistance

Nous retranscrivons ici les seuils établis par le comité EUCAST pour *Candida* sp. (**Tableau 4**) et *Aspergillus* spp. (**Tableau 5**), 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 un *Candida* sp. (autre que le complexe *C. parapsilosis/orthopsilosis/metapsilosis*) était habituellement associée à une mutation dans le Hot Spot d'un ou plusieurs gènes *Fks*.

Tableau 4 : *Candida* sp. EUCAST Antifungal Clinical Breakpoint

(Table v. 6.0, valid from 2013-03-01)

(http://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/AFST/Antifungal_breakpoints_v_6.0.pdf)

| Antifungal agent | MIC breakpoint (mg/L) | | | | | | | | | | | | | |
|-----------------------|-----------------------|-------------------|--------------------|-------------------|-------------------|-------------------|------------------------|-------------------|----------------------|-------------------|--------------------------|-----------------|--|-----|
| | <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 ¹ | |
| | S ≤ | R > | S ≤ | R > | S ≤ | R > | S ≤ | R > | S ≤ | R > | S ≤ | R > | S ≤ | R > |
| Amphotericin B | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | IE | IE | IE | IE |
| Anidulafungin | 0.03 | 0.03 | 0.06 | 0.06 | 0.06 | 0.06 | 0.002 | 4 | 0.06 | 0.06 | IE ² | IE ² | IE | IE |
| Caspofungin | Note ³ | Note ³ | Note ³ | Note ³ | Note ³ | Note ³ | - | - | Note ³ | Note ³ | IE ² | IE ² | IE | IE |
| Fluconazole | 2 | 4 | IE ² | IE ² | 0.002 | 32 | 2 | 4 | 2 | 4 | IE ² | IE ² | 2 | 4 |
| Itraconazole | IP | IP | IP | IP | IP | IP | IP | IP | IP | IP | IP | IP | IP | IP |
| Micafungin | 0.016 | 0.016 | 0.03 | 0.03 | IE ⁴ | IE ⁴ | 0.002 | 2 | IE ⁴ | IE ⁴ | IE ⁴ | IE ⁴ | IE | IE |
| Posaconazole | 0.06 | 0.06 | IE ² | IE ² | IE ² | IE ² | 0.06 | 0.06 | 0.06 | 0.06 | IE ² | IE ² | IE | IE |
| Voriconazole | 0.12 ⁵ | 0.12 ⁵ | IE | IE | IE | IE | 0.12 ⁵ | 0.12 ⁵ | 0.12 ⁵ | 0.12 ⁵ | IE ² | IE 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 higher than for *C. albicans*.
3. Due to significant inter-laboratory variation in MIC ranges for caspofungin, EUCAST breakpoints have not yet been established.
4. MICs for *C. tropicalis* are 1-2 two-fold dilution steps higher than for *C. albicans* and *C. glabrata*. In the clinical study successful outcome was numerically slightly lower for *C. tropicalis* than for *C. albicans* at both dosages (100 and 150 mg daily). However, the difference was not significant and whether it translates into a relevant clinical difference is unknown. MICs for *C. krusei* are approximately three two-fold dilution steps higher than those for *C. albicans* and, similarly, those for *C. guilliermondii* are approximately eight two-fold dilutions higher. In addition, only a small number of cases involved these species in the clinical trials. This means there is insufficient evidence to indicate whether the wild-type population of these pathogens can be considered susceptible to micafungin.
5. Strains with MIC values above the S/I breakpoint are rare or not yet reported. The identification and 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.

Tableau 5 : *Aspergillus* sp. EUCAST Antifungal Clinical Breakpoint

(Table v. 6.0, mars 2013)

http://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/AFST/Antifungal_breakpoints_v_6.0.pdf

| Antifungal agent | MIC breakpoint (mg/L) | | | | | | | | | | | |
|---------------------------------|-----------------------|-----------------|---------------------|-------------------|--------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|--|-----------------|
| | <i>A. flavus</i> | | <i>A. fumigatus</i> | | <i>A. nidulans</i> | | <i>A. niger</i> | | <i>A. terreus</i> | | Non-species related breakpoints ¹ | |
| | S ≤ | R > | S ≤ | R > | S ≤ | R > | S ≤ | R > | S ≤ | R > | S ≤ | R > |
| Amphotericin B | IE ² | IE ² | 1 | 2 | Note ³ | Note ³ | 1 | 2 | - | - | IE | IE |
| Anidulafungin | 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 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Itraconazole⁴ | 1 | 2 | 1 | 2 | 1 | 2 | IE ^{2,5} | IE ^{2,5} | 1 | 2 | IE ⁵ | IE ⁵ |
| Micafungin | IE | IE | IE | IE | IE | IE | IE | IE | IE | IE | IE | IE |
| Posaconazole⁴ | IE ² | IE ² | 0.12 ⁶ | 0.25 ⁶ | IE ² | IE ² | IE ² | IE ² | 0.12 ⁶ | 0.25 ⁶ | IE | IE |
| Voriconazole⁴ | IE ² | IE ² | 1 | 2 | IE | IE | IE ² | IE ² | IE ² | IE 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 *A. fumigatus*.
3. There are too few MIC data to establish ECOFFs and hence to suggest any breakpoints.
4. Monitoring of azole trough concentrations in patients treated for fungal infection is recommended.
5. The MIC values for isolates of *A. niger* and *A. versicolor* are in general higher than those for *A. fumigatus*. Whether this translates into a poorer clinical response is unknown.
6. Provided adequate drug exposure has been confirmed using therapeutic drug monitoring (TDM). There remains some uncertainty regarding cut-off values for posaconazole concentrations that separate patients with a high probability of clinical success from those with a low probability of clinical success. In some circumstances (e.g. patients with persistent and profound neutropenia, large lesions, or those with other features associated with a poor clinical outcome) a relatively high trough concentration should be sought. Preclinical and clinical data suggest this value should be >1 mg/L at steady state. For other patient groups a lower trough concentration may be acceptable. For prophylaxis a target concentration of >0.7 mg/L has been suggested.

3.2.2. Résultats de la surveillance des résistances aux antifongiques pour les levures

Les données du CNRMA concernent actuellement 5861 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, et les antifongiques pertinents (**Tableau 6**).

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.

Nous avons pu observer quelques isolats de *C. albicans*, *C. glabrata* et *C. krusei* avec des CMI hautes pour la caspofungine, des isolats de *C. tropicalis* ayant des CMI hautes pour certains azolés ou pour la 5-fluorocytosine, qui ont justifié des explorations complémentaires. L'étude des isolats de *C. tropicalis* permet de constater en Ile-de-France (**Figure 11**) une diminution de la résistance à la 5FC depuis 2009 et la quasi-disparition du clone R5FC précédemment décrit¹¹ (le clone n'ayant été détecté que rarement en dehors de cette région, et seulement entre 2007 et 2009).

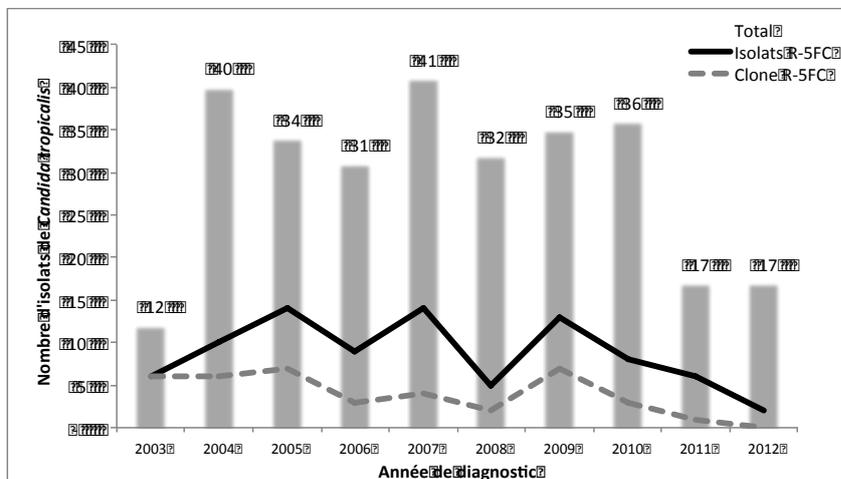


Figure 11 : Evolution de la résistance à la 5FC de *C. tropicalis*

Le clone R-5FC a été identifié en 2008 parmi les isolats de *C. tropicalis* résistants à la 5FC (isolats R-5FC) responsables de fongémies en Ile de France (Observatoire des Levures). Le nombre total d'isolats de *C. tropicalis* diminue en 2011 et 2012 en raison de la diminution de centres participant à l'ODL

Par ailleurs, 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 vient d'être publiée³⁶.

Les résultats de la détermination systématique de la sensibilité aux antifongiques sont donc moins une aide à la prise en charge thérapeutique pour l'instant qu'un élément très important de la surveillance épidémiologique lorsque les données sont générées avec la même technique et centralisées comme ici au CNRMA.

³⁶ 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 6 : Profil de sensibilité des levures aux antifongiques
(levures testées au CNRMA depuis 2003, mise à jour 12/03/ 2013)

| Espèces étudiées [§] | Valeurs des CMI50 / CMI90 (µg/ml) pour les antifongiques* | | | | | | |
|---|---|-------------|------------|-------------|-----------|-----------|-------------|
| | AMB | 5-FC | Fluco | Vori | Posa | Caspo** | Mica** |
| <i>C. albicans</i> (n =2278) | 0.06/0.12 | ≤0.12/0.5 | 0.25/0.5 | ≤0.01/≤0.01 | 0.03/0.06 | 0.03/0.06 | ≤0.01/≤0.01 |
| <i>C. dubliniensis</i> (n = 61) | 0.03/0.06 | ≤0.12/≤0.12 | ≤0.12/0.25 | ≤0.01/0.03 | 0.03/0.06 | 0.03/0.06 | 0.03/0.03 |
| <i>C. glabrata</i> (n = 852) | 0.12/0.25 | ≤0.12/≤0.12 | 16/≥64 | 0.25/2 | 1/2 | 0.06/0.12 | ≤0.01/0.03 |
| <i>C. parapsilosis</i> (n = 494) | 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=22) | 0.03/0.12 | ≤0.12/≤0.12 | 0.5/8 | 0.03/1 | 0.06/0.25 | 0.12/0.25 | 0.25/0.25 |
| <i>C. metapsilosis</i> (n=17) | 0.06/0.25 | ≤0.12/≤0.12 | 1/4 | 0.03/0.06 | 0.03/0.12 | 0.12/0.5 | 0.25/0.25 |
| <i>C. tropicalis</i> (n = 402) | 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 = 175) | 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=19) | 0.25/0.5 | 2/4 | 16/≥64 | 0.12/0.5 | 0.12/0.25 | 0.06/0.12 | 0.03/0.03 |
| <i>C. kefyri</i> (n = 89) | 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 = 67) | 0.03/0.12 | ≤0.12/≤0.12 | 8/64 | 0.06/0.5 | 0.25/0.5 | 0.06/0.12 | 0.25/0.25 |
| <i>C. fermentati</i> (n = 28) | 0.12/0.25 | ≤0.12/0.5 | 8/64 | 0.12/0.5 | 0.25/0.5 | 0.12/0.5 | 0.25/- |
| <i>C. lusitanae</i> (n = 81) | 0.12/0.25 | ≤0.12/1 | 0.5/1 | ≤0.01/0.06 | 0.03/0.06 | 0.06/0.12 | 0.06/0.12 |
| <i>C. haemulonii</i> (n = 36) | 0.5/2 | ≤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 | - |
| <i>Candida palmiophila</i> (n=18) | 0.12/0.5 | ≤0.12/0.5 | 16/64 | 0.12/1 | 0.12/0.25 | 0.03/0.25 | 0.06/- |
| <i>Pichia jadinii</i> (n = 17) | 0.06/0.12 | ≤0.12/2 | 1/4 | 0.06/0.12 | 0.12/0.5 | ≤0.01/1 | - |
| <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/- |
| <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 = 26) | 0.06/0.12 | ≤0.12/≤0.12 | 8/16 | 0.12/0.25 | 0.5/1 | 0.12/0.25 | 0.12/0.25 |
| <i>Yarrowia lipolytica</i> (n=10) | 1/1 | 16/64 | 4/8 | 0.12/0.25 | 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=29) | 0.25/1 | ≤0.12/0.25 | 16/32 | 0.12/1 | 0.5/2 | ≥8/≥8 | ≥8/≥8 |
| <i>Saprochaete clavata</i> (<i>G. clavatum</i>) (n=59) | 0.5/0.5 | 0.25/0.5 | 32/64 | 0.5/2 | 0.5/1 | ≥8/≥8 | ≥8/≥8 |
| <i>Cr. neoformans</i> var. <i>grubii</i> (n=654) | 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=154) | 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=33) | 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 = 22) | 0.12/0.25 | 2/8 | 8/16 | 0.12/0.25 | 0.25/0.25 | ≥8/ ≥8 | ≥8/≥8 |
| <i>Rhodotorula mucilaginosa</i> (n=20) | 0.5/0.5 | 0.25/0.5 | ≥64/≥64 | 2/8 | 1/2 | ≥8/ ≥8 | ≥8/≥8 |
| <i>Trichosporon asahii</i> (n=17) | 2/≥8 | 64/≥64 | 4/32 | 0.12/0.25 | 0.25/1 | ≥8/≥8 | 2/≥8 |
| <i>Trichosporon inkin</i> (n=8) | 0.5/- | 64/- | 1/- | ≤0.01/- | 0.06/- | ≥8/- | 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 (casposungine), 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 casposungine ou début 2008 pour la micafungine.

3.2.3. Résultats de la surveillance des résistances aux antifongiques pour les filamenteux (Tableau 7)

Tableau 7 : Profil de sensibilité des filamenteux aux antifongiques

| | Valeurs des CMI50 / CMI90 (µg/ml) pour les antifongiques* | | | | | | |
|---|---|-----------|-----------|-----------|----------|-----------|------------|
| | AMB | Itra | Vori | Posa | Caspo | Terbi | Mica |
| Mucorales | | | | | | | |
| <i>Lichtheimia corymbifera</i> (n=39) | 0.5/1 | 1/4 | ≥8/≥8 | 0.5/1 | 8/≥8 | 0.5/1 | ≥8/≥8 |
| <i>Lichtheimia ramosa</i> (n=38) | 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/≥8 |
| <i>Rhizopus oryzae</i> (n=52) | 0.12/0.25 | 0.5/2 | 8/≥8 | 0.25/1 | ≥8/≥8 | ≥8/≥8 | ≥8/≥8 |
| <i>Rhizopus microsporus</i> (n=27) | 0.06/0.12 | 1/≥8 | 8/≥8 | 0.5/1 | ≥8/≥8 | 0.5/1 | ≥8/≥8 |
| <i>Rhizomucor pusillus</i> (n=30) | 0.06/0.12 | 0.5/1 | ≥8/≥8 | 0.25/0.5 | ≥8/≥8 | 0.25/1 | ≥8/≥8 |
| <i>Mucor circinelloides</i> (n=13) | 0.06/0.06 | 2/≥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/- |
| Hyphomycètes | | | | | | | |
| <i>Acremonium</i> spp. (n=12) | 4/≥8 | ≥8/≥8 | 1/4 | 2/≥8 | ≥8/≥8 | 0.5/≥8 | ≥8/≥8 |
| <i>Aspergillus fumigatus</i> (n=175) | 0.5/0.5 | 0.25/≥8 | 0.25/2 | 0.06/0.5 | 0.5/0.5 | 2/4 | 0.01/0.06 |
| <i>Aspergillus flavus</i> (n=52) | 1/2 | 0.12/0.5 | 0.5/0.5 | 0.12/0.25 | 0.25/0.5 | 0.06/0.12 | 0.03/0.06 |
| <i>Aspergillus</i> section <i>Usti</i> (n=27) | 0.5/1 | 2/≥8 | 4/8 | ≥8/≥8 | 2/8 | 0.25/0.5 | 0.25/≥8 |
| <i>Emericella</i> spp. (n=25) | 0.5/4 | 0.25/0.5 | 0.12/0.25 | 0.12/0.5 | 1/4 | 0.12/0.5 | 0.01/0.06 |
| <i>Aspergillus niger</i> (n=14) | 0.25/0.5 | 0.5/2 | 0.5/1 | 0.25/0.5 | 0.25/0.5 | 0.25/0.25 | 0.03/0.03 |
| <i>Aspergillus terreus</i> (n=23) | 2/8 | 0.06/0.25 | 0.25/0.5 | 0.06/0.25 | 0.5/2 | 0.06/0.12 | 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> complexe (n=77) | 2/4 | ≥8/≥8 | 4/8 | 2/≥8 | ≥8/≥8 | 2/8 | ≥8/≥8 |
| <i>Gibberella fujikuroi</i> complexe (n=60) | 4/8 | ≥8/≥8 | 4/8 | 4/≥8 | ≥8/≥8 | 1/2 | ≥8/≥8 |
| <i>Fusarium solani</i> complexe (n=112) | 4/8 | ≥8/≥8 | 8/≥8 | ≥8/≥8 | 8/≥8 | ≥8/≥8 | ≥8/≥8 |
| <i>Fusarium dimerum</i> complexe (n=10) | 0.5/0.5 | ≥8/≥8 | 4/- | ≥8/≥8 | 8/- | 0.5/- | ≥8/≥8 |
| <i>Fusarium</i> spp. (n=25) | 4/4 | ≥8/≥8 | 4/8 | ≥8/≥8 | 8/8 | 1/4 | ≥8/≥8 |
| <i>Pseudallescheria boydii</i> (n=27) | ≥8/≥8 | 0.5/≥8 | 0.25/0.5 | 0.5/1 | 1/2 | ≥8/≥8 | 0.25/1 |
| <i>Pseudallescheria apiosperma</i> (n=57) | 8/≥8 | 1/≥8 | 0.5/1 | 1/2 | 1/2 | ≥8/≥8 | 0.25/0.5 |
| <i>Pseudallescheria ellipsoidea</i> (n=6) | ≥8/- | 1/- | 0.5/- | 1/- | 0.5/- | ≥8/≥8 | 0.25/- |
| <i>Scedosporium prolificans</i> (n=18) | ≥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</i> spp. (n=15) | 8/≥8 | ≥8/≥8 | 8/≥8 | ≥8/≥8 | 1/4 | 2/8 | 0.25/1 |
| <i>Purpureocillium lilacinum</i> (n=20) | ≥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=11) | 0.12/0.5 | 0.25/0.5 | ≥8/≥8 | 0.25/0.5 | 0.5/4 | 1/8 | 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 | 0.03/0.5 |
| <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>Myceliophthora thermophila</i> (n=5) | 1/- | 0.12/- | 0.12/- | 0.12/- | 4/- | 2/- | 0.5/- |
| Coelomycètes | | | | | | | |
| <i>Medicopsis romeroi</i> (n=6) | 0.5/- | 4/- | 0.5/- | 1/- | 4/- | 0.12/- | 2/- |
| Dématiés | | | | | | | |
| <i>Alternaria infectoria</i> (n=25) | 0.25/0.5 | 0.5/1 | 4/≥8 | 0.12/0.5 | 0.5/1 | 0.5/1 | 0.06/0.12 |
| <i>Alternaria alternata</i> complexe (n=21) | 0.25/1 | 0.5/2 | 2/4 | 0.25/0.5 | 0.5/2 | 2/≥8 | 0.12/1 |
| <i>Exophiala dermatitidis</i> (n=20) | 0.12/0.25 | 0.5/- | 0.06/0.25 | 0.12/0.25 | 8/≥8 | 0.06/- | 1/≥8 |
| <i>Exophiala jeanselmei</i> (n=8) | 1/- | 0.5/- | 0.25/- | 0.25/- | 2/- | 0.06/- | 2/- |
| <i>Curvularia</i> spp. (n=9) | 0.12/- | 0.5/- | 0.5/- | 0.12/- | 1/- | 0.5/- | 0.06/- |
| <i>Chaetomium</i> sp. (n=7) | 0.5/- | 0.25/- | 0.25/- | 0.25/- | 2/- | 1/- | 0.5/- |
| <i>Doratomyces</i> sp. (n=5) | 2/- | ≥8/- | 4/- | 1/- | 1/- | 2/- | 0.12/- |
| <i>Fonsecaea</i> spp. (n=8) | 0.5/- | 0.03/- | 0.06/- | 0.06/- | 1/- | 0.03/- | 1/- |
| <i>Phaeoacremonium</i> spp. (n=12) | 0.25/2 | ≥8/≥8 | 0.25/0.5 | 0.25/1 | 8/≥8 | 0.5/0.5 | ≥8/- |
| <i>Scytalidium</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/- |
| Dimorphiques | | | | | | | |
| <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 (caspofungine), Terbi (terbinafine), Mica (micafungine) ; - : non déterminable pour moins de 10 isolats testés - (filamenteux testés au CNRMA depuis 2003, MAJ 15/03/2013)

3.2.4. Analyse des tendances

En prenant les seuils définis partiellement par l'EUCAST (cf. plus haut), on peut étudier les tendances sur les levures collectées dans le cadre de l'observatoire qu'est l'ODL. 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 (**Tableau 8**) et du voriconazole (**Tableau 9**) 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 3 à 14% entre 2008 et 2012). En parallèle, on ne note pas d'augmentation de la résistance de *C. parapsilosis* au voriconazole. 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 caspofungine des isolats provenant d'espèces de *Candida* habituellement sensibles reste rare (selon les années, 0-1% des isolats de *C. albicans*, 0-5% pour ceux de *C. glabrata*, 0-3% pour *C. tropicalis*) ou absente (*C. krusei*) (**Tableau 10**).

Tableau 8 : Evolution de la résistance des levures au fluconazole
(% d'isolats dont la CMI fluconazole est $>4 \mu\text{g/ml}$; ODL)

| | | 2003 | 2004 | 2005 | 2006 | 2007 | 2008 | 2009 | 2010 | 2011 | 2012 |
|------------------------|--------------------|------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| <i>C. albicans</i> | % $\mu\text{g/ml}$ | 2 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | (n testés) | (45) | (213) | (178) | (168) | (213) | (200) | (224) | (212) | (158) | (128) |
| <i>C. parapsilosis</i> | % | 0 | 2 | 2 | 5 | 19 | 14 | 8 | 10 | 10 | 3 |
| | (n testés) | (7) | (45) | (42) | (43) | (58) | (36) | (39) | (41) | (32) | (21) |
| <i>C. tropicalis</i> | % | 25 | 2 | 6 | 13 | 5 | 16 | 0 | 28 | 0 | 5 |
| | (n testés) | (12) | (40) | (34) | (31) | (41) | (32) | (35) | (36) | (17) | (19) |
| <i>Cr. neoformans</i> | % | 60 | 33 | 50 | 23 | 21 | 30 | 45 | 9 | 25 | 20 |
| | (n testés) | (10) | (15) | (20) | (22) | (14) | (10) | (11) | (14) | (8) | (5) |

Tableau 9 : Evolution de la résistance des levures au voriconazole
(% d'isolats dont la CMI voriconazole est $>0,12 \mu\text{g/ml}$)

| | | 2003 | 2004 | 2005 | 2006 | 2007 | 2008 | 2009 | 2010 | 2011 | 2012 |
|------------------------|------------|------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| <i>C. albicans</i> | % | 0 | 1 | 1 | 0 | 1 | 0 | 0 | 2 | 0 | 0 |
| | (n testés) | (45) | (213) | (178) | (168) | (213) | (200) | (224) | (212) | (158) | (128) |
| <i>C. parapsilosis</i> | % | 0 | 0 | 0 | 0 | 3 | 0 | 0 | 2 | 3 | 0 |
| | (n testés) | (7) | (45) | (42) | (43) | (58) | (36) | (39) | (41) | (32) | (21) |
| <i>C. tropicalis</i> | % | 8 | 0 | 12 | 16 | 5 | 22 | 9 | 28 | 6 | 0 |
| | (n testés) | (12) | (40) | (34) | (31) | (41) | (32) | (35) | (36) | (17) | (19) |
| <i>Cr. neoformans</i> | % | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | (n testés) | (10) | (15) | (20) | (22) | (14) | (10) | (11) | (14) | (8) | (5) |

Tableau 10 : Evolution du pourcentage de levures ayant des CMI caspofungine hautes
(% d'isolats dont la CMI caspofungine est $>0,25 \mu\text{g/ml}$, ODL)

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

3.3. Détection et investigation des cas groupés et des phénomènes anormaux

Deux épisodes, éloignés de quelques semaines à quelques mois (septembre 2011 à mars 2012), de fongémies dues à un champignon rare, ayant impliqué 3 patients dans deux centres hospitaliers ont été signalés à l'InVS, tandis que les souches étaient envoyées pour identification au CNRMA. Les analyses, faites au CNRMA ont permis d'identifier *Saprochaete clavata* (*Geotrichum clavatum*) souvent confondu avec *Magnusiomyces capitatus* (*Geotrichum capitatum*). *Magnusiomyces capitatus* a déjà été rapporté comme responsable d'épidémies de fongémies graves dans des services d'hématologie, avec une origine possible de contamination par des produits laitiers. En revanche, *S. clavata* a rarement été décrit dans ce contexte, et aucun réservoir n'est connu pour ce champignon. Comme on peut le voir dans le Tableau 6, il s'agit d'une espèce ayant une résistance intrinsèque aux échinocandines et dont la sensibilité aux azolés est variable. Les fongémies à *S. clavata* ou *M. capitatus* sont rares (10 isolats de chaque espèce isolées dans l'ODL entre 2003 et 2012 (1 à 2 par an), soit entre 0,2 et 0,5% du total des isolats).

Dans ce contexte, l'apparition d'un nouvel épisode de 3 cas groupés dans un 3ème établissement en mai 2012 était très anormale et a fait évoquer une source commune (produit de santé ou aliment contaminé). Une recherche active de tous les cas survenus entre 2009 et 2012 dans l'ensemble des services d'hématologie français a alors été organisée par l'InVS (Sophie Vaux, Bruno Coignard) et le CNRMA, avec le concours de la Société Française d'Hématologie (SFH). Tous les cas pour lesquels l'espèce *S. clavata* a été identifiée au CNRMA ont alors fait l'objet d'une enquête, coordonnée par l'InVS, recherchant une source d'exposition commune et des facteurs de risque, et ceci, grâce à l'aide des microbiologistes/mycologues et des cliniciens hospitaliers, ainsi que des CCLIN et de l'Etablissement Français du Sang. Une alerte nationale a été lancée début juin 2012, relayée au plan international par l'ECDC et le CDC. Aucun autre pays n'a connu une telle épidémie.

L'analyse épidémiologique a été faite à l'InVS avec le concours des C-CLIN, des cliniciens, hygiénistes et microbiologistes. Du 12/09/11 au 22/10/12, 30 cas d'infections à *S. clavata* (incluant 27 fongémies) sont survenues dans 14 hôpitaux et 11 régions, dont 17 lors d'un pic épidémique (semaines 15 à 22) (**Figure 12**). Les 27 patients (dont 14 femmes, âge médian 63 ans (23-86 ans)) avaient des pathologies hématologiques sévères (essentiellement des leucémies myéloïdes aiguës). La majorité (80%) des patients recevaient des traitements antifongiques au moment de la fongémie (casposungine ou posaconazole). La mortalité globale était de 81%.

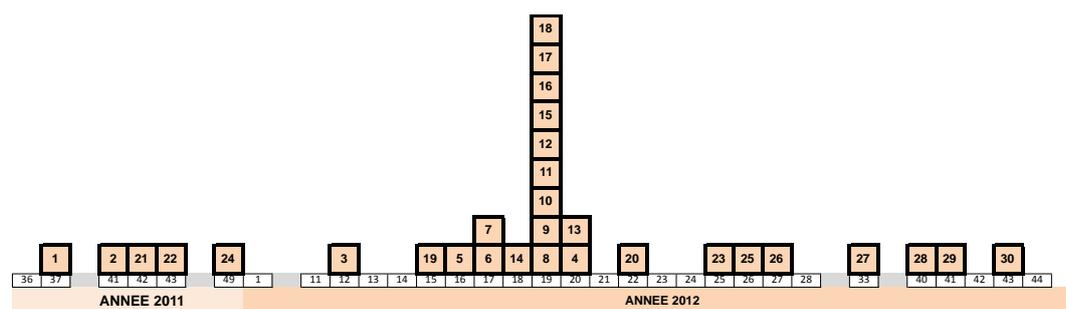


Figure 12 : Distribution des cas d'infections dues à *Saprochaete clavata* depuis 2011
Le pic épidémique est visible entre les semaines 15 et 22 de 2012

L'implication du CNRMA s'est faite à plusieurs niveaux :

- 1) Recherche active des cas par mailing auprès des correspondants du CNRMA et appels téléphoniques dans plus de 50 centres hospitaliers français.
- 2) Récupération de toutes les souches identifiées dans les laboratoires hospitaliers comme *M. capitatus* depuis début 2011 et identification.

En pratique, sur les 40 souches identifiées comme *G. capitatum* et adressées au CNRMA au moment du pic épidémique, 3 seulement étaient *M. capitatus* et le reste *S. clavata*.

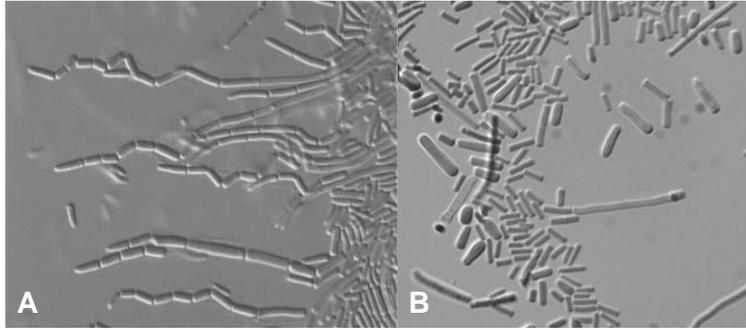


Figure 13 : Aspect microscopique de *M. capitatus* (A) et *S. clavata* (B)

Il faut souligner d'emblée que les erreurs d'identification ne compromettent pas la prise en charge thérapeutique, car les profils de sensibilité aux antifongiques des deux espèces sont très proches et les pathologies associées souvent voisines.

Les erreurs d'identification s'expliquent facilement. En effet, les deux espèces sont indissociables sur la morphologie qui met en évidence des filaments arthrosporés et des conidies (**Figure 13**), aucune des deux espèces n'a d'activité uréase. Nombre de laboratoires utilisent le profil d'assimilation des sucres ou le MALDI-TOF pour identifier leurs levures. Or, l'espèce *S. clavata* n'existe pas dans les bases de données correspondantes (seule *M. capitatus* est incluse). La croissance sur cellobiose, salicine et arbutine positives pour *S. clavata* et négative pour *M. capitatus* pourrait les différencier, mais elle n'est étudiée que dans la galerie 50CH, non utilisée en routine. Nous avons cependant, après analyse de 85 isolats (59 *S. clavata* et 26 *M. capitatus*) trouvé deux profils ID32C majoritaires pour l'espèce *S. clavata* (66% des souches ont les codes 30100100011 ou 30100100031) qui sont absents pour l'espèce *M. capitatus*. Ces codes pourraient donc permettre de différencier les deux espèces dès l'analyse de la galerie ID32C pour les laboratoires ne faisant pas de séquençage.

Pour les laboratoires qui pratiquent l'identification moléculaire par séquençage des régions ITS, l'identification a été rendue *M. capitatus* dans tous les cas, en raison des séquences erronées déposées dans les bases de données publiques telle GenBank. Ces bases de données contiennent des séquences déposées par des non mycologues et sont donc erronées dans plus de 20% des cas (et d'autant plus qu'il s'agit d'espèces rares)³⁷. En l'occurrence, en utilisant une base de données fiables, telle celle de la CBS (<http://www.mycobank.org/>), les séquences ITS des isolats cliniques ont 99-100% de similarité avec celle de la souche type de *S. clavata* (CBS 425.71) et seulement 96% de similarité avec celle de *M. capitatus*, mais les séquences de la région D1D2 de la sous-unité 26S sont identiques pour les deux espèces.

3) Vérification de l'absence d'évolution des profils de sensibilité aux antifongiques entre les souches récentes et les souches plus anciennes de la collection du CNRMA

Les souches de la collection et celles du pic épidémique ont été testées dans les mêmes conditions et aucune différence n'a été constatée dans les profils de sensibilité aux antifongiques, ce qui n'est pas en faveur de l'hypothèse de la sélection d'un clone résistant par une pré-exposition à un antifongique.

4) Echec des tentatives de différenciation des souches par des techniques déjà publiées.

Nous avons testés différentes amorces utilisées dans la littérature avec la technique RAPD et démontré que tous les isolats testés, y compris les isolats anciens, étaient identiques (**Figure 14**). Cette technique permet donc de différencier l'espèce mais non les isolats d'une même espèce.

³⁷ Nilsson RH et al. Taxonomic Reliability of DNA Sequences in Public Sequence Databases: A Fungal Perspective. PLoS ONE. 2006;1:e59.

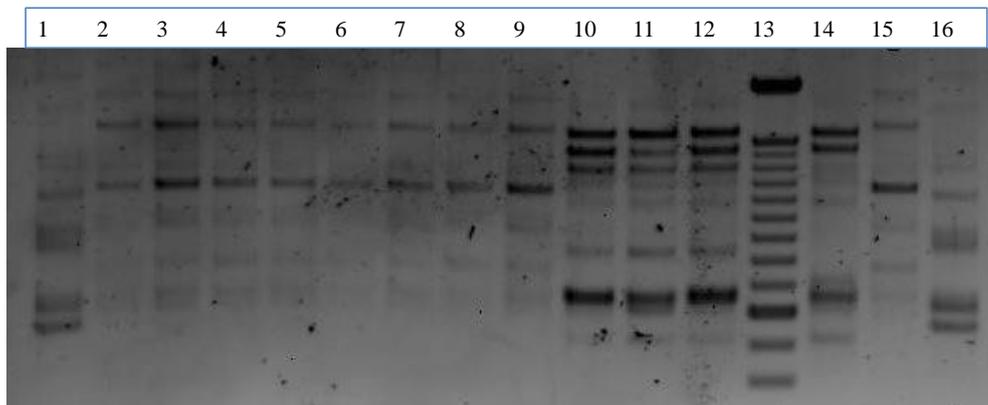


Figure 14 : Profils RAPD (amorce OPE4) de *S. clavata*, *M. capitatus* et *G. candidum*
 Profils générés par amplification, avec l'amorce OPE-4, de l'ADN génomique de souches cliniques de *G. candidum* (piste 1), *S. clavata* (pistes 2 à 9, isolats datant des années 1980 à 2012) ou *M. capitatus* (10-12), ainsi que de souches type *M. capitatus* (14, CBS178.71), *S. clavata* (15, CBS162.80), et *G. candidum* (16, CBS425.71) - (Ligne 13, échelle).

- 5) Mise en culture des dispositifs de prélèvements de produits sanguins et de quelques lots de produits sanguins eux-mêmes

L'enquête de l'InVS est encore en cours pour déterminer la responsabilité éventuelle de concentrés plaquettaires tout en sachant que l'analyse microbiologique des lots éventuellement incriminés n'a pas permis d'isoler de champignon en culture, ni d'amplifier d'ADN fongique au CNRMA.

- 6) Mise en place d'une collaboration avec la plate-forme de Génotypage des Pathogènes et Santé Publique (PF-8) pour comparer les souches de façon fiable.

Les génomes de *S. clavata* et de *M. capitatus* n'étant pas séquencés, il était impossible de trouver des cibles utilisables pour la mise au point d'un génotypage par MLST ou polymorphisme de séquences microsatellites. Après discussion avec Sylvain Brisse et Valérie Caro, il a été décidé de faire le séquençage du génome entier de plusieurs souches cliniques de *S. clavata* correspondant à l'épisode épidémique et antérieures à celui-ci, et de la souche type. Les extractions d'ADN ont été réalisées au CNRMA, tandis que les bibliothèques, le séquençage et l'analyse ont été réalisés à la PF-8, en deux expériences successives avec au total 19 souches séquencées sur un séquenceur de type Illumina HiSeq 2000 générant des "reads" de 100 bases ($2 \times \sim 7$ million reads de 100 bases/souche). Pour résumer en quelques mots un travail de plusieurs mois, l'assemblage des contigs a été fait *de novo* et a permis d'identifier des SNPs qui différenciait les souches épidémiques formant un cluster, des autres souches plus diverses.

- 7) Mise au point d'une technique permettant l'identification du clone épidémique de *S. clavata*

Grâce à l'assemblage réalisé à la PF-8, nous avons pu dessiner des amorces permettant d'amplifier 4 régions géniques contenant des SNPs spécifiques du clone épidémique, ce qui nous permet, dès l'identification de l'espèce d'obtenir très rapidement la caractérisation de l'isolat. Nous avons pu, grâce à cette technique, démontrer l'apparition de la souche clonale dès la semaine 43 de 2011, confirmer l'appartenance au clone épidémique de toutes les souches isolées pendant les semaines 16 à 22, et la disparition du clone depuis la semaine 27 (**Figure 15**). En revanche, à ce jour, la source de l'épidémie n'a pas été identifiée avec certitude.

Il nous semble donc important de continuer à surveiller les souches de *M. capitatus*/*S. clavata* responsables d'infections invasives pour détecter rapidement une éventuelle épidémie et être plus réactif pour rechercher en temps réel la source de la contamination.

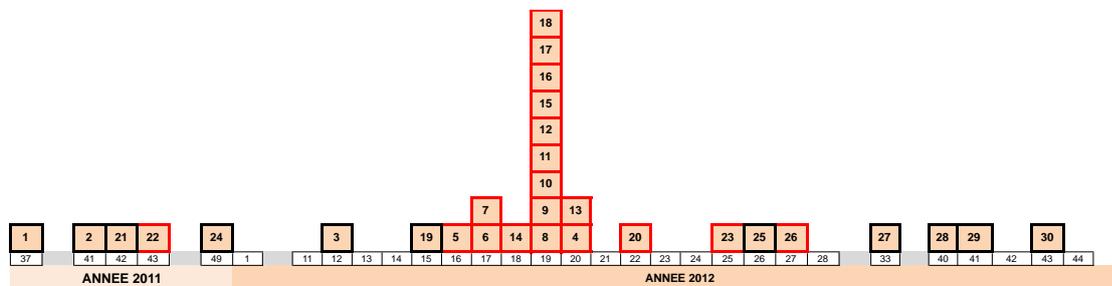


Figure 15 : Distribution du clone épidémique de *S. clavata*
Le clone déterminé par PCR spécifique correspond aux cas entourés de rouge

3.4. Contribution 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 dans le cadre de collaborations autres (voir plus loin).

3.5. Enquêtes ou études ponctuelles concourant à la surveillance

Le CNRMA a contribué à deux enquêtes visant à estimer le poids des mycoses invasives en France grâce à l'analyse des données du PMSI (Programme de Médicalisation du Système d'Information) pilotée par Dounia Bitar et Didier Che de l'InVS (Cellule des Maladies Emergentes du Département des Maladies Infectieuses).

3.5.1. Analyse des sources de données sur les mucormycoses par la méthode de capture-recapture

La première étude a donc porté sur les mucormycoses et a été suscitée par l'étude RetroZygo qui avait analysé les cas de mucormycoses diagnostiqués en France entre 2005 et 2007³⁸. Pour la mettre en place, deux sources de données indépendantes avaient été utilisées : les cas pour lesquels l'expertise du CNRMA avait été sollicitée pour des identifications d'isolats ou pour des conseils thérapeutiques, et la base du PMSI d'où ont été extraites les hospitalisations pour lesquelles le terme "mucormycoses" avait été utilisé. La méthode de capture-recapture a été utilisée pour évaluer le nombre de cas ayant échappé aux deux sources (28 cas), sachant que sur les 94 cas inclus dans la base, 33 seulement étaient communs, 30 étaient uniquement dans la base PMSI, 31 uniquement dans celle du CNRMA. La combinaison des deux bases permettait donc d'obtenir une sensibilité de 77% (66%-92%) tandis qu'elle atteignait 53% pour chacune des deux, ce qui démontrait encore une fois l'intérêt de combiner deux sources de données pour des pathologies rares³⁹.

3.5.2. Analyse du poids des infections fongiques invasives en France par l'étude des données du PMSI

Les données disponibles sur les infections fongiques invasives survenant dans la population générale sont limitées, elles sont en effet souvent limitées à une population donnée, à une infection particulière et sur une période restreinte. Les données du PMSI entre 2001 et 2010 ont été analysées, afin d'estimer le poids des principales IFI dans la population en France métropolitaine, de décrire leurs caractéristiques épidémiologiques et leurs facteurs de risque, et enfin d'estimer leurs tendances au cours du temps. Ces données seront publiées prochainement dans un numéro spécial du BEH⁴⁰.

³⁸ Lanternier F et al. A global analysis of mucormycosis in France: the RetroZygo Study (2005-2007). Clin Infect Dis 2012 ; 54 Suppl 1, S35-43

³⁹ Bitar D et al. Estimating the burden of mucormycosis infections in France (2005-2007) through a capture-recapture method on laboratory and administrative data. Rev Epidemiol Sante Publique. 2012;60:383.

⁴⁰ Bitar et al. Mycoses invasives en France métropolitaine, PMSI 2001-2010 : incidence, létalité et tendances. BEH 2013 ;12-13 : 109

Les cinq IFI les plus fréquentes ont été retenues. Les cas ont été définis à partir des codes CIM-10 (classification internationale des maladies, 10^{ème} version) respectifs : fongémies à *Candida* (candidémies) ; aspergilloses invasives (AI) incluant les aspergilloses "pulmonaires invasives" et "disséminées" ; cryptococcoses incluant toutes les formes y compris les "formes non précisées" ; pneumonies à *Pneumocystis jirovecii* (Ppj), pour lesquelles les codes "pneumocystose" ou "infection VIH à l'origine de Ppj" ont été retenus uniquement en présence d'un diagnostic de pneumonie confirmée ; enfin mucormycoses (zygomycoses) incluant toutes les formes y compris « non précisées » mais excluant les formes gastro-intestinales, l'étude précédente ayant montré que ces dernières étaient essentiellement des erreurs de codage ou de diagnostic (faux positifs). Les IFI endémiques dans les territoires d'Outre-mer (notamment les histoplasmoses) et les IFI rares (moins de 40 cas annuels) ont été exclues de cette analyse. Les données détaillées seront prochainement publiées dans un numéro spécial du BEH consacré aux mycoses.

Au total, 35876 épisodes initiaux d'IFI ont été répertoriés, incluant candidémies (43,3%), pneumocystoses (26,1%), aspergilloses invasives (23,9%), cryptococcoses (5,2%) et mucormycoses (1,5%), avec une incidence globale de 5,9 cas/100000 personnes/an et une mortalité de 27,6%. L'incidence des candidémies, aspergilloses invasives et mucormycoses a augmenté annuellement de 7,8%, 4,4% et 7,3% alors qu'elle a diminué de 8,5% et 9,8% pour les pneumocystoses et cryptococcoses, respectivement ($p < 0.05$). L'évolution dépendait largement du terrain. Ainsi, l'incidence annuelle des pneumocystoses a augmenté au cours des insuffisances rénales chroniques (+13,5%) et chez les transplantés d'organes solides (+13%), alors qu'elle a diminué au cours de l'infection VIH (-14,8%). Ces données démontrent le poids des infections fongiques en France et l'enjeu majeur qu'elles représentent en termes de prise en charge thérapeutique et considération économiques.

4. ALERTE

Il n'existait pas de procédure d'alerte formalisée entre le CNRMA et l'InVS avant l'épisode de fongémies à *S. clavata*. La procédure a été facilement mise en place avec des mails du CNRMA vers l'InVS à l'adresse « noa-signalment@invs.sante.fr » dès qu'une souche envoyée au CNRMA était identifiée comme *S. clavata*. En pratique, dès réception de l'isolat, une extraction d'ADN était faite à partir du repiquage adressé au CNRMA. Puis, une amplification des régions ITS était réalisée au CNRMA, le séquençage était ensuite fait à la PF-8 et les chromatogrammes analysés ensuite au CNRMA. En pratique, l'identification de l'espèce était obtenue en général moins de 24h après réception de la souche, et le résultat communiqué au correspondant et à l'InVS immédiatement.

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 au concours hospitalo-universitaire 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.

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, 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

Le serveur RESOMYC est 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.

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.

5.4. Activité d'expertise

Au plan national

- F. Dromer a été nommée expert rapporteur auprès de la Commission nationale de matériovigilance de l'AFSSAPS (J.O n° 127 du 2 juin 2006).
- O. 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.
- O. Lortholary et S. Bretagne sont experts auprès de l'AFSSAPS (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

- **IDSAs** : 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*).
- **ECMM/ISHAM** : 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 ».
- **ISHAM** : 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. 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.
- **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) et pneumocystose (ECIL5 en cours)
- **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. O. Lortholary a notamment participé à l'actualisation du consensus des définitions des infections fongiques invasives
- **EFISG** : au sein de la Société Européenne de Microbiologie (ESCMID), s'est créé un groupe d'étude des infections fongiques (EFISG) dont le secrétariat a été assuré par O. Lortholary jusqu'en 2007. L'objectif de ce groupe est de pouvoir mener en Europe des études épidémiologiques, physiopathologiques et cliniques dans le domaine des infections fongiques systémiques en dehors du domaine de l'hématologie couvert dans l'EORTC. Ce groupe rassemble cliniciens et mycologues de nombreux pays européens concernés par ces thématiques.
- **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. Activités de recherche ayant un lien direct avec les missions et activités du CNR.

6.1.1. Participation à des groupes de travail sur les recommandations nationales ou internationales de prise en charge des infections fongiques

La société européenne de microbiologie clinique et de maladies infectieuses (ESCMID) vient de publier ses recommandations sur le diagnostic et la prise en charge des infections invasives à *Candida* auxquelles le CNRMA a activement participé. En particulier, Olivier Lortholary a coordonné les travaux du groupe « infection à *Candida* au cours de l'infection par le VIH »⁴¹. L'ensemble des travaux a fait l'objet d'un numéro spécial de la revue *Clinical Microbiology and Infection* (ESCMID Guideline for the diagnosis and management of *Candida* diseases 2012).

La 3^e conférence européenne sur les infections au cours des hémopathies malignes a publié les premières recommandations sur le diagnostic et la prise en charge des mucormycoses chez les patients atteints d'hémopathies malignes auxquelles le CNRMA a participé⁴². Celles-ci devraient aider les cliniciens et microbiologistes européens confrontés à cette mycose invasive dont l'incidence augmente en France.

Suite au travail coordonné par le CNRMA en France sur la mise en évidence de la transmission de *Candida* spp. liée à la contamination du liquide de conservation du greffon rénal lors de la procédure de prélèvements multiples d'organes, nous avons été invités par la société américaine de transplantation à participer à la rédaction des recommandations de prévention de la transmission des champignons par les greffons d'organe solide⁴³.

Nous avons participé à une méta-analyse de six cohortes⁴⁴ évaluant la contribution de la détection du beta-D-glucane pour le diagnostic d'infections fongiques invasives chez des patients atteints d'hémopathies malignes (1771 adultes avec 414 épisodes d'infections fongiques invasives). En présence de deux tests consécutifs positifs, la sensibilité de la détection de cet antigène était médiocre (49,6%), mais la spécificité, la valeur prédictive positive et négative étaient respectivement de 98,9%, 83,5% et 94,6%.

Une mise au point sur les autres tests sériques (galactomane et détection d'ADN) pour le diagnostic de l'aspergillose invasive a été réalisée à l'occasion de la réunion ECIL3. Si un consensus apparaît pour souligner l'intérêt du galactomane, la détection d'ADN souffre toujours d'un manque de procédures communes qui ne permet pas son acceptation définitive⁴⁵. Rappelons que pour remédier à cette situation, nous participons au groupe européen EAPCRI (European Aspergillus PCR Initiative) qui propose des recommandations basées sur des contrôles de qualité organisés dans plusieurs pays européens⁴⁶. Nous participons également ponctuellement à la validation des marqueurs biologiques en collaboration avec certaines équipes demandant notre expertise⁴⁷.

⁴¹ Lortholary O, et al. ESCMID guideline for the diagnosis and management of *Candida* diseases 2012: patients with HIV infection or AIDS. *Clin. Microbiol. Infect.* 2012; 18 Suppl.7: 68

⁴² Skiada A et al. Diagnosis and treatment of mucormycosis in patients with haematological malignancies: guidelines from the 3rd European Conference on Infections in Leukemia (ECIL 3). *Haematologica*. 2012 ([Epub ahead of print] PMID: 22983580

⁴³ Singh N et al. Donor-Derived Fungal Infections in Organ Transplant Recipients: Guidelines of the American Society of Transplantation, Infectious Diseases Community of Practice. *Am. J. Transplant.* 2012 ; 12 : 2414

⁴⁴ Lamoth F et al. Beta-Glucan antigenemia assay for the diagnosis of invasive fungal infections in patients with hematological malignancies: a systematic review and meta-analysis of cohort studies from the Third European Conference on Infections in Leukemia (ECIL-3). *Clin. Infect. Dis.* 2012; 54:633

⁴⁵ Marchetti O et al. European Conference on Infections in Leukemia (ECIL) Laboratory Working Groups. ECIL recommendations for the use of biological markers for the diagnosis of invasive fungal diseases in leukemic patients and hematopoietic SCT recipients *Bone Marrow Transplant.* 2012 Jun;47:846.

⁴⁶ White PL et al. Evaluation of *Aspergillus* PCR protocols for testing serum specimens *J Clin Microbiol.* 2011;49:3842

⁴⁷ Saliba F et al. Outcomes associated with amphotericin B lipid complex (ABLC) prophylaxis in high-risk liver transplant patients. *Med Mycol.* 2013;51:155.

6.1.2. Travaux sur les techniques de détermination de la sensibilité aux antifongiques – Comité EUCAST-AFST.

Le CNRMA participe depuis la création de l'EUCAST aux travaux du groupe d'étude de la sensibilité des champignons aux antifongiques. En 2012, le comité a révisé le document EDef7.1 sur la méthode de détermination des CMI des levures en milieu liquide⁴⁸. Le dimethylsulphoxide est désormais le solvant recommandé pour l'étude de la caspofungine, de la micafungine et du fluconazole⁴⁹.

Le comité a également rédigé une note technique sur la proposition de valeurs critiques de l'amphotéricine B et de l'itraconazole et du posaconazole sur *Aspergillus* spp.⁵⁰.

6.1.3. Travaux originaux sur les Mucormycoses

En collaboration avec l'Institut de Veille Sanitaire, le CNRMA a rapporté en 2012 les données de l'étude française « Rétrozygo ». Il s'agissait de l'analyse exhaustive rétrospective des 101 cas français de mucormycose prouvée ou probable survenus entre 2005 et 2007. L'infection était plus fréquente chez l'homme et les trois facteurs de risque principaux étaient la présence d'une hémopathie maligne, suivie d'un diabète puis d'un traumatisme. *Rhizopus oryzae* était l'espèce prédominante (32% au total et 85% des localisations rhinocérébrales) suivie par *Lichtheimia* (29%). Le pronostic de cette infection dont on a montré antérieurement l'augmentation d'incidence en France reste sévère avec 56% de survie à 3 mois. La présence de deux facteurs de risque diminuait la survie⁵¹.

Une étude rétrospective a été menée dans les centres français de greffe de moelle osseuse et de cellules souches périphériques pour préciser les caractéristiques de 29 patients ayant développé une mucormycose entre 2003-2008 dans ce contexte. La mucormycose survenait en médiane 225 jours après l'allogreffe ; la survie globale était de 34% à 3 mois et de 17% à un an⁵².

Une analyse exhaustive de la littérature sur les mucormycoses liées aux soins a été réalisée incluant les 169 cas survenus entre 1970 et 2008. Les trois facteurs de risque principaux étaient une transplantation d'organe (24%), un diabète (22%) et une prématurité (21%). Deux sites inhabituels de cette infection étaient retrouvés de manière prédominante, la peau dans 57% des cas suivie du tube digestif (15%). Une épidémie ou des cas groupés étaient liés à des bandages adhésifs dans 19 cas et à un abaisse-langue dans 5 cas⁵³.

6.1.4. Travaux originaux sur *Candida* :

Nous avons rapporté l'expérience française sur l'acquisition de la résistance aux échinocandines chez les espèces de *Candida* spp. habituellement sensibles entre 2004-2010. Cet événement était rare (0,4% des épisodes) et concernait 20 patients. Pour 12/20 patients, nous avons pu analyser l'isolat initial (CMI basse, séquence sauvage du gène codant la glucane synthase) et ultérieur (après traitement par caspofungine, CMI élevée, mutation sur le gène glucane synthase) en démontrant leur identité génotypique. En cas de résistance à la caspofungine, une résistance était aussi observée à la micafungine et l'anidulafungine⁵⁴.

Nous avons décrit et étudié le pronostic de 24 patients atteints d'hémopathie maligne et développant une candidose hépatosplénique à Paris en 2000-2007. Aucun de ces patients n'avait reçu de prophylaxie antifongique et toutes les cultures fongiques étaient négatives alors que l'examen direct des prélèvements tissulaires était positif dans 25% des cas, renforçant notre hypothèse que ce tableau

⁴⁸ Arendrup MC et al. EUCAST technical note on the EUCAST definitive document EDef 7.2: method for the determination of broth dilution minimum inhibitory concentrations of antifungal agents for yeasts EDef 7.2 (EUCAST-AFST). Clin. Microbiol. Infect. 18:E246.

⁴⁹ Alastruey-Izquierdo A et al. Comparison of dimethyl sulfoxide and water as solvents for echinocandin susceptibility testing by the EUCAST methodology. J. Clin. Microbiol. 2012 ;50:2509

⁵⁰ Arendrup MC et al. EUCAST technical note on *Aspergillus* and amphotericin B, itraconazole, and posaconazole. Clin. Microbiol. Infect. 2012;18:E248.

⁵¹ Lanternier F et al. A global analysis of mucormycosis in France: the RetroZygo Study (2005-2007). Clin Infect Dis. 2012 Feb;54 Suppl 1:S35

⁵² Xhaard A et al. Mucormycosis after allogeneic haematopoietic stem cell transplantation: a French Multicentre Cohort Study (2003-2008). Clin. Infect. Dis. 2012; 18: E396

⁵³ Rammaert B et al. Healthcare-associated mucormycosis. Clin. Infect. Dis. 2012; 54 Suppl 1: S44

⁵⁴ Dannaoui E et al. *Candida* spp. with acquired echinocandin resistance, France, 2004-2010. Emerg. Infect. Dis. 2012; 18:86

s'inscrit dans le spectre des syndromes inflammatoires de reconstitution immunitaire d'origine fongique. L'analyse multivariée des causes de décès révélait que la durée de la neutropénie et la rechute de l'hétopathie étaient les facteurs indépendants de décès⁵⁵.

Nous participons également, en tant que groupe, à des études collaboratives internationales en mettant à disposition de chercheurs étrangers des isolats pour des projets spécifiques après accord des mycologues français⁵⁶.

6.1.5. Travaux sur la résistance d'*Aspergillus fumigatus* aux azolés

La résistance aux azolés d'*Aspergillus fumigatus* est de plus en plus rapportée en Europe et dans certaines parties du monde. Deux mécanismes sont invoqués à savoir le traitement au long cours de formes chroniques d'aspergilloses et l'inhalation de spores résistantes de l'environnement. Dans le premier cas, le risque est individuel et les études françaises auxquelles nous avons participé retrouvent une fréquence d'environ 8% chez les patients mucoviscidiques. Les typages que nous avons réalisés confirment que la sélection a bien eu lieu chez le patient⁵⁷. Plus inquiétant sur le plan épidémiologique est la dispersion de clones résistants sélectionnés par l'usage agricole de fongicides azolés. Le risque est d'avoir des aspergilloses invasives chez des patients immunodéprimés avec d'emblée des isolats résistants aux azoles. Nous avons cependant montré en 2011 une fréquence faible, loin des 6 % rapporté en Hollande⁵⁸. La surveillance microbiologique des isolats doit néanmoins être poursuivie car l'analyse des marqueurs microsatellites montre que la pression antifongique sélectionne chez le patient certains génotypes avec des CMI élevées aux azolés⁵⁹.

6.1.6. Diagnostic de la pneumocystose

La surveillance de la pneumocystose est incluse dans le nouveau cahier des charges du CNRMA. La difficulté du recensement réside dans les modifications des outils diagnostiques de ces dernières années. L'apparition de la PCR quantitative (qPCR) permet un diagnostic fiable, en éliminant virtuellement les faux positifs, et une quantification de la charge fongique. Si les fortes charges correspondent bien aux anciennes définitions de la pneumocystose avec microscopie positive, la plus forte sensibilité de la qPCR confirme la présence de *Pneumocystis jirovecii* dans des contextes cliniques moins caricaturaux que la pneumocystose du patient VIH. Le problème actuel est donc l'interprétation de la qPCR avec microscopie négative sachant que les patients non-VIH présentent des symptômes pulmonaires marqués avec des charges fongiques beaucoup plus faibles que les patients VIH positifs⁶⁰. L'étude de marqueurs sériques pourrait aider à mieux cerner les divergences⁶¹. Des groupes de travail pour aboutir à des définitions communes sont nécessaires.

6.1.7. Autres travaux sur des problématiques fongiques en lien avec le CNRMA

Nous avons participé à une étude de cohorte d'une journée analysant le bon usage des antifongiques dans 169 services de réanimation en France et en Belgique. Le résultat majeur de cette étude était que 7,5% des patients hospitalisés en réanimation recevaient un traitement antifongique (60% fluconazole et caspofungine 24%) parmi lesquels deux tiers n'avaient aucun critère d'infection fongique documentée. Ces résultats, joints aux résultats antérieurs du CNRMA, portant sur l'impact écologique

⁵⁵ De Castro N et al. Hepatosplenic candidiasis in the era of new antifungal drugs: a study in Paris 2000-2007. Clin. Microbiol. Infect. 2012; 18: E185

⁵⁶ Schmid J, ... and the French Mycoses Study Group. Increased Mortality in Young Candidemia Patients Associated with Presence of a *Candida albicans* General-Purpose Genotype. J. Clin. Microbiol. 2011 ; 49:3250-3256.

⁵⁷ Morio F et al. 2012. High prevalence of triazole resistance in *Aspergillus fumigatus*, especially mediated by TR/L98H, in a French cohort of patients with cystic fibrosis. J. Antimicrob. Chemother. 67:1870-1873.

⁵⁸ Alanio A et al. Low prevalence of resistance to azoles in *Aspergillus fumigatus* in a French cohort of patients treated for haematological malignancies. J. Antimicrob. Chemother. 2011 ; 66:371-374.

⁵⁹ Alanio A et al. Azole preexposure affects the *Aspergillus fumigatus* population in patients. Antimicrob. Agents Chemother. 2012 ; 56:4948-4950.

⁶⁰ Botterel F et al. Clinical Significance of Quantifying *Pneumocystis jirovecii* DNA by Using Real-Time PCR in Bronchoalveolar Lavage Fluid from Immunocompromised Patients. J. Clin. Microbiol. 2012 ; 50:227

⁶¹ Costa JM et al. Association Between Circulating DNA, Serum (1->3)-D-Glucan, and Pulmonary Fungal Burden in *Pneumocystis* Pneumonia. Clin. Infect. Dis. 2012 ; 55:e5-e8.

du fluconazole et de la caspofungine renforcent l'importance du bon usage des antifongiques en réanimation⁶².

A la suite de la publication du protocole d'étude du voriconazole dans l'aspergillose invasive, nous avons participé à une analyse de l'évolution du galactomannane sérique comme facteur prédictif du pronostic de l'aspergillose invasive. Une réduction de plus de 35% de l'index du galactomannane sérique entre le jour du diagnostic et J7 était prédictive d'une réponse clinique satisfaisante⁶³.

Enfin, nous avons mené une analyse rétrospective des cas de cryptococcose survenant au cours de l'infection par le VIH en collaboration avec l'hôpital universitaire de Bobo-Dioulasso en montrant le déclin parallèle des nouveaux cas de cryptococcose avec l'augmentation très importante des patients sévèrement immunodéprimés rentrant dans un programme d'antirétroviraux⁶⁴.

6.2. Les publications et communications réalisées ou prévues en lien avec les activités du CNR

Publications dans des journaux à comité de lecture

1. Alanio A, Cabaret O, Sitterle E, Costa JM, Brisse S, Cordonnier C, Bretagne S, Azole preexposure affects the *Aspergillus fumigatus* population in patients. *Antimicrob Agents Chemother.* 2012; 56:4948.
2. Azoulay E, Dupont H, Tabah A, Lortholary O, Stahl JP, Francois A, Martin C, Guidet B, Timsit JF, Systemic antifungal therapy in critically ill patients without invasive fungal infection*. *Crit Care Med.* 2012; 40:813.
3. Arendrup MC, Cuenca-Estrella M, Lass-Flörl C, Hope W, EUCAST-AFST. EUCAST technical note on the EUCAST definitive document EDef 7.2: method for the determination of broth dilution minimum inhibitory concentrations of antifungal agents for yeasts EDef 7.2 (EUCAST-AFST). *Clin. Microbiol. Infect.* 2012;18:E246.
4. Arendrup MC, Cuenca-Estrella M, Lass-Flörl C, Hope WW, European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing Subcommittee on Antifungal Susceptibility Testing (EUCAST-AFST). EUCAST technical note on *Aspergillus* and amphotericin B, itraconazole, and posaconazole. *Clin. Microbiol. Infect.* 2012;18:E248.
5. Bamba S, Lortholary O, Sawadogo A, Millogo A, Guiguemde RT, Bretagne S, Decreasing incidence of cryptococcal meningitis in West Africa in the era of highly active antiretroviral therapy. *AIDS.* 2012; 26:1039.
6. Botterel F, Cabaret O, Foulet F, Cordonnier C, Costa JM, Bretagne S, Clinical significance of quantifying *Pneumocystis jirovecii* DNA by using real-time PCR in bronchoalveolar lavage fluid from immunocompromised patients. *J Clin Microbiol.* 2012; 50:227.
7. Brunel AS, Reynes J, Tuailon E, Rubbo PA, Lortholary O, Montes B, Le Moing V, Makinson A, Thalidomide for steroid-dependent immune reconstitution inflammatory syndromes during AIDS. *AIDS.* 2012; 26:2110.
8. Chai LY, Kullberg BJ, Johnson EM, Teerenstra S, Khin LW, Vonk AG, Maertens J, Lortholary O, Donnelly PJ, Schlamm HT, Troke PF, Netea MG, Herbrecht R, Early serum galactomannan trend as a predictor of outcome of invasive aspergillosis. *J Clin Microbiol.* 2012; 50:2330.
9. Cornely OA, Bassetti M, Calandra T, Garbino J, Kullberg BJ, Lortholary O, Meersseman W, Akova M, Arendrup MC, Arian-Akdagli S, Bille J, Castagnola E, Cuenca-Estrella M, Donnelly JP, Groll AH, Herbrecht R, Hope WW, Jensen HE, Lass-Flörl C, Petrikos G, Richardson MD, Roilides E, Verweij PE, Viscoli C, Ullmann AJ, ESCMID* guideline for the diagnosis and management of *Candida* diseases 2012: non-neutropenic adult patients. *Clin Microbiol Infect.* 2012; 18 Suppl 7:19.

⁶² Azoulay E et al. Systemic antifungal therapy in critically ill patients without invasive fungal infection*. *Critical Care Med* 2012 ; 40:813

⁶³ Chai LY et al. Early serum galactomannan trend as a predictor of outcome of invasive aspergillosis. *J. Clin. Microbiol.* 2012; 50:2330

⁶⁴ Bamba S et al. Decreasing incidence of cryptococcal meningitis in West Africa in the era of highly active antiretroviral therapy. *AIDS* 2012; 26:1039

10. Costa JM, Botterel F, Cabaret O, Foulet F, Cordonnier C, Bretagne S, Association between circulating DNA, serum (1->3)-beta-D-glucan, and pulmonary fungal burden in Pneumocystis pneumonia. *Clin Infect Dis*. 2012; 55:e5.
11. Cuenca-Estrella M, Verweij PE, Arendrup MC, Arikan-Akdagli S, Bille J, Donnelly JP, Jensen HE, Lass-Florl C, Richardson MD, Akova M, Bassetti M, Calandra T, Castagnola E, Cornely OA, Garbino J, Groll AH, Herbrecht R, Hope WW, Kullberg BJ, Lortholary O, Meersseman W, Petrikos G, Roilides E, Viscoli C, Ullmann AJ, ESCMID* guideline for the diagnosis and management of Candida diseases 2012: diagnostic procedures. *Clin Microbiol Infect*. 2012; 18 Suppl 7:9.
12. Dannaoui E, Desnos-Ollivier M, Garcia-Hermoso D, Grenouillet F, Cassaing S, Baixench MT, Bretagne S, Dromer F, Lortholary O, Candida spp. with acquired echinocandin resistance, France, 2004-2010. *Emerg Infect Dis*. 2012; 18:86.
13. De Castro N, Mazoyer E, Porcher R, Raffoux E, Suarez F, Ribaud P, Lortholary O, Molina JM, Hepatosplenic candidiasis in the era of new antifungal drugs: a study in Paris 2000-2007. *Clin Microbiol Infect*. 2012; 18:E185.
14. Desnos-Ollivier M, Robert V, Raoux-Barbot D, Groenewald M, Dromer F, Antifungal susceptibility profiles of 1698 yeast reference strains revealing potential emerging human pathogens. *PLoS One*. 2012; 7:e32278.
15. Fauvel M, Farrugia C, Tsapis N, Gueutin C, Cabaret O, Bories C, Bretagne S, Barratt G, Aerosolized liposomal amphotericin B: prediction of lung deposition, in vitro uptake and cytotoxicity. *Int J Pharm*. 2012; 436:106.
16. Hope WW, Castagnola E, Groll AH, Roilides E, Akova M, Arendrup MC, Arikan-Akdagli S, Bassetti M, Bille J, Cornely OA, Cuenca-Estrella M, Donnelly JP, Garbino J, Herbrecht R, Jensen HE, Kullberg BJ, Lass-Florl C, Lortholary O, Meersseman W, Petrikos G, Richardson MD, Verweij PE, Viscoli C, Ullmann AJ, ESCMID* guideline for the diagnosis and management of Candida diseases 2012: prevention and management of invasive infections in neonates and children caused by Candida spp. *Clin Microbiol Infect*. 2012; 18 Suppl 7:38.
17. Lamoth F, Cruciani M, Mengoli C, Castagnola E, Lortholary O, Richardson M, Marchetti O, beta-Glucan antigenemia assay for the diagnosis of invasive fungal infections in patients with hematological malignancies: a systematic review and meta-analysis of cohort studies from the Third European Conference on Infections in Leukemia (ECIL-3). *Clin Infect Dis*. 2012; 54:633.
18. Lanternier F, Dannaoui E, Morizot G, Elie C, Garcia-Hermoso D, Huerre M, Bitar D, Dromer F, Lortholary O, A global analysis of mucormycosis in France: the RetroZygo Study (2005-2007). *Clin Infect Dis*. 2012; 54 Suppl 1:S35.
19. Lanternier F, Sun HY, Ribaud P, Singh N, Kontoyiannis DP, Lortholary O, Mucormycosis in organ and stem cell transplant recipients. *Clin Infect Dis*. 2012; 54:1629.
20. Lefort A, Chartier L, Sendid B, Wolff M, Mainardi JL, Podglajen I, Desnos-Ollivier M, Fontanet A, Bretagne S, Lortholary O, Diagnosis, management and outcome of Candida endocarditis. *Clin Microbiol Infect*. 2012; 18:E99.
21. Lewis RE, Lortholary O, Spellberg B, Roilides E, Kontoyiannis DP, Walsh TJ, How does antifungal pharmacology differ for mucormycosis versus aspergillosis? *Clin Infect Dis*. 2012; 54 Suppl 1:S67.
22. Li W, Averette AF, Desnos-Ollivier M, Ni M, Dromer F, Heitman J, Genetic Diversity and Genomic Plasticity of Cryptococcus neoformans AD Hybrid Strains. *G3 (Bethesda)*. 2012; 2:83.
23. Lortholary O, Petrikos G, Akova M, Arendrup MC, Arikan-Akdagli S, Bassetti M, Bille J, Calandra T, Castagnola E, Cornely OA, Cuenca-Estrella M, Donnelly JP, Garbino J, Groll AH, Herbrecht R, Hope WW, Jensen HE, Kullberg BJ, Lass-Florl C, Meersseman W, Richardson MD, Roilides E, Verweij PE, Viscoli C, Ullmann AJ, ESCMID* guideline for the diagnosis and management of Candida diseases 2012: patients with HIV infection or AIDS. *Clin Microbiol Infect*. 2012; 18 Suppl 7:68.
24. Marchetti O, Lamoth F, Mikulska M, Viscoli C, Verweij P, Bretagne S, ECIL recommendations for the use of biological markers for the diagnosis of invasive fungal diseases in leukemic patients and hematopoietic SCT recipients. *Bone Marrow Transplant*. 2012; 47:846.
25. Morio F, Aubin GG, Danner-Boucher I, Haloun A, Sacchetto E, Garcia-Hermoso D, Bretagne S, Miegville M, Le Pape P, High prevalence of triazole resistance in Aspergillus fumigatus,

especially mediated by TR/L98H, in a French cohort of patients with cystic fibrosis. *J Antimicrob Chemother.* 2012; 67:1870.

26. Morio F, Berre JY, Garcia-Hermoso D, Najafzadeh MJ, de Hoog S, Benard L, Michau C, Phaeohyphomycosis due to *Exophiala xenobiotica* as a cause of fungal arthritis in an HIV-infected patient. *Med Mycol.* 2012; 50:513.
27. Parize P, Rammaert B, Lortholary O, Emerging invasive fungal diseases in transplantation. *Curr Infect Dis Rep.* 2012; 14:668.
28. Planche V, Ducroz S, Alanio A, Bougnoux ME, Lortholary O, Dannaoui E, In vitro combination of anidulafungin and voriconazole against intrinsically azole-susceptible and -resistant *Aspergillus* spp. *Antimicrob Agents Chemother.* 2012; 56:4500.
29. Rammaert B, Aguilar C, Bougnoux ME, Noel N, Charlier C, Denis B, Lecuit M, Lortholary O, Success of posaconazole therapy in a heart transplanted patient with *Alternaria infectoria* cutaneous infection. *Med Mycol.* 2012; 50:518.
30. Rammaert B, Desjardins A, Lortholary O, New insights into hepatosplenic candidosis, a manifestation of chronic disseminated candidosis. *Mycoses.* 2012; 55:e74.
31. Rammaert B, Lanternier F, Poiree S, Kania R, Lortholary O, Diabetes and mucormycosis: a complex interplay. *Diabetes Metab.* 2012; 38:193.
32. Rammaert B, Lanternier F, Zahar JR, Dannaoui E, Bougnoux ME, Lecuit M, Lortholary O, Healthcare-associated mucormycosis. *Clin Infect Dis.* 2012; 54 Suppl 1:S44.
33. Riviere S, Denis B, Bougnoux ME, Lanternier F, Lecuit M, Lortholary O, Serum *Aspergillus* galactomannan for the management of disseminated histoplasmosis in AIDS. *Am J Trop Med Hyg.* 2012; 87:303.
34. Salas V, Pastor FJ, Calvo E, Sutton D, Garcia-Hermoso D, Mayayo E, Dromer F, Fothergill A, Alvarez E, Guarro J, Experimental murine model of disseminated infection by *Saksenaia vasiformis*: successful treatment with posaconazole. *Med Mycol.* 2012; 50:710.
35. Skiada A, Lanternier F, Groll AH, Pagano L, Zimmerli S, Herbrecht R, Lortholary O, Petrikos GL, Diagnosis and treatment of mucormycosis in patients with haematological malignancies: guidelines from the 3rd European Conference on Infections in Leukemia (ECIL 3). *Haematologica.* 2012.
36. Spellberg B, Ibrahim A, Roilides E, Lewis RE, Lortholary O, Petrikos G, Kontoyiannis DP, Walsh TJ, Combination therapy for mucormycosis: why, what, and how? *Clin Infect Dis.* 2012; 54 Suppl 1:S73.
37. Ullmann AJ, Akova M, Herbrecht R, Viscoli C, Arendrup MC, Arikian-Akdagli S, Bassetti M, Bille J, Calandra T, Castagnola E, Cornely OA, Donnelly JP, Garbino J, Groll AH, Hope WW, Jensen HE, Kullberg BJ, Lass-Flörl C, Lortholary O, Meersseman W, Petrikos G, Richardson MD, Roilides E, Verweij PE, Cuenca-Estrella M, ESCMID* guideline for the diagnosis and management of *Candida* diseases 2012: adults with haematological malignancies and after haematopoietic stem cell transplantation (HCT). *Clin Microbiol Infect.* 2012; 18 Suppl 7:53.
38. Xhaard A, Lanternier F, Porcher R, Dannaoui E, Bergeron A, Clement L, Lacroix C, Herbrecht R, Legrand F, Mohty M, Michallet M, Cordonnier C, Malak S, Guyotat D, Couderc LJ, Socie G, Milpied N, Lortholary O, Ribaud P, Mucormycosis after allogeneic haematopoietic stem cell transplantation: a French Multicentre Cohort Study (2003-2008). *Clin Microbiol Infect.* 2012; 18:E396.

Chapitre de livres ou publications autres

1. Dromer F, Lortholary O, in Hunter's Tropical Medicine 9e, Alan Magill, JM, Ed Ryan, Tom Solomon, Ed. Elsevier, 2012.
2. Bitar D, Morizot G, Van Cauteren D, Dannaoui E, Lanternier F, Lortholary O, Dromer F, Estimating the burden of mucormycosis infections in France (2005-2007) through a capture-recapture method on laboratory and administrative data. *Rev Epidemiol Sante Publique.* 2012; 60:383.
3. Desjardins A, Coignard-Biehler H, Mahlaoui N, Frange P, Bougnoux ME, Blanche S, Fischer A, Blumental S, Lortholary O, [Chronic granulomatous disease: pathogenesis and therapy of associated fungal infections]. *Med Sci (Paris).* 2012; 28:963.

7. PROGRAMME D'ACTIVITÉ N+1 ET N+2

Le programme d'activité du CNRMA est en continuité avec celui de l'année qui vient de s'écouler. Les techniques d'identification et de typage seront développées en fonction des isolats envoyés et des questions qui se poseront (épidémie, cas groupés, nouveau pathogène). Notre principal projet est de terminer 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.

8. ANNEXES

Liste des CC-CNRMA formant RESSIF

CHU d'Amiens représenté par le Dr. Taieb Chouaki
CHU de Besançon représenté par le Pr. Laurence Million
CHU de Martinique représenté par le Dr. Nicole Desbois
CHU de Nancy représenté par le Dr. Marie Machouart
CHU de Nantes représenté par le Dr. Florent Morio
CHU de Nice représenté par le Dr. Martine Gari-Toussaint
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 Kauffman-Lacroix
CHU de Rennes représenté par le Pr. Jean-Pierre Gangneux
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 Chandénier
CHU d'Angers représenté par le Dr. Marc Pihet
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
CH d'Orléans représenté par le Dr. Didier Poisson
Hôpital des Quinze-Vingt représenté par le Dr. Christine Chaumeil
CHU de Reims représenté par le Dr. Dominique Toubas
CHU de Rouen représenté par le Pr. Loïc Favennec
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 Béclère
Clermont-Ferrand, Laboratoire de Bactériologie-Virologie, Centre Hospitalier
Clichy, Laboratoire de Microbiologie, Hôpital Beaujon
Colmar, Laboratoire de Microbiologie, CHG Louis Pasteur
Colombes, Unité de Parasitologie-Mycologie, Hôpital Louis Mourier
Corbeil-Essonnes, Laboratoire de Microbiologie, Centre Hospitalier
Coulommiers, Laboratoire de Biologie, Centre Hospitalier René 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
 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 Boulloche
 Montfermeil, Laboratoire de Biologie, Centre Hospitalier
 Montpellier, Laboratoire de Parasitologie-Mycologie, CHU – Institut Botanique
 Montreuil, Laboratoire de Biologie Médicale, Centre Hospitalier Intercommunal
 Mulhouse, Laboratoire de Biologie Médicale, Hôpital Emile Muller
 Nancy, Laboratoire de Mycologie Médicale, CHR Hôpital Fournier
 Nantes, Laboratoire de Parasitologie-Mycologie, CHRU Hôtel-Dieu
 Neuilly, Laboratoire de Bactériologie, Hôpital Américain
 Nevers, Laboratoire de Bactériologie-Immunologie, Centre Hospitalier
 Nice, Laboratoire de Parasitologie-Mycologie, Centre Hospitalier de l'Archet
 Nîmes, Laboratoire de Bactério-Parasitologie, Centre Hospitalier Universitaire
 Niort, Laboratoire de Biologie Médicale, Centre Hospitalier
 Orléans, Laboratoire de Biologie Médicale, Centre Hospitalier Régional
 Paris 5, Laboratoire de Microbiologie, Institut Curie
 Paris 10, Laboratoire de Bactériologie, Groupe Hospitalier Lariboisière – Fernand Widal
 Paris 10, Laboratoire de Parasitologie-Microbiologie, Hôpital Saint-Louis
 Paris 12, Laboratoire de Biologie Médicale, Hôpital des Quinze-Vingts
 Paris 12, Laboratoire de Microbiologie, Hôpital Trousseau
 Paris 14, Laboratoire de Biologie Médicale, Institut Mutualiste Montsouris
 Paris 14, Laboratoire de Parasitologie-Mycologie, Groupe Hospitalier Cochin Port-Royal
 Paris 18, Laboratoire de Parasitologie-Mycologie, CHU Bichat-Claude-Bernard
 Paris 19, Service de Bactériologie, Hôpital Robert Debré
 Pau, Laboratoire de Bactériologie, Centre Hospitalier Général
 Perpignan, Laboratoire de Biologie Médicale, CHG Maréchal Joffre
 Poissy, Laboratoire de Biologie Médicale, Centre Hospitalier Intercommunal
 Poitiers, Laboratoire de Parasito-Mycologie et Sérologie, CHRU de la Milétrie
 Pontoise, Laboratoire de Bactériologie, Centre Hospitalier René Dubos
 Provins, Laboratoire de Biologie M. Maugerie, Centre Hospitalier Léon Binet
 Reims, Laboratoire de Parasitologie-Mycologie, CHRU Hôpital Maison Blanche
 Rennes, Laboratoire de Parasitologie-Mycologie, CHU Hôpital de Pontchaillou
 Roanne, Laboratoire de Séro-Hémato-Bactériologie, Centre Hospitalier Général
 Rodez, Laboratoire de Biologie Médicale, Centre Hospitalier
 Rouen, Laboratoire de Parasitologie-Mycologie, Hôpital Charles-Nicolle
 Saint-Cloud, Laboratoire de Biologie Médicale, Centre Hospitalier
 Saint-Denis, Laboratoire de Microbiologie-Sérologie-Parasitologie, Centre Hospitalier Général
 Saint-Etienne, Laboratoire de Parasitologie-Mycologie, CHU Hôpital Nord
 Saint-Germain-en-Laye, Laboratoire de Biologie Médicale, Centre Hospitalier Général
 Saint-Julien-en-Genevois, Laboratoire de Biologie Médicale, Centre Hospitalier
 Saint-Mandé, Laboratoire de Biologie Médicale, HIA Begin
 Saint-Maurice, Laboratoire de Biologie Médicale, Hôpital National
 Saint-Nazaire, Laboratoire de Biologie Médicale, Centre Hospitalier Général
 Sens, Laboratoire de Biologie Médicale, Centre Hospitalier
 Strasbourg, Laboratoire de Biochimie, CHRU Hôpital de Haute-pierre
 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