



**Rapport annuel  
d'activité**

**2020**

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

**Responsables**

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

**Collaborateurs**

Dr. Alexandre Alanio, médecin mycologue  
Mme Reine Bouyssic, assistante  
Mme Marie Desnos-Ollivier, ingénieur  
Mme Dea Garcia-Hermoso, ingénieur  
Mme Cécile Gautier, technicienne  
Mme Virginie Geolier, technicienne  
Pr. Fanny Lanternier, médecin clinicien  
Dr. Karine Silbon, médecin d'études cliniques

**Année d'exercice  
2019**

100  $\mu\text{m}$

## TABLE DES MATIERES

<b>1 RESUME ANALYTIQUE.....</b>	<b>1</b>
<b>2 SUMMARY .....</b>	<b>2</b>
<b>3 MISSIONS ET ORGANISATION DU CNR.....</b>	<b>3</b>
<b>4 ACTIVITES D'EXPERTISE.....</b>	<b>3</b>
4.1 ÉVOLUTIONS DES TECHNIQUES.....	3
4.2 TRAVAUX D'ÉVALUATION DES TECHNIQUES, REACTIFS ET TROUSSES .....	4
4.3 TECHNIQUES TRANSFEREES VERS D'AUTRES LABORATOIRES.....	4
4.4 COLLECTIONS DE MATERIEL BIOLOGIQUE .....	4
4.5 ACTIVITES D'EXPERTISE.....	5
4.5.1 Expertise 2019 sur les levures .....	6
4.5.2 Expertise 2019 sur les champignons filamenteux.....	10
4.5.3 Expertise 2019 sur la sensibilité aux antifongiques .....	14
4.5.4 Expertise 2019 sur les mycoses endémiques.....	16
4.5.5 Expertise 2019 en anatomopathologie .....	16
4.5.6 Expertise 2019 pour les diagnostics moléculaires.....	17
4.5.7 Activités de séquençage.....	18
<b>5 ACTIVITES DE SURVEILLANCE.....</b>	<b>19</b>
5.1 DESCRIPTION DU RESEAU DE PARTENAIRES.....	19
5.2 SURVEILLANCE DE L'ÉVOLUTION ET DES CARACTERISTIQUES DES INFECTIONS.....	21
5.2.1 <i>Cryptococcoses</i> .....	22
5.2.2 <i>Fongémies</i> .....	23
5.2.3 <i>Pneumocystoses</i> .....	24
5.2.4 <i>Mucormycoses</i> .....	25
5.2.5 <i>Aspergilloses</i> .....	26
5.2.6 <i>Fusarioses</i> .....	28
5.3 SURVEILLANCE DE LA RESISTANCE DES AGENTS PATHOGENES AUX ANTI-INFECTIEUX.....	28
5.3.1 Définitions utilisées pour exprimer la résistance .....	29
5.3.2 Résultats de la surveillance des résistances aux antifongiques pour les levures.....	30
5.3.3 Résultats de la surveillance des résistances aux antifongiques pour les filamenteux.....	32
5.3.4 Analyse des tendances .....	36
5.4 INTERFACES AVEC LES RESEAUX DE SURVEILLANCE NATIONAUX OU INTERNATIONAUX.....	38
5.5 ENQUETES OU ETUDES PONCTUELLES CONCOURANT A LA SURVEILLANCE .....	38
5.5.1 Cas groupés d'infection à <i>Saprochaete clavata</i> .....	38
5.5.2 Colonisation à <i>Candida auris</i> .....	39
5.5.3 Cas groupés de pneumocystose chez des patients transplantés de rein.....	40
<b>6 ALERTES.....</b>	<b>40</b>
<b>7 ACTIVITES DE RETRO-INFORMATION, DE FORMATION ET DE CONSEIL.....</b>	<b>41</b>
7.1 CONSEIL ET EXPERTISE AUX PROFESSIONNELS DE SANTE .....	41
7.2 CONSEIL ET EXPERTISE AUX AUTORITES SANITAIRES .....	41
7.2.1 Au plan national .....	41
7.2.2 Au plan international.....	42
7.3 ACTIVITE DE FORMATION .....	43
<b>8 TRAVAUX DE RECHERCHE ET PUBLICATIONS.....</b>	<b>43</b>
8.1 ACTIVITES DE RECHERCHE EN LIEN DIRECT AVEC LES MISSIONS ET ACTIVITES DU CNR .....	43
8.1.1 Diagnostic de la pneumocystose.....	43
8.1.2 Travaux sur l'aspergillose invasive .....	43
8.1.3 Travaux sur la cryptococcose.....	44
8.2 PUBLICATIONS ET COMMUNICATIONS EN LIEN DIRECT AVEC LES MISSIONS/ACTIVITES DU CNR.....	44
8.2.1 Publications 2019.....	44
8.2.2 Publications 2020.....	47
8.2.3 Communications nationales.....	49
8.2.4 Communications internationales .....	49
8.2.5 Séminaires sur invitations .....	49

<b>9 COOPERATION AVEC LES LABORATOIRES DE SANTE ANIMALE, D'HYGIENE ALIMENTAIRE, ENVIRONNEMENTAUX.....</b>	<b>50</b>
<b>10 PROGRAMME D'ACTIVITE POUR LES ANNEES SUIVANTES.....</b>	<b>50</b>
10.1 EXPERTISE MICROBIOLOGIQUE.....	50
10.1.1 Analyse de la cohérence des seuils de détection de la résistance aux échinocandines .....	50
10.1.2 Description des profils de sensibilité aux antifongiques des espèces rares.....	50
10.1.3 Poursuite du développement des techniques d'identification et de typage .....	50
10.1.4 Poursuite du développement de méthodes diagnostiques par qPCR pour le diagnostic des infections à champignons dimorphiques.....	50
10.1.5 Harmonisation du diagnostic de la pneumocystose et des attitudes thérapeutiques .....	51
10.1.6 Analyse des génotypes circulants de <i>Pneumocystis jirovecii</i> chez les transplantés rénaux français.....	52
10.2 SURVEILLANCE MICROBIOLOGIQUE ET EPIDEMIOLOGIQUE .....	52
10.2.1 Analyse des IFI diagnostiquées en France (2012-2018) .....	52
10.2.2 Analyse des infections fongiques compliquant les infections COVID-19 sévères en réanimation .....	52
10.2.3 Poursuite des études collaboratives avec les cliniciens et mycologues de RESSIF.....	52
<b>11 LISTE DES COLLABORATEURS DU CNRMA .....</b>	<b>53</b>
11.1 CC-CNRMA FORMANT RESSIF.....	53
11.2 CENTRES PARTICIPANTS A L'ODL.....	53
11.3 PARTICIPANTS A LA SURVEILLANCE DES MYCOSES INVASIVES EN 2019 .....	54
<b>12 ANNEXE 1 : MISSIONS &amp; ORGANISATION DU CNR.....</b>	<b>55</b>
12.1 MISSIONS DU CNR ET DE SES EVENTUELS LABORATOIRES ASSOCIES .....	55
12.2 ORGANISATION DU CNR .....	55
12.3 LOCAUX ET EQUIPEMENTS.....	56
12.4 COLLECTIONS DE MATERIEL BIOLOGIQUE .....	57
12.4.1 Collection de levures .....	58
12.4.2 Collection de champignons filamenteux .....	59
12.4.3 Collection d'images numériques .....	59
12.4.4 Collection d'ADN génomique .....	59
12.4.5 Base de données de séquences : Institut Pasteur FungiBank .....	60
12.4.6 Collection de sérums .....	60
12.5 DEMARCHE QUALITE DU LABORATOIRE .....	60
12.6 ASPECTS REGLEMENTAIRES.....	61
<b>13 ANNEXE 2 : CAPACITES TECHNIQUES DU CNR.....</b>	<b>62</b>
13.1 LISTE DES TECHNIQUES DE REFERENCE .....	62
13.1.1 Techniques pour le diagnostic, l'identification et l'évaluation de la sensibilité aux antifongiques .....	62
13.1.2 Techniques mises en place en 2019.....	63
13.2 LISTE DES MARQUEURS EPIDEMIOLOGIQUES DISPONIBLES .....	63
13.3 LISTE DES TECHNIQUES RECOMMANDEES PAR LE CNR .....	63
13.3.1 Identification des champignons .....	64
13.3.2 Diagnostic des mycoses endémiques .....	64
13.3.3 Détermination de la sensibilité aux antifongiques des isolats de champignons pathogènes.....	65
13.3.4 Désinfection des surfaces .....	65

## LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Résumé de l'activité d'expertise en 2019.....	5
Tableau 2 : Dénominations taxonomiques pour les levures.....	7
Tableau 3 : Dénominations taxonomiques pour les champignons filamenteux.....	10
Tableau 4 : Mutations dans le gène <i>Cyp51A</i> d' <i>Aspergillus fumigatus</i> .....	16
Tableau 5 : Principales caractéristiques des fongémies.....	24
Tableau 6 : Caractéristiques des pneumocytoses répertoriées dans RESSIF.....	25
Tableau 7 : Caractéristiques des mucormycoses répertoriées dans RESSIF.....	25
Tableau 8 : Seuils cliniques EUCAST pour <i>Candida</i> and <i>Cryptococcus</i> spp.....	29
Tableau 9 : Seuils cliniques EUCAST pour <i>Aspergillus</i> spp.....	30
Tableau 10 : Profil de sensibilité des levures aux antifongiques.....	31
Tableau 11 : Profil de sensibilité des levures à 4 azolés, dont l'isavuconazole.....	32
Tableau 12 : Profil de sensibilité des champignons filamenteux aux antifongiques.....	33
Tableau 13 : Profil de sensibilité des filamenteux à 4 azolés, dont l'isavuconazole.....	35
Tableau 14 : Proportion d'isolats de levures "résistants" selon les seuils EUCAST.....	36
Tableau 15 : Profil de sensibilité des souches de <i>C. auris</i> reçues au CNRMA.....	40
Tableau 16 : Composition de l'équipe du CNRMA.....	55
Tableau 17 : Liste des couples d'amorces utilisés en fonction des genres étudiés.....	64

## LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Organigramme fonctionnel du CNRMA.....	3
Figure 2 : Analyse des isolats cliniques et des souches type du complexe <i>K. telluris</i> .....	9
Figure 3 : Analyse d'une souche clinique et des souches type du complexe <i>H. guilliermondii</i> .....	10
Figure 4 : Morphologies caractéristiques (1).....	12
Figure 5 : Morphologies caractéristiques (2).....	12
Figure 6 : Morphologies caractéristiques (3).....	13
Figure 7 : Morphologies caractéristiques (4).....	13
Figure 8 : Morphologies caractéristiques (5).....	14
Figure 9 : Schéma du gène <i>Cyp51A</i> d' <i>A. fumigatus</i> et principales mutations.....	15
Figure 10 : Sélection d'expertises anatomopathologiques.....	17
Figure 11 : Répartition des déclarations à travers le portail dédié (MAJ mars 2020).....	20
Figure 12 : Répartition des principales IFI répertoriées dans RESSIF.....	21
Figure 13 : Mortalité globale à 3 mois en fonction des IFI diagnostiquée.....	22
Figure 14 : Évolution des cryptococcoses déclarées en France (1985-2018).....	22
Figure 15 : Caractéristiques des patients atteints de cryptococcose en France.....	23
Figure 16 : Mortalité à 3 mois au cours de la cryptococcose.....	23
Figure 17 : Répartition des 6 principales de <i>Mucorales</i> en fonction du terrain.....	26
Figure 18 : Éléments contribuant au diagnostic de l'aspergillose invasive.....	27
Figure 19 : Pathologies sous-jacentes selon l'espèce d' <i>Aspergillus</i> impliquée.....	27
Figure 20 : Evolution du pourcentage d'isolats "résistants".....	37
Figure 21 : Evolution du clone R-5FC de <i>Candida tropicalis</i> .....	37
Figure 22 : Analyse des isolats de <i>S. clavata</i> responsables de cas groupés en 2019.....	38
Figure 23 : Représentation schématique des génotypes de <i>C. auris</i> selon l'origine géographique.....	39
Figure 24 : Locaux du CNRMA.....	56
Figure 25 : Portail de la base de données de séquences Institut Pasteur FungiBank.....	60

## 1 Résumé analytique

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

En 2019, le CNRMA a fourni son expertise biologique pour 812 isolats (levures, filamenteux, champignons dimorphiques) et 717 échantillons biologiques (liquides, tissus), et son expertise clinique pour 3 à 5 avis/jour. Pour les isolats, nous avons effectué l'identification par approche polyphasique et la détermination de la sensibilité à huit antifongiques selon la méthode EUCAST. Les nouvelles identifications et la veille taxonomique permettent au CNRMA d'alimenter et de mettre à jour la base de séquences « Institut Pasteur FungiBank ». Des diagnostics moléculaires (n=659) ou anatomopathologiques (n=58) ont été réalisés sur les liquides biologiques ou tissus.

Le CNRMA a mis en place en 2012 le réseau de centres collaborateurs du CNRMA (les CC-CNRMA) et l'a agrandi en 2017. Les 29 CC-CNRMA forment le RESeau de Surveillance des Infections Fongiques invasives (RESSIF). RESSIF collecte, de façon active et pérenne, toutes les informations sur les infections fongiques invasives probables ou prouvées et les isolats correspondants des espèces non communes et, pour les espèces communes, les isolats de sensibilité diminuée à au moins un antifongique. L'Observatoire des Levures (ODL) mis en place en 2002 en région parisienne surveille de façon plus spécifique les fongémies à levures et collecte tous les isolats pour les caractériser de façon standardisée. Le site de déclaration en ligne a été remodelé et permet maintenant à tout clinicien ou mycologue qui le souhaite de participer à la surveillance indépendamment des réseaux de surveillance active (RESSIF ou ODL). La base RESSIF comprend actuellement 12353 cas d'infections fongiques invasives, et représente une base unique au plan international que nous avons commencé à « nettoyer » pour analyser les 7 premières années.

Le CNRMA continue à investiguer les cas groupés d'infections dues à des espèces rares en utilisant le séquençage de génomes entiers grâce à la plateforme mise en place à l'Institut Pasteur. L'utilisation d'un panel de souches comprenant la souche type de l'espèce et des isolats épidémiologiquement liés ou non, et de souches historiques de sa collection a permis notamment d'affirmer l'origine environnementale dans des cas d'infection invasive à *Saprochaete clavata* dans un même centre hospitalier en 2019. Nous avons également été impliqués pour confirmer l'identification de *Candida auris* et génotyper les trois isolats concernés, ainsi que dans l'investigation de cas groupés de pneumocystoses chez des transplantations de rein.

## 2 Summary

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

In 2019, the NRCMA performed expertise on 812 isolates (characterization) and 717 biological specimen or tissues (molecular or histopathological diagnoses), and provided 3 to 5 daily therapeutic advice. The expertise on the isolates included identification by polyphasic approach (morphology, MALDI-TOF and DNA sequencing of multiple loci) and susceptibility to eight antifungal drugs by the EUCAST method. Nucleotide sequences obtained from newly identified isolates are uploaded in the Institut Pasteur FungiBank database that we launched in 2015.

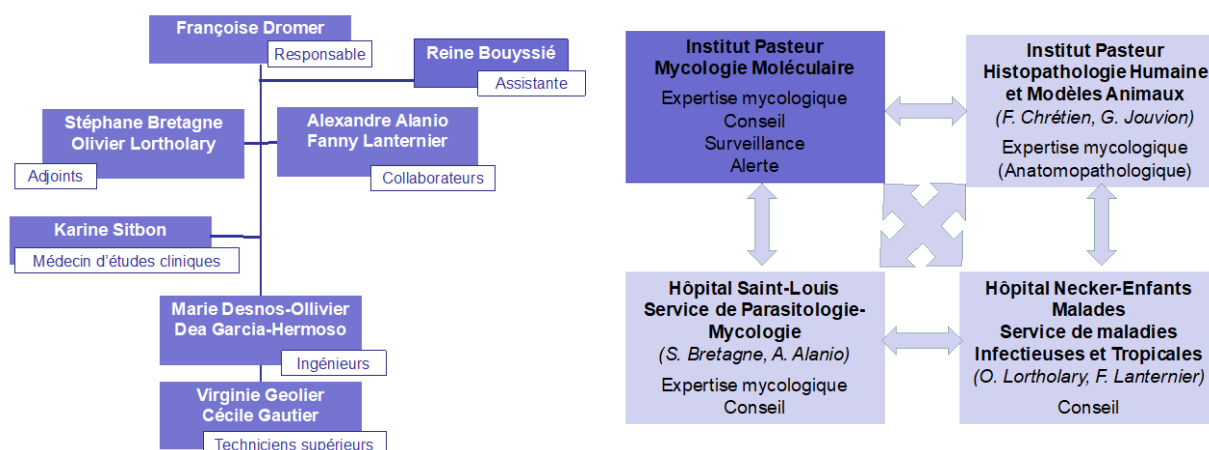
The network of collaborative centers called RESSIF (RESeau de Surveillance des Infections Fongiques) has expanded since 2012. It now includes 29 hospitals from remote regions of metropolitan France and overseas that notify all their cases of proven or probable IFIs to the NRCMA. The notifications are made through a secured website administered at the NRCMA. The centers send also the isolates (all the non-common species or the common species with abnormal susceptibility to one or more antifungal drugs). The YEASTS program (Observatoire Des Levures) launched in 2002 continues with 14 participating centers that notify their cases of yeast fungemia and send all the corresponding isolates. The third source of information in IFIs is the passive notification when isolates are sent for expertise. Any clinician or mycologist/microbiologist willing to participate in the surveillance of IFIs can request parameters allowing notification on line on the “renovated” website. As of March 2019, the RESSIF database included 12353 cases. The database is currently cured so that to analyzed the first 7 years of the survey. A preliminary analysis is presented in this report.

In 2019, the NRCMA has been involved in the investigation of a few grouped cases. We used whole genome sequencing and the bioinformatics analysis provided at the dedicated P2M platform at Institut Pasteur. Large panels of strains including epidemiologically related and unrelated strains, recently isolated or present in the collection as well as type strain allowed us to uncover for example that a single clone of *Saprochaete clavate* recovered also from the environment was involved in the occurrence of several cases of invasive infections in the same hospital. We also confirmed the identification of *Candida auris* in three cases and genotyped the corresponding isolates. We were also involved in the investigation of clusters of pneumocystosis among kidney transplant recipients.

### **3 Missions et organisation du CNR**

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

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



**Figure 1 : Organigramme fonctionnel du CNRMA**

Le CNR a été accrédité selon la norme NF EN ISO 15189 en mars 2015 (n°8-2588). La portée d'accréditation est visible sur le site du [COFRAC](#). Le CNR poursuit la démarche d'accréditation selon les conditions imposées par la Loi du 30 mai 2013 (2013-442). En 2019, des audits internes (11/09 et 28/11/2019) ainsi qu'une revue de direction (3/6/2019) ont été organisés.

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

### **4 Activités d'expertise**

Le CNRMA a reçu, en 2019, 878 souches dans le cadre de demande d'expertise ou de réseau de surveillance. Aux expertises réalisées au CNRMA se sont ajoutées celles réalisées dans l'unité Neuropathologie Expérimentale dirigée par le Pr. F. Chrétien sur les prélèvements anatomopathologiques et celles réalisées sur le site de Saint-Louis (SLS) dans le laboratoire de Parasitologie-Mycologie dirigé par le Pr. S. Bretagne pour le diagnostic moléculaire sur échantillon biologique.

#### **4.1 Évolutions des techniques**

Le CNRMA continue à développer les outils d'identification des champignons d'espèces rares pour lesquelles les caractéristiques morphologiques sont insuffisamment discriminantes et les séquences



disponibles dans les bases de données inexistantes ou non fiables. Les identifications d'espèces réalisées par MALDI-TOF sont systématiquement contrôlées par séquençage nucléotidique d'un ou plusieurs loci, dès lors qu'il s'agit d'une espèce rare ou d'identification difficile ou incertaine.

Le CNRMA utilise maintenant les données issues du séquençage des génomes entiers pour caractériser les souches de *Candida auris* ou pour comparer les souches dans le cadre d'investigation de cas groupés d'infections invasives liées à des espèces rares, comme cela a été le cas pour des infections dues à *Saprochaete clavata*<sup>1</sup> ou *Mucor circinelloides*<sup>2</sup> par exemple.

Le CNRMA a également mis en place des techniques de PCR en temps réel pour l'identification du clone épidémique de 2012 de *Saprochaete clavata*, et l'identification de *Candida auris* d'un isolat de *C. auris* ou d'une espèce souvent confondue avec *C. auris*.

Le CNRMA dispose aussi de la technique de typage des souches de *C. auris* permettant de déterminer rapidement l'origine de la souche envoyée<sup>3</sup>.

## 4.2 Travaux d'évaluation des techniques, réactifs et trousse

Les collaborateurs du CNRMA participent à deux larges études cliniques prospectives et multicentriques en Afrique subsaharienne, AMBITION et DREAMM financées par EDCTP. Ces deux études permettront, entre autres, d'évaluer les performances du test BioSynex CryptoPS en comparaison du LFA IMMY pour le diagnostic de la cryptococcose chez des patients séropositifs pour le VIH.

## 4.3 Techniques transférées vers d'autres laboratoires

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

La base contient actuellement 2203 séquences (ITS, 26S, IGS, actine, RPB1, FKS) pour 2137 souches de levures et 2623 séquences (18S, 28S, ITS, calmoduline, actine,  $\beta$ -tubuline, EF1- $\alpha$ , RPB1, RPB2, CYP51A) pour 1269 souches de champignons filamenteux. La base de données est implémentée régulièrement avec les nouvelles données disponibles. Elle fait partie des bases de données "interrogées" quand on recherche une homologie de séquence sur [Mycobank](#).

Le CNR a également fourni des profils MALDI-ToF à la base de données [MSI online](#) administrée par R. Piarroux.

## 4.4 Collections de matériel biologique

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

- Levures correspondant à 28 genres et 107 espèces différentes (1 à près de 3280 isolats/espèces) comprenant plus de 5400 souches collectées dans le cadre de l'Observatoire des Levures, plus de 2600 souches d'autres sites profonds ou superficiels, et plus de 3100 souches de cryptocoques, auxquelles s'ajoutent des souches de référence achetées dans des collections internationales.
- Champignons filamenteux correspondant à 99 genres et 372 espèces différentes (1 à 394 isolats/espèces) avec près de 3400 souches d'origine clinique y compris des champignons dimorphiques stockés en P3 et des souches de référence achetées dans des collections internationales.

---

<sup>1</sup> Vaux S et al (2014) Multicenter Outbreak of Infections by *Saprochaete clavata*, an Unrecognized Opportunistic Fungal Pathogen. *MBio* 5(6):e02309–14.

<sup>2</sup> Garcia-Hermoso D et al (2018) Outbreak of Invasive Wound Mucormycosis in a Burn Unit Due to Multiple Strains of *Mucor circinelloides* f. *circinelloides* Resolved by Whole-Genome Sequencing. *MBio* 9(2):e00573–18–12.

<sup>3</sup> de Groot Tet et al. (2020) Development of *Candida auris* Short Tandem Repeat Typing and Its Application to a Global Collection of Isolates. *MBio* 11(1):41–9.



## 4.5 Activités d'expertise

Le CNRMA a reçu sur le site IP/CNRMA 878 échantillons dont une faible proportion n'était pas conforme à ses missions [(mycoses superficielles (n=18) et demandes de sérologies (n=3)], et d'autres dont l'identification n'a pu aboutir immédiatement car ils contenaient des mélanges de plusieurs espèces nécessitant purification avant analyse ou des souches non viables (n=45) dont certaines n'ont pas été retrouvées par les laboratoires expéditeurs. Au total, 812 souches ont été caractérisées. Enfin, d'autres échantillons ont été reçus directement à SLS (n=659) ou sur le site IP/anatomopathologie (n=58).

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

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

**Tableau 1 : Résumé de l'activité d'expertise en 2019**

EXPERTISE SUR LES SOUCHES		Levures (n= 540)	Filamenteux (n=262)	Classe 3 (n=10)
<b>MALDI-TOF</b>				
Détermination de la sensibilité aux antifongiques		528	230	0
Séquençage Sanger (>2 régions/souches)		205	262	10
<b>PCR en temps réel</b>				
qPCR de <i>Saprochaete clavata</i>		16		
qPCR de <i>Candida auris</i>		3		
<b>Typage</b>				
MLST de <i>Candida tropicalis</i>		6		
Ploïdie et typage de <i>Cryptococcus neoformans</i>		73		
Microsatellites <i>C. albicans</i> (5 marqueurs)		0		
Microsatellites <i>C. glabrata</i> (5 marqueurs)		0		
Microsatellites <i>C. parapsilosis</i> (3 marqueurs)		6		
Microsatellites <i>A. fumigatus</i> (4 marqueurs)		20		
Microsatellites <i>C. auris</i> (12 marqueurs)		7		
<b>Recherche de mutations</b>				
FKS		10		
CYP51			15	
<b>Séquençage génome entier</b>	<b>110</b>			
<b>AUTRES EXPERTISES</b>				
<b>Expertise anatomopathologique</b>	<b>58</b>			
<b>Diagnostic moléculaire</b>				
Histoplasmose	<b>635</b>			
Coccidioidomycose	<b>24</b>			
<b>Avis thérapeutiques</b>	<b>3 à 5 / jour</b>			

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

L'activité d'expertise est associée à un rapport envoyé au correspondant dans les 10 jours suivant la réception. Ce résultat est final dans la grande majorité des cas (sauf pour le typage ou la recherche de mutation et pour certaines espèces rares). Si ce n'est pas le cas, un résultat préliminaire est envoyé dans ce délai de 10 jours. Les résultats finaux sur l'identification de l'espèce ou le typage sont envoyés dès qu'ils

sont disponibles. Les expertises urgentes définies au CNRMA (confirmation d'espèces pour *C. auris* ou *S. clavata*) sont assurées grâce aux techniques de PCR en temps réel ou avec l'aide du pôle d'identification des pathogènes au sein de la CIBU (cellule d'intervention biologique d'urgence) qui nous fournit dans la demi-journée les chromatogrammes, ce qui nous permet de donner une réponse au correspondant souvent moins de 24h après réception de l'isolat.

Toute demande d'expertise doit systématiquement être accompagnée d'une [fiche de demande d'expertise](#) (disponible sur le site web du CNRMA). En l'absence d'information sur une souche provenant d'un prélèvement profond, le correspondant est systématiquement contacté par téléphone pour obtenir les informations manquantes. Les demandes non conformes entraînent l'envoi d'un courrier au laboratoire expéditeur et sont classées au bout d'un mois en l'absence de réponse. En 2017, 18 demandes étaient non conformes car ne correspondant pas aux missions du CNR (mycoses superficielles, expertise relevant d'un LABM), et 3 concernaient une demande de sérologies des mycoses exotiques, technique arrêtée pour manque de service rendu depuis 2015. Dans ce dernier cas, les responsable/adjoints/collaborateurs du CNRMA contactent le laboratoire correspondant pour discuter de l'opportunité de mettre en oeuvre d'autres moyens de diagnostic (qPCR essentiellement, cf. plus loin).

La totalité des échantillons était en provenance de France, de métropole (93,6%) ou des DOM-TOM (6,4%). Les souches proviennent des laboratoires hospitaliers, en raison même des missions du CNRMA qui couvrent uniquement les mycoses invasives. Les isolats reçus provenaient du sang (49,9%), d'échantillons pulmonaires (16,5%), de biopsies cutanées (11,3%), de liquides céphalo-rachidiens (3,4%), d'échantillons oculaires (3,5%), osseux (3,3%), digestifs (3,3%) ou ORL (4%). Nous avons également reçu des souches de l'environnement (n=12) dans un contexte d'investigation d'épidémies. Des précisions sont données plus loin en fonction de l'expertise microbiologique requise.

#### 4.5.1 Expertise 2019 sur les levures

Les levures provenaient essentiellement d'hémocultures (72,5%), mais aussi du système nerveux central (3,3%), des poumons (4,6%), de l'appareil digestif (3,9%), de la peau (3,5%) de lésions ostéo-articulaires (2,4%), et des urines (3,3%).

Le niveau de caractérisation pour les 540 levures identifiées (correspondant à 47 genres et espèces différents) est celui décrit précédemment. Nous avons donc réalisé :

- ✓ Une analyse phénotypique : pureté sur milieu chromogène et profil protéique par MALDI-TOF systématique, et, en fonction du genre ou espèce suspectés : activité uréase, température de croissance, croissance sur milieu CGB.
- ✓ Une identification moléculaire pour tous les isolats d'espèces communes ayant un profil protéique inhabituel par MALDI-TOF, et pour toutes les espèces de levures moins fréquentes voire rares, soit 205 isolats avec amplification d'un ou plusieurs loci :
  - Régions ITS1-5.8S-ITS2 (168 isolats)
  - Région D1D2 de la sous-unité 26S (104 isolats)
  - Amplification de la région IGS1 (19 isolats de *Trichosporon* spp. et *Cryptococcus* spp.)
  - Amplification du gène codant l'actine (25 isolats de *Clavispora lusitaniae*)
  - Amplification d'une partie du gène RPBI (10 isolats de *Meyerozyma guilliermondii* et 2 isolat de *Meyerozyma caribbica*)
- ✓ Un profil de sensibilité des souches aux 8 antifongiques pour 528 isolats (12 souches n'ayant pas poussé correctement dans les milieux liquides)
- ✓ Un typage MLST pour rechercher le clone 5FC-R pour 6 isolats de *C. tropicalis* résistants à la 5FC (6 patients, aucune souche du clone R-5FC<sup>4</sup>)

---

<sup>4</sup> Desnos-Ollivier M et al (2008) Clonal population of flucytosine-resistant *Candida tropicalis* from blood cultures, Paris, France. *Emerging Infect Dis* 14(4):557–565.

- ✓ Le séquençage des gènes *Fks* pour 10 isolats (4 *C. albicans*, 5 *C. glabrata*, 1 *K. marxianus*, 1 *C. tropicalis*), résistants aux échinocandines ou liés épidémiologiquement à des isolats résistants.
- ✓ L'identification en urgence d'isolats de *Geotrichum* spp. et/ou du clone épidémique de 2012 pour ceux adressés comme *Saprochaete clavata* a été réalisée sur 12 isolats. La PCR en temps réel mise au point au CNRMA a permis de donner un résultat dans la journée suivant la réception de la souche pour les isolats suspects avec donc identification de 12 isolats de *S. clavata*, aucune ne correspondant au clone épidémique de 2012 ou au clone B.
- ✓ L'identification en urgence en moins de 24 heures pour des isolats suspects ou identifiés comme *C. auris* a été réalisée pour 7 isolats par PCR en temps réel et séquençage en urgence. La confirmation de l'espèce *C. auris* a été faite pour 3 isolats. Les 4 autres isolats appartenaient à des espèces proches phylogénétiquement et dont l'identification était douteuse par MALDI-TOF.
- ✓ La détermination de la ploïdie et le sérotypage de 72 souches de *Cryptococcus* sp. aboutissant à la caractérisation de 66 souches de *Cr. neoformans* (47 sérotype A, 14 sérotype D, 5 AD) et 1 souche de *Cr. gattii*.

La détermination de certains caractères phénotypiques reste fondamentale pour constituer une base de données fiable et une collection de souches bien caractérisées, même avec l'utilisation du MALDI-TOF et des séquençages de régions conservées. *C'est l'association entre cette expertise du CNRMA sur l'identification d'espèces rares et les données cliniques correspondantes qui permet de déterminer si ces espèces sont associées à des pathologies de présentations ou de pronostic différents.*

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

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

\* *C. haemulonii* et *C. duobushaemulonii* sont deux espèces distinctes

\*\**C. neoformans* var. *grubii* correspond au sérotype A et *C. neoformans* var. *neoformans* au sérotype D

Nous avons poursuivi la constitution d'une base de données complète (caractères phénotypiques CMI et séquences) dans BioloMICS, et alimenté la nouvelle base de données **Institut Pasteur FungiBank**. Il faut noter que de constantes révisions taxonomiques entraînent des changements de noms, y compris pour des espèces courantes (**Tableau 2**). En tant que Centre de Référence, le CNRMA se doit de donner les noms taxonomiques en vigueur, mais maintient dans le compte-rendu le nom d'usage de façon à ne pas perturber l'interprétation des résultats par les cliniciens ou mycologues/microbiologistes non experts de ce domaine très spécialisé.

Outre les espèces fréquentes (*Candida albicans*, *Candida glabrata*, *Candida parapsilosis*, *Candida tropicalis*, *Pichia kudriavzevii*, *Kluyveromyces marxianus* var. *marxianus*), nous avons identifié ou confirmé l'identification de *Candida dubliniensis*, *Candida haemulonii*, *Candida haemulonii* var. *vulnera*, *Candida duobushaemulonii*, *Candida inconspicua*, *Candida orthopsilosis*, *Candida metapsilosis*, *Candida mesorugosa*, *Candida nivariensis*, *Clavispora lusitaniae*, *Cyberlindnera fabianii*, *Cyberlindnera mengyuntiae*, *Galactomyces candidus*, *Hanseniaspora pseudoguilliermondii*, *Kazachstania bovina*, *Kazachstania slooffiae*, *Kazachstania telluris*, *Kodamaea ohmeri*, *Lodderomyces elongisporus*, *Wickerhamiella pararugosa*, *Magnusiomyces capitatus*, *Meyerozyma caribbica*, *Meyerozyma guilliermondii*, *Pichia norvegensis*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Saprochaete clavata*, *Wickerhamomyces anomalus*, *Yarrowia lipolytica*.

Parmi les levures basidiomycètes, outre *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* et var. *grubii*, nous avons identifié *Rhodotorula mucilaginosa*, *Trichosporon asahii*, *Trichosporon inkin*, *Trichosporon* cf. *coremiiforme*, *Malassezia furfur*, mais aussi *Naganishia diffluens*, *Apiotrichum* sp.

**Toutes ces espèces sont, rappelons-le, responsables d'infections sévères et il ne s'agit donc pas ici d'une liste purement "botanique"**. Plusieurs espèces n'ayant jamais ou très rarement été impliquées en pathologie humaine ont d'ailleurs été identifiées dans des cas d'infection invasive en 2019 :

*Candida haemulonii* var. *vulnera* : cette variété décrite en 2012 par Cendejas-Bueno et al.<sup>5</sup> à partir de prélèvements isolés d'ongle et de peau de patients en Espagne, peut se différencier de *C. haemulonii* uniquement par séquençage des régions ITS et par MALDI-TOF selon les bases de données disponibles. Neuf cas de colonisations et d'infections par cette espèce ont été décrits entre 2010 et 2015 au Brésil mais cette espèce reste très rarement reportée sans doute également du fait de sa difficulté d'identification. En 2019, un centre hospitalier nous a fait parvenir une souche isolée d'une oreille identifiée comme *C. haemulonii*. Le séquençage et la comparaison des séquences des souches types nous a permis d'identifier la première souche de *C. haemulonii* var. *vulnera*. Comme toutes les espèces du complexe *C. haemulonii*, cet isolat avait des CMI élevées aux azolés et à l'amphotéricine B mais des valeurs de CMI basses pour les échinocandines et la flucytosine.

**Infections à *Kazachstania* spp.** : *Kazachstania* est un nom de genre de levures ascomycètes appartenant à la famille des Saccharomycetales et comportant plus de 30 espèces différentes. De nombreuses espèces de *Kazachstania* sont capables de fermenter et de pousser à des températures supérieures à 37°C. En phénotypie, les espèces *K. telluris*, *K. pintolopesii*, *K. slooffiae*, *K. bovina* et *K. heterogenica* sont très similaires et sont regroupées dans le complexe « *K. telluris* ». L'espèce *K. heterogenica* semble même être issue de l'hybridation de souches de *K. pintolopesii* et d'une autre espèce inconnue. Ces levures sont fréquemment isolées dans le levain, des fromages et également dans de nombreux microbiotes animaux. Une certaine spécificité d'hôte a été observée : *K. telluris* est fréquemment associé aux pigeons, *K. slooffiae* aux cochons et aux chevaux, *K. pintolopesii* aux rongeurs et *K. bovina* aux vaches mais également à l'homme. Ces espèces ont été décrites un peu partout dans le monde (USA, Europe, Asie, Afrique du Sud, Amérique du Sud) mais aucune infection à l'homme ni infection chez l'animal n'a été décrite.

---

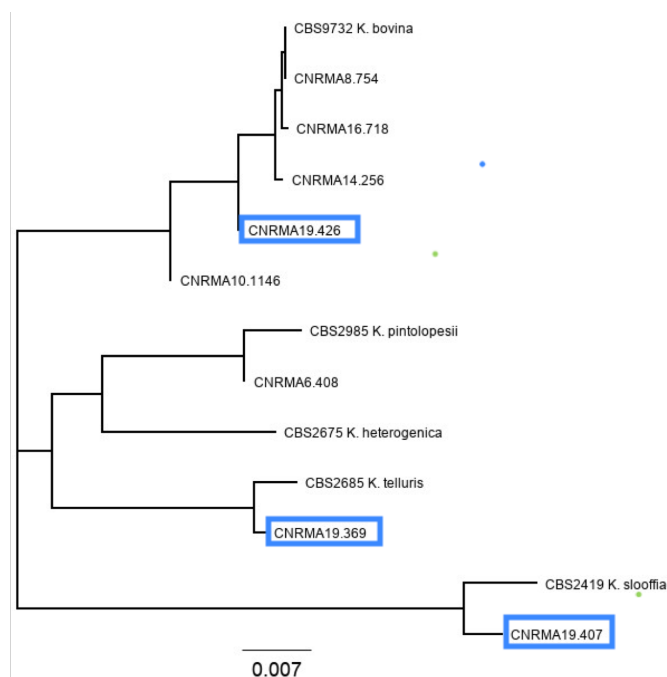
<sup>5</sup> Cendejas-Bueno E et al. (2012) Reclassification of the *Candida haemulonii* complex as *Candida haemulonii* (*C. haemulonii* group I), *C. duobushaemulonii* sp. nov. (*C. haemulonii* group II), and *C. haemulonii* var. *vulnera* var. nov.: three multiresistant human pathogenic yeasts. *J Clin Microbiol.* 2012;50:3641–3651.

L'identification se fait par séquençage des régions D1D2, mtLSU, ITS et/ou RPBII (**Figure 2**). D'après les résultats obtenus au CNRMA sur les souches cliniques et sur les 31 souches types de collection des différentes espèces de *Kazachstania*, la sensibilité au fluconazole était réduite *in vitro* avec des CMI élevées, tandis que les CMI du posaconazole et du voriconazole étaient plus basses (0.25mg/L), et que les CMI de l'amphotéricine B, de la 5FC et des échinocandines étaient basses.

Depuis 2006, nous avons reçu au CNRMA 8 souches appartenant au genre *Kazachstania*, isolées de liquide pleural ou liquide péritonéal et d'hémocultures et appartenant à 4 espèces différentes. Trois isolats (dont deux issus d'hémoculture) ont été reçues au CNRMA en 2019. Ces 3 isolats appartiennent à trois espèces distinctes (*K. bovina*, *K. slooffiae* et *K. telluris*) excluant toute possibilité d'une source commune, mais laissant supposer des contaminations par des animaux.

**Figure 2 : Analyse des isolats cliniques et des souches type du complexe *K. telluris***

Les séquences concaténées des régions D1D2 et ITS1-5.8S-ITS2 ont été alignées pour les isolats cliniques et les souches types du complexe *K. telluris*. Neighbor Joining Tree (Geneious software) construit à partir de la matrice de distance issue de l'alignement multiple (MUSCLE)

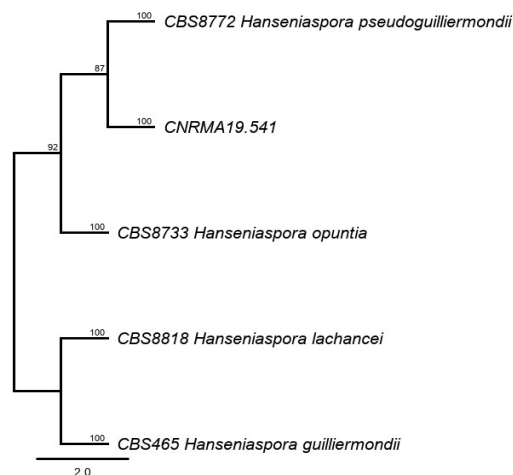


**Infection à *Hanseniaspora pseudoguilliermondii***

Le complexe phylogénétique « *Hanseniaspora guilliermondii* » comprend 4 espèces dont 3 ne peuvent être différenciées phénotypiquement (*H. guilliermondii*, *H. opuntia*, *H. pseudoguilliermondii*). Les espèces de ce complexe se différencient des autres espèces du genre *Hanseniaspora* par leur capacité de croissance à 37°C, ce qui peut donc en faire des agents pathogènes opportunistes pour l'homme. En 2019, nous avons reçu une souche isolée d'une hémoculture appartenant à l'espèce *Hanseniaspora pseudoguilliermondii*. L'identification a été faite par séquençage multilocus (**Figure 3**). Cette espèce a été décrite en 2006 et uniquement isolée de fruits, et concentré de jus d'orange. Les autres espèces du complexe sont également retrouvées dans des fruits et des procédés de fermentation du vin. Un seul cas d'infection invasive chez l'homme à *H. opuntiae* a été décrit en 2018. Il s'agit donc du premier cas d'infection invasive due à *H. pseudoguilliermondii*.

**Figure 3 : Analyse d'une souche clinique et des souches type du complexe *H. guilliermondii***

Les séquences des régions ITS de la souche clinique CNRMA19.541 et des souches types du complexe *H. guilliermondii* ont été alignées. Neighbor Joining Tree (Geneious software) construit à partir de la matrice de distance issue de l'alignement multiple (MUSCLE)



**4.5.2 Expertise 2019 sur les champignons filamenteux**

Les champignons filamenteux étaient isolés essentiellement des poumons (39,6%), de la peau (25,8%), de l'œil (10,5%) de la sphère ORL (8,6%), du sang (5,2%), mais aussi des os (4,9%), ou du cerveau (2,6%).

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

Dénomination précédente	Espèce actuelle
<i>Acremonium kiliense</i>	<i>Sarocladium kiliense</i>
<i>Acremonium strictum</i>	<i>Sarocladium strictum</i>
<i>Bipolaris spicifera</i>	<i>Curvularia spicifera</i>
<i>Emericella nidulans</i>	<i>Aspergillus nidulans</i>
<i>Emericella quadrilineata</i>	<i>Aspergillus quadrilineatus</i>
<i>Fusarium delphinoides</i>	<i>Bisifusarium delphinoides</i>
<i>Fusarium dimerum</i>	<i>Bisifusarium dimerum</i>
<i>Fusarium falciforme</i>	<i>Neocosmospora falciformis</i>
<i>Fusarium keratoplasticum</i>	<i>Neocosmospora keratoplastica</i>
<i>Fusarium petroliphila</i>	<i>Neocosmospora petroliphila</i>
<i>Geosmithia argillacea</i>	<i>Rasamsonia argillacea</i>
<i>Lecythophora hoffmannii</i>	<i>Coniochaeta hoffmannii</i>
<i>Madurella grisea</i>	<i>Trematosphaeria grisea</i>
<i>Myceliophthora thermophila</i>	<i>Thermotheomyces thermophilus</i>
<i>Neosartorya hiratsukae</i>	<i>Aspergillus hiratsukae</i>
<i>Ochroconis gallopava</i>	<i>Verruconis gallopava</i>
<i>Paecilomyces lilacinus</i>	<i>Purpureocillium lilacinum</i>
<i>Penicillium marneffeii</i>	<i>Talaromyces marneffeii</i>
<i>Penicillium purpureogenum</i>	<i>Talaromyces purpureogenus</i>
<i>Pseudallescheria minutispora</i>	<i>Scedosporium minutisporum</i>
<i>Pyrenochaeta romeroi</i>	<i>Medicopsis romeroi</i>
<i>Pyrenochaeta mackinnonii</i>	<i>Nigrograna mackinnonii</i>
<i>Rousoella percutanea</i>	<i>Parathyridaria percutanea</i>
<i>Scedosporium prolificans</i>	<i>Lomentospora prolificans</i>

Le niveau de caractérisation pour les 262 champignons filamenteux identifiés cette année (73 espèces de 42 genres différents incluant quelques souches de champignons dimorphiques classe 3) est celui décrit plus haut. De plus, chaque année, en raison de changements taxonomiques ou d'études en cours, des souches sont ressorties de la collection pour complément d'identification. Le **Tableau 3** décrit les changements taxonomiques récents.

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
- ✓ En parallèle,
  - pour les genres *Aspergillus*, *Penicillium*, *Paecilomyces*, *Scopulariopsis*, *Microascus*, *Scedosporium*, *Chaetomium*, *Phaeoacremonium*, pour les coelomycètes et les dermatophytes, ainsi que les levures noires, le séquençage partiel du gène de la beta-tubuline a été réalisé en utilisant 4 paires d'amorces différentes (119 isolats)
  - pour les genres *Aspergillus* et *Sporothrix*, le gène de la calmoduline a été partiellement séquencé (40 isolats).
  - pour les genres *Fusarium*, *Purpureocillium*, *Sarocladium*, *Acremonium*, *Trichoderma*, *Alternaria*, *Paecilomyces*, *Scopulariopsis*, *Microascus*, pour les levures noires, les coelomycètes, les *Mucorales*, le gène *Tef1-α* (facteur d'élongation) a été partiellement amplifié avec 4 paires d'amorces différentes (100 isolats).
  - pour les genres *Fusarium*, *Paecilomyces*, *Purpureocillium*, *Sarocladium*, *Acremonium*, *Curvularia*, certaines espèces d'*Aspergillus* et les "levures noires", le gène *rpb2* (sous unité RPB2 RNA polymérase II) a été séquencé (57 isolats).
  - Pour les genres *Nannizziopsis*, *Paecilomyces* et *Phaeoacremonium*, le gène de l'actine a été partiellement séquencé (9 isolats).
  - Pour le genre *Mucor*, le gène codant pour la sous unité *rpb1* (sous-unité RPB1 ARN polymérase II ADN-dépendante) a été amplifié (6 isolats).
- ✓ La recherche des mutations CYP51A pour 17 isolats d'*A. fumigatus* résistants aux azolés
- ✓ La recherche de mutation dans le « hotspot » 1 du gène *fks* (HS1) d'*A. fumigatus* pour 7 isolats ayant des valeurs de concentrations minimales inhibitrices hautes de la caspofungine.
- ✓ La détermination du profil de sensibilité à 8 antifongiques pour 230 isolats (l'absence de croissance adéquate de certaines espèces et/ou isolats empêche la détermination des CMI pour certains isolats).

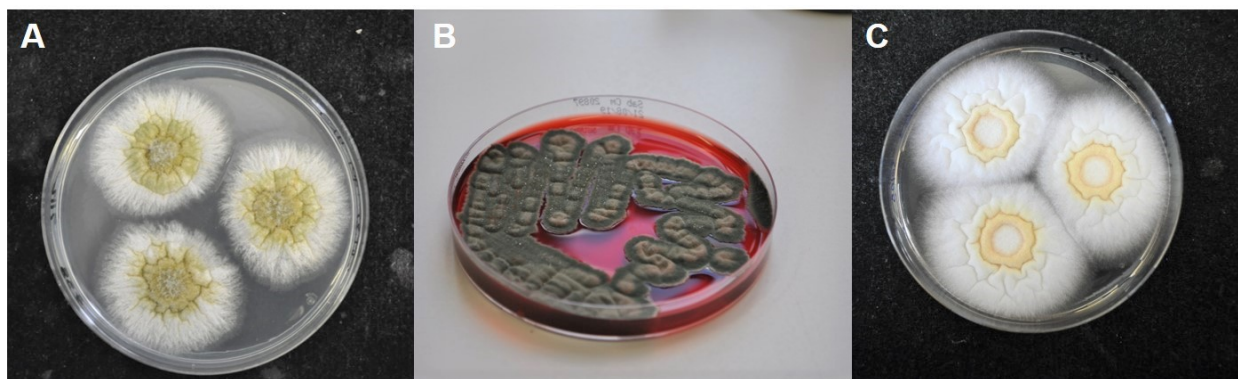
*Rappelons que l'identification des espèces au sein des complexes d'espèces n'a pas nécessairement d'intérêt pour la prise en charge des patients. En revanche, c'est tout l'intérêt du CNR dont l'expertise permet de caractériser ces espèces rares et de colliger les données cliniques correspondantes, pour,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

**Dans l'ordre des *Eurotiales***, pour le genre *Aspergillus*, nous avons caractérisé 80 souches principalement isolées de lésions respiratoires (80%). Plusieurs espèces appartenant aux 6 sections d'*Aspergillus* ont été identifiées. Les espèces majoritaires étaient *A. fumigatus* (49%) et *A. flavus* (18%) appartenant aux sections *Fumigati* et *Flavi* (**Figure 4**) respectivement. Trois isolats appartenant à la section *Fumigati* ont été identifiés comme *A. lentulus*, *A. udagawae* et *A. fennelliae*. Le reste des espèces rencontrées comprenait

- *A. calidoustus*, *A. pseudodeflectus* (sect. *Usti*)
- *A. tamarii*, *A. pseudonomius* (sect. *Flavi*)
- *A. terreus* (**Figure 4**) (sect. *Terrei*)
- *A. tubingensis*, *A. welwitschiae* (sect. *Nigri*)
- *A. westerdijkiae* (sect. *Circumdati*)



Le genre *Talaromyces* (ordre des *Eurotiales*) était représenté par deux isolats identifiés comme *Talaromyces marneffei* (manipulé en laboratoire de confinement P3) et *Talaromyces* section *Trachyspermi* (Figure 4).

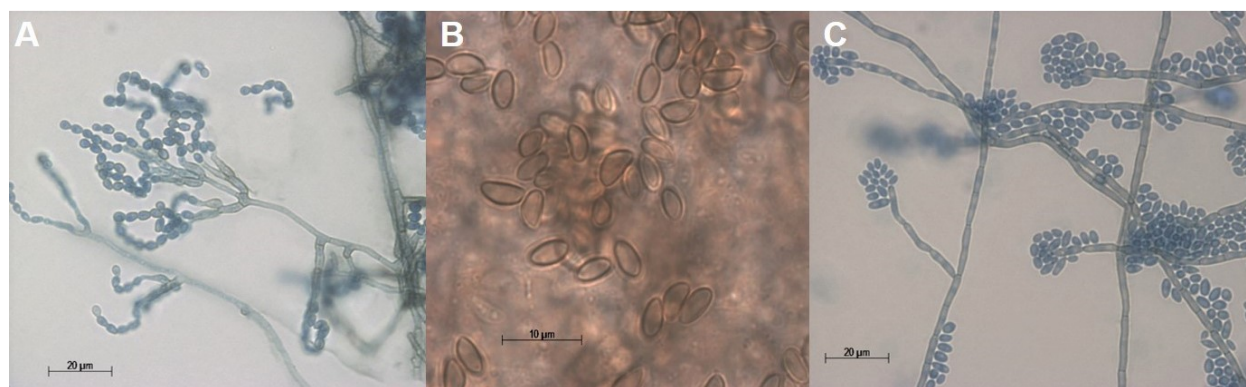


**Figure 4 : Morphologies caractéristiques (1)**

Aspect macroscopique sur milieu Czapek (CZA) d'*Aspergillus flavus* (A) et *A. terreus* (C) après 7 jours d'incubation, et production de pigment rouge pour *Talaromyces* section *Trachyspermi* sur milieu Sabouraud (B).

L'ordre des *Onygenales* était représenté majoritairement par 8 souches d'*Histoplasma* spp. (manipulation dans laboratoire de confinement P3), responsables de mycoses endémiques, par trois isolats du genre *Nannizziopsis* et par deux souches identifiées comme *Trichophyton rubrum* et *Trichophyton benhamiae*.

Des souches des levures noires et espèces apparentées à l'ordre des *Chaetothyriales*, dont *Exophiala dermatitidis*, *E. jeanselmei*, *E. spinifera*, *E. phaeomuriformis* (Figure 5), *Fonsecaea pedrosoi* et *Cladophialophora bantiana* (cette dernière à manipuler en laboratoire de confinement P3) ont été caractérisées.



**Figure 5 : Morphologies caractéristiques (2)**

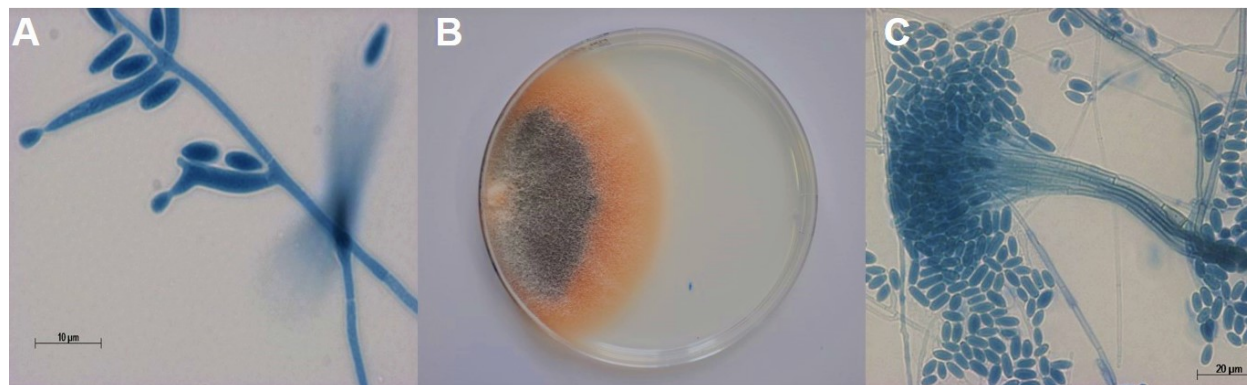
Conidiophores et conidies (A) à partir de microcultures sur malt 2% de *Microascus cirrosus* et présence d'ascospores (B) obtenues de la forme sexuée du même champignon. Aspect microscopique de la levure noire *Exophiala phaeomuriformis* (C).

Dans l'ordre des *Pleosporales*, nous avons identifié des souches d'*Alternaria infectoria* et d'*A. alternata*, ainsi que des phaeohyphomycètes (*Curvularia eragrostidis*, *C. geniculata*) ainsi que des coelomycètes (*Medicopsis romeroi*, *Paraconiothyrium cyclothyrioides*).

Une souche de *Neoscytalidium dimidiatum* (ordre de *Botryosphaeriales*) et deux membres de l'ordre de *Capnodiales* (*Cladosporium parahalotolerans* et *Hortaea werneckii*) ont été également identifiés.

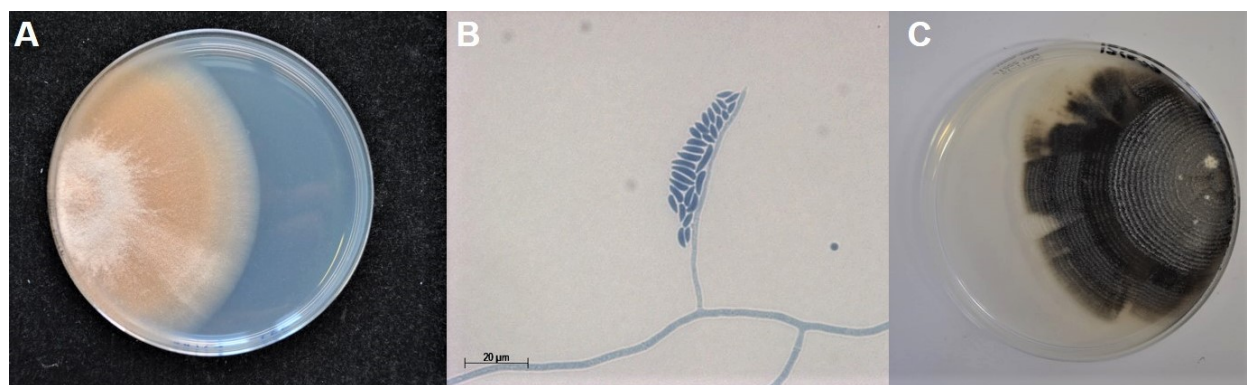
Dans l'ordre des *Hypocreales*, nous avons caractérisé 48 souches distribuées dans de différents complexes d'espèces. Le complexe *Fusarium solani* (FSSC) était représenté par 14 souches (*Neocosmospora*

*keratoplastica*, *N. petroliphila*, *N. falciformis*, *N. gamsii*). Parmi les 8 souches appartenant au complexe *Fusarium oxysporum* (FOSC), nous avons rencontré des espèces récemment décrites : *F. veterinarianum* et *F. nirenbergiae*. D'autres espèces appartenant aux complexes *Fusarium fujikuroi* (FFSC) (*F. proliferatum* et *F. verticillioides*) et *Bisifusarium dimerum* (FDSC) ont été expertisées (**Figure 6**, **Figure 7**). Nous avons également reçu de souches de *Purpureocillium lilacinum*, *Trichoderma longibrachiatum*, *Acremonium fusidioides*, *Metarhizium robertsii*, espèces appartenant toutes à l'ordre des *Hypocreales*.



**Figure 6 : Morphologies caractéristiques (3)**

Polyphialide et conidies à partir d'une culture sur lame (malt 2%) de *Fusarium proliferatum* (A) et aspect de la colonie sur milieu pomme de terre dextrose (PDA) (B). Synnema observé chez *Scedosporium ellipsoideum* (C).



**Figure 7 : Morphologies caractéristiques (4)**

Culture sur PDA de *Bisifusarium dimerum* après 7 jours d'incubation et conidies courbées caractéristiques de cette espèce (A,B). Aspect macroscopique sur PDA de l'hyphomycète *Gibellulopsis serrae* (C).

Les 19 souches hyphomycètes appartenant à l'ordre de *Microascales* correspondaient à 7 espèces différentes groupées dans les genres *Scedosporium* (*S. apiospermum*, *S. boydii*, *S. ellipsoideum*) (**Figure 6**), *Lomentospora* (*L. prolificans*), *Scopulariopsis* (*S. brevicaulis*) et *Microascus* (*M. cirrosus*, *M. gracilis*) (**Figure 5**).

Un isolat de *Coniochaeta hoffmannii* (syn. *Lecythophora hoffmannii*) apparenté à l'ordre *Coniochaetales* et un coelomycète *Diaporthe sp.* appartenant à l'ordre *Diaporthales* ont été identifiés.

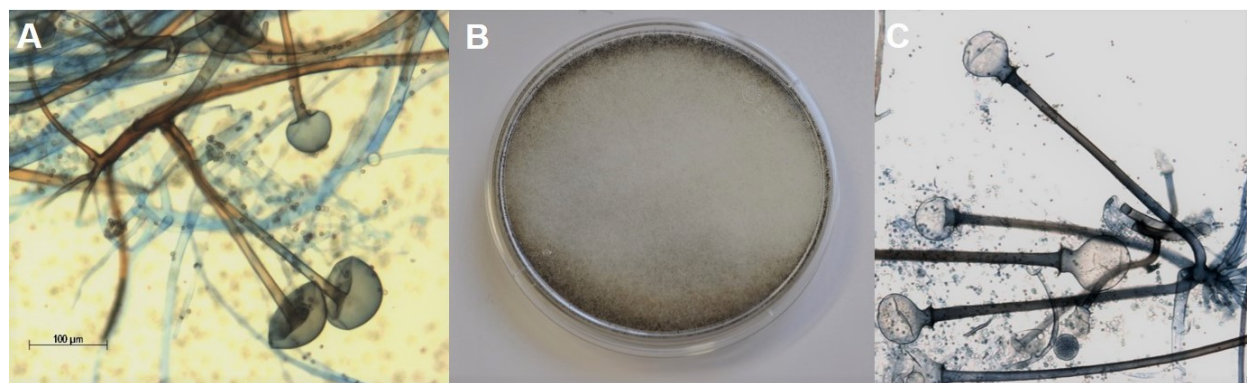
L'ordre *Glomerellales* était représenté par un seul isolat de *Gibellulopsis serrae* (**Figure 7**). D'autres hyphomycètes dematiés ont été analysés : *Phaeoacremonium parasiticum* (ordre *Togniniales*), *Humicola fuscoatra* var. *fuscoatra* et *Madurella mycetomatis* (ordre *Sordariales*), ainsi que d'autres champignons ascomycètes : *Sporothrix globosa* (ordre *Ophiostomatales*) et *Phialemoniopsis ocularis*, membre de la classe des *Sordariomycetes*.

Nous avons analysé quatre isolats de champignons basidiomycètes dont deux ont été identifiés comme *Hormographiella aspergillata* et un comme *H. verticillata*. Le dernier isolat fait partie des



Agaricales, mais la morphologie et le séquençage n'ont pas permis l'identification de genre et espèce pour le moment. Ce champignon avait été cultivé à partir d'un prélèvement de la sphère ORL chez une patiente adulte martiniquaise présentant une cytopathie mitochondriale.

Dans l'ordre de *Mucorales*, nous avons reçu et caractérisé 41 souches identifiées comme *Rhizopus arrhizus* (25%), *R. microsporus* (25%) (**Figure 8**), *Lichtheimia corymbifera* (20%), *L. ramosa* (5%), *Mucor circinelloides* f. *circinelloides* (14%), *M. velutinosus* (7%), *Rhizomucor pusillus* (2%) et *Saksenaea vasiformis* (2%).



**Figure 8 : Morphologies caractéristiques (5)**

Sporanges, rhizoïdes et sporangiophores non branchés de *Rhizopus arrhizus* (A) et *Rhizopus microsporus* (C) ; Culture de 4 jours de *Rhizopus arrhizus* sur malt 2% (B).

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

#### 4.5.3 Expertise 2019 sur la sensibilité aux antifongiques

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

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

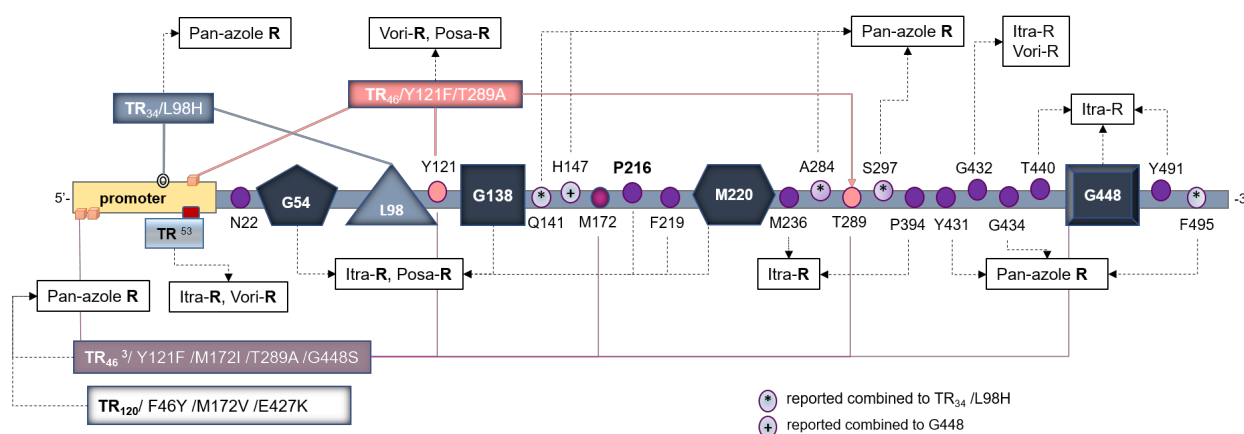
Au total, 763 isolats ont été testés en 2019 pour leur sensibilité aux antifongiques. Le nombre très important d'antifongiques testés, de genres et d'espèces différents rend impossible un compte rendu détaillé, certaines espèces n'étant représentées que par un très petit nombre d'isolats. Nous présentons donc les données de CMI depuis 2003, et en nous limitant : 1) aux espèces pour lesquelles au moins 5 isolats ont été testés et 2) aux antifongiques pertinents pour les espèces concernées. Une analyse des tendances sera faite plus loin sur un nombre limité d'espèces de levures analysées dans le cadre de l'Observatoire des Levures (ODL), pour éviter le biais lié à l'envoi de souches isolées dans un contexte connu d'échec thérapeutique.

En effet, nous recevons des isolats pour confirmation d'une moindre sensibilité décelée en routine, et pour recherche d'une éventuelle mutation dans les gènes cibles.

Ainsi, nous avons fait le séquençage des gènes *Fks* pour 10 isolats de levures résistants aux échinocandines :

- 4 *Candida albicans* (4 patients) avec CMI haute et présence de mutation en région HS1 : S645P pour 1 souche, S645S/P pour 1 souche, R647G pour 1 souche et R1361G en région HS2 pour 1 souche.
- 4 *Candida glabrata* (5 patients) avec, pour 4 souches, des CMI hautes et présence de mutation en région HS1 du gène *FKS2* pour 3 souches : F658Δ pour 1 souche, S663P pour 2 souches et *FKS1* pour 1 souche, ainsi qu'une mutation en région HS1 du gène *FKS1* (S629P) pour 1 souche
- 1 souche de *Candida tropicalis* avec CMI hautes et présence d'une mutation S645P en région HS1
- 1 souche de *Kluyveromyces marxianus* avec CMI hautes et présence d'une mutation S655S/L en région HS1

Nous avons également recherché des mutations dans le gène *CYP51A* pour 15 isolats d'*A. fumigatus*. Dans la **Figure 9** sont représentées les principales substitutions non synonymes décrites pour le gène cible et son promoteur. Les souches résistantes aux azolés portent des mutations ponctuelles dans la région codante soit en combinaison ou en absence de répétitions en tandem dans le promoteur. Les mécanismes pouvant expliquer la résistance sont connus pour un certain nombre des mutations (**Tableau 4**).



**Figure 9 : Schéma du gène *Cyp51A* d'*A. fumigatus* et principales mutations**

Les régions hotspot sont indiquées: G54, L98, G138, M220, G448. Les constructions génétiques ont démontré que ces mutations peuvent être responsables d'un phénotype de résistance aux antifongiques azolés (modifié de Alanio A. *et al.*)

Itra: itraconazole ; Vori : voriconazole ; Posa : posaconazole ; TR, tandem repeat ; R, résistant

Nous avons retrouvé la mutation TR34/L98H pour 5 souches isolées de 5 patients différents, toutes ayant des CMI hautes à l'itraconazole, voriconazole et isavuconazole. Trois de ces 5 souches avaient en outre des CMI hautes pour le posaconazole.

Deux souches indépendantes avec des CMI hautes pour le voriconazole et l'isavuconazole portaient la mutation TR46/Y121F/T289A décrite comme responsable d'apparition des phénotypes de résistance aux azolés.

La mutation qui comporte une triple répétition de 46 nucléotides dans le promoteur, combinée à 4 polymorphismes nucléotidiques (TR46/Y121F/M172I/T289A/G448S), a été retrouvée pour une souche ayant des CMI hautes pour voriconazole, posaconazole et isavuconazole. Cette modification a été récemment décrite pour des souches issues de compost exposé aux azolés <sup>6</sup>.

Nous avons également mis en évidence, pour deux isolats résistants, les substitutions M220K et G448S, respectivement. Pour 3 isolats ayant des CMI anormalement hautes aux azolés, nous n'avons détecté aucune mutation dans le gène *CYP51A*.

<sup>6</sup> Zhang J, et al. (2017). A novel environmental azole resistance mutation in *Aspergillus fumigatus* and a possible role of sexual reproduction in its emergence. *mBio* 8:e00791-17.

**Tableau 4 : Mutations dans le gène *Cyp51A* d'*Aspergillus fumigatus***

Mutations <sup>6,7,8</sup>		Mécanisme
TR <sub>34</sub> /L98H *		Hyper expression de la protéine cible et une affinité d'interaction réduite par modification structural du canal d'accès au ligand
TR <sub>46</sub> /Y121F/T289A		
TR <sub>46</sub> /Y121F/M172I/T289A/G448S		
TR120/F46Y/M172V/E427K		Acquisition de novo du TR après traitement prolongé aux azolés
TR53		Mutation décrite pour des souches résistantes. Mécanisme <b>non connu</b>
G54W/R/E/V/A/D	M220T/V/I/K/R/L	Mutations décrites pour des souches résistantes (par affinité d'interaction réduite).
G138C/S	G448S	
P216		
F46Y/M172V/N248T/D255E/E427K		Polymorphismes décrits pour des souches sensibles aux azolés
N22D	Y431S/C	Polymorphismes nucléotidiques décrits occasionnellement pour des souches résistantes aux azolés
F165L	G432S/A	
F219S/C/I	G434C	
I242V	T440	
D262Y	N479D	
N248K	Y491H	
A284T		

\*parfois en combinaison avec S52T, Q88H, N125I, S297, F495I, Q141H

#### 4.5.4 Expertise 2019 sur les mycoses endémiques

L'expertise concernant les mycoses endémiques relève davantage des conseils sur la démarche diagnostique ou/et thérapeutique. Le CNRMA n'a pas été sollicité cette année pour explorer des expositions accidentelles groupées à des champignons dimorphiques (classe 3). En revanche, il a été sollicité pour la confirmation ou l'identification d'isolats (cf. plus haut) et des diagnostics moléculaires.

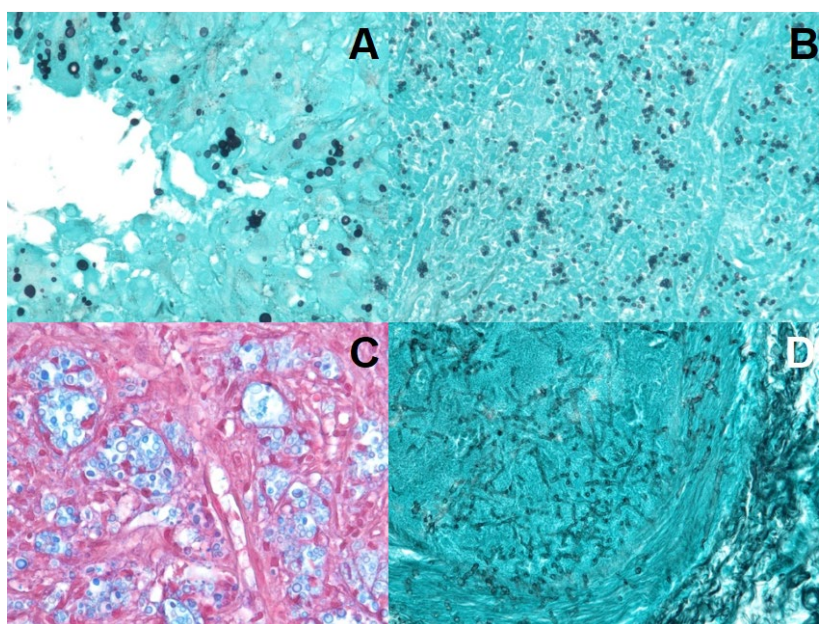
#### 4.5.5 Expertise 2019 en anatomopathologie

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

En 2019, les demandes provenaient à part à peu près égale d'hôpitaux de l'AP-HP (45%) ou de centres hospitaliers en province et dans les DOM-TOM (38%), et 17% de cabinets privés. Au total, 58 échantillons ont été analysés et discutés, aboutissant à un diagnostic de certitude (21 dossiers, 45%) ou de présomption (6 dossiers, 13%) (**Figure 10**). Dans 11 cas, le diagnostic n'a pas pu être établi en l'absence d'éléments fongiques visibles. Les données histopathologiques ont été confrontées aux données éventuellement disponibles au CNRMA et aux diagnostics moléculaires.

<sup>7</sup> Rivero-Mendez O, Alastrucy-Izquierdo A, Mellado E, Cuenca-Estrella M. (2016) Triazole Resistance in *Aspergillus* spp.: A Worldwide Problem? *J. Fungi* (Basel). doi: 10.3390/jof2030021

<sup>8</sup> Van der Torre M. et al. (2020) Detecting Azole-Antifungal Resistance in *Aspergillus fumigatus* by Pyrosequencing. *J. Fungi* (Basel), 6, 12; doi:10.3390/jof6010012



**Figure 10 : Sélection d'expertises anatomopathologiques**

Paracoccidioidomycose cutanée (A), histoplasmose pulmonaire (B), cryptococcose pulmonaire (C) et mucormycose hépatique (D)  
[A, B et D : Gomori-Grocott, C bleu alcian]

#### 4.5.6 Expertise 2019 pour les diagnostics moléculaires

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

La généralisation de la PCR quantitative (qPCR) avec les optimisations et les contrôles adéquats permet de multiplier les tests diagnostiques, de remplacer certaines méthodes, comme la microscopie, et d'en compléter d'autres, comme les recherches d'antigènes. Ces tests qPCR ont été optimisés dans le laboratoire de Mycologie-Parasitologie de l'hôpital St-Louis en insistant sur les étapes pré-analytiques mais aussi sur le choix des enzymes utilisées et des sondes. Ces tests pratiqués en routine concernent l'aspergillose invasive, la pneumocystose, les mucormycoses, et l'histoplasmose. Pour l'aspergillose invasive et la pneumocystose, l'immense majorité des laboratoires hospitaliers réalisent ces examens. La question est donc l'harmonisation des pratiques. Ce travail a été mis en place à l'échelle européenne dans le cadre du groupe de travail Fungal PCR Initiative (International Society of Human and Animal Mycology, ISHAM) dans lequel Stéphane Bretagne et Alexandre Alanio sont très impliqués. Il a abouti à l'addition de la PCR sur sérum dans les critères EORTC/MSG diagnostiques de l'aspergillose chez l'immunodéprimé<sup>9</sup>.

Peu de laboratoires ont en revanche développé un test pour le diagnostic d'histoplasmose. Ce test est réalisé à partir de prélèvement profonds (tissus pathologiques), superficiels (écouvillon cutané/buccal) et de sang prélevé sur anticoagulant. Sur les 635 prélèvements (435 patients) adressés au laboratoire pour une suspicion d'histoplasmose (dont 253 prélèvements sanguins, 62 moelles osseuses/ganglions, 153 prélèvements respiratoires, 69 prélèvements système nerveux central, 46 cutané et 52 autres de diverses origines), 43 étaient positifs correspondant à 23 patients pour lesquels le diagnostic, évoqué sur le contexte clinique, a été confirmé par l'histologie et/ou la culture dans au moins 10 cas portés à notre connaissance immédiate.

La PCR spécifique pour le diagnostic de coccidioidomycose a été réalisée chez 19 patients (24 prélèvements dont 10 sanguins, 6 respiratoires et 8 autres), et n'a été positive pour aucun d'entre eux.

<sup>9</sup> Donnelly et al. Revision and Update of the Consensus Definitions of Invasive Fungal Disease From the European Organization for Research and Treatment of Cancer and the Mycoses Study Group Education and Research Consortium. (2019) Clin Infect Dis. DOI: 10.1093/cid/ciz1008



#### ***4.5.7 Activités de séquençage***

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

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

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

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

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

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

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

Le CNRMA a utilisé le séquençage génome entier (WGS) pour investiguer des cas groupés d'infections à des pathogènes fongiques rares. Le CNRMA a ainsi réalisé en 2019 le séquençage de 108 génomes de champignons, sachant que certains séquençages ont été refaits en raison de résultats non interprétables ou pour vérification. Dans la mesure où les génomes de ces espèces ne sont pas disponibles, le CNR est obligé d'abord de définir l'échantillonnage approprié (souche type, souches historiques, souches épidémiologiquement liées et non liées) pour permettre une interprétation des données de WGS. La description de ces analyses est faite plus loin. Les séquences ne sont pas encore toutes déposées mais le seront prochainement comme nous l'avons fait dans le passé dans la base de données EMBL. Les séquences de *S. clavata* ont été déposées dans la base de données EMBL (BioProject PRJEB36345).



## 5 Activités de surveillance

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

### **Au cours de l'année 2019 :**

- Dans le cadre de la surveillance active par le biais de ses réseaux de partenaires (ODL et RESSIF), 2037 dossiers ont été enregistrés sur le site dédié. Ces déclarations correspondaient à 1164 fongémies (dont 292 dans l'ODL) et 1008 infections fongiques invasives hors fongémies.
- Dans le cadre de la surveillance passive, 68 cryptococcoses et 135 autres infections fongiques invasives (mycoses exotiques et mycoses rares) ont été déclarées sur le site.
- Le génotypage de souches a été fait par les techniques disponibles (microsatellites pour des cas groupés d'infections à *C. parapsilosis*; MLST pour des infections récurrentes à *C. neoformans* ou *C. tropicalis* chez un même patient ou pour détecter le clone résistant à la 5FC; PCR temps réel pour les isolats de *S. clavata*), et par séquençage du génome entier pour des cas groupés d'infection à *Saprochaete clavata* et pour les isolats de *Candida auris*.

### 5.1 Description du réseau de partenaires

La surveillance utilise trois types de réseaux de partenaires :

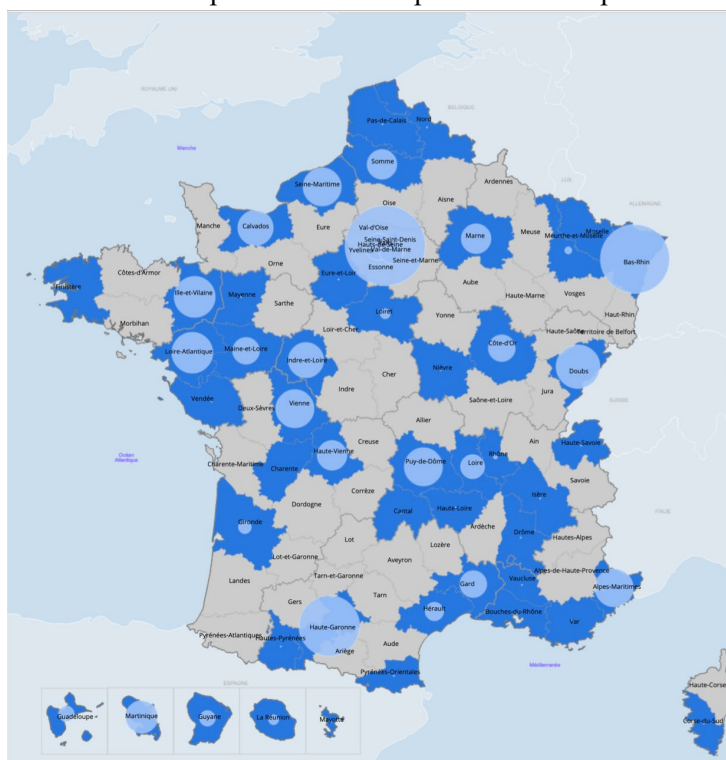
- L'Observatoire des Levures (ODL), mis en place en 2002, fait appel à un réseau de mycologues/microbiologistes de tous les hôpitaux de court séjour de l'AP-HP et quelques hôpitaux de la périphérie en Ile-de-France. Pendant 8 ans, le réseau a fonctionné avec 27 centres participants. Les restructurations et quelques défections font que l'ODL fonctionne actuellement (année 17) avec 15 centres actifs<sup>10</sup>. Ces centres déclarent de façon exhaustive toutes leurs fongémies à levures et envoient les isolats correspondants quelle que soit l'espèce isolée.
- Le RESeau de Surveillance des Infections Fongiques (RESSIF) a été mis en place en 2012 à l'occasion du renouvellement du mandat du CNRMA et de l'extension de ses missions. Il comprenait, en 2012, 13 centres collaborateurs du CNRMA (CC-CNRMA). Après un appel à volontaires parmi tous les correspondants hospitaliers du CNRMA en 2013, puis à l'occasion de la préparation du nouveau mandat en 2016, RESSIF compte maintenant 29 CC-CNRMA<sup>11</sup>. La particularité de RESSIF est de s'appuyer sur une charte de fonctionnement, signée par tous les partenaires et définissant le rôle de chacun et ses engagements. RESSIF permettra de déterminer avec plus de précision l'incidence de certaines mycoses invasives et d'obtenir des données sur la pneumocystose qu'il serait difficile de chiffrer par le biais d'une surveillance passive. Les CC-CNRMA envoient tous les isolats correspondants aux espèces non fréquentes (donc toutes, sauf *A. fumigatus*, *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. krusei*, *C. kefyr*) à moins que l'isolat n'ait un profil anormal de

<sup>10</sup> Liste des Centres participants à l'ODL par ordre alphabétique des villes, les référents mycologues étant indiqués entre parenthèses : Bobigny - **hôpital Avicenne** (Sophie Brun), Bondy - **hôpital Jean Verdier** (Isabelle Poilane), Boulogne - **hôpital Ambroise Paré** (Anne-Laure Roux), Créteil - **hôpital Henri Mondor** (Françoise Botterel), Garches - **hôpital Raymond Poincaré** (Anne-Laure Roux), Kremlin-Bicêtre - **hôpital du Kremlin Bicêtre** (Adela Angouvant), Paris - **hôpital Cochin** (André Paugam), **hôpital Necker-Enfants Malades** (Marie-Elisabeth Bougnoux), **hôpital Bichat** (Sandrine Houzé), **hôpital Saint-Louis** (Stéphane Bretagne), **hôpital Robert Debré** (Patricia Marianni), **hôpital Lariboisière** (Stéphane Bretagne), **LeChesnay-CH de Versailles** (Odile Eloy), Villejuif - **hôpital Paul Brousse** (Adela Angouvant) et **Institut Gustave Roussy** (Elisabeth Chachaty).

<sup>11</sup> Liste des CC-CNRMA ayant déclaré en 2019, par ordre alphabétique des villes, les référents mycologues étant indiqués entre parenthèses : **Amiens** (Taieb Chouaki, Anne Totet), **Angers** (Jean-Philippe Bouchara), **Besançon** (Laurence Millon), **Caen** (Julie Bonhomme), **Cayenne** (Magalie Demar), **Clermont-Ferrand** (Philippe Poirier), **Dijon** (Frédéric Dalle), **Fort-de-France** (Nicole Desbois), **Limoges** (Bernard Bouteille), **Nice** (Martine Gari-Toussaint, Lilia Hasseine), **Nîmes** (Mylène Sasso), **Paris - hôpital Cochin** (André Paugam), **Paris - hôpital Saint-Louis** (Stéphane Bretagne), **Paris - hôpital des Quinze-Vingt** (Lilia Merabet), **Paris - hôpital Necker-Enfants Malades** (Marie-Elisabeth Bougnoux), **Paris - hôpital Robert Debré** (Patricia Mariani), **Poitiers** (Estelle Perraud-Cateau), **Pointe-à-Pitre** (Muriel Nicolas), **Reims** (Dominique Toubas), **Rennes** (Jean-Pierre Gangneux), **Rouen** (Loïc Favennec), **Saint-Etienne** (Hélène Raberin), **Strasbourg** (Valérie Bru), **Toulouse** (Sophie Cassaing), **Tours** (Jacques Chandenier, Guillaume Desoubeaux), **Versailles** (Odile Eloy), Villejuif **Institut Gustave Roussy** (Elisabeth Chachaty).

sensibilité aux antifongiques. Le CNRMA reçoit donc un isolat dans environ 25% des cas, mais souvent de façon décalée par rapport à l'isolement dans le centre, sans impact donc sur la prise en charge du patient.

- Enfin, les collègues mycologues, microbiologistes et cliniciens qui ne font pas partie des deux réseaux précédents, contribuent, par des déclarations occasionnelles, à la surveillance de certaines infections fongiques invasives rares, en particulier la cryptococcose, mais aussi les mucormycoses, fusarioses ou mycoses endémiques. Les correspondants envoient alors les souches pour expertise. Ces déclarations sont utiles pour augmenter la couverture de la surveillance et caractériser des souches d'espèces rares. Le nombre de centres ayant déclaré au moins une cryptococcose depuis 1985 s'élevait à 204 en mars 2020 (1-220 cas/centres dans 80 départements métropolitains et 5 départements ultramarins).



**Figure 11 : Répartition des déclarations à travers le portail dédié (MAJ mars 2020)**

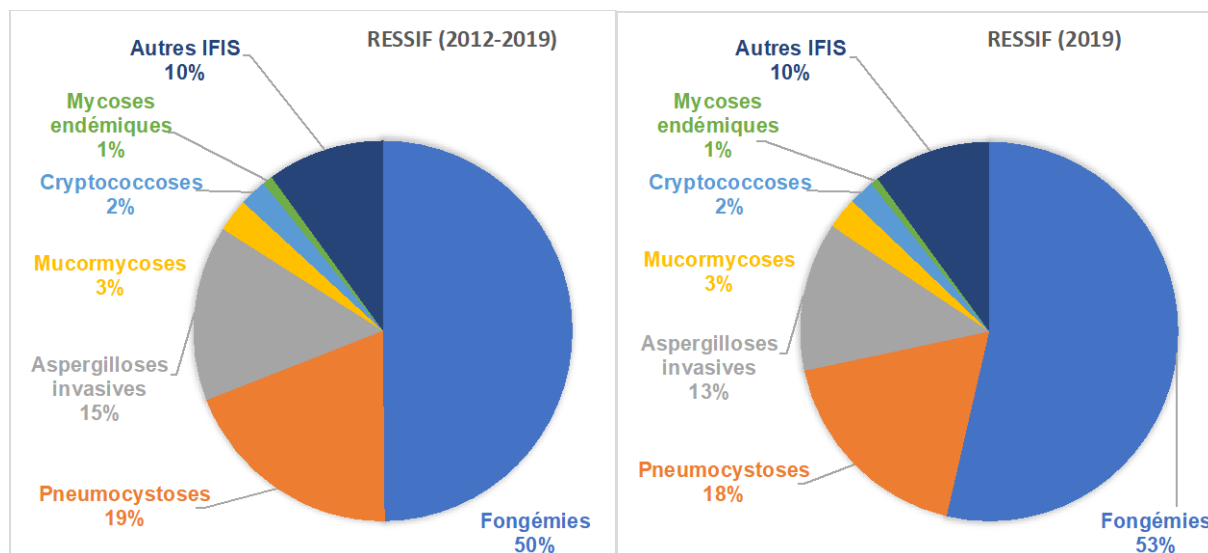
Les cercles sont proportionnels au nombre de cas déclarés par un ou plusieurs centres situés dans les départements colorés en bleu sur la carte.

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

Tout professionnel de santé (microbiologiste ou clinicien) souhaitant participer à la surveillance des mycoses invasives peut adresser un mail à [cnrma@pasteur.fr](mailto:cnrma@pasteur.fr) en demandant l'ouverture d'un compte. Au 20 février 2020, 846 déclarations avaient été faites sur la fiche simplifiée (dont 402 au titre de l'ODL) et 12898 sur la fiche complète dont 106 IFI classées possibles et 456 supplémentaires concernant des cas hors surveillance de RESSIF (par exemple les péritonites post-opératoires ou les sinusites non invasives). Ceci portait à 75 les déclarations hors surveillance RESSIF en 2019. À ce jour, 74 centres hospitaliers répartis dans 51 départements et 13/14 régions ont utilisé le portail de déclaration en ligne (**Figure 11**).

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

En 2019, 1469 épisodes d'IFI prouvées ou probables ont été déclarés dans le cadre de RESSIF, et à ce jour, 82% des souches correspondantes ont été adressées au CNRMA. Ceci porte à 12353 le nombre d'IFI répertoriées dans la base RESSIF pendant les 8 premières années du réseau avec près de 97% des souches correspondantes reçues au CNRMA. On peut remarquer que la distribution des IFIs pour l'année 2019 n'est pas très différente de celle des années précédentes (**Figure 12**).



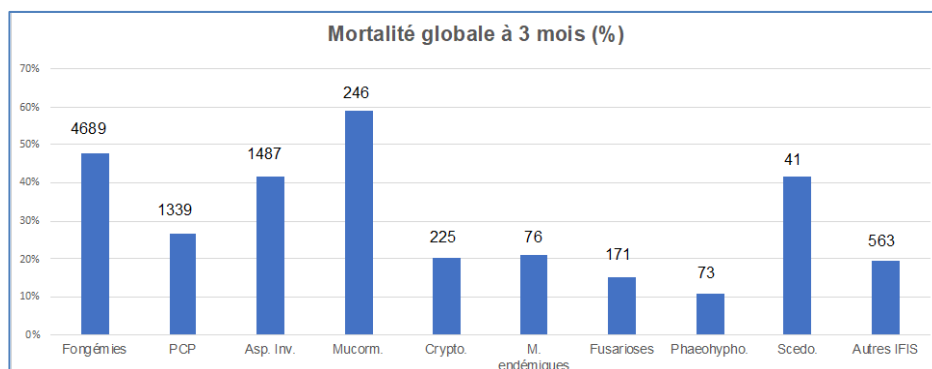
**Figure 12 : Répartition des principales IFI répertoriées dans RESSIF**

12 353 IFIs ont notifiées entre 2012 et 2019, et 1469 en 2019

Nous analyserons succinctement les données globales sur les 8 premières années de RESSIF. Près d'un tiers des patients était hospitalisé en réanimation au moment du diagnostic d'IFI (31%) et plus d'un sur 10 était en chirurgie (11%). Globalement, la proportion d'hommes était toujours plus élevée que celle des femmes avec un ratio H/F de 1,6/1. Les principaux facteurs de risque pour les 11485 patients concernés par ces 12353 IFIs se répartissaient en pathologies malignes (42,3%), transplantation d'organes solides (7,9%), infection par le VIH (4,3%), chirurgie récente (18,4%), autres facteurs favorisants (24,7% maladies systémiques, diabète, traitement corticoïdes, traumatisme, ...). Rarement, aucune cause n'est retrouvée (1,3%). L'âge médian était de 62 ans (extrêmes 0-100 ans).

Dans 5,6% des cas, les infections sont dues à plusieurs espèces dans un même site anatomique, qu'il s'agisse d'une fongémie avec deux espèces de levures, ou de l'association d'une aspergillose pulmonaire et d'une pneumocystose. L'épisode déclaré peut aussi être, soit la récurrence d'une infection antérieure (2,1%), soit un nouvel épisode (4,5%) dû à un nouveau pathogène dans le même site ou dans un site différent (aspergillose pulmonaire et fongémie), ou au même pathogène dans un nouveau site (fongémie suivie d'une arthrite par exemple).

L'évolution à 3 mois était très variable selon les IFI (**Figure 13**), le pronostic le plus péjoratif étant associé aux mucormycoses avec une mortalité globale de l'ordre de 58%.



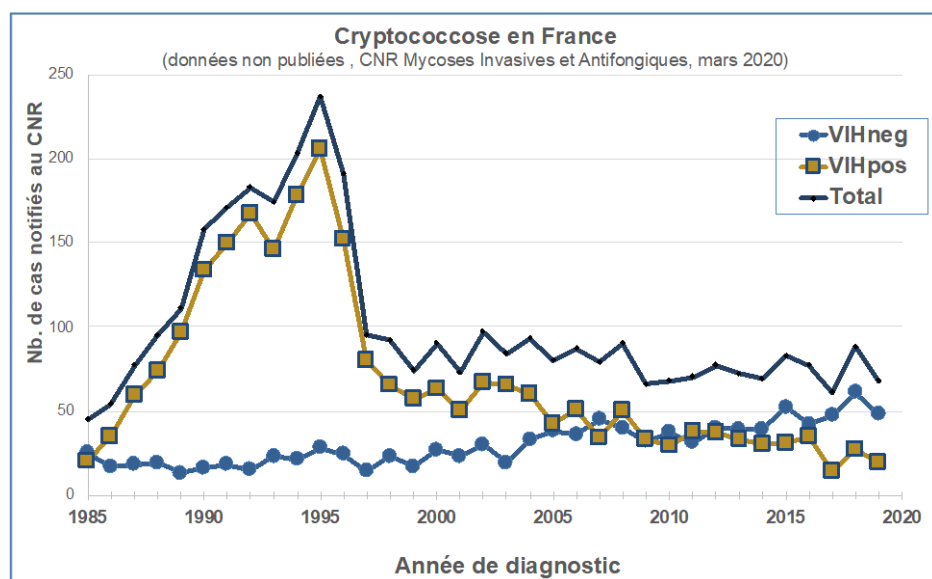
**Figure 13 : Mortalité globale à 3 mois en fonction des IFI diagnostiquée**

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

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

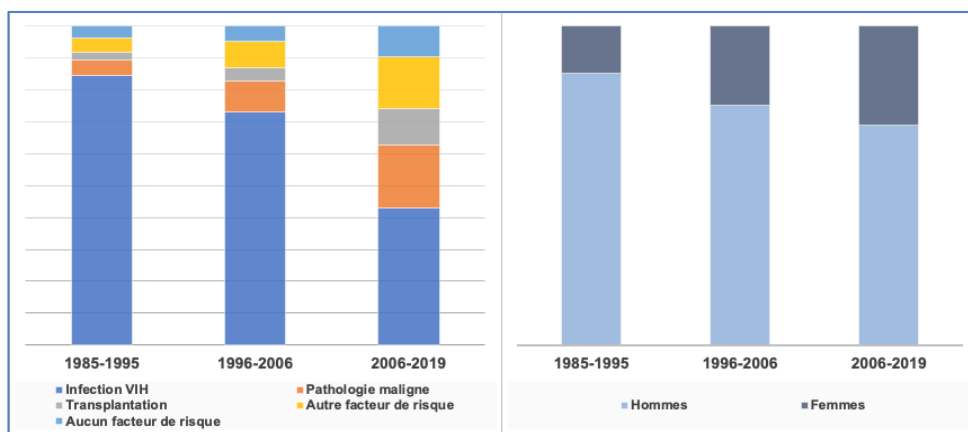
### 5.2.1 Cryptococcoses

Au moment du bilan (4 mars 2020), 3535 cas de cryptococcose ont été enregistrés dans RESOMYC, avec pour l'année 2019, 68 cas enregistrés contre 79 à la même époque l'an dernier. C'est la deuxième année consécutive de baisse importante chez les patients séropositifs (**Figure 14**).



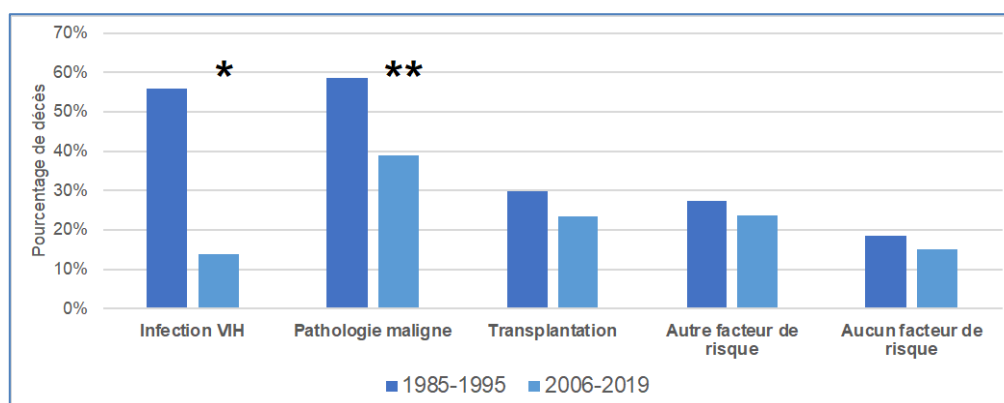
**Figure 14 : Évolution des cryptococcoses déclarées en France (1985-2018)**

Nous avons analysé les facteurs de risque en fonction de 5 grandes catégories (infection VIH, pathologie malignes, transplantation d'organe solide, autre facteur de risque, et aucun facteur de risque identifié) et sur trois périodes « 1985-1995 », « 1996-2006 » et « 2007-2019 ». L'épidémiologie de la cryptococcose en France évolue significativement au cours de ces trois périodes avec, à chaque fois, un doublement des cas diagnostiqués dans chacune des catégories chez les patients séronégatifs pour le VIH et à l'inverse une diminution d'un facteur 2 chez les patients séropositifs pour le VIH (**Figure 15**,  $p < 0,0001$ ). La proportion de femmes a augmenté en parallèle ( $p < 0,0001$ ). La proportion de patients originaires du continent africain diffère significativement entre patients VIH-négatif et VIH-positif dans la dernière période (15,0% vs. 42,3%,  $p < 0,001$ ) alors qu'elle était équivalente dans la première période (11,5% vs. 15,6%, NS).



**Figure 15 : Caractéristiques des patients atteints de cryptococcose en France**  
Principaux facteurs de risque et répartition hommes/femmes selon la période de diagnostic chez les patients ayant une cryptococcose en France (1985 -2019)

Si l'on compare la première et la troisième période, le pourcentage de patients ayant une méningoencéphalite n'a pas beaucoup évolué dans les différentes catégories. Si l'on considère seulement les patients avec méningoencéphalite, la mortalité globale à 3 mois a chuté chez les patients séropositifs et les patients d'hématologie, mais pas dans les autres catégories suggérant une prise en charge différente et/ou un retard de diagnostic (**Figure 16**). Globalement, pendant la période récente (2006-2019), la mortalité à 3 mois reste significativement plus élevée chez les patients séronégatifs en comparaison des patients séropositifs (27,3% vs. 14,3%,  $p < 0,0001$ ).



**Figure 16 : Mortalité à 3 mois au cours de la cryptococcose**  
Comparaison selon le facteur de risque et la période de diagnostic

### 5.2.2 Fongémies

Nous ne ferons pas de bilan spécifique de l'ODL car nous venons d'analyser les fongémies en hématologie<sup>12</sup> et les levures rares<sup>13</sup>, et nous sommes en train de finaliser l'analyse des tendances sur la période 2004-2017. Contrairement à l'ODL où seules les fongémies à levures sont colligées, dans RESSIF, tout champignon isolé du sang est répertorié. On compte ainsi au moment du bilan, 6378 épisodes avec hémocultures positives comprenant 6283 levures, 24 champignons dimorphiques et 71 filamenteux. La grande majorité des patients (95,6%) n'a fait qu'un épisode de fongémie, mais 204 patients (3,6%) en ont fait deux et 28 plus de deux (3 épisodes pour 20 patients, 4 épisodes pour 3 patients, plus de 4 pour 8 patients). Nous rappelons ici que la mortalité globale à 3 mois est de 47,5% en moyenne.

<sup>12</sup> Lortholary O, et al (2017) The risk and clinical outcome of candidemia depending on underlying malignancy. *Intensive Care Med* 38(Suppl 7):311–662.

<sup>13</sup> Bretagne S, et al (2017) Predisposing factors and outcome of uncommon yeast species-related fungaemia based on an exhaustive surveillance programme (2002-14). *J Antimicrob Chemother.* doi:10.1093/jac/dkx045.

Dans 110 cas, un épisode d'IFI avait été diagnostiqué avant la fongémie dans un délai médian de 21 jours (extrêmes de 0 à 2431 jours). Dans 264 cas, la fongémie impliquait deux espèces, essentiellement (96%) des levures ascomycètes.

Parmi les levures, 2,9% (n=186) étaient des basidiomycètes (107 *Cr. neoformans*, 35 *Rhodotorula mucilaginosa*, 27 *Trichosporon* spp. et 13 *Malassezia* spp.). Parmi les 6096 levures ascomycètes, les principales étaient, comme dans l'observatoire des levures *C. albicans* (50,5%), *C. glabrata* (17,2%), *C. parapsilosis* (12,4%), *C. tropicalis* (7,3%), *C. krusei* (3,2%), *C. kefyr* (1,7%) et *Cl. lusitaniae* (2,0%). Des espèces très rarement isolées en pathologie humaine ont été identifiées (*Candida homilentoma*, *Candida sorbosivorans*, *Candida theae*, *Candida rugosa*, *Debaryomyces fabryi*, *Cyberlindnera fabianii*, ...). A noter qu'aucune fongémie à *C. auris* n'a été déclarée dans le cadre de RESSIF ou de l'ODL, mais en revanche nous avons répertorié des fongémies dues à des isolats du complexe *haemulonii* (*C. haemulonii* et *C. duobushaemulonii*) dans le cadre de RESSIF.

Quelques diagnostics de mycoses endémiques ont été faits ou confirmés par des hémocultures positives (24 *Histoplasma capsulatum* var. *capsulatum*, et 1 *Talaromyces (Penicillium) marneffeii*).

Enfin, 71 infections dues à des champignons filamenteux ont été associées à des hémocultures positives et en particulier 33 infections à *Fusarium* spp. 5 *Mucorales*, et 33 espèces variées.

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

Tableau 5 : Principales caractéristiques des fongémies

	Levures		Dimorphiques (n=24)	Filamenteux (n=71)
	Ascomycètes (n= 6097)	Basidiomycètes (n = 186)		
<b>Sex ratio H/F</b>	1,6 / 1	2,3 / 1	4.3 / 1	1,5 / 1
<b>Age médian [extrêmes]</b>	64 [0 – 99]	52 [0 – 99]	43 [2 – 70]	59 [0 - 81]
<b>Facteurs de risque</b>				
<b>Pathologie maligne</b>	37,4%	33,9%	4,4%	75,4%
<b>Chirurgie récente</b>	32,1%	8,5%	-	4,6%
<b>Transplantation d'organe</b>	3,3%	8,5%	-	4,6%
<b>Infection VIH</b>	0,2%	23,2%	91,3%	-
<b>Autres</b>	26,6%	24,3%	-	15,4%
<b>Aucun</b>	0,4%	1,7%	4,4	-
<b>Tt corticoïde prolongé</b>	10,8%	16,6%	4,2%	23,9%
<b>Mortalité globale à 3 mois (évolution connue pour 85% des patients)</b>	47,8%	34,9%	31,8%	55,4%

Aucune tendance n'est décelable au cours du temps ou en fonction des régions.

### 5.2.3 Pneumocystoses

Depuis 2012, 2367 cas de pneumocystose ont été répertoriés dans RESSIF chez 2326 patients (31 récurrences survenant dans un délai médian de 428 jours ± 611). Il s'agissait majoritairement d'hommes (64,6%) adultes (63±17 ans) avec seulement 2,0% d'enfants (**Tableau 6**). Les patients étaient infectés par le VIH dans 18,9% des cas seulement. Les conditions prédisposantes pour les patients séronégatifs se répartissaient entre pathologies malignes (57,3%), transplantation d'organe (18,8%) et autres pathologies (23,0,5%). A noter que dans un certain nombre de cas, la pneumocystose était diagnostiquée en même temps qu'une autre IFI [aspergillose pulmonaire (n=56), cryptococcose (n=11), mucormycose et scedosporiose (n=1 chacune)]. Les co-infections aspergilloso-pneumocystoses sont en cours d'analyse par l'un des CC-CNRMA (Rennes, F. Robert-Gangneux) en collaboration avec le CNRMA.

L'examen direct était positif dans 42,5% et la PCR dans 86,1 % des cas en moyenne avec des variations

significatives selon le terrain ( $p < 0,0001$ ). Le diagnostic était établi par la seule PCR dans 66,6% des cas (examen direct négatif) et par le seul examen direct dans 32,4% des cas.

Le diagnostic des pneumocystoses continue à poser des problèmes en l'absence de consensus sur les critères. Ici, nous avons classé les épisodes de PCP en infections prouvées (microscopie positive - 55,3%), infections probables (microscopie négative et PCR positive avec un  $Cq \leq 30$  - 30,0%) et infections possibles pour les autres cas (14,7%), avec des différences significatives selon le terrain ( $p < 0,0001$ ).

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

**Tableau 6 : Caractéristiques des pneumocystoses prouvées et probables répertoriées dans RESSIF**

	VIH	Transplantation d'organe	Pathologie maligne	Autre
<b>Sex ratio H/F</b>	2,9 / 1	1,8 / 1	1,7 / 1	1,4 / 1
<b>Age médian [extrêmes]</b>	48 [2 – 79]	63 [2 – 88]	66 [1 – 93]	65 [1 – 97]
<b>Moyens diagnostiques</b>				
<b>Ex. direct positif</b>	74,7%	51,0%	33,8%	34,0%
<b>PCR positive</b>	73,7%	82,6%	88,5%	92,1%
<b>Type d'infection</b>				
<b>Prouvée</b>	71,0%	57,6%	47,4%	45,7%
<b>Probable</b>	19,4%	31,2%	38,9%	37,7%
<b>Mortalité globale à 3 mois</b>	6,7%	16,5%	35,0%	31,7%

#### 5.2.4 Mucormycoses

Pour les 348 cas de mucormycoses rapportés dans RESSIF (63,1% d'hommes, âge médian de 59 ans, 13 enfants), les principaux facteurs de risque se répartissaient en pathologie maligne (63,2%), diabète (7,5%), transplantation (8,3%), et traumatisme/brûlures étendues (11,8%). L'infection invasive était prouvée dans 54,3% des cas. Une infection simultanée par un autre pathogène dans le même site était diagnostiquée pour 75 patients (*Aspergillus* spp. dans 74,5% des cas). Dans 47,9% des cas en moyenne, l'épisode de mucormycose survenait alors que le patient était sous antifongiques, plus fréquemment chez les patients d'hématologie (60,1%) que les autres (25,4%,  $p < 0,001$ ). Les localisations différaient selon le facteur de risque sous-jacent ( $p < 0,001$ ), avec dans la majorité des cas (51,5%) une atteinte pulmonaire, mais aussi ORL (16,8%) et cutanée (16,1%) (**Tableau 7**).

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

	Hémopathies malignes (n = 220)	Transplantation d'organe (n = 29)	Diabète (n = 26)	Brûlures étendues – traumatisme (n = 41)
<b>Sex ratio</b>	1,8 / 1	2,7 / 1	4,2 / 1	2,1 / 1
<b>Age médian [extrêmes]</b>	60 [3 – 84]	58 [8 – 77]	63 [16 – 83]	46 [18 – 82]
<b>Localisation</b>				
<b>Pulmonaire</b>	71,5%	69,2%	33,3%	12,8%
<b>ORL</b>	17,7%	19,2%	58,3%	2,6%
<b>Ostéoarticulaire</b>	-	-	8,3%	18,0%
<b>Cutanées</b>	10,8%	11,5%	-	66,7%
<b>IFI prouvée</b>	47,3%	59,2%	76,90%	80,5%
<b>Moyens diagnostiques</b>				
<b>Isolement en culture</b>	54,1%	82,8%	76,9%	97,6%
<b>Histologie</b>	53,6%	69,0%	96,2%	75,6%
<b>PCR diagnostique</b>	61,8%	37,9%	46,2%	34,2%
<b>Mortalité globale à 3 mois</b>	69,0%	56,0%	45,5%	34,4%

Le diagnostic avait été fait par culture (64,8%), histologie/examen direct (60,3%) et/ou PCR (54,9%). L'identification polyphasique systématique des isolats permet de mettre en évidence une diversité



impressionnante en termes de genres et espèces avec 6 espèces représentant 84,3% du total. On constate des différences de répartition des espèces selon le terrain sous-jacent (**Figure 17**), rendant intéressante l'identification précise des espèces en cause, et ceci d'autant plus que la mortalité associée semble différer selon les espèces, potentiellement en rapport avec la pathologie en cause et la localisation de l'infection.

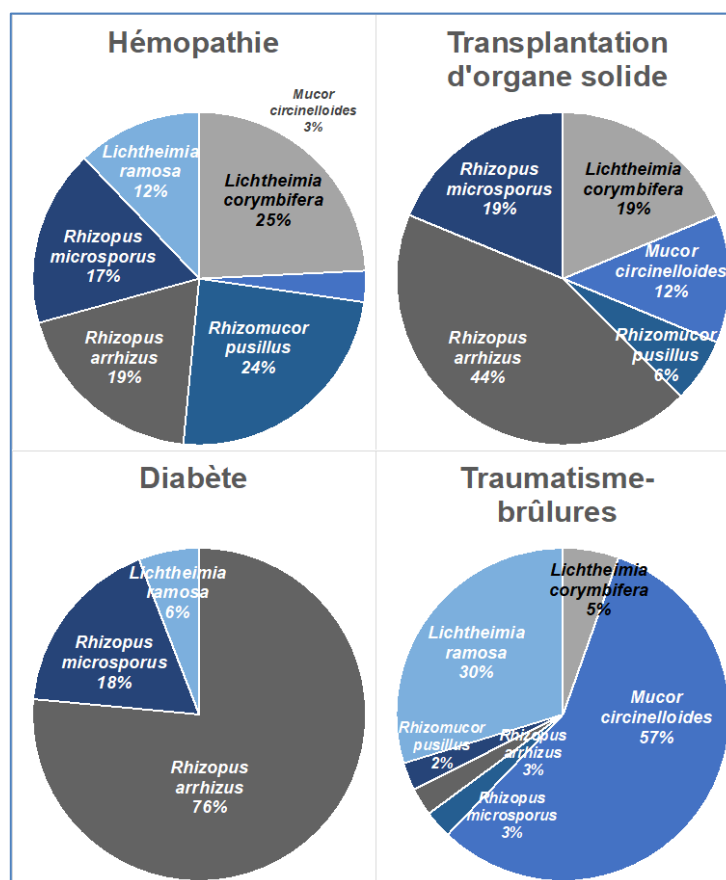


Figure 17 : Répartition des 6 principales de *Mucorales* en fonction du terrain

### 5.2.5 Aspergilloses

De 2012 à 2018, 1889 cas d'AI ont été répertoriés dans RESSIF, dont 82,7% d'infections probables et 16,3% d'infections prouvées. L'âge médian des 1862 patients était de 60 ans [0-91 ans] avec 2,9% d'enfant et une majorité d'hommes (63,4%). Dans 37 cas (2%), il s'agissait d'un deuxième épisode lié à une nouvelle espèce ou d'une récurrence.

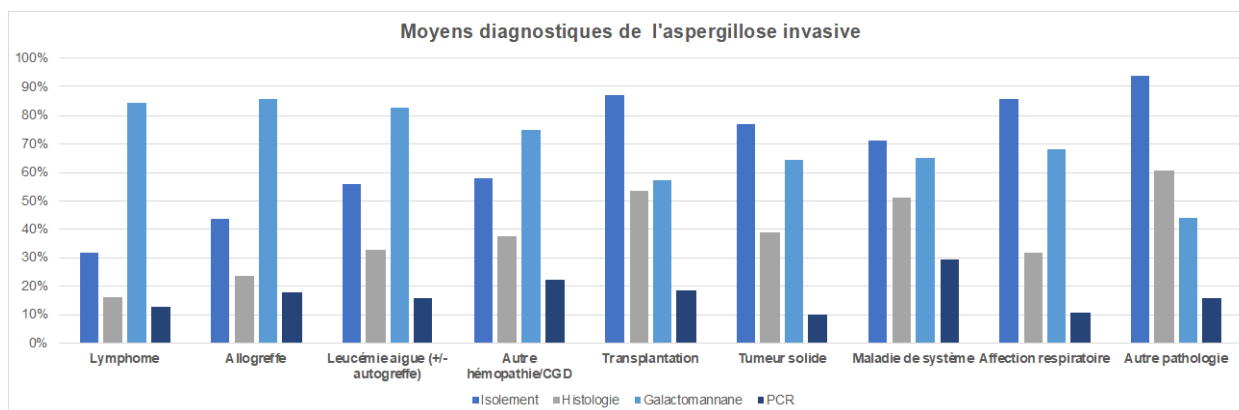
Dans près de 10% des cas, le site anatomique était infecté par 2 pathogènes, le plus souvent par deux espèces d'*Aspergillus* (n=48), mais pouvaient être associés à l'*Aspergillus*, une mucorale (n=57), *Pneumocystis jirovecii* (n=53), un *Fusarium* spp. (n=10) ou d'autres filamenteux (n=12). Dans 19 cas supplémentaires, une candidémie concomitante à l'aspergillose était diagnostiquée.

Nous avons analysé les facteurs de risque en utilisant les catégories que nous avons utilisées pour l'analyse de SAIF<sup>14</sup> : lymphomes (24,8%), allogreffes quel qu'en soit le motif (16,8%), leucémies aiguës ± autogreffe (11,9%), autres hémopathies et déficits immunitaires congénitaux (11,7%), transplantations d'organes (11,8%), cancers (6,7%), pathologies respiratoires chroniques (2,1%), maladies de système (3,5%) et diverses pathologies autres (10,6%). Près d'un tiers des patients globalement (31,2%) avaient un traitement antifongique au moment du diagnostic de l'aspergillose (39% des patients ayant un lymphome, et 52% des

<sup>14</sup> Lortholary O, et al (2011) Epidemiological trends in invasive aspergillosis in France: the SAIF network (2005-2007). *Clin Microbiol Infect* 17:1882-1889.

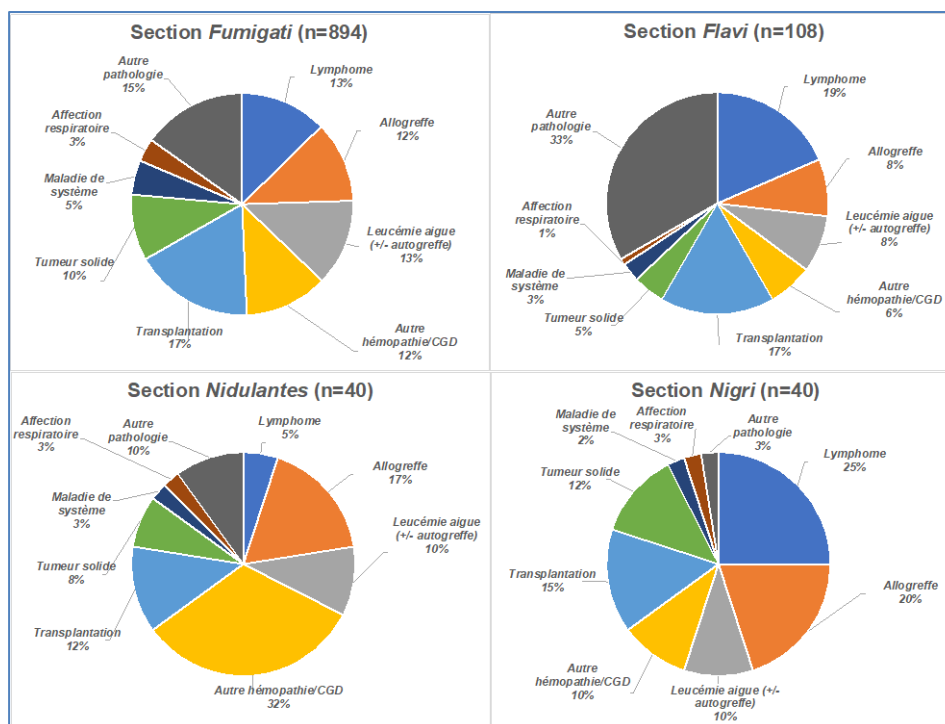
patients ayant eu une allogreffe).

Il faut garder en mémoire que les critères de diagnostic de l'AI imposent des critères d'hôte que ne remplissent pas nécessairement les patients ayant des pathologies respiratoires chroniques par exemple. Les modalités du diagnostic variaient considérablement selon le terrain sous-jacent (**Figure 18**) sauf la PCR qui est globalement utilisée en moyenne dans 20% des cas (15-29%).



**Figure 18 : Éléments contribuant au diagnostic de l'aspergillose invasive**

Lorsqu'un *Aspergillus* est isolé, l'espèce en cause était *Aspergillus fumigatus* dans plus de deux tiers des cas (78,0%), et globalement, l'isolat appartenait dans 78,8% des cas à la section *Fumigati*, et plus rarement aux sections *Flavi* (9,8%), *Nigri* ou *Nidulantes* (3,4%), ou *Terrei* (2,6%). Cette distribution changeait ( $p=0,010$ ) si le patient avait reçu des antifongiques antérieurement, avec un peu moins d'isolats de la section *Fumigati* (73,5% vs. 80,9%) et davantage de section *Nidulantes* (4,6% vs. 3,0%), ou *Nigri* (5,7% vs. 2,5%). Il y avait dans ce contexte davantage d'*A. calidoustus* (2,8% vs. 0,7%,  $p=0,005$ ). La distribution changeait aussi en fonction du terrain sous-jacent (**Figure 19**). Des données complémentaires sont nécessaires pour savoir s'il s'agit d'une réelle différence ou d'un simple biais d'interprétation des résultats de la culture.



**Figure 19 : Pathologies sous-jacentes selon l'espèce d'*Aspergillus* impliquée**

En analysant l'évolution globale pour les 1669 patients pour lesquels elle était rapportée, la mortalité globale était de 43,3% à 3 mois. Elle était significativement plus élevée pour les 626 patients infectés par un isolat appartenant à la section *Fumigati* (48,9% vs. 38,5%,  $p=0,013$ ), et plus faible en cas d'infection par une espèce de la section *Nigri* ( $n=35$  - 22,9%). L'évolution, connue pour 11 des 13 patients infectés par *A. calidoustus*, était fatale dans près de 82% des cas dans un délai médian de 5 jours [0-68 j]. L'évolution variait aussi significativement en fonction du facteur de risque ( $p<0,0001$ ) avec une mortalité globale allant de 63,9% en cas de pathologie respiratoire chronique ( $n=36$ ) à 34% chez les patients atteints de lymphomes ( $n=412$ ).

### 5.2.6 Fusarioses

Nous avons actuellement répertorié 288 cas d'infection à *Fusarium* spp. dont 56,6% sont des infections prouvées, et 61,1% des infections oculaires. Cette dernière localisation est associée à des traumatismes par corps étrangers et en particulier des lentilles de contact, ce qui explique la prédominance féminine (seulement 35,2% d'hommes) et l'âge médian plus jeune (37,5 ans [17-80]). Les autres localisations étaient des localisations ostéo-articulaires et/ou cutanées (17,7%), majoritairement liées à des traumatismes locaux et/ou brûlures étendues (64,1%) mais survenant aussi dans un contexte d'immunosuppression (27,5%). Une immunosuppression (hémopathie, transplantation d'organe solide, autres déficits immunitaires) accompagnait les autres tableaux cliniques dans 82,5% des cas. Ces autres localisations incluent des fongémies (52,6%), localisation pulmonaires (33,3%) et ORL (7,0%). Une prescription antifongique antérieure était notée pour 16,2% des patients, plus fréquemment dans un contexte hématologique (53,9% des patients) que dans les autres situations ( $p<0,0001$ ). La mortalité était de 42,3% en cas de fongémies, de 37,9% en hématologie et de 20,5% dans les cas de traumatisme loco-régional (incluant les brûlures étendues).

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

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

Dans la mesure où les seuils de résistance n'ont été définis pour cette technique que pour quelques antifongiques et sur les espèces communes, nous présenterons les résultats en termes de CMI<sub>50</sub> et de CMI<sub>90</sub>, c'est-à-dire, les concentrations correspondant aux concentrations minimales de l'antifongique inhibant respectivement 50% et 90% des isolats de l'espèce concernée. Soulignons cependant que depuis notre étude publiée en 2008<sup>15</sup>, nous recherchons systématiquement une mutation dans le(s) gène(s) *Fks* lorsque la CMI de la caspofungine est  $\geq 0,5$  mg/L en AM3 (sauf pour les isolats de *C. parapsilosis* et les espèces basidiomycètes intrinsèquement résistantes aux échinocandines). En pratique, nous interprétons donc les résultats des CMI en fonction du profil de sensibilité obtenu pour les isolats de la même espèce testés dans les mêmes conditions au CNRMA, en sachant que cette interprétation est d'autant plus fiable que le nombre d'isolats déjà testés est grand. Pour améliorer la lisibilité de ce rapport, nous avons choisi de présenter les données cumulées des profils de CMI obtenus depuis 2003 pour les levures et les champignons filamenteux séparément.

---

<sup>15</sup> Desnos-Ollivier M, et al (2008) Mutations in the *fks1* gene in *Candida albicans*, *C. tropicalis*, and *C. krusei* correlate with elevated caspofungin MICs uncovered in AM3 medium using the method of the European Committee on Antibiotic Susceptibility Testing. *Antimicrob Agents Chemother* 52:3092-3098.

### 5.3.1 Définitions utilisées pour exprimer la résistance

Nous retranscrivons ici les seuils établis par le comité EUCAST<sup>16</sup> pour *Candida* et *Cryptococcus* spp. (Tableau 8) et *Aspergillus* spp. (Tableau 9), sachant que, pour la caspofungine et la micafungine, nous avons modifié la technique en utilisant le milieu AM3 au lieu du milieu RPMI, et établi qu'une CMI de la caspofungine au-dessus de 0,25 mg/L pour une espèce de *Candida* autre que celles du complexe *C. parapsilosis/orthopsilosis/metapsilosis*, était habituellement associée à une mutation dans le hot spot d'un ou plusieurs gènes *Fks*.

Tableau 8 : Seuils cliniques EUCAST pour *Candida* and *Cryptococcus* spp.

**Candida and Cryptococcus spp.** EUCAST Antifungal Clinical Breakpoint Table v. 10.0 valid from 2020-02-04

MIC method (EUCAST standardised broth microdilution method)  
 Medium: RPMI1640-2% glucose, MOPS buffer  
 Inoculum: Final 0.5x10<sup>8</sup> – 2.5x10<sup>7</sup> cfu/mL  
 Incubation: 18-24h  
 Reading: Spectrophotometric, complete (>90%) inhibition for amphotericin B but 50% growth inhibition for other compounds  
 Quality control: *C. parapsilosis* ATCC 22019 or *C. krusei* ATCC 6258

Antifungal agent	MIC breakpoint (mg/L)																		Comments on the I category	Comments on the ATU		
	<i>Candida albicans</i>		<i>Candida dubliniensis</i>		<i>Candida glabrata</i>		<i>Candida krusei</i>		<i>Candida parapsilosis</i>		<i>Candida tropicalis</i>		<i>Candida guilliermondii</i>		<i>Cryptococcus neoformans</i>		Non-species related breakpoints for <i>Candida</i> <sup>1</sup>					
	S ≤	R >	S ≤	R >	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	1	1	IE	IE	1	1	IE	IE	No data to support an I category according to the new definitions	
Anidulafungin	0.03	0.03			0.06	0.06	0.06	0.06	4	4	0.06	0.06	IE <sup>2</sup>	IE <sup>2</sup>	-	-	IE	IE				
Caspofungin	Note <sup>3</sup>	Note <sup>3</sup>			Note <sup>3</sup>	Note <sup>3</sup>	Note <sup>3</sup>	Note <sup>3</sup>	Note <sup>3</sup>	Note <sup>3</sup>	Note <sup>3</sup>	Note <sup>3</sup>	IE <sup>2</sup>	IE <sup>2</sup>	-	-	IE	IE				
Fluconazole	2	4			2	4	0.001 <sup>4</sup>	16	-	-	2	4	2	4	IE <sup>2</sup>	IE <sup>2</sup>	IE	IE	2	4	See dosages table for appropriate dose	
Isavuconazole	IE	IE			IE	IE	IE	IE	IE	IE	IE	IE	IE	IE	IE	IE	IE	IE	IE	IE		
Itraconazole	0.06	0.06			0.06	0.06	IE <sup>2</sup>	IE <sup>2</sup>	IE <sup>2</sup>	IE <sup>2</sup>	0.125	0.125	0.125	0.125	IE <sup>2</sup>	IE <sup>2</sup>	IE	IE	IE	IE		
Micafungin																						
	0.016	0.016	0.03					0.03	0.03	IE <sup>5</sup>	IE <sup>5</sup>	2	2	IE <sup>5</sup>	IE <sup>5</sup>	IE <sup>5</sup>	IE <sup>5</sup>	IE <sup>5</sup>	IE <sup>5</sup>		If S to anidulafungin, report as S and add the following comment: "isolates susceptible to anidulafungin with micafungin MIC of 0.03 mg/L do not harbour an <i>fks</i> mutation conferring resistance to the echinocandins". If not S to anidulafungin, report as R and refer to reference laboratory for <i>fks</i> sequencing and confirmation of MICs.	
Posaconazole	0.06	0.06			0.06	0.06	IE <sup>2</sup>	IE <sup>2</sup>	IE <sup>2</sup>	IE <sup>2</sup>	0.06	0.06	0.06	0.06	IE <sup>2</sup>	IE <sup>2</sup>	IE	IE	IE	IE		
Voriconazole <sup>6</sup>	0.06 <sup>7</sup>	0.25 <sup>7</sup>			0.06 <sup>7</sup>	0.25 <sup>7</sup>	IE	IE	IE	IE	0.125 <sup>7</sup>	0.25 <sup>7</sup>	0.125 <sup>7</sup>	0.25 <sup>7</sup>	IE <sup>2</sup>	IE <sup>2</sup>	IE	IE	IE	IE	4 mg/kg iv twice daily	

#### Notes

1. Non-species related breakpoints have been determined mainly on the basis of PK/PD data and are independent of MIC distributions of specific *Candida* species. They are for use only for organisms that do not have specific breakpoints.
2. The ECOFFs for these species are in general higher than for *C. albicans*.
3. Isolates that are susceptible to anidulafungin as well as micafungin should be considered susceptible to caspofungin, until caspofungin breakpoints have been established. EUCAST breakpoints have not yet been established for caspofungin, due to significant inter-laboratory variation in MIC ranges for caspofungin.
4. The entire *C. glabrata* is in the I category. MICs against *C. glabrata* should be interpreted as resistant when above 16 mg/L. Susceptible category (≤0.001 mg/L) is simply to avoid missclassification of "I" strains as "S" strains.
5. 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, there were only a small number of cases involved these species in the clinical trials. This means there is insufficient evidence (IE) to indicate whether the wild-type population of these pathogens can be considered susceptible to micafungin.
6. For *Candida* the I category is introduced to acknowledge that the increased exposure obtained by iv dosing is sufficient (potentially confirmed by TDM). There is not enough information available for the response to voriconazole of infections caused by *Candida* isolates with higher MICs.
7. Strains with MIC values above the S/I breakpoint are rare or not yet reported. The identification and antifungal susceptibility tests on any such isolate must be repeated and if the result is confirmed the isolate sent to a reference laboratory. Until there is evidence regarding clinical response for confirmed isolates with MIC above the current resistant breakpoint they should be reported resistant. A clinical response of 76% was achieved in infections caused by the species listed below when MICs were lower than or equal to the epidemiological cut-offs. Therefore, wild type populations of *C. albicans*, *C. dubliniensis*, *C. parapsilosis* and *C. tropicalis* are considered susceptible.

<sup>16</sup> [http://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST\\_files/AFST/Clinical\\_breakpoints/AFST\\_BP\\_v10.0\\_200204.pdf](http://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/AFST/Clinical_breakpoints/AFST_BP_v10.0_200204.pdf)

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

Aspergillus spp.	EUCAST Antifungal Clinical Breakpoint Table v. 10.0 valid from 2020-02-04																	
Antifungal agent	MIC method (EUCAST standardised broth microdilution method) Medium: RPM1940:2% glucose, MOPS as buffer Inoculum: Final 1x10 <sup>5</sup> – 2.5x10 <sup>5</sup> c.f.u/ml. Incubation: 48h Reading: Visual, complete inhibition for amphotericin B and azoles (MIC), aberrant growth endpoint for echinocandins (MEC). Quality control: <i>A. fumigatus</i> ATCC 204305, <i>A. flavus</i> ATCC 284304, <i>A. fumigatus</i> F 6919, <i>A. niger</i> CM 1813, <i>C. parapsilosis</i> ATCC 22019 (read after 18-24 h) or <i>C. trusei</i> ATCC 6258 (read after 18-24 h).																	
	MIC breakpoint (mg/L)																	
	<i>A. flavus</i>			<i>A. fumigatus</i>			<i>A. nidulans</i>			<i>A. niger</i>			<i>A. terreus</i>			Non-species related breakpoints <sup>1</sup>		Comments on the I category
S ≤	R >	ATU	S ≤	R >	ATU	S ≤	R >	ATU	S ≤	R >	S ≤	R >	ATU	S ≤	R >			
Amphotericin B	-	-	1	1	-	-	1	1	-	-	-	-	IE	IE	No data to support an "I" category according to the new definition of "I"			
Anidulafungin	IE	IE	IE	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	IE	IE	IE			
Fluconazole	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-			
Isavuconazole	1	2	2	1	2	2	0.25	0.25	IE <sup>1</sup>	IE <sup>2</sup>	1	1	IE	IE	If voriconazole wild-type ( <i>A. flavus</i> : voriconazole MIC ≤2 mg/L; <i>A. fumigatus</i> : voriconazole MIC ≤1 mg/L) report as isavuconazole S and add the following comment: "The MIC of 2 mg/L is one dilution above the S breakpoint but within the wild-type isavuconazole MIC range due to a stringent breakpoint susceptibility breakpoint. See rationale documents for more information. If voriconazole non wild-type report as isavuconazole R and refer to reference laboratory for <i>CYP51A</i> sequencing and confirmation of MICs <sup>2</sup> ."			
Itraconazole <sup>4</sup>	1	1	2	1	1	2	1	1	2	IE <sup>2,5</sup>	IE <sup>2,5</sup>	1	1	2	IE <sup>5</sup>	IE <sup>5</sup>	Report as R with the following comment: "In some clinical situations (non-invasive infections forms) itraconazole can be used provided sufficient exposure is ensured".	
Micafungin	IE	IE	IE	IE	IE	IE	IE	IE	IE	IE	IE	IE	IE	IE	IE			
Posaconazole <sup>4</sup>	IE <sup>2</sup>	IE <sup>2</sup>	0.125	0.25	0.25	IE <sup>2</sup>	IE <sup>2</sup>	IE <sup>1</sup>	IE <sup>2</sup>	0.125	0.25	0.25	IE	IE	Posaconazole MIC = 0.25 mg/L, should not be interpreted as I but only as ATU		If S to itraconazole report as R and refer to reference laboratory for <i>CYP51A</i> sequencing and confirmation of MICs.	
Voriconazole <sup>4</sup>	IE <sup>2</sup>	IE <sup>2</sup>	1	1	2	1	1	2	IE <sup>2</sup>	IE <sup>2</sup>	IE <sup>2</sup>	IE <sup>2</sup>	IE	IE	Report as R with the following comment: "In some clinical situations (non-invasive infections forms) voriconazole can be used provided sufficient exposure is ensured".			

**Notes**

1. Non-species related breakpoints have not been determined.
2. The ECOFFs for these species are in general one two-fold dilution higher than for *A. fumigatus*.
3. Itraconazole and posaconazole R isolates but S to voriconazole and isavuconazole are not uncommon in azole-treated patients. Refer the isolate to a reference laboratory for *CYP51A* sequencing and confirmation of MICs.
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.

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

Les données du CNRMA concernant actuellement près de 9500 isolats de levures dont la sensibilité a été testée à 8 antifongiques systémiques. Nous présentons ci-dessous les résultats concernant les espèces pour lesquelles plus de 10 isolats ont été testés depuis 2003, et les antifongiques pertinents correspondants (**Tableau 10**). Il faut remarquer que les CMI50 et les CMI90 du voriconazole et du posaconazole sont nettement plus hautes pour *C. glabrata* et *C. krusei* que pour *C. albicans* confirmant l'existence fréquente de "résistances" croisées. A quelques exceptions près, les CMI hautes observées font partie du profil naturel des espèces (comme *C. krusei* et le fluconazole, *C. haemulonii* et l'amphotéricine B et les azolés, *C. parapsilosis* et les échinocandines). La distribution des valeurs de CMI de la micafungine est comparable à celle de la caspofungine sur les espèces de levures « fréquentes ». Comme la caspofungine, la micafungine n'a pas d'activité sur les levures des genres *Cryptococcus*, *Geotrichum*, *Rhodotorula* et *Trichosporon*. Il n'y a donc pas d'argument microbiologique pour privilégier l'une ou l'autre des échinocandines disponibles en France.

La détermination de l'espèce permettant le plus souvent de prédire la susceptibilité aux antifongiques, la détermination systématique de la sensibilité aux antifongiques n'est pas un prérequis pour la prise en charge thérapeutique en dehors de circonstances particulières (échecs, prescriptions antérieures d'antifongiques). Par contre, l'analyse des CMI générées avec la même technique et centralisées au CNRMA des isolats cliniques circulant en France, est essentielle à la surveillance épidémiologique.

**Tableau 10 : Profil de sensibilité des levures aux antifongiques**  
(mise à jour 20/02/2020)

Espèces étudiées	Nom actuel	Valeurs des CMI50 / CMI90 mg/L pour les antifongiques*						
		AMB	5-FC	Fluco	Vori	Posa	Caspo**	Mica**
<i>C. albicans</i> (n=3311)		0.06/0.12	≤0.12/0.5	0.25/0.5	≤0.01/≤0.01	≤0.01/0.06	0.03/0.06	0.03/0.03
<i>C. dubliniensis</i> (n=135)		≤0.014/0.03	≤0.12/≤0.12	≤0.12/0.25	≤0.01/≤0.01	0.03/0.06	0.03/0.03	0.015/0.03
<i>C. glabrata</i> (n=1284)		0.12/0.25	≤0.12/≤0.12	16/64	0.25/1	0.5/2	0.06/0.12	0.015/0.03
<i>C. nivariensis</i> (n=13)		0.12/0.25	0.5/1	4/4	0.06/0.12	0.12/0.25	0.06/0.12	0.015/0.03
<i>C. parapsilosis</i> (n=824)		0.06/0.12	≤0.12/0.25	0.5/2	≤0.01/0.06	0.06/0.12	0.25/1	0.25/0.5
<i>C. orthopsilosis</i> (n=49)		0.03/0.06	≤0.12/≤0.12	0.5/8	0.03/1	0.06/0.12	0.12/0.25	0.12/0.25
<i>C. metapsilosis</i> (n=45)		0.06/0.12	≤0.12/≤0.12	1/2	0.03/0.06	0.03/0.12	0.06/0.12	0.12/0.25
<i>C. tropicalis</i> (n=645)		0.06/0.12	≤0.12/32	0.5/4	0.03/0.25	0.06/0.25	0.03/0.06	0.03/0.03
<i>C. krusei</i> (n=344)	<i>Pichia kudriavzevii</i>	0.12/0.25	2/4	32/64	0.25/0.5	0.12/0.25	0.12/0.25	0.06/0.12
<i>C. inconspicua</i> (n=45)		0.12/0.25	2/4	16/32	0.12/0.25	0.12/0.12	0.03/0.06	0.015/0.03
<i>C. kefyr</i> (n=170)	<i>Kluyveromyces marxianus</i>	0.06/0.12	0.5/8	0.25/1	≤0.01/≤0.01	0.06/0.12	0.015/0.03	0.03/0.06
<i>C. guilliermondii</i> (n=116)	<i>Meyerozyma guilliermondii</i>	0.03/0.06	≤0.12/0.25	8/64	0.06/0.5	0.25/0.5	0.06/0.25	0.12/0.25
<i>C. fermentati</i> (n=35)	<i>Meyerozyma caribbica</i>	0.12/0.25	≤0.12/≤0.12	8/64	0.12/2	0.25/0.5	0.12/0.5	0.25/2
<i>C. lusitaniae</i> (n=226)	<i>Clavispora lusitaniae</i>	0.06/0.25	≤0.12/0.5	0.25/0.5	≤0.01/≤0.01	≤0.01/0.06	0.03/0.06	0.03/0.06
<i>C. haemulonii</i> (n=43)		0.5/2	≤0.12/0.25	32/≥64	≥8/≥8	4/≥8	0.03/0.06	0.06/0.06
<i>C. haemulonii</i> type II (n=44)	<i>Candida duobushaemulonii</i>	2/8	≤0.12/≥64	32/≥64	≥8/≥8	1/≥8	0.015/0.03	0.03/0.06
<i>C. palmiophila</i> (n=20)		0.12/0.5	≤0.12/0.5	8/32	0.12/0.25	0.12/0.25	0.06/0.25	0.03/0.25
<i>Pichia jadinii</i> (n=23)	<i>Cyberlindnera jadinii</i>	0.06/0.12	≤0.12/1	1/4	0.06/0.12	0.12/0.25	0.015/1	0.015/2
<i>Pichia fabianii</i> (n=11)	<i>Cyberlindnera fabianii</i>	0.06/0.12	≤0.12/≤0.12	1/1	0.03/0.03	0.12/0.25	0.03/0.06	0.03/-
<i>C. pelliculosa</i> (n=36)	<i>Wickerhamomyces anomalus</i>	0.06/0.12	≤0.12/16	2/4	0.12/0.25	0.25/0.5	0.03/0.06	0.015/0.03
<i>Pichia ohmeri</i> (n=32)	<i>Kodamaea ohmeri</i>	0.06/0.06	≤0.12/1	4/16	0.03/0.12	0.03/0.12	0.12/≥8	0.06/0.12
<i>Pichia norvegensis</i> (n=19)		0.12/0.12	4/16	32/64	0.25/0.5	0.12/0.25	0.06/0.06	0.03/0.06
<i>S. cerevisiae</i> (n=64)		0.06/0.12	≤0.12/≤0.12	8/16	0.12/0.25	0.5/1	0.12/0.25	0.12/0.25
<i>C. lipolytica</i> (n=27)	<i>Yarrowia lipolytica</i>	1/4	32/≥64	4/16	0.06/0.25	0.25/1	0.12/0.5	0.25/0.25
<i>Geotrichum candidum</i> (n=36)	<i>Galactomyces candidus</i>	0.25/0.5	0.25/1	16/64	0.25/1	0.25/1	1/≥8	0.5/≥8
<i>G. capitatum</i> (n=56)	<i>Magnusiomyces capitatus</i>	0.25/0.5	≤0.12/0.25	8/16	0.06/0.5	0.12/1	≥8/≥8	≥8/≥8
<i>G. clavatum</i> (n=186)	<i>Saprochaete clavata</i>	0.25/0.5	0.5/1	16/64	0.5/1	0.5/1	≥8/≥8	≥8/≥8
<i>Cr. neoformans</i> var. <i>grubii</i> (n=953)		0.12/0.5	4/16	4/8	0.03/0.12	0.06/0.25	≥8/≥8	4/≥8
<i>Cr. neoformans</i> var. <i>neoformans</i> (n=212)		0.06/0.25	4/16	1/4	≤0.01/0.06	0.03/0.12	≥8/≥8	1/4
<i>Cr. neoformans</i> hybrides AD (n=178)		0.12/0.25	4/8	4/8	0.03/0.12	0.06/0.25	≥8/≥8	4/≥8
<i>Cr. gattii</i> (n=29)		0.12/0.25	2/8	8/16	0.12/0.5	0.25/0.5	≥8/≥8	≥8/≥8
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i> (n=55)		0.25/0.5	0.25/0.5	≥64/≥64	2/4	1/2	≥8/≥8	≥8/≥8
<i>Trichosporon asahii</i> (n=59)		2/≥8	64/≥64	4/16	0.06/0.25	0.25/0.5	≥8/≥8	≥8/≥8
<i>Trichosporon inkin</i> (n=10)		0.5/2	64/≥64	2/4	≤0.01/0.06	0.06/0.25	4/-	4/-

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

L'isavuconazole est le dernier azolé commercialisé et n'est testé au CNRMA que depuis janvier 2015. Nous présentons donc ici la comparaison des CMI sur des espèces pour lesquelles plus de 10 isolats ont été testés en parallèle avec les différents azolés (**Tableau 11**). Sur ces espèces, les CMI de l'isavuconazole sont équivalentes à celles du voriconazole sauf sur les isolats de *S. cerevisiae* pour lesquels elles sont un peu plus basses, ceux de *C. neoformans* pour lesquels elles sont un peu plus élevées, mais surtout ceux de *M. capitatus* ou *S. clavata* pour lesquels elles sont très nettement plus élevées<sup>17</sup>.

**Tableau 11 : Profil de sensibilité des levures à 4 azolés, dont l'isavuconazole**

pour les espèces pour lesquelles au moins 10 isolats ont été testés depuis janvier 2015 (technique EUCAST, mise à jour 04/02/2019)

Espèce (nbre isolats testés)	CMI50/CMI90 mg/L pour les azolés			
	Fluconazole	Posaconazole	Voriconazole	Isavuconazole
<i>Candida albicans</i> (n=584)	≤0.125/0.25	≤0.015/0.03	≤0.015/≤0.015	≤0.007/≤0.007
<i>Candida dubliniensis</i> (n=53)	≤0.125/0.25	≤0.015/0.03	≤0.015/≤0.015	≤0.007/≤0.007
<i>Candida glabrata</i> (n=252)	8/32	0.5/1	0.125/0.5	0.25/0.5
<i>Candida parapsilosis</i> (n=188)	0.5/4	0.03/0.125	≤0.015/0.12	0.015/0.03
<i>Candida orthopsilosis</i> (n=16)	0.5/16	0.06/0.125	0.03/1	0.015/0.06
<i>Candida metapsilosis</i> (n=19)	1/2	0.03/0.06	0.03/0.03	0.05/0.015
<i>Candida tropicalis</i> (n=129)	0.25/1	0.03/0.06	0.03/0.06	≤0.007/0.03
<i>Pichia kudriavzevii</i> (n=100)	32/≥64	0.125/0.25	0.25/0.5	0.125/0.25
<i>Candida inconspicua</i> (n=15)	16/32	0.06/0.12	0.12/0.12	0.12/0.12
<i>Kluyveromyces marxianus</i> (n=48)	0.25/0.5	0.06/0.125	≤0.015/≤0.015	≤0.007/≤0.007
<i>Clavispora lusitanae</i> (n=79)	0.25/0.5	≤0.015/0.03	≤0.015/≤0.015	≤0.007/0.015
<i>Meyerozyma guilliermondii</i> (n=29)	4/≥64	0.25/0.5	0.125/4	0.25/4
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> (n=21)	4/16	0.5/1	0.12/0.5	0.03/0.25
<i>Kodamaea ohmeri</i> (n=12)	4/4	0.03/0.125	≤0.015/0.06	0.015/0.06
<i>Wickerhamomyces anomalus</i> (n=11)	2/8	0.06/0.25	0.06/0.25	0.06/0.06
<i>Galactomyces candidus</i> (n=10)	16/≥64	0.25/0.5	0.25/2	0.25/2
<i>Magnusiomyces capitatus</i> (n=28)	4/16	0.12/0.5	0.03/0.25	4/≥4
<i>Saprochaete clavata</i> (n=83)	16/32	0.25/1	0.25/0.5	4/≥4
<i>C. neoformans</i> var. <i>grubii</i> (n=236)	2/8	0.03/0.125	≤0.015/0.06	0.06/0.25
<i>C. neoformans</i> var. <i>neoformans</i> (n=33)	0.5/2	≤0.015/0.06	0.03/0.03	0.015/0.06
<i>C. neoformans</i> AD hybrid (n=40)	2/8	0.03/0.125	≤0.015/0.06	0.03/0.125
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i> (n=22)	≥64/≥64	0.25/2	0.5/4	1/4
<i>Trichosporon asahii</i> (n=16)	2/8	0.25/0.5	0.06/0.125	0.25/1

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

Depuis 2003, le CNRMA a déterminé la sensibilité à 8 antifongiques systémiques de près de 2950 isolats de champignons filamenteux (**Tableau 12**). Les données sur l'isavuconazole sont présentées plus loin dans un tableau séparé car le nombre de souches est plus limité.

Ces isolats nous sont envoyés pour de multiples raisons : difficulté d'identification requérant notre expertise, difficulté de prise en charge thérapeutique en raison de la rareté de l'espèce, de la localisation, de l'immunodéficience de l'hôte ou de l'absence d'efficacité sous traitement. Elles ne proviennent donc pas d'un programme de surveillance systématique (sauf celles qui sont analysées dans le cadre de RESSIF). Cependant, à quelques exceptions près (*A. fumigatus* en particulier), les "résistances" observées font partie du profil naturel des espèces et ne représentent pas des résistances acquises sous traitement antifongique.

<sup>17</sup> Desnos-Ollivier M, Bretagne S, Boullié A, Gautier C, Dromer F, Lortholary O, French Mycoses Study Group (2019) Isavuconazole MICs distribution of 29 yeast species responsible for invasive infections (2015-2017). *Clin Microbiol Infect*



Les profils de sensibilité des espèces pour lesquelles plus de 5 isolats ont été testés sont présentés. Pour les Mucorales, on retrouve une bonne activité *in vitro* de l'amphotéricine B et une activité du posaconazole variable selon les espèces, et l'absence d'activité du voriconazole et des échinocandines.

**Tableau 12 : Profil de sensibilité des champignons filamenteux aux antifongiques**  
(MAJ 04/03/2020)

Espèce (nombre d'isolats testés)	Valeurs des CMI50 / CMI90 (mg/L) pour les antifongiques*						
	AMB	Itra	Vori	Posa	Caspo	Mica	Terbi
<i>Cunninghamella bertholletiae</i> (n=16)	0.5/1	2/≥8	≥8/≥8	0.5/1	≥8/≥8	≥8/≥8	0.12/0.25
<i>Cunninghamella</i> spp. (n=8)	4/-	2/-	≥8/-	1/-	≥8/-	≥8/-	0.12/-
<i>Lichtheimia corymbifera</i> (n =75)	0.5/0.5	1/4	≥8/≥8	0.5/0.5	≥8/≥8	≥8/≥8	0.5/1
<i>Lichtheimia ornata</i> (n=7)	0.25/-	0.5/-	≥8/-	0.5/-	≥8/-	≥8/-	0.5/-
<i>Lichtheimia ramosa</i> (n=70)	0.12/0.25	2/≥8	≥8/≥8	0.5/1	≥8/≥8	≥8/≥8	1/2
<i>Mucor circinelloides</i> (n=68)	0.03/0.12	≥8/≥8	≥8/≥8	1/≥8	≥8/≥8	≥8/≥8	≥8/≥8
<i>Mucor velutinosus</i> (n=11)	0.06/0.25	≥8/≥8	≥8/≥8	0.5/2	≥8/≥8	≥8/≥8	≥8/≥8
<i>Mucor indicus</i> (n=15)	0.06/0.12	≥8/≥8	≥8/≥8	1/2	≥8/≥8	≥8/≥8	≥8/≥8
<i>Mucor</i> spp. (n=10)	0.12/0.25	≥8/≥8	≥8/≥8	2/≥8	≥8/≥8	≥8/≥8	≥8/≥8
<i>Rhizomucor pusillus</i> (n=55)	0.06/0.12	0.5/1	≥8/≥8	0.25/0.5	≥8/≥8	≥8/≥8	0.25/0.5
<i>Rhizomucor miehei</i> (n=8)	0.03/-	0.03/-	2/-	0.06/-	≥8/-	2/-	0.25/-
<i>Rhizopus arrhizus</i> (n =100)	0.12/0.25	1/≥8	8/≥8	0.5/2	≥8/≥8	≥8/≥8	≥8/≥8
<i>Rhizopus microsporus</i> (n=65)	0.06/0.12	1/≥8	8/≥8	0.5/2	≥8/≥8	≥8/≥8	0.5/1
<i>Saksenaea vasiformis</i> complex (n=5)	8/-	0.25/-	8/-	0.12/-	≥8/-	≥8/-	0.25/-
<i>Syncephalastrum racemosum</i> (n=5)	0.03/-	≥8/-	≥8/-	0.5/-	≥8/-	≥8/-	0.5/-
<i>Alternaria infectoria</i> complex (n=28)	0.25/0.5	0.5/1	4/≥8	0.12/0.5	0.5/1	0.06/0.12	0.5/1
<i>Alternaria alternata</i> complex (n=34)	0.5/1	0.5/8	2/4	0.25/0.5	0.5/≥8	0.25/≥8	4/≥8
<i>Aspergillus flavus</i> (n=160)	1/4	0.12/0.25	0.5/0.5	0.12/0.25	0.25/0.5	≤0.007/0.03	0.03/0.06
<i>Aspergillus fumigatus</i> CMI itra>1mg/L (n=97)	0.25/0.5	≥8/≥8	2/8	0.5/2	0.5/0.5	≤0.007/0.03	1/8
<i>Aspergillus fumigatus</i> (n=293)	0.25/0.5	0.25/0.5	0.25/1	0.06/0.12	0.5/0.5	0.015/0.03	2/2
<i>Aspergillus nidulans</i> (n=21)	2/8	0.12/0.5	0.12/0.25	0.06/0.12	0.5/4	0.015/0.06	0.12/0.5
<i>Aspergillus quadrilineatus</i> (n=17)	0.5/1	0.12/0.5	0.12/0.25	0.12/0.25	2/2	≤0.007/0.03	0.12/0.25
<i>Aspergillus calidoustus</i> (n=20)	1/2	≥8/≥8	4/8	≥8/≥8	0.5/4	0.015/0.06	0.25/0.5
<i>Aspergillus</i> section <i>Usti</i> (n=28)	0.5/1	2/≥8	4/8	≥8/≥8	2/≥8	0.25/≥8	0.25/0.5
<i>Aspergillus</i> section <i>Nidulantes</i> (n=8)	1/-	0.25/-	0.12/-	0.12/-	1/-	≤0.007/-	0.06/-
<i>Aspergillus</i> section <i>Nigri</i> (n=21)	0.25/1	0.5/4	0.5/1	0.25/0.5	0.25/0.5	0.015/0.5	0.12/0.5
<i>Aspergillus tamarii</i> (n=8)	0.5/-	0.06/-	0.25/-	0.06/-	0.25/-	≤0.007/-	≤0.01/-
<i>Aspergillus tubingensis</i> (n=23)	0.25/-	1/8	1/2	0.25/0.25	0.25/0.25	≤0.007/≤0.007	0.25/0.25
<i>Aspergillus terreus</i> (n=49)	4/8	0.06/0.25	0.5/1	0.06/0.12	0.5/1	≤0.007/0.03	0.06/0.12
<i>Aspergillus sydowii</i> (n=6)	2/-	0.5/-	0.5/-	0.25/-	0.12/-	≤0.007/-	0.06/-
<i>Aspergillus versicolor</i> (n=9)	1/-	0.25/-	0.25/-	0.12/-	0.5/-	0.03/-	0.25/-
<i>Aspergillus welwitschiae</i> (n=14)	0.5/1	1/2	0.5/1	0.25/0.25	0.12/0.25	0.007/0.007	0.12/0.25
<i>Aureobasidium pullulans</i> (n=7)	0.25/-	0.03/-	0.12/-	0.06/-	1/-	1/-	1/-
<i>Chaetomium</i> spp. (n=13)	2/8	0.12/0.5	0.25/1	0.12/0.5	1/2	0.12/0.5	2/16
<i>Curvularia</i> spp. (n=26)	0.125/0.5	0.25/≥8	0.5/2	0.12/0.5	0.5/2	0.06/1	0.5/2
<i>Doratomyces</i> spp. (n=5)	2/-	≥8/-	4/-	1/-	1/-	0.12/-	2/-
<i>Exophiala dermatitidis</i> (n=33)	0.12/0.25	0.5/1	0.06/0.5	0.12/0.5	4/≥8	1/≥8	0.06/0.25
<i>Exophiala jeanselmei</i> (n=10)	0.5/1	0.25/0.5	0.25/0.5	0.25/-	1/-	2/-	0.06/-
<i>Exophiala oligosperma</i> (n=5)	0.25/-	0.25/-	0.25/-	0.25/-	≥8/-	2/-	0.03/-
<i>Exophiala spinifera</i> (n=12)	0.12/0.25	0.03/-	0.12/0.25	0.25/-	2/2	0.25/2	0.06/-
<i>Fonsecaea monophora</i> (n=9)	0.25/-	≤0.01/-	0.06/-	0.06/-	0.5/-	0.5/-	0.03/-
<i>Fonsecaea pedrosoi</i> (n=8)	0.25/-	0.12/-	0.06/-	0.06/-	1/-	1/-	0.03/-
<i>Fonsecaea nubica</i> (n=12)	0.5/1	≤0.01/0.5	0.06/0.12	0.03/0.25	1/2	0.5/4	0.03/0.25

(suite)	AMB	Itra	Vori	Posa	Caspo	Mica	Terbi
<i>Fusarium fujikuroi</i> complex (n=161)	4/8	≥8/≥8	4/8	4/≥8	≥8/≥8	≥8/≥8	1/2
<i>Fusarium dimerum</i> complex (n= 37)	0.25/0.5	≥8/≥8	2/8	≥8/≥8	≥8/≥8	≥8/≥8	0.5/1
<i>Fusarium incarnatum-equiseti</i> complex (n=5)	1/-	≥8/-	2/-	1/-	≥8/-	≥8/-	4/-
<i>Fusarium oxysporum</i> complex (n=175)	2/4	≥8/≥8	2/8	2/≥8	≥8/≥8	≥8/≥8	2/4
<i>Fusarium solani</i> complex (n=247)	4/8	≥8/≥8	8/≥8	≥8/≥8	≥8/≥8	≥8/≥8	≥8/≥8
<i>Lecytophora hoffmannii</i> (n=6)	0.25/-	0.25/-	1/-	0.12/-	2/-	2/-	0.25/-
<i>Lomentospora prolificans</i> (n=39)	8/≥8	≥8/≥8	8/≥8	≥8/≥8	4/≥8	4/≥8	≥8/≥8
<i>Medicopsis romeroi</i> (n=6)	0.5/-	4/-	0.5/-	1/-	4/-	2/-	0.12/-
<i>Microascus cirrosus</i> (n=7)	8/-	≥8/-	≥8/-	≥8/-	4/-	≥8/-	2/-
<i>Neoscytalidium dimidiatum</i> (n=8)	0.12/-	≥8/-	0.12/-	0.5/-	0.5/-	0.12/-	0.5/-
<i>Purpureocillium lilacinum</i> (n=51)	8/≥8	2/≥8	0.25/0.5	0.25/0.5	≥8/≥8	2/≥8	0.25/0.5
<i>Paecilomyces variotii</i> (n=15)	0.06/0.5	0.12/0.5	8/≥8	0.12/0.5	2/4	0.03/0.25	1/8
<i>Penicillium</i> spp. (n=28)	0.5/8	1/≥8	8/≥8	1/≥8	2/≥8	0.12/2	0.25/1
<i>Penicillium chrysogenum</i> (n=7)	0.5/-	0.25/-	1/-	0.25/-	0.5/-	0.03/-	0.25/-
<i>Phaeoacremonium parasiticum</i> (n=20)	0.5/2	≥8/≥8	0.25/0.25	0.25/1	≥8/≥8	≥8/≥8	0.25/0.5
<i>Pleurostomophora richardsiae</i> (n=7)	0.25/-	0.25/-	0.5/-	0.25/-	4/-	1/-	1/-
<i>Scedosporium ellipsoideum</i> (n=9)	≥8/-	1/-	0.5/-	1/-	0.5/-	0.25/-	≥8/-
<i>Sarocladium kiliense</i> (n=10)	8/≥8	≥8/≥8	0.5/1	1/≥8	4/≥8	4/≥8	0.5/0.5
<i>Scedosporium boydii</i> (n=45)	8/≥8	0.5/4	0.25/0.5	0.5/1	1/2	0.25/1	≥8/≥8
<i>Scedosporium apiospermum</i> (n=108)	8/≥8	1/≥8	0.5/1	0.5/2	1/2	0.25/1	≥8/≥8
<i>Scedosporium aurantiacum</i> (n=6)	8/-	4/-	0.5/-	1/-	8/-	4/-	≥8/-
<i>Scedosporium dehoogii</i> (n=10)	8/≥8	0.5/1	0.25/0.5	0.5/1	2/2	0.25/0.5	≥8/≥8
<i>Scedosporium minutisporum</i> (n=5)	8/-	0.5/-	0.25/-	0.5/-	2/-	0.25/-	≥8/-
<i>Scopulariopsis brevicaulis</i> (n=20)	8/≥8	≥8/≥8	8/≥8	≥8/≥8	1/4	0.25/0.5	2/8
<i>Sporothrix schenckii</i> (n=19)	1/2	0.5/1	8/≥8	1/4	≥8/≥8	≥8/≥8	0.06/2
<i>Sporothrix globosa</i> (n=5)	8/-	1/-	≥8/≥8	1/2	≥8/-	1/-	0.25
<i>Thermothelomyces thermophilus</i> (n=8)	1/-	0.12/-	0.12/-	0.06/-	4/-	0.5/-	2/-
<i>Trichoderma longibrachiatum</i> (n=23)	1/2	≥8/≥8	0.5/1	1/2	0.5/1	0.06/0.25	1/2
<i>Trichoderma</i> spp. (n=8)	1/-	≥8/-	1/-	8/-	0.5/-	0.06/-	2/-
<i>Hormographiella aspergillata</i> (n=6)	0.06/-	≥8	1/-	2/-	4/-	4/-	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)

**Dans ce tableau résumant les données sur les souches testées au CNR, la proportion élevée des souches d'*A. fumigatus* résistantes est totalement artificielle et ne reflète en rien la réalité épidémiologique en France.** En effet, plus d'un tiers des souches d'*A. fumigatus* nous sont envoyées dans un contexte d'échec thérapeutique ou de suspicion de résistance. Nous avons séparé, dans le tableau, les souches pour lesquelles les CMI de l'itraconazole étaient élevées (>1 mg/L), avec parfois une résistance croisée pour le voriconazole et le posaconazole, de façon à mieux mettre en évidence le profil des souches sauvages. Certaines espèces émergentes, comme les *Aspergillus* de la section *Usti*, ont des profils de sensibilité particuliers avec des CMI élevées pour tous les azolés et les échinocandines. Les *Fusarium* spp. et *Lomentospora prolificans* sont caractérisés par une résistance à la plupart des antifongiques systémiques, y compris les nouveaux azolés et les échinocandines. Les dématiés ont globalement une bonne sensibilité à l'amphotéricine B et aux azolés. On peut remarquer que l'activité des différents azolés n'est pas superposable, même pour une espèce donnée. Certaines espèces ont des CMI basses pour l'itraconazole et le posaconazole et des CMI hautes pour le voriconazole (*Mucorales*, *Exophiala dermatitidis*, ou la forme mycélienne de *Sporothrix schenckii*). A l'inverse, des CMI basses pour le voriconazole et hautes pour l'itraconazole et le posaconazole sont observées pour d'autres espèces (*Trichoderma* spp.).

Dans la mesure où l'isavuconazole n'est testé que depuis janvier 2015, nous présentons la comparaison des CMI sur des espèces pour lesquelles plus de 5 isolats ont été testés en parallèle avec les différents azolés (**Tableau 13**). Sur ces espèces, les CMI de l'isavuconazole sont très élevées et comparables à celles du voriconazole et de l'itraconazole sur les *Mucorales* et sur les *Fusarium* spp. Pour les autres espèces testées, les CMI de l'isavuconazole sont la plupart du temps plus hautes que pour tout ou partie des autres azolés, ce qui, rappelons-le, ne préjuge pas de l'activité *in vivo* de cet antifongique étant données les différences de pharmacocinétique.

**Tableau 13 : Profil de sensibilité des filamenteux à 4 azolés, dont l'isavuconazole**  
pour les espèces pour lesquelles au moins 5 isolats ont été testés depuis janvier 2015 (MAJ 04/03/2020)

Espèce (nbre d'isolats)	Valeurs des CMI50/CMI90 (mg/L) pour les azolés			
	Posaconazole	Itraconazole	Voriconazole	Isavuconazole
<i>Cunninghamella bertholletiae</i> (n=10)	1/1	≥8/≥8	≥8/≥8	≥8/≥8
<i>Lichtheimia corymbifera</i> (n=31)	0.5/0.5	0.5/2	≥8/≥8	4/≥8
<i>Lichtheimia ramosa</i> (n=20)	0.5/1	1/≥8	≥8/≥8	≥8/≥8
<i>Mucor circinelloides</i> (n=39)	2/≥8	≥8/≥8	≥8/≥8	≥8/≥8
<i>Mucor indicus</i> (n=12)	1/2	≥8/≥8	≥8/≥8	≥8/≥8
<i>Mucor velutinosus</i> (n=5)	1/-	≥8/-	≥8/-	≥8/-
<i>Rhizopus arrhizus</i> (n=41)	0.5/≥8	2/≥8	≥8/≥8	2/≥8
<i>Rhizopus microsporus</i> (n=30)	1/≥8	≥8/≥8	8/≥8	4/≥8
<i>Rhizomucor pusillus</i> (n=11)	0.25/0.25	0.5/0.5	≥8/≥8	4/≥8
<i>Alternaria alternata</i> complex (n=8)	0.25/-	1/-	2/-	4/-
<i>Aspergillus calidoustus</i> (n=16)	≥8/≥8	≥8/≥8	4/8	2/4
<i>Aspergillus flavus</i> (n=83)	0.125/0.125	0.125/0.25	0.5/1	0.5/1
<i>Aspergillus fumigatus</i> (n=112)	0.06/0.12	0.25/0.5	0.25/1	0.5/1
<i>Aspergillus fumigatus</i> itraR* (CMI>1mg/L) (n=48)	0.5/2	≥8/≥8	4/4	4/8
<i>Aspergillus nidulans</i> (n=8)	0.06/-	0.125/-	0.125/-	0.125/-
<i>Aspergillus quadrilineatus</i> (n=7)	0.12/-	0.125/-	0.12/-	0.125/-
<i>Aspergillus terreus</i> (n=18)	0.06/0.12	0.06/0.25	0.5/1	0.5/1
<i>Aspergillus tubingensis</i> (n=16)	0.25/0.5	1/≥8	1/4	4/≥8
<i>Aspergillus welwitschiae</i> (n=14)	1/2	0.5/1	0.25/0.25	2/2
<i>Chaetomium</i> sp. (n=5)	0.06/-	0.06/-	0.25/-	0.25/-
<i>Curvularia</i> sp. (n=11)	0.03/0.25	0.06/2	0.5/1	1/2
<i>Exophiala dermatitidis</i> (n=8)	0.03/-	0.06/-	0.25/-	1/-
<i>Fonsecaea monophora</i> (n=6)	≤0.01/-	0.015/-	0.06/-	0.03/-
<i>Fonsecaea nubica</i> (n=7)	0.03/-	0.015/-	0.06/-	0.03/-
<i>Fusarium dimerum</i> complex (n=21)	≥8/≥8	≥8/≥8	2/4	≥8/≥8
<i>Fusarium fujikuroi</i> complex (n=61)	4/≥8	≥8/≥8	4/8	≥8/≥8
<i>Fusarium oxysporum</i> complex (n=67)	2/≥8	≥8/≥8	2/4	≥8/≥8
<i>Fusarium solani</i> complex (n=104)	≥8/≥8	≥8/≥8	8/≥8	≥8/≥8
<i>Lomentospora prolificans</i> (n=15)	≥8/≥8	≥8/≥8	8/≥8	≥8/≥8
<i>Scedosporium apiospermum</i> (n=46)	0.5/1	0.5/≥8	0.5/0.5	2/4
<i>Scedosporium boydii</i> (n=13)	0.25/1	1/≥8	0.25/0.5	2/≥8
<i>Scopulariopsis brevicaulis</i> (n=8)	2/-	≥8/-	8/-	4/-
<i>Phaeoacremonium parasiticum</i> (n=12)	0.25/0.5	≥8/≥8	0.25/0.5	2/4
<i>Purpureocillium lilacinum</i> (n=25)	0.25/0.5	4/≥8	0.25/0.5	0.5/2
<i>Trichoderma longibrachiatum</i> (n=7)	1/-	≥8/-	0.5/-	≥8/-

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

### 5.3.4 Analyse des tendances

L'analyse de 17 années de surveillance de la sensibilité aux antifongiques de quatre des principales espèces de *Candida* responsables de fongémies en Ile-de-France (ODL) est présentée en utilisant les seuils préconisés par EUCAST pour fluconazole et voriconazole (**Tableau 14, Figure 20**).

Pour *Candida albicans*, il existe une proportion très faible (0,4%) d'isolats résistants aux antifongiques azolés prescrits en thérapeutique (fluconazole et voriconazole). Il n'existe donc pas d'argument microbiologique contre l'utilisation des azolés pour les infections profondes à *C. albicans*. De même, la résistance aux candines (caspofungine et micafungine) de *C. albicans* reste exceptionnelle. Il n'existe pas de souche sauvage de *C. albicans* ayant une sensibilité diminuée à la caspofungine sans pression antifongique antérieure.

Pour *C. glabrata*, l'interprétation est plus délicate car les seuils ont changé, passant de 32 à 16 mg/L. Selon le nouveau seuil, près d'un tiers (31.3%) des isolats sont résistants avec une augmentation très nette du pourcentage en 2018 et 2019 atteignant les valeurs de 2010 (voisines de 40%) alors qu'entre 2010 et 2017 on avait assisté à une franche diminution. La figure permet de comprendre qu'il s'agit donc d'une augmentation des isolats ayant des CMI à 32 mg/L (seuil précédent). La prévalence de la résistance de *C. glabrata* aux échinocandines reste globalement faible (2,1%).

La résistance au fluconazole et au voriconazole concerne un petit pourcentage des isolats de *Candida parapsilosis* (en moyenne 5,8% et 8,4% respectivement), avec des variations selon les années, mais aucune tendance significative à la hausse contrairement à ce qui est rapporté dans d'autres pays. Il importe donc de surveiller ce phénomène car le fluconazole représente actuellement la proposition thérapeutique de première ligne selon les recommandations internationales. On rappelle que le complexe *parapsilosis* est intrinsèquement de moindre sensibilité ou résistant aux échinocandines.

Pour *Candida tropicalis*, on note une prévalence variable de la résistance aux deux azolés testés selon les années, mais une tendance globale à la baisse de ce phénomène. Les isolats résistants à la caspofungine sont extrêmement rares. A noter que le clone résistant à la 5FC qui avait été rapporté en 2008<sup>18</sup> n'est plus identifié depuis 2014 malgré la persistance de souches résistantes à cet antifongique (**Figure 21**).

**Tableau 14 : Proportion d'isolats de levures "résistants" selon les seuils EUCAST**

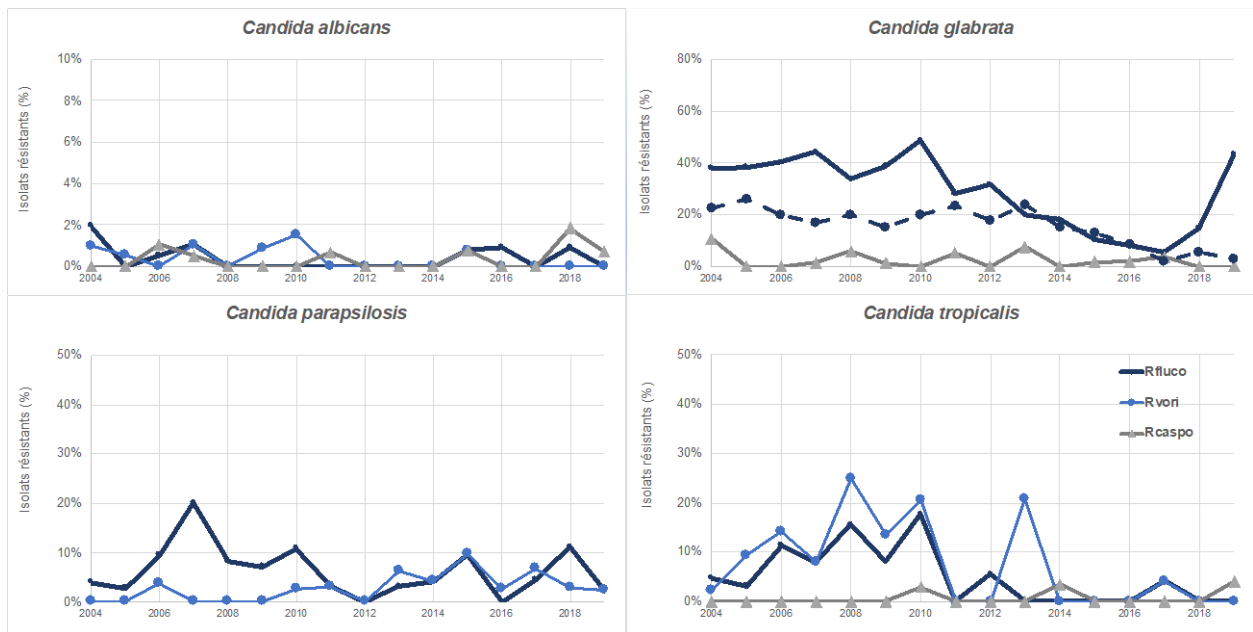
Analyse des CMI du fluconazole, voriconazole et caspofungine des isolats collectés dans l'ODL

Espèces	Fluconazole		Voriconazole		Caspofungine	
	Seuil mg/L	% R [extrêmes]	Seuil mg/L	% R [extrêmes]	Seuil mg/L	% R [extrêmes]
<i>C. albicans</i>	> 4	<b>0,4 %</b> [0 - 1,2]	> 0,25	<b>0,5 %</b> [0 - 2,4]	> 0,25	<b>0,3 %</b> [0 - 1,8]*
<i>C. glabrata</i>	> **16	<b>31.3 %</b> [5.2-44.2] *#	-	-	> 0,25	<b>2,1 %</b> [0 - 7,3]
<i>C. parapsilosis</i>	> 4	<b>6,7 %</b> [0 - 18,9] *	> 0,25	<b>2,5 %</b> [0 - 6,8]	-	
<i>C. tropicalis</i>	> 4	<b>5.8 %</b> [0 - 15,6] *#	> 0,25	<b>8,4 %</b> [0 - 27,8]*#	> 0,25	<b>0,8 %</b> [0 - 3,4]

\* p<0,05 (variation significative du pourcentage de résistance de 2004 à 2018, Chi2) ; # p <0,05 (test de tendance)

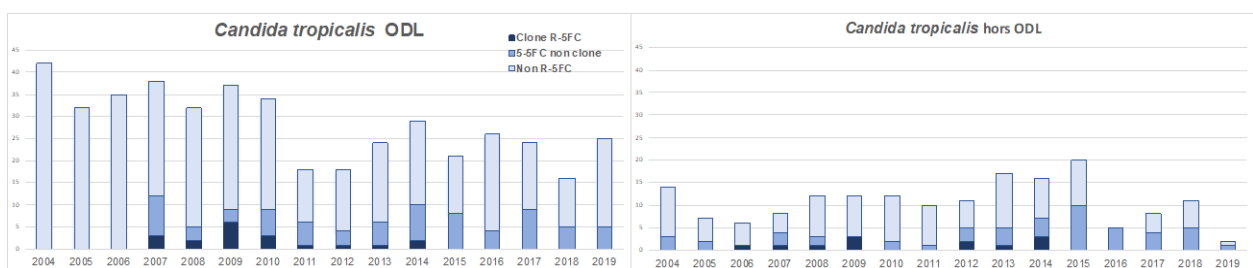
\*\*la valeur du seuil de résistance a été modifiée par EUCAST dans la dernière version v10 passant de >32mg/L à >16mg/L ce qui explique « l'augmentation » de pourcentage de souches de *C. glabrata* résistant au fluconazole par rapport aux données rapportées les années précédentes

<sup>18</sup> Desnos-Ollivier M et al. (2008) Clonal population of flucytosine-resistant *Candida tropicalis* from blood cultures, Paris, France. *Emerging Infect Dis* 14(4):557-565.



**Figure 20 : Evolution du pourcentage d'isolats "résistants"**

Analyses des données de l'ODL (2004-2019). Sur le graphique concernant *C. glabrata*, la ligne hachée bleu foncé représente la proportion d'isolats ayant une CMI>32 mg/L (ancien seuil de résistance pour EUCAST)



**Figure 21: Evolution du clone R-5FC de *Candida tropicalis***

Pour *A. fumigatus*, le CNRMA n'a pas mis en place d'observatoire, mais les quelques études régionales de monitoring systématique prouvent que le phénomène de résistance ne concerne qu'une très petite proportion des isolats cliniques des patients immunodéprimés. Sur les 1889 aspergilloses invasives recensées depuis 2012 dans RESSIF, 866 ont eu une culture positive à *A. fumigatus*, et seuls 21 patients étaient infectés par une souche azole-R (soit 2.4%). On peut donc dire que l'incidence de la résistance aux azoles reste très contenue en France en ce qui concerne les isolats responsables d'infections invasives. Une généralisation des prophylaxies antifongiques chez les patients d'hématologie peut faire craindre une plus grande fréquence d'infection à *A. fumigatus* résistant justifiant la poursuite de la surveillance. La principale source de résistance décrite dans plusieurs pays est l'usage d'antifongiques azolés dans l'agriculture et la horticulture. Les patients s'infectent alors d'emblée avec des isolats résistants ayant des mutations assez monomorphes dans le gène *cyp51A*.

En revanche, chez les patients chroniquement colonisés (mucoviscidose, bronchopathie chronique) traités au long cours par des azolés, l'isolement d'*A. fumigatus* résistant aux azoles est fréquent, mais sans que cela se traduise habituellement par une infection invasive. Pour les patients avec aspergillose chronique, suivis en pneumologie et traités par des azolés au long cours, les phénomènes d'acquisition de résistance sont complexes et non majoritairement liés à l'utilisation agricole des fongicides. Les mutations décrites dans ce cadre sont multiples. Ces pathologies ne sont pas surveillées dans le cadre du CNRMA.

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

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

Il n'existe pas de vrais réseaux internationaux de surveillance pour toutes les infections fongiques invasives. Cependant, la communauté internationale est très vigilante sur les risques de dissémination de *Candida auris*, et sur l'émergence des résistances aux antifongiques azolés pour *Candida spp.* et *A. fumigatus*. Les responsables du CNRMA sont en contact avec Santé Publique France et l'ANSES (Agence Nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail), ainsi que l'eCDC, les microbiologistes et les infectiologues européens et internationaux lors des congrès en particulier ou de colloques ou dans des groupes de travail. Le CNRMA fait partie de l'EUCAST qui indirectement surveille la sensibilité aux anti-infectieux en collectant les données permettant de définir les "epidemiological cutoff" (ECOFFs ou ECVs). Il contribue donc à ces surveillances en envoyant, à l'EUCAST, les données de la surveillance française de sensibilité des levures et filamenteux aux antifongiques. Par ailleurs, le CNRMA sait solliciter les collègues étrangers en cas de phénomène inhabituel.

## 5.5 Enquêtes ou études ponctuelles concourant à la surveillance

### 5.5.1 Cas groupés d'infection à *Saprochaete clavata*

Un hôpital a signalé trois cas d'infection à *Saprochaete clavata* dans un même service à un mois d'intervalle. Suite aux recommandations du CNRMA, des prélèvements dans l'environnement hospitalier des patients ont été effectués par les hygiénistes de l'hôpital. Deux prélèvements provenant d'un broc et d'un tunnel de lavage de lave-vaisselle se sont révélés positifs à *S. clavata*. Des mesures d'hygiène ont immédiatement été prises par l'hôpital et aucun nouveau cas de contamination ou infection à *S. clavata* n'a été reporté ultérieurement. Tous les isolats cliniques et environnementaux ont été analysés au CNRMA, aucun n'appartient aux clones précédemment identifiés en 2012 (clades A et B) et 2018. L'analyse du génome entier effectuée par la plateforme P2M de l'Institut Pasteur (Vincent Enouf, Alexis Criscuolo) a permis de montrer que les isolats cliniques (n=4) des trois patients ainsi que l'isolat provenant du tunnel de lavage appartiennent à un nouveau clade, confirmant que la source de l'infection est très probablement le lave-vaisselle (**Figure 22**). La souche isolée dans le broc quant à elle n'est pas liée génétiquement aux autres souches. Les premiers résultats de ce travail ont été présentés au congrès TIMM à Nice, en octobre 2019.

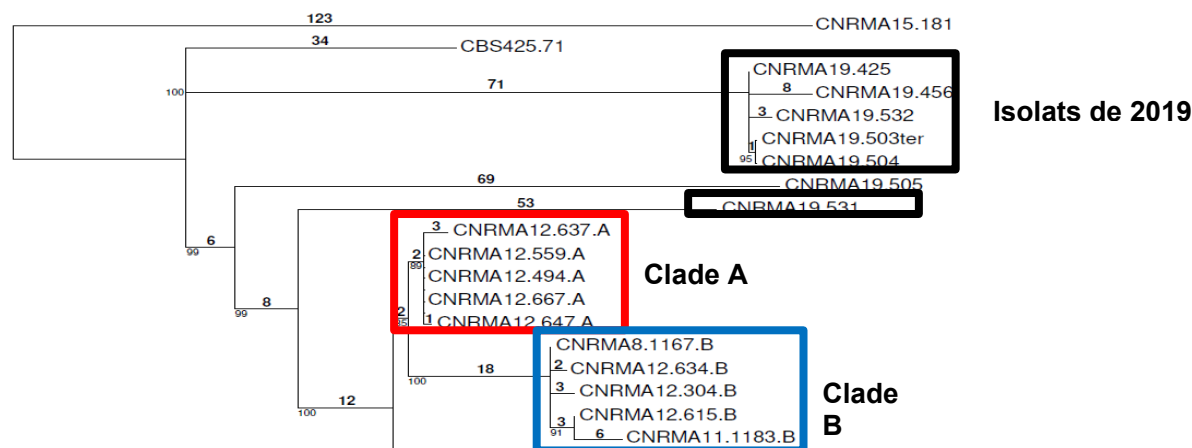


Figure 22 : Analyse des isolats de *S. clavata* responsables de cas groupés en 2019



### 5.5.2 Colonisation à *Candida auris*

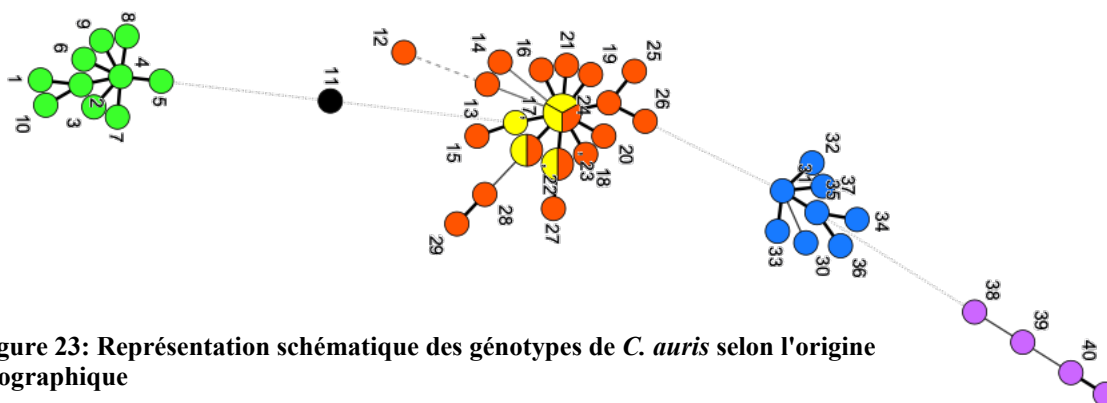
Au cours de l'année 2019, 3 cas de colonisation à *C. auris* ainsi que 4 cas de suspicion de *C. auris* ont été déclarés au CNRMA et les isolats analysés en urgence. Le profil protéique par MALDI-TOF a été déterminé, tandis que la PCR en temps réel décrite par Kordalewska *et al*<sup>19</sup>, et mise en place au CNRMA en 2018, ainsi que le séquençage des régions ITS par technique Sanger (Pôle de Génotypage des Pathogènes, CIBU, Institut Pasteur) étaient réalisées. Les résultats ont été envoyés aux correspondants dans les 24 heures suivant la réception de l'échantillon.

Pour les 4 cas de suspicion, les isolats appartenaient aux espèces *Wickerhamomyces anomalus* (n=1), *Apiotrichum veenhuisii* (n=1) et à une espèce inconnue proche de *Candida pseudohaemulonii* (n=2) qui fait partie du complexe d'espèces *C. haemulonii*, contenant *C. auris*.

Trois isolats ont été confirmés *C. auris*. Ils provenaient de trois hôpitaux et avaient été isolés respectivement d'urines, d'un écouvillon anal et d'un conduit auditif externe de trois patients différents. Les cas ont fait l'objet d'un signalement à Santé Publique France.

Une 4<sup>ème</sup> souche de *C. auris* a été reçue au CNRMA, elle faisait partie d'un contrôle qualité hospitalier et nous a été envoyé pour vérification par l'un des laboratoires qui l'avait reçue (cf. plus loin, §4 Alertes). Nous sommes intervenus auprès du prestataire de cet EEQ pour signaler la dangerosité potentielle d'un tel envoi non accompagné de consignes spécifiques de manipulation.

Le génome entier de ces 4 isolats a été séquencé par la plateforme P2M de l'Institut Pasteur et le génotypage déterminé en utilisant les 12 marqueurs microsatellites décrits par de Groot *et al*<sup>3</sup>. L'analyse des génomes et des génotypes a démontré que tous les isolats reçus en 2019 au CNRMA, ainsi que les 3 isolats cliniques précédemment reçus, appartiennent au clade génétique I, identifié comme étant le clade Indien (**Figure 23**).



**Figure 23: Représentation schématique des génotypes de *C. auris* selon l'origine géographique**

Minimum Spanning Tree construit avec le logiciel Bionumerics à partir des données de génotypage par les 12 marqueurs microsatellites. Chaque rond correspond à un génotype, les valeurs correspondent aux génotypes décrits dans la littérature. Les génotypes en orange appartiennent au clade I d'Asie du Sud, les génotypes en orange au clade II d'Asie de l'Est, les génotypes en bleu au clade III Africain, les génotypes en vert au clade IV Sud-Américain. Les génotypes en jaune correspondent aux isolats cliniques reçus au CNRMA

Les valeurs de CMIs ont été déterminés (**Tableau 15**) et correspondent au profil habituellement décrit avec des valeurs hautes pour le fluconazole, variables pour les autres azolés et l'amphotéricine B et la flucytosine et relativement basses pour les échinocandines. Les cas signalés par l'hôpital de la Réunion ont été présentés lors du congrès de la RICAI à Paris en décembre 2019.

<sup>19</sup> Kordalewska M, Zhao Y, Lockhart SR, Chowdhary A, Berrio I, Perlin DS (2017) Rapid and accurate molecular identification of the emerging multidrug-resistant pathogen *Candida auris*. *J Clin Microbiol* 55:2445–2452



Tableau 15 : Profil de sensibilité des souches de *C. auris* reçues au CNRMA

Strain	CMI (mg/L)						
	Fluco	Vori	Posa	AMB	5-FC	Caspo	Mica
CNRMA7.797	≥64	0.5	0.125	0.5	0.25	0.06	0.5
CNRMA15.337	≥64	0.125	≤0.014	0.25	≥64	0.015	0.03
CNRMA17.624	≥64	0.5	≤0.014	0.5	≥64	0.03	0.06
CNRMA19.95	≥64	1	0.06	0.125	≥64	0.03	0.03
CNRMA19.700	≥64	2	0.125	0.5	≥64	0.015	0.015
CNRMA19.885	8	0.06	≤0.014	0.06	≤0.124	0.015	0.015
CBS10913	2	≤0.014	≤0.014	0.06	≤0.125	0.015	0.015

Fluco (fluconazole), Vori (voriconazole), Posa (posaconazole), AMB (amphotéricine B), 5-FC (5-fluorocytosine), Caspo (caspofungine), Mica (micafungine).

### 5.5.3 Cas groupés de pneumocystose chez des patients transplantés de rein

Cet épisode a concerné au total 10 patients, 7 étant diagnostiqués en 2019 dans un court laps de temps (juillet à septembre 2019) et les trois autres ayant été identifiés rétrospectivement en mars 2019, août et octobre 2018. L'investigation a été faite par l'équipe d'hygiène locale en relation avec les cliniciens de l'hôpital, Santé Publique France (A. Berger-Carbonne et I. Poujol) et le CNRMA pour la réalisation des tests de génotypage microsatellite. Pour ces 10 patients, il a été identifié le même génotype Gt21, génotype connu dans la cohorte de Saint-Louis et déjà observé depuis août 2010 chez les patients transplantés rénaux, dans différents centres en France. Ce génotype est responsable ponctuellement de phénomènes épidémiques dans cette même population (correspond au Gt 123 de l'étude Européenne<sup>32</sup>). Ces données soulèvent la question de l'origine de la contamination et des flux de malades. La prise en compte de ces résultats a cependant permis de modifier la prise en charge des patients transplantés de rein avec la mise en place pour toute la cohorte de patients d'une prophylaxie par Bactrim.

## 6 Alertes

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

- Plusieurs suspicions de *C. auris* ont été rapidement levées grâce à la RT-PCR mise en place au CNRMA et des cas de colonisation à *C. auris* ont été explorés.
- Les cas groupés d'infections à *S. clavata* ont été notifiés à SPF et au CNRMA. L'identification a rapidement confirmé qu'il ne s'agissait pas du clone épidémique de 2012<sup>1</sup> (cf. description plus haut).
- Deux cas d'aspergillose invasive survenus en l'espace de 2 mois dans le même service de réanimation, dans un contexte de grippe grave et de travaux dans l'environnement immédiat des patients. Le typage des souches par la technique de microsatellites a identifié deux génotypes différents. Ceci excluait une contamination croisée mais bien entendu pas le fait que la même source environnementale (travaux) soit à l'origine de l'infection.
- Des cas groupés de pneumocystose chez des patients transplantés de rein et suivis dans le même centre hospitalier.

Le CNR a également été saisi par des collègues mycologues ayant appris que des laboratoires de microbiologie avaient reçu dans un panel de souches bactériennes et fongiques pour contrôle qualité MALDI-TOF (MALDI-TOF EQA scheme de QCMD), une souche de *C. auris*. L'envoi de cette souche n'avait été accompagné d'aucune recommandation particulière. Ceci est apparu comme potentiellement dangereux étant donnée la propension de cette levure à adhérer aux surfaces et donc la nécessité d'utiliser des procédés de nettoyage/désinfection particulier au laboratoire. SpF et l'ANSM ont laissé le CNRMA contacter le distributeur du panel. Après notre intervention, le distributeur a envoyé un message aux adhérents du programme leur suggérant de nous contacter en cas de doute "*As you are aware the panel contains a range of viable bacterial and fungal species. It is therefore important that your laboratory has the appropriate procedures for the handling and disposal of the EQA panel materials. If you have any concerns regarding the treatment and disposal of the fungal pathogens included within this EQA scheme please contact the NRCMA.*"

## **7 Activités de rétro-information, de formation et de conseil**

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

### **7.1 Conseil et expertise aux professionnels de santé**

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

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

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

Une réunion annuelle est organisée pour les partenaires des réseaux de surveillance active RESSIF et ODL. Elle permet de faire le point sur le fonctionnement des réseaux et de discuter des points d'amélioration, des études à prévoir. Elle fait l'objet d'un compte-rendu envoyé à tous les partenaires. La réunion de bilan de 2019 n'a pu avoir lieu puisqu'elle était programmée au moment des grèves en décembre 2019, et n'a pu être reprogrammée au printemps 2020 en raison de la crise sanitaire.

Les responsables et collaborateurs du CNRMA font partie de groupes de travail qui aboutissent à l'établissement de recommandations nationales ou internationales comme par exemple, à l'initiative de la COMAI AP-HP, [les recommandations sur le bon usage des antifongiques](#) coordonnées par F. Lanternier.

### **7.2 Conseil et expertise aux autorités sanitaires**

#### ***7.2.1 Au plan national***

- A la demande de l'agence danoise de l'environnement, l'ANSES formé un groupe de travail étudiant le lien potentiel entre l'usage des fongicides azolés en agriculture et l'augmentation éventuelle de l'incidence des aspergilloses multi-résistantes aux azolés (MARAF) chez les patients immunodéprimés. Fanny Lanternier et Stéphane Bretagne ont donc rejoint ce groupe d'experts.

- Françoise Dromer a participé aux travaux du Haut Commissariat de Santé Publique (HCSP) sur *C. auris*
- Tous les responsables et collaborateurs du CNRMA sont régulièrement sollicités par SpF. Lors de la journée "Signalement des infections associées aux soins" réunissant les responsables signalement des CPIas au siège de SpF à Saint Maurice (2/12/2019), le CNRMA (S. Bretagne et F. Dromer) est intervenu dans "Place aux experts" pour faire le point sur les recommandations du HCSP sur *C. auris* et sur les pneumocystoses.

### 7.2.2 Au plan international

- **EUCAST** : Nous participons activement en tant que représentants pour la France à l'AFST (AntiFungal Susceptibility Testing) sous-comité de l'EUCAST (European Committee for Antibiotic Susceptibility Testing). Ce comité regroupe 1 à 2 membres par pays (environ 15 pays sont représentés et Olivier Lortholary est notre représentant).
- **ECMM** : Fanny Lanternier, Alexandre Alanio et Stéphane Bretagne, tous trois fellows de l'ECMM, ont participé à la rédaction de recommandations ECMM sur le diagnostic et la prise en charge thérapeutique des mucormycoses (Global guideline for the diagnosis and management of mucormycosis: An initiative of the European Confederation of Medical Mycology in cooperation with the Mycoses Study Group Education and Research Consortium<sup>20</sup>. C'est une mise à jour qui inclut de nombreux auteurs d'horizons différents, y compris les régions avec un accès limité aux investigations complémentaires et aux thérapeutiques innovantes. La publication souligne aussi les lacunes actuelles sur les connaissances de ces infections et identifie quelques pistes de recherche.
- **eCDC** : Françoise Dromer a été sollicitée par l'eCDC dans le cadre d'une enquête sur les pratiques d'identification de *C. auris* en France
- **EORTC** : le CNRMA est actif au sein du groupe d'étude des antifongiques de l'Organisation Européenne de Recherche et de Lutte contre le Cancer (EORTC) à Bruxelles. Olivier Lortholary et Stéphane Bretagne sont co-auteurs d'une mise à jour des définitions et de recommandations<sup>21</sup>. Si la classification entre prouvée, probable et possible ne change pas, le contenu de chaque catégorie a été modifié avec des critères radiologiques moins stricts et sur le plan biologique, avec l'inclusion de la PCR aspergillus sur le sérum comme critère diagnostique. C'est la mission que s'était fixée l'European Aspergillus PCR Initiative sous l'égide de l'ISHAM et dont S. Bretagne a été membre fondateur en 2006.
- **ISHAM** :
  - Dea Garcia-Hermoso représente le CNRMA dans le groupe de travail « Joined ECMM/ISHAM Working Group » sur les infections à *Pseudallescheria/Scedosporium*
  - Dea Garcia-Hermoso est membre du groupe de travail sur « Barcoding and identification of fungi »
  - Françoise Dromer et Marie Desnos-Ollivier sont membres du groupe de travail sur le génotypage des souches cliniques et environnementales de *C. neoformans* et *C. gattii*.
  - Alexandre Alanio est membre du groupe « Fungal Whole Genome Sequencing » visant à standardiser la pratique de séquençage à haut débit pour le séquençage et les analyses du mycobiome.

<sup>20</sup> Cornely OA, et al. (2019) Global guideline for the diagnosis and management of mucormycosis: an initiative of the European Confederation of Medical Mycology in cooperation with the Mycoses Study Group Education and Research Consortium. *Lancet Infect Dis.* 19(12):e405-e421. doi: 10.1016/S1473-3099(19)30312-3. Epub 2019 Nov 5. Review.

<sup>21</sup> Donnelly JP et al (2019). Revision and Update of the Consensus Definitions of Invasive Fungal Disease From the European Organization for Research and Treatment of Cancer and the Mycoses Study Group Education and Research Consortium. *Clin Infect Dis.* 5. pii: ciz1008. doi: 10.1093/cid/ciz1008. [Epub ahead of print]

### 7.3 Activité de formation

Les responsables et collaborateurs du CNRMA contribuent au travers de conférences, colloques, séminaires et cours nationaux et internationaux à la formation de cliniciens et microbiologistes à la mycologie médicale. Ainsi, les collaborateurs hospitalo-universitaires participent à différents DU (en particulier le DU de mycologie médicale de Paris V), DURPI, DESC et même au summer school de l'ESCMID. Le cours de mycologie médicale de l'Institut Pasteur, dirigé par Olivier Lortholary et Dea Garcia-Hermoso a eu lieu en mars 2019 (prochaine session prévue au printemps 2021).

## 8 Travaux de recherche et publications

### 8.1 Activités de recherche en lien direct avec les missions et activités du CNR

#### 8.1.1 Diagnostic de la pneumocystose

Une première étude<sup>22</sup> a permis de dresser un état des lieux des différents tests de PCR quantitative utilisés pour le diagnostic de la pneumocystose en Europe. Nous avons créé un panel de cinq extraits d'acides nucléiques qui ont été envoyés à 16 laboratoires en Europe. Un total de 20 tests différents de qPCR a pu être analysé par échantillon. Nous avons ainsi montré que la capacité à détecter *P. jirovecii* pouvait varier au maximum de 10.000 fois pour un même échantillon mettant en évidence une grande hétérogénéité dans la façon de faire le diagnostic de pneumocystose par qPCR en Europe. De plus, il a été montré que la méthode donnant les meilleurs résultats étaient basés sur l'amplification d'acides nucléiques totaux et une détection de la cible mtSSU.

La deuxième étude<sup>23</sup> découle de la précédente et avait pour but de montrer quels sont les facteurs techniques qui influencent les résultats de la PCR quantitative. Ainsi nous avons montré que différents thermocycleurs, différentes enzymes de PCR, différentes méthodes influencent le résultat. Ainsi les méthodes de reverse transcriptase quantitative PCR (one step) étaient les meilleures permettant une meilleure sensibilité à partir de l'amplification d'acides nucléiques totaux (ARN et ADN) et non seulement à partir d'ADN.

Enfin, une revue de la littérature<sup>24</sup> fait le point sur les épidémies hospitalières dues à *P. jirovecii* et discute les mesures de prophylaxies à mettre en place de façon régulière et dans le cadre de transmission active dans un hôpital.

#### 8.1.2 Travaux sur l'aspergillose invasive

Une étude sur les facteurs associés à la survenue d'une aspergillose invasive après greffe de moëlle<sup>25</sup> résultant de la première collaboration entre le CNRMA à travers et la Société Française de Greffe de Moëlle a été publiée. C'est une étude multicentrique cas contrôlé qui a utilisé d'un côté les données mycologiques du réseau SAIF de 2005 à 2010 (Institut Pasteur, Paris) et les données du registre ProMISe de l'European Society for Blood and Marrow Transplantation. Ainsi 185 cas d'aspergillose prouvées ou probables ont été appariés à 651 contrôles. La première observation est le décalage vers des temps tardifs de la survenue de l'aspergillose avec 63% des cas survenant à plus de 100 jours après la greffe. Ces aspergilloses tardives sont associées à la survenue de GVHD aiguë de grade II, la rechute de la maladie hématologique, et la survenue d'une neutropénie. Ainsi, bien que les prises en charge thérapeutiques des patients allogreffés de

<sup>22</sup> Gits-Muselli et al. (2020) The Fungal PCR Initiative's evaluation of in-house and commercial *Pneumocystis jirovecii* qPCR assays: Toward a standard for a diagnostics assay. *Med Mycol*;58(6):779-788

<sup>23</sup> Dellière S et al. (2019) Quantification of *Pneumocystis jirovecii*: Cross-Platform Comparison of One qPCR Assay with Leading Platforms and Six Master Mixes. *J Fungi Basel Switz*;6(1):9

<sup>24</sup> Dellière S et al. (2019) Outbreak-Causing Fungi: *Pneumocystis jirovecii*. *Mycopathologia*.;1-18

<sup>25</sup> Robin C et al., SAIF (Surveillance des Aspergilloses Invasives en France) and the SFGM-TC (Société Francophone de Greffe de Moëlle et de Thérapie Cellulaire) Aspergillus Group. (2019) Mainly Post-Transplant Factors Are Associated with Invasive Aspergillosis after Allogeneic Stem Cell Transplantation: A Study from the Surveillance des Aspergilloses Invasives en France and Société Francophone de Greffe de Moëlle et de Thérapie Cellulaire. *Biol Blood Marrow Transplant*. 25(2):354-361. doi: 10.1016/j.bbmt.2018.09.028. Epub 2018 Sep 27.

moelle aient été largement modifiées au milieu des années 2000, ce sont toujours les facteurs post greffe qui restent prépondérants pour la survenue d'une aspergillose invasive.

La participation à l'étude sur la physiopathologie des infections fongiques au cours des déficits immunitaires primitifs a permis de se focaliser sur l'étude des aspergilloses pulmonaires chez les patients avec déficit en STAT3 et de décrire des formes de type aspergillose chronique et des formes de type ABPA<sup>26</sup>.

### 8.1.3 Travaux sur la cryptococcose

Nous avons utilisé les bases MEDLINE, EMBASE, et Web of Science et réalisé une méta-analyse<sup>27</sup> avec effet random pour préciser la prévalence de la détection de l'antigène cryptococcique chez les patients infectés par le VIH et avec une lymphopénie CD4 < 100/mm<sup>3</sup> (31 études ; 35,644 participants). La prévalence de la positivité était de 6% et celle de la méningite latente était de 33% parmi les patients ayant un antigène détecté. L'incidence de la méningite était de 21.4% (95% IC, 11.6%-34.4%) sans fluconazole et de 5.7% (95% CI, 3.0%-9.7%) avec le fluconazole préemptif à la posologie de 800 mg/j. Le taux de mortalité globale était plus élevé chez les CrAg-positifs que chez les CrAg-négatifs (risk ratio, 2.2; 95% CI, 1.7-2.9; P < .001)

L'essai ACTA a démontré qu'en comparaison au traitement de référence de 2 semaines d'amphotéricine B (AmB) plus flucytosine (5FC), 1 semaine d'AmB et 5FC était associé à une moindre mortalité et 2 semaines par voie orale de fluconazole (FLU) plus 5FC était non-inferieur. Ces données ont été obtenues au Malawi, Zambie, Cameroun, et Tanzanie. Une première étude ancillaire<sup>28</sup> a consisté en une analyse coût-efficacité de l'association FLU plus 5FC vs. FLU en Zambie. Les coûts moyens par patient étaient US\$847 (95%CI:776-927) pour FLU+5FC, et US\$628 (95%CI:557-709) pour FLU. La mortalité à 10 semaines était de 35.1% (95%CI 28.9-41.7) avec FLU+5FC et 53.8% (95%CI: 43.1-64.1) avec FLU. L'adjonction de 5FC au FLU était donc cout-efficace.

Dans l'essai ACTA, les couts par patient étaient US \$1442 pour 2 semaines de FLU oral et 5FC, \$1763 pour une semaine d'AmB et FLU, \$1861 pour une semaine d'AmB et 5FC, \$2125 pour 2 semaines d'AmB et FLU, et \$2285 pour 2 semaines d'AmB et 5FC. Comparée à 2 semaines d'AmB et 5FC, 1 semaine d'AmB et 5FC était moins onéreuse et plus efficace et 2 semaines de FLU et 5FC était moins coûteuse et aussi efficace. Une semaine d'AmB et 5FC et 2 semaines de FLU oral et 5FC sont des traitements coûts efficaces<sup>29</sup>.

## 8.2 Publications et communications en lien direct avec les missions/activités du CNR

### 8.2.1 Publications 2019

1. Barde F, Billaud E, Goldwirt L, Horodyckid C, Jullien V, Lanternier F, Lesprit P, Limousin L, Cohen JF, Lortholary O (2019) Low Central Nervous System Posaconazole Concentrations during Cerebral Phaeohyphomycosis. *Antimicrob Agents Chemother* 63(11):348. doi:10.1128/AAC.01184-19.
2. Boyer-Chammard T, Temfack E, Alanio A, Jarvis JN, Harrison TS, Lortholary O (2019) Recent advances in managing HIV-associated cryptococcal meningitis. *F1000Res* 8(743):743. doi:10.12688/f1000research.17673.1.
3. Cogliati M, Desnos-Ollivier M, McCormick-Smith I, Rickerts V, Ferreira-Paim K, Meyer W, Boekhout T, Hagen F, Theelen B, Inacio J, Alonso B, Colom MF, Trilles L, Montagna MT, De Donno A, Susever

<sup>26</sup> Duréault A, colleagues and the French Mycoses Study Group (2019). Spectrum of Pulmonary Aspergillosis in Hyper-IgE Syndrome with Autosomal-Dominant STAT3 Deficiency *J Allergy Clin Immunol Pract.* 7(6):1986-1995.e3. doi: 10.1016/j.jaip.2019.02.041.

<sup>27</sup> Temfack E et al. (2019). Cryptococcal antigen (CrAg) screening and targeted preemptive fluconazole in antiretroviral-naive human immunodeficiency virus-infected adults with CD4 cell counts <100/μL seems promising as a strategy to reduce the burden of cryptococcal meningitis (CM). *Clin Infect Dis.* 68(4):688-698.

<sup>28</sup> Shiri T et al. Addition of flucytosine to fluconazole for the treatment of cryptococcal meningitis in Africa: a multi-country cost-effectiveness analysis. *Clin Infect Dis.* 2019 Feb 28. pii: ciz163. doi: 10.1093/cid/ciz163.

<sup>29</sup> Chen T et al. Healthcare Costs and Life-years Gained From Treatments Within the Advancing Cryptococcal Meningitis Treatment for Africa (ACTA) Trial on Cryptococcal Meningitis: A Comparison of Antifungal Induction Strategies in Sub-Saharan Africa. *Clin Infect Dis.* 2019 Mar 13. pii: ciy971. doi: 10.1093/cid/ciy971.

- S, Ergin C, Velegraki A, Ellabib MS, Nardoni S, Macci C, Trovato L, Dipineto L, Akcaglar S, Mlinaric-Missoni E, Bertout S, Venca ACF, Sampaio AC, Criseo G, Ranque S, Cerikcioglu N, Marchese A, Vezzulli L, Ilkit M, Pasquale V, Polacheck I, Lockhart SR. Genotypes and population genetics of *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii* species complexes in Europe and the mediterranean area. *Fungal Genet Biol* 2019;129:16-29.
4. Cohen JF, Ouziel A, Matczak S, Brice J, Spijker R, Lortholary O, Bougnoux ME, Toubiana J (2019) Diagnostic accuracy of serum (1,3)-beta-d-glucan for neonatal invasive candidiasis: systematic review and meta-analysis. *Clin Microbiol Infect*. 291-298. doi: 10.1016/j.cmi.2019.09.010.
  5. Colley T, Sharma C, Alanio A, Kimura G, Daly L, Nakaoki T, Nishimoto Y, Bretagne S, Kizawa Y, Strong P, Rapeport G, Ito K, Meis JF, Chowdhary A (2019) Anti-fungal activity of a novel triazole, PC1244, against emerging azole-resistant *Aspergillus fumigatus* and other species of *Aspergillus*. *J Antimicrob Chemother* 74(10):2950–2958. doi:10.1093/jac/dkz302.
  6. Cornely OA, Alastruey-Izquierdo A, Arenz D, Chen SCA, Dannaoui E, Hochhegger B, Hoenigl M, Jensen HE, Lagrou K, Lewis RE, Mellingshoff SC, Mer M, Pana ZD, Seidel D, Sheppard DC, Wahba R, Akova M, Alanio A, Al-Hatmi AMS, Arikan-Akdagli S, Badali H, Ben-Ami R, Bonifaz A, Bretagne S, Castagnola E, Chayakulkeeree M, Colombo AL, Corzo-Leon DE, Drgona L, Groll AH, Guinea J, Heussel CP, Ibrahim AS, Kanj SS, Klimko N, Lackner M, Lamoth F, Lanternier F, Lass-Floerl C, Lee DG, Lehrnbecher T, Lmimouni BE, Mares M, Maschmeyer G, Meis JF, Meletiadis J, Morrissey CO, Nucci M, Oladele R, Pagano L, Pasqualotto A, Patel A, Racil Z, Richardson M, Roilides E, Ruhnke M, Seyedmousavi S, Sidharthan N, Singh N, Sinko J, Skiada A, Slavin M, Soman R, Spellberg B, Steinbach W, Tan BH, Ullmann AJ, Vehreschild JJ, Vehreschild M, Walsh TJ, White PL, Wiederhold NP, Zaoutis T, Chakrabarti A, Mucormycosis ECMM MSG Global Guideline Writing Group (2019) Global guideline for the diagnosis and management of mucormycosis: an initiative of the European Confederation of Medical Mycology in cooperation with the Mycoses Study Group Education and Research Consortium. *Lancet Infect Dis* 19(12):e405–e421. doi:10.1016/S1473-3099(19)30312-3.
  7. Danion F, Rouzaud C, Duréault A, Poirée S, Bougnoux M-E, Alanio A, Lanternier F, Lortholary O (2019) Why are so many cases of invasive aspergillosis missed? *Med Mycol* 57(Supplement\_2):S94–S103. doi:10.1093/mmy/myy081.
  8. Dellière S, Gits-Muselli M, Bretagne S, Alanio A (2019) Outbreak-Causing Fungi: *Pneumocystis jirovecii*. *Mycopathologia* 367(1242):2214–18. doi:10.1007/s11046-019-00408-w.
  9. Dellière S, Gits-Muselli M, White PL, Mengoli C, Bretagne S, Alanio A (2019) Quantification of *Pneumocystis jirovecii*: Cross-Platform Comparison of One qPCR Assay with Leading Platforms and Six Master Mixes. *JoF* 6(1):9. doi:10.3390/jof6010009
  10. Desnos-Ollivier M, Bretagne S, Boullié A, Gautier C, Dromer F, Lortholary O, French Mycoses Study Group (2019) Isavuconazole MIC distribution of 29 yeast species responsible for invasive infections (2015-2017). *Clin Microbiol Infect* 25(5):634.e1–634.e4. doi:10.1016/j.cmi.2019.02.007.
  11. Duréault A, Tcherakian C, Poirée S, Catherinot E, Danion F, Jouvion G, Bougnoux M-E, Mahlaoui N, Givel C, Castelle M, Picard C, Chansdesris MO, Lortholary O, Lanternier F, French Mycoses Study Group (2019) Spectrum of Pulmonary Aspergillosis in Hyper-IgE Syndrome with Autosomal-Dominant STAT3 Deficiency. *J Allergy Clin Immunol Pract* 7(6):1986–1995.e3. doi:10.1016/j.jaip.2019.02.041.
  12. Garcia-Hermoso D, Valenzuela-Lopez N, Rivero-Menendez O, Alastruey-Izquierdo A, Guarro J, Cano-Lira JF, Stchigel AM, French Mycoses Study Group (2019) Diversity of coelomycetous fungi in human infections: A 10-y experience of two European reference centres. *Fungal Biol* 123(4):341–349. doi:10.1016/j.funbio.2019.02.001.

13. Garcia-Vidal C, Carratalà J, Lortholary O (2019) Defining standards of CARE for invasive fungal diseases in solid organ transplant patients. *J Antimicrob Chemother* 74(Supplement\_2):ii16–ii20. doi:10.1093/jac/dkz039
14. Gits-Muselli M, Villiers S, Hamane S, Bercot B, Donay J-L, Denis B, Guigue N, Alanio A, Bretagne S (2019) Time to and differential time to blood culture positivity for assessing catheter-related yeast fungaemia: A longitudinal, 7-year study in a single university hospital. *Mycoses:myc.13024*. doi:10.1111/myc.13024.
15. Hoang MTV, ISHAM Barcoding of Medical Fungi Working Group, Meyer W (2019) Dual DNA Barcoding for the Molecular Identification of the Agents of Invasive Fungal Infections. *Front Microbiol* 10:1647. doi:10.3389/fmicb.2019.01647.
16. Kanyama C, Molloy SF, Chan AK, Lupiya D, Chawinga C, Adams J, Bright P, Lalloo DG, Heyderman RS, Lortholary O, Jaffar S, Loyse A, van Oosterhout JJ, Hosseinipour MC, Harrison TS (2019) One year mortality outcomes from the ACTA trial of cryptococcal meningitis treatment in Malawi. *Clin Infect Dis* 17:873. doi:10.1093/cid/ciz454
17. Koehler P, Mellinshoff SC, Lagrou K, Alanio A, Arenz D, Hoenigl M, Koehler FC, Lass-Flörl C, Meis JF, Richardson M, Cornely OA (2019) Development and validation of the European QUALity (EQUAL) score for mucormycosis management in haematology. *J Antimicrob Chemother* 54(6):S35–1712. doi:10.1093/jac/dkz051.
18. Meyer W, Irinyi L, Hoang MTV, Robert V, Garcia-Hermoso D, Desnos-Ollivier M, Yurayart C, Tsang C-C, Lee C-Y, Woo PCY, Pchelin IM, Uhrlaß S, Nenoff P, Chindamporn A, Chen S, Hebert PDN, Sorrell TC, ISHAM barcoding of pathogenic fungi working group (2019) Database establishment for the secondary fungal DNA barcode translational elongation factor 1 $\alpha$  (TEF1 $\alpha$ ). *Genome* 62(3):160–169. doi:10.1139/gen-2018-0083.
19. Parize P, Mamez A-C, Garcia-Hermoso D, Dumaine V, Poirée S, Kauffmann-Lacroix C, Jullien V, Lortholary O, Lanternier F (2019) Successful Treatment of *Saksena* sp. Osteomyelitis by Conservative Surgery and Intradiaphyseal Incorporation of Amphotericin B Cement Beads. *Antimicrob Agents Chemother* 63(1):691. doi:10.1128/AAC.01006-18
20. Plachouras D, Lötsch F, Kohlenberg A, Monnet DL, Candida auris survey collaborative group (2020) Candida auris: epidemiological situation, laboratory capacity and preparedness in the European Union and European Economic Area\*, January 2018 to May 2019. *Euro Surveill* 25(12):516. doi:10.2807/1560-7917.ES.2020.25.12.2000240.
21. Ponatshego PL, Lawrence DS, Youssouf N, Molloy SF, Alufandika M, Bango F, Boulware DR, Chawinga C, Dziwani E, Gondwe E, Hlupeni A, Hosseinipour MC, Kanyama C, Meya DB, Mosepele M, Muthoga C, Muzoora CK, Mwandumba H, Ndhlovu CE, Rajasingham R, Sayed S, Shamu S, Tsholo K, Tugume L, Williams D, Maheswaran H, Shiri T, Boyer-Chammard T, Loyse A, Chen T, Wang D, Lortholary O, Lalloo DG, Meintjes G, Jaffar S, Harrison TS, Jarvis JN, Niessen LW (2019) AMBIsome Therapy Induction Optimisation (AMBITION): High dose AmBisome for cryptococcal meningitis induction therapy in sub-Saharan Africa: economic evaluation protocol for a randomised controlled trial-based equivalence study. *BMJ Open* 9(4):e026288. doi:10.1136/bmjopen-2018-026288.
22. Pouvaret A, Guery R, Montillet M, Molina TJ, Duréault A, Bougnoux ME, Galliot R, Lanternier F, Delarue R, Lortholary O (2019) Concurrent cerebral aspergillosis and abdominal mucormycosis during Ibrutinib therapy for chronic lymphocytic leukemia. *Clin Microbiol Infect* 25(6):771–773. doi:10.1016/j.cmi.2019.01.016.
23. Rammaert B, Puyade M, Cornely OA, Seidel D, Grossi P, Husain S, Picard C, Lass-Flörl C, Manuel O, Le Pavec J, Lortholary O, SCEDO-LUNG collaborative group (2019) Perspectives on *Scedosporium* species and *Lomentospora prolificans* in lung transplantation: Results of an international practice survey



from ESCMID fungal infection study group and study group for infections in compromised hosts, and European Confederation of Medical Mycology. *Transpl Infect Dis* 21(5):e13141. doi:10.1111/tid.13141.

24. Robin C, Cordonnier C, Sitbon K, Raus N, Lortholary O, Maury S, Peffault de la Tour R, Bretagne S, Bastuji-Garin S, SAIF (Surveillance des Aspergilloses Invasives en France) and the SFGM-TC (Société Francophone de Greffe de Moelle et de Thérapie Cellulaire) Aspergillus Group (2019) Mainly Post-Transplant Factors Are Associated with Invasive Aspergillosis after Allogeneic Stem Cell Transplantation: A Study from the Surveillance des Aspergilloses Invasives en France and Société Francophone de Greffe de Moelle et de Thérapie Cellulaire. *Biol Blood Marrow Transplant* 25(2):354–361. doi:10.1016/j.bbmt.2018.09.028
25. Rouzaud C, Jullien V, Herbrecht A, Palmier B, Lapusan S, Morgand M, Guéry R, Duréault A, Danion F, Puget S, Goldwirt L, Lanternier F, Lortholary O (2019) Isavuconazole Diffusion in Infected Human Brain. *Antimicrob Agents Chemother* 63(10):26. doi:10.1128/AAC.02474-18.
26. Serris A, Danion F, Lanternier F (2019) Disease Entities in Mucormycosis. *JoF* 5(1):23. doi:10.3390/jof5010023.
27. Shiri T, Loyse A, Mwenge L, Chen T, Lakhi S, Chanda D, Mwaba P, Molloy SF, Heyderman R, Kanyama C, Hosseinipour MC, Kouanfack C, Temfack E, Mfinanga S, Kivuyo S, Chan AK, Jarvis JN, Lortholary O, Jaffar S, Niessen LW, Harrison TS. (2019) Addition of flucytosine to fluconazole for the treatment of cryptococcal meningitis in Africa: a multi-country cost-effectiveness analysis. *Clin Infect Dis* 17:873. doi:10.1093/cid/ciz163.

### 8.2.2 Publications 2020

1. Alanio A, Dellière S, Fodil S, Bretagne S, Mégarbane B (2020) Prevalence of putative invasive pulmonary aspergillosis in critically ill patients with COVID-19. *Lancet Respir Med* 8(6):e48–e49. doi:10.1016/S2213-2600(20)30237-X
2. Arastehfar A, Lim W, Daneshnia F, van de Sande WWJ, Fahal AH, Desnos-Ollivier M, de Hoog GS, Boekhout T, Ahmed SA (2020) *Madurella* real-time PCR, a novel approach for eumycetoma diagnosis. *PLoS Negl Trop Dis* 14(1):e0007845. doi:10.1371/journal.pntd.0007845.
3. Bouchand C, Nguyen D, Secretan P-H, Vidal F, Guéry R, Auvity S, Cohen JF, Lanternier F, Lortholary O, Cisternino S, Schlatter J (2020) Voriconazole topical cream formulation: evidence for stability and antifungal activity. *Int J Antimicrob Agents*:106083. doi:10.1016/j.ijantimicag.2020.106083
4. Bougnoux ME, Angebault C, Paccoud O, Coignard H, Lanternier F, Lortholary O (2020) Impact of intravenous and subcutaneous immunoglobulins on false positivity of galactomannan and  $\beta$ -D-glucan antigenaemia and detection of circulating *Aspergillus fumigatus* DNA. *Clin Microbiol Infect* 26(8):1101–1102. doi:10.1016/j.cmi.2020.02.036.
5. Chaussade H, Cazals X, Desoubeaux G, Jouvion G, Bougnoux M-E, Lefort A, Rivoisy C, Desnos-Ollivier M, Chrétien F, Chouaki T, Gruson B, Bernard L, Lortholary O, Lanternier F, French Mycosis Study Group (2020) Central nervous system candidiasis beyond neonates: Lessons from a nationwide study. *Med Mycol* 40:12. doi:10.1093/mmy/myaa051.
6. Chow NA, Muñoz JF, Gade L, Berkow EL, Xiao Li, Welsh RM, Forsberg K, Lockhart SR, Adam R, Alanio A, Alastruey-Izquierdo A, Althawadi S, Belén Araúz A, Ben-Ami R, Bharat A, Calvo B, Desnos-Ollivier M, Escandón P, Gardam D, Gunturu R, Heath CH, Kurzai O, Martin R, Litvintseva AP, Cuomo CA (2020) Tracing the Evolutionary History and Global Expansion of *Candida auris* Using Population Genomic Analyses. *mBio* 11(2):84. doi:10.1128/mBio.03364-19.
7. Cuomo CA, Alanio A (2020) Tracking a Global Threat: a New Genotyping Method for *Candida auris*. *MBio* 11(2):41. doi:10.1128/mBio.00259-20.

8. Danion F, Aïmanianda V, Bayry J, Duréault A, Wong SSW, Bougnoux M-E, Tcherakian C, Alyanakian M-A, Guegan H, Puel A, Picard C, Lortholary O, Lanternier F, Latge J-P (2020) *Aspergillus fumigatus* Infection in Humans With STAT3-Deficiency Is Associated With Defective Interferon-Gamma and Th17 Responses. *Front Immunol* 11:38. doi:10.3389/fimmu.2020.00038.
9. Danion F, Duréault A, Gautier C, Sénéchal A, Persat F, Bougnoux M-E, Givel C, Couderc L-J, Lortholary O, Garcia-Hermoso D, Lanternier F (2020) Emergence of azole resistant-*Aspergillus fumigatus* infections during STAT3-deficiency. *J Med Microbiol* 69(6):844–849. doi:10.1099/jmm.0.001200.
10. Dellièvre S, Rivero-Menendez O, Gautier C, Garcia-Hermoso D, Alastruey-Izquierdo A, Alanio A (2020) Emerging mould infections: Get prepared to meet unexpected fungi in your patient. *Med Mycol* 58(2):156–162. doi:10.1093/mmy/myz039.
11. Desnos-Ollivier M, Letscher-Bru V, Neuvéglise C, Dromer F (2020) *Yarrowia lipolytica* causes sporadic cases and local outbreaks of infections and colonisation. *Mycoses* 63(7):737–745. doi:10.1111/myc.13095.
12. Desnos-Ollivier M, Maufrais C, Pihet M, Aznar C, Dromer F, French Mycoses Study Group (2020) Epidemiological investigation for grouped cases of *Trichosporon asahii* using whole genome and IGS1 sequencing. *Mycoses* 57(2):e01505. doi:10.1111/myc.13126.
13. Lanternier F, et al. (2020) Invasive pulmonary aspergillosis treatment duration in haematology patients in Europe: An EFISG, IDWP-EBMT, EORTC-IDG and SEIFEM survey. *Mycoses* 63(5):420–429. doi:10.1111/myc.13056.
14. Mercier V, Bastides F, Bailly E, Garcia-Hermoso D, Miquelestorena-Standley E, Baz El Z, Marteau E, Vermes E, De Muret A, Bernard L, Desoubeaux G (2020) Successful Terbinafine Treatment for Cutaneous Phaeohyphomycosis Caused by *Trematosphaeria grisea* in a Heart Transplanted Man: Case Report and Literature Review. *Mycopathologia*.
15. Nyuykonge B, Klaassen CHW, Zandijk WHA, de Hoog GS, Ahmed SA, Desnos-Ollivier M, Verbon A, Bonifaz A, van de Sande WWJ (2020) Diagnostic implications of mycetoma derived from *Madurella pseudomycetomatis* isolates from Mexico. *J Eur Acad Dermatol Venereol*:e16402. doi:10.1111/jdv.16402.
16. Paccoud O, Fontaine H, Bougnoux ME, Lortholary O, Suarez F, Lanternier F (2020) Portal vein thrombosis as a long-term complication of chronic hepatosplenic candidiasis in an allogeneic haematopoietic stem-cell transplant recipient. *Clin Microbiol Infect* 26(7):967–968. doi:10.1016/j.cmi.2020.02.012
17. Patchouras D, Lötsch F, Kohlenberg A, Monnet LD, *Candida auris* survey collaborative group (2020). *Candida auris*: epidemiological situation, laboratory capacity and preparedness un the European Union and European economic area, January 2018 to May 2019. *Euro Surveill* 25 (12): 2000240doi: 10.2807/1560-7917.ES.2020.25.12.2000240.
18. Perrineau S, Guéry R, Monnier D, Puel A, Lanternier F (2020) Anti-GM-CSF Autoantibodies and *Cryptococcus neoformans* var. *grubii* CNS Vasculitis. *J Clin Immunol* 40(5):767–769. doi:10.1007/s10875-020-00796-5.
19. Pilmis B, Bougnoux M-E, Guéry R, Senghor Y, Le Monnier A, Lanternier F, Bretagne S, Alanio A, Lortholary O (2020) Failure of multiplex meningitis/encephalitis (ME) NAT during cryptococcal meningitis in solid organ recipients. *Transpl Infect Dis* 4:e13263. doi:10.1111/tid.13263
20. Rocchi S, et al. (2020) Interlaboratory evaluation of Mucorales PCR assays for testing serum specimens: A study by the fungal PCR Initiative and the Modimucor study group. *Med Mycol* 5:e405. doi:10.1093/mmy/myaa036

### 8.2.3 Communications nationales

- **Journées de Biologie Clinique Necker** Émergence de la résistance aux antifongiques : une menace pour la santé humaine ? (S. Bretagne), , Paris, janvier 2019
- **Réanimation 2019**Infections fongiques émergentes (F. Lanternier), , Parc des Expositions, Paris, janvier 2019
- **6<sup>ème</sup> Journée Recherche et Innovation en Biologie et Recherche Hospitalière** Mycobiome, une entité mal définie (S. Bretagne), , Paris, mai 2019
- **JNI (Journées Nationales d'Infectiologie)**, Lyon, juin 2019
  - Mucormycoses (F. Lanternier)
  - *Candida auris* : focus sur la France – Infections liées aux biothérapies - Aspergillose extra pulmonaire (O. Lortholary)
- **CARE XII**, Paris, octobre 2019
  - Cryptococcosis and hematological malignancies (F. Lanternier)
  - Haematology in the move: providing a new playground for fungi (O. Lortholary)
- **FungiLead**, La cryptococcose s'expose au changement: des essais et des recommandations (A. Alanio) et Antifongiques, toujours de l'innovation (A. Alanio), Paris, novembre 2019
- **RICAI** (39<sup>ème</sup> Réunion interdisciplinaire de Chimiothérapie Anti-Infectieuse), Immunogénétique des infections fongiques; de la génétique aux déficits immunitaires primitifs (F. Lanternier), Paris, décembre 2019

### 8.2.4 Communications internationales

- **ECIL 8 - 8th European Conference on Infections in Leukaemia**: ECIL-8 Recommendations for Targeted Treatment: Mucormycosis, First-Line (F. Lanternier), Sophia-Antipolis, septembre 2019
- **TIMM 2019 - 9th Trends in Medical Mycology** (O. Lortholary, co-chair), Nice-Acropolis Convention Center, Nice, octobre 2019:
  - M. Desnos-Ollivier: Whole genome sequencing: a valuable tool to study outbreaks due to uncommon yeast species (conférence invitée)
  - Dea Garcia-Hermoso: *Mucorales*: identification of species and association to clinical findings (conférence invitée)
  - F. Lanternier: Primary immunodeficiencies characterised by fungal infections (conférence invitée)
  - F. Lanternier: When the skin talks for systemic infections (conférence invitée)
  - O. Lortholary: Current therapeutic strategies - Chairman of cryptococcosis session - Guest moderator: current management of cryptococcal meningitis
- **IDWeek 2019 IDSA (Infectious Diseases Society of America)**: Advances in antifungal therapy of cryptococcal infections (O. Lortholary), Washington DC, USA, octobre 2019
- **17th InFocus - 1st ISHAM Latin America Congress**: Molecular diagnosis of mucormycosis. Genetic of IFI (F. Lanternier), Salvador, Brazil, novembre 2019
- **International Forum on Mucormycosis 2019**: Mucormycosis: who is at risk for infection and what are the outcomes? Assessment of mucormycosis in Adults patients (O. Lortholary), Chicago IL, USA, novembre 2019
- **Congrès allemand de mycologie 2019**, Primary immunodeficiencies and invasive fungal infections (F. Lanternier), Mannheim, Allemagne, octobre 2019

### 8.2.5 Séminaires sur invitations

- Disseminated aspergillosis with Ibrutinib and Management of IFD in Haematology patients (O. Lortholary), Londres UK, mars 2019
- Perspective historique et dynamique (O. Lortholary), IUH de Marseille - Soirée scientifique sur les Infections fongiques graves, Marseille, octobre 2019

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

*Pas de liens*

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

Le programme d'activité du CNRMA est en continuité avec celui des années précédentes même si nous savons d'ores et déjà que le bilan de l'année 2020 sera impacté par la crise sanitaire.

#### **10.1 Expertise microbiologique**

##### ***10.1.1 Analyse de la cohérence des seuils de détection de la résistance aux échinocandines***

La détermination des seuils de détection de la résistance aux échinocandines pour les levures posent des problèmes au CLSI et à l'EUCAST. Nous nous proposons d'utiliser la base de données du CNRMA pour analyser la cohérence des seuils de détection de la résistance aux échinocandines pour les levures courantes en reprenant de façon systématique les seuils proposés par EUCAST pour la micafungine, et les données obtenues en parallèle pour la caspofungine au CNRMA, en utilisant le résultat de la recherche de mutations. Ce séquençage sera fait systématiquement pour toutes les isolats classés résistants avec le seuil EUCAST et sensible en utilisant le seuil du CNRMA<sup>15</sup>.

##### ***10.1.2 Description des profils de sensibilité aux antifongiques des espèces rares***

Le CNR dispose d'une base de données unique sur les profils de sensibilité des levures rares. L'objectif est dans les deux années qui viennent de publier et de rendre ainsi disponible à la communauté internationale non francophone des données dont la communauté nationale dispose partiellement à travers ce rapport annuel.

##### ***10.1.3 Poursuite du développement des techniques d'identification et de typage***

Ces développements se feront en fonction des isolats envoyés et des questions qui se poseront (épidémie, cas groupés, nouveau pathogène). Notre objectif est de développer les techniques de typage à partir des données de NGS en commençant par les espèces à l'origine de cas groupés ou apparemment groupés.

##### ***10.1.4 Poursuite du développement de méthodes diagnostiques par qPCR pour le diagnostic des infections à champignons dimorphiques.***

Dans la continuité du travail réalisé pour le diagnostic moléculaire de l'histoplasmosse et de la coccidioïdomycose par A. Alanio à l'hôpital Saint-Louis, nous sommes en train de développer des tests moléculaires du même type pour diagnostiquer les maladies rares dues à des champignons dimorphiques, non-endémiques en France, mais importantes épidémiologiquement dans le monde comme la talaromyose (Asie du Sud-Est), la sporotrichose (Amérique du Sud), la blastomyose (Amérique du Nord, Afrique du Sud), l'emergomyose (Afrique du Sud). Des collaborations avec des référents cliniciens et mycologues sont en cours d'établissement pour valider ces méthodes sur des cohortes de patients bien identifiées. Ces tests permettront de répondre aux attentes des infectiologues, confrontés régulièrement à des suspicions diagnostiques chez des patients ayant voyagé en zone d'endémie. Le diagnostic de ces infections repose en effet sur les méthodes de culture et d'anatomopathologie classiques en l'absence d'autres tests fiables et/ou disponibles en France reposant sur la détection des antigènes.

### 10.1.5 Harmonisation du diagnostic de la pneumocystose et des attitudes thérapeutiques

La pneumocystose a été incluse dans les infections fongiques à surveiller dans les missions du renouvellement du CNRMA. Or, si la détection du pneumocystis par PCR quantitative (qPCR)<sup>30,22,31</sup> et le génotypage des isolats par microsattellites<sup>32,33</sup> pour l'étude de la transmission entre patients sont techniquement résolus et opérationnels au CNRMA, il demeure de nombreuses interrogations sur sa définition et sa physiopathologie<sup>34</sup>.

Ainsi, certains centres du réseau RESSIF ne déclarent que les cas qui ont été classés comme tels par les cliniciens (en pratique ceux qui ont été traités par cotrimoxazole à doses dites thérapeutiques) quelle que soit la charge fongique pourvu que la microscopie soit positive, certains déclarent les cas PCR positifs en fonction de seuils [Quantification cycle (Cq) <30 PCP prouvée, Cq>30 PCP probable, et Cq>35 colonisation], d'autres déclarent les cas où le clinicien a décidé que ce n'était pas une PCP mais a néanmoins prescrit du cotrimoxazole à doses dites prophylactiques. Il en découle une difficulté à analyser les déclarations et en particulier, une difficulté à cerner les PCP dans les populations non-VIH qui présentent une symptomatologie plus sévère avec des charges fongiques plus faibles<sup>35</sup>. Le constat est que ces populations VIH-négatives présentent une mortalité plus importante (**Tableau 6**).

Cette mortalité pourrait être due, en partie, à un traitement suboptimal de ces patients. Or, l'efficacité de la prophylaxie dans l'allogreffe de moelle démontre l'intérêt de faibles doses de cotrimoxazole pour supprimer ce risque<sup>35,36</sup>. Il convient donc de mieux cerner les cas dits à faibles charges, de mieux comprendre les interprétations des cliniciens, et de proposer de nouveaux moyens d'interprétation. En effet, la cinétique de décroissance de la charge fongique, même minime, est moindre en l'absence de traitement, et cette charge fongique peut même à l'inverse augmenter si le patient n'est pas traité avec un risque de développement de détresse respiratoire qui aurait pu être évitée<sup>37</sup>. Par ailleurs, ces faibles charges pourraient contribuer à aggraver l'état du patient en s'ajoutant à d'autres pathologies (virales, bactériennes) fréquentes chez ces patients<sup>38</sup>. Enfin, et c'est sans doute le plus important à l'échelle d'un service, elles contribuent à la transmission aérienne du champignon et responsable d'épidémie<sup>39</sup>. Ainsi, la prise de cotrimoxazole même à des doses prophylactiques a le potentiel d'interrompre la chaîne de transmission dans un service<sup>34</sup>.

Nous proposons donc de recenser parmi les centres déclarants RESSIF volontaires, l'ensemble des qPCR positives avec des charges Cq>30 sans considérer les raisons qui amèneraient à déclarer ou non le cas dans RESSIF, et d'analyser le devenir en fonction des pratiques et des attitudes thérapeutiques. Un projet sera déposé dans ce sens et discuté lors de la prochaine réunion RESSIF.

<sup>30</sup> Alanio A et al (2016) ECIL guidelines for the diagnosis of *Pneumocystis jirovecii* pneumonia in patients with haematological malignancies and stem cell transplant recipients. *J Antimicrob Chemother* 71(9):2386

<sup>31</sup> Dellière S et al (2019) Quantification of *Pneumocystis jirovecii*: Cross-Platform Comparison of One qPCR Assay with Leading Platforms and Six Master Mixes. *JoF* 6(1):9.

<sup>32</sup> Alanio A, et al. (2017) Diversity of *Pneumocystis jirovecii* Across Europe: A Multicentre Observational Study. *EBioMedicine* 22:155–163

<sup>33</sup> Alanio A et al (2017) Investigating Clinical Issues by Genotyping of Medically Important Fungi: Why and How? *Clin Microbiol Rev* 30(3):671–707

<sup>34</sup> Alanio A, Bretagne S (2017) *Pneumocystis jirovecii* detection in asymptomatic patients: what does its natural history tell us? *F1000Res* 6:739–10.

<sup>35</sup> Cordonnier C et al. (2017) *Pneumocystis jirovecii* pneumonia: still a concern in patients with haematological malignancies and stem cell transplant recipients—authors' response. *J Antimicrob Chemother* 72(4):dkw580–1268.

<sup>36</sup> Stern A et al. (2014) Prophylaxis for *Pneumocystis pneumonia* (PCP) in non-HIV immunocompromised patients. *Cochrane Database of Systematic Reviews* 26 Suppl D(8):137–53.

<sup>37</sup> Mori S et al. (2009) A followup study of asymptomatic carriers of *Pneumocystis jirovecii* during immunosuppressive therapy for rheumatoid arthritis. *J Rheumatol*. 36(8): 1600–5.

<sup>38</sup> Guigue N et al. (2015) Utility of adding *Pneumocystis jirovecii* DNA detection in nasopharyngeal aspirates in immunocompromised adult patients with febrile pneumonia. *Med Mycol* 53(3):241–247.

<sup>39</sup> Robin C et al. (2017) Molecular Demonstration of a *Pneumocystis* Outbreak in Stem Cell Transplant Patients: Evidence for Transmission in the Daycare Center. *Front Microbiol* 8.

### ***10.1.6 Analyse des génotypes circulants de *Pneumocystis jirovecii* chez les transplantés rénaux français***

A l'occasion de l'investigation de l'épidémie de pneumocystose en 2019 associée à un génotype spécifique et déjà impliqué dans des phénomènes épidémiques dans plusieurs hôpitaux français, nous souhaitons, avec Santé Publique France et les hygiénistes, mettre en place une étude rétrospective et prospective de génotypage systématique des pneumocystoses des patients transplantés rénaux en France de 2012 à 2023. Cette étude a pour but de comprendre comment le génotype 21 dissémine et pourquoi il semble associé spécifiquement aux patients transplantés. En parallèle, une collaboration avec des immunologistes spécialistes de la pneumocystose est en cours d'établissement, pour comprendre les déterminants immunologiques qui sous-tendent cette association préférentielle.

## **10.2 Surveillance microbiologique et épidémiologique**

### ***10.2.1 Analyse des IFI diagnostiquées en France (2012-2018)***

Ce travail prévu en 2019 a été retardé du fait des reports de déclarations dans certains CC-CNRMA, ce qui aurait biaisé les résultats. Les données préliminaires analysées à l'occasion de ce rapport démontre l'intérêt majeur de partager avec la communauté scientifique les données générées en France grâce à la participation des membres de RESSIF.

Nous allons également finaliser le travail sur les tendances épidémiologiques des candidémies en Ile-de-France. Ce travail a consisté en l'analyse de l'évolution des candidémies sur les 12 dernières années, en collaboration avec Didier Che et Julien Durand de Santé Publique France.

### ***10.2.2 Analyse des infections fongiques compliquant les infections COVID-19 sévères en réanimation***

Certaines aspergilloses invasives se développaient dans un contexte de gripes sévères. L'épidémie de Sars-Cov-2 a permis de découvrir que des IFI (aspergilloses invasives, mais aussi pneumocystoses et candidémies) pouvaient compliquer l'évolution des COVID-19 en réanimation. Nous avons entrepris de colliger les déclarations de ces complications auprès de tous les collaborateurs du CNRMA et allons en faire la synthèse prochainement.

### ***10.2.3 Poursuite des études collaboratives avec les cliniciens et mycologues de RESSIF***

De nombreuses collaborations sont en cours avec les CC-CNRMA et les cliniciens et mycologues français, certaines portées par nos collègues, pour exploiter les données générées par la surveillance active, décortiquer une question particulière en recueillant éventuellement des données complémentaires. Ainsi des projets concernant les fusarioses, histoplasmoses d'importation, les aspergilloses cérébrales, la comparaison des infections à *A. fumigatus* et *A. non fumigatus*, les co-infection pneumocystose/aspergillose pulmonaire, ...) ont été approuvés par le comité de coordination RESSIF et devraient se concrétiser.

Les réseaux de surveillance mis en place par le CNRMA sont sources de données clinico-biologiques nombreuses en quantité et en diversité. L'analyse de pathologies spécifiques amènent souvent à rechercher des données supplémentaires qui n'apparaissent pertinentes que secondairement et ne peuvent être anticipées prospectivement pour la surveillance, au risque d'aboutir à des fichiers dont la taille n'est pas compatible avec un recueil prospectif de routine. Cette collecte de données complémentaires ralentit considérablement l'analyse des cas. Pour les pathologies communes, les analyses épidémiologiques en cours ont pris du retard du fait de l'absence de personnel dédié ayant une expertise bioinformatique.

## **11 Liste des collaborateurs du CNRMA**

### **11.1 CC-CNRMA formant RESSIF**

Amiens (Dr. Taieb Chouaki/ Dr. A. Totet)  
Angers (Pr. Jean-Philippe Bouchara/Dr. Marc Pihet)  
Besançon (Pr. Laurence Millon)  
Caen (Dr. Julie Bonhomme)  
Clermont-Ferrand (Dr. Philippe Poirier)  
Dijon (Pr. Frédéric Dalle)  
Pointe-à-Pitre (Dr. Muriel Nicolas)  
Cayenne (Pr. Magalie Demar)  
Institut Gustave Roussy (Dr. Elisabeth Chachaty)  
Limoges (Dr. Bernard Bouteille)  
Fort de France (Dr. Nicole Desbois)  
Montpellier (Dr. Nathalie Bourgeois/Dr. Laurence Lachaud)  
Nantes (Pr. Patrice Le Pape/Dr Frédéric Morio)  
Nice (Dr. Martine Gari-Toussaint)  
Nîmes (Dr. Mylène Sasso)  
Paris/Cochin (Dr. André Paugam)  
Paris/Saint-Louis (Pr. Stéphane Bretagne)  
Paris/Hôpital Necker-Enfants Malades (Dr. Marie-Elisabeth Bougnoux)  
Paris/Hôpital des Quinze-Vingt (Dr. Lilia Merabet)  
Paris/Robert Debré (Pr Stéphane Bonacorsi/Dr. Patricia Mariani)  
Poitiers (Dr. Estelle Perraud-Cateau/Dr. Alida Minoza)  
Reims (Dr. Dominique Toubas)  
Rennes (Pr. Jean-Pierre Gangneux)  
Rouen (Pr. Loïc Favennec)  
Saint Etienne (Dr. Hélène Raberin/Dr. Caroline Mahinc)  
Strasbourg (Dr. Valérie Letscher-Bru)  
Toulouse (Dr. Sophie Cassaing)  
Tours (Pr. Guillaume Desoubeaux/Dr Eric Bailly)  
Versailles (Dr. Odile Eloy)

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

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



### **11.3 Participants à la surveillance des mycoses invasives en 2019**

Antibes, Laboratoire de Biologie Médicale, Centre Hospitalier Général  
Bayonne, Laboratoire de Biologie Médicale, Centre Hospitalier Général  
Béthune, Laboratoire de Biologie Médicale, Centre Hospitalier Général  
Bordeaux, Laboratoire de Parasitologie-Mycologie, CHU Hôpital Saint-André  
Brest, Laboratoire de microbiologie, Centre Hospitalier  
Castillon La Bataille, Synlab Aquitaine  
Compiègne, Centre Hospitalier de Compiègne  
Chambéry, Centre Hospitalier, Laboratoire de Biologie Médicale  
Chartres, CH Chartres Louis Pasteur Le Coudray  
Flers, CHG Jacques Monod  
Grenoble, CHRU Albert-Michallon  
La Rochelle, Groupe Hospitalier La Rochelle – RE – AUNIS  
Le Plessis Robinson, Laboratoire de Microbiologie, Centre Chirurgical Marie-Lannelongue  
Levallois Perret, Institution Franco Britannique  
Longjumeau, Groupe Hospitalier Nord-Essonne  
Lyon, Laboratoire de Mycologie, Hôpital de la Croix-Rousse  
Maison Alfort, Laboratoire de Parasitologie-Mycologie  
Mamoudzou, Centre Hospitalier Mayotte  
Meulan, Centre Hospitalier Intercommunal  
Montargis, Centre Hospitalier Layne  
Neuilly sur Seine, Laboratoire de Bactériologie, Hôpital Américain  
Nouméa, Centre Hospitalier G. Bouret  
Orange, Laboratoire Bouteille Perrée  
Orléans, Hôpital de la Sources  
Papeete, H.I.A. J. Prince  
Pau, Laboratoire de Bactériologie, Centre Hospitalier Général,  
Perpignan, laboratoire de bactériologie, CH Maréchal-Joffre  
Pringy, Laboratoire de Biologie Médicale, Centre Hospitalier Général  
Pontoise, Centre Hospitalier René Dubos  
Rang du Fliers, Sorlin, Centre Hospitalier  
Saint-Denis, La Réunion, Laboratoire de Biologie, CHD Felix Guyon  
Saint- Etienne, C.H.U. Hôpital du Nord  
Saint Flour, Laboratoire de Biologie Médicale OXYLAB  
Saint-Pierre, La Réunion, Laboratoire de Bactério-Parasito-Virologie et Hygiène, Groupe Hospitalier  
Réunion Sud  
Sanary, Laboratoire Biolittoral Sanary Bastide  
Suresnes, Laboratoire Central, Centre Medico Chirurgical Foch  
Tourcoing, Laboratoire de Biologie Médicale, CH Gustave Dron  
Troyes, Laboratoire d'Analyses, Centre Hospitalier  
Vaires sur Marne, BIO-VSM Laboratoire  
Vantoux, Hôpital Privé de Metz

## **12 Annexe 1 : Missions & organisation du CNR**

### **12.1 Missions du CNR et de ses éventuels laboratoires associés**

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

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

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

### **12.2 Organisation du CNR**

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

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

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

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

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

### 12.3 Locaux et équipements

Des locaux, entièrement rénovés en 2014, ont été attribués à l'unité de mycologie moléculaire (recherche) dans le bâtiment Duclaux (rez de chaussée haut, l'aile Fourneau) au 28 rue du Dr. Roux (**Figure 24**). Ils comprennent :



**Figure 24 : Locaux du CNRMA**

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

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

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

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

Les équipements principaux propres comprennent :

- PSM2 et incubateurs à CO<sub>2</sub>, hottes chimiques
- Thermocycleurs (iCycler et C1000 de Bio-Rad et LCR480 de Roche)
- MagNAlyser
- Extracteur semi-automatique KingFisher
- QUBit (fluoromètre pour quantification d'ADN, ARN et protéines)
- Nanodrop
- Caméras numériques, appareil photo Reflex

- Lecteur de plaques par spectrométrie (Tecan, Multiskan Go)
- Compteur de cellules (Luna)
- Microscopes : optiques, contraste interférentiel, inversé, à épifluorescence
- Loupe binoculaire
- Ordinateurs
- Container d'azote
- Congélateurs à -20°C, à -80°C et réfrigérateurs
- Etuves et incubateurs agités et non agités
- Enceinte illuminée Memmert
- Bioscreen
- Cytométrie en flux (Guava)

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

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

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

#### 12.4 Collections de matériel biologique

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

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

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

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

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

A tout le moins, les résultats du projet sont systématiquement communiqués au CNRMA.

#### 12.4.1 Collection de levures

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

- ✓ vérification de la pureté de la souche (pour les levures sur milieu BBL™ CHROMagar™ Candida, BD ou milieu aux graines de Niger pour les souches des *Cryptococcus sp.*)
- ✓ identification phénotypique par profil MALDI-TOF. Pour les levures rares, détermination de la fermentation du glucose, de la croissance à différentes températures et sur des milieux spéciaux (nitrate, NaCl 10% NaCl 15%, glucose 50%, acide acétique).
- ✓ extraction de l'ADN
- ✓ en cas d'identification de *C. albicans*, recherche systématique de l'espèce *C. dubliniensis* par PCR duplex
- ✓ en cas d'identification de *C. parapsilosis*, recherche systématique de *C. orthopsilosis* et *C. metapsilosis* par séquençage des régions ITS<sup>40</sup>
- ✓ en cas de suspicion de *C. auris*, réalisation en urgence d'une PCR en temps réel avec des amorces spécifiques pour amplifier une partie de la région ITS1 et séquençage génome entier pour détermination du clade
- ✓ en cas de suspicion de *S. clavata*, réalisation en urgence d'une PCR-ASO en temps réel permettant d'identifier *S. clavata* et l'espèce proche *M. capitatus* ainsi que le clade A responsable de l'épidémie nationale de 2012
- ✓ en cas d'identification de *Trichosporon sp.* séquençage systématique de la région IGS1 de l'ADN ribosomique<sup>41</sup>
- ✓ en cas d'identification de *Debaryomyces sp.* ou de *C. lusitaniae*, séquençage systématique d'une partie du gène codant l'actine<sup>42</sup>
- ✓ en cas d'identification de *M. guilliermondii* ou *M. caribbica*, séquençage systématique d'une partie du gène *RPB1*
- ✓ en cas d'identification de *C. neoformans* détermination du sérotype par amplification de régions des gènes *Gpal* et *Pak1* avec des amorces spécifiques du sérotype A ou D et/ou séquençage de la région IGS du gène codant l'ARN ribosomique
- ✓ détermination de la sensibilité à 8 antifongiques systémiques (amphotéricine B, 5-fluorocytosine, fluconazole, voriconazole, posaconazole, isavuconazole, caspofungine, micafungine)
- ✓ en cas de moindre sensibilité à la caspofungine (CMI $\geq$ 0,5 mg/L), séquençage systématique partiel des gènes codant la 1,3 beta-glucane synthase pour les isolats de *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. tropicalis*, *C. krusei*, *C. dubliniensis*, *C. kefyr* et *C. lusitaniae*
- ✓ en cas d'espèce non « fréquente » ou de profil MALDI-TOF non valide, séquençage systématique des régions ITS1 – 5.8S – ITS2 par les couples d'amorces V9D/LS266 et de la région D1/D2 de la sous-unité 26S (couple d'amorces NL1/NL4) du gène codant pour l'ARN ribosomique
- ✓ recherche d'ascospores si c'est pertinent, culture sur lames pour les espèces de *Trichosporon*
- ✓ récupération de données cliniques et épidémiologiques
- ✓ Stockage des données physiologiques, des profils de sensibilités aux antifongiques, des résultats de typage et des séquences nucléotidiques dans la base de données « Institut Pasteur FungiBank »

<sup>40</sup> Tavanti A, et al. *Candida orthopsilosis* and *Candida metapsilosis* spp. nov. to replace *Candida parapsilosis* groups II and III. J Clin Microbiol. 2005; 43:284

<sup>41</sup> Sugita T, et al. Sequence Analysis of the Ribosomal DNA Intergenic Spacer 1 Regions of *Trichosporon* Species. J Clin Microbiol. 2002, 40;1826

<sup>42</sup> Martorell P, et al. Sequence-based identification of species belonging to the genus *Debaryomyces* FEMS Yeast research. 2005; 5:1157

La collection du CNRMA comprend ainsi des souches bien caractérisées appartenant à 28 genres et 107 espèces différents (1 à 3280 isolats/espèce) et se répartissant en :

- plus de 5400 souches de nombreuses espèces de levures isolées d'hémocultures en région parisienne depuis octobre 2002 dans le cadre de l'Observatoire des Levures, stockées congelées en glycérol 40% à -80°C, et depuis 2009 en glycérol 20% dans l'azote liquide.
- plus de 2600 souches de levures provenant d'autres sites profonds ou superficiels, stockées congelées à -20°C entre 2002 et 2006, à -80°C depuis 2007, et en double depuis 2009 dans l'azote liquide.
- plus de 3100 souches de *Cr. neoformans* provenant de la surveillance de la cryptococcose en France depuis 1991. Seules les souches reçues depuis 2001 ont été analysées comme décrit ci-dessus et stockées congelées. Les souches antérieures étaient initialement stockées dans l'eau distillée stérile à 4°C, mais ont été progressivement remises en culture et stockées à -80°C et dans l'azote liquide.
- S'y ajoutent des souches de référence (contrôle de qualité, souches types) importantes pour les activités d'expertise. Elles proviennent des collections internationales (ATCC, CBS) et sont conservées à -80°C. Elles ne peuvent être distribuées.

#### ***12.4.2 Collection de champignons filamenteux***

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

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

La collection comprend des souches appartenant à 99 genres et 372 espèces différents, (1 à 394 isolats/espèce) :

- ✓ près de 3400 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.

#### ***12.4.3 Collection d'images numériques***

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

#### ***12.4.4 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.



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

La base de données compilant les données d'identification polyphasique réalisée au CNRMA « Institut Pasteur FungiBank » (<http://fungibank.pasteur.fr/>) a été créée en collaboration avec Vincent Robert (société BioAware) avec le logiciel BioloMICS (Figure 25). Elle est constituée des séquences ADN de pathogènes fongiques (levures et champignons filamenteux) associés aux données de CMI. Cette base de données est publique, accessible sans mot de passe pour l'utilisateur. Les centres collaborateurs du CNRMA peuvent obtenir des paramètres de connexion qui leur donnent accès à davantage d'information et de séquences.

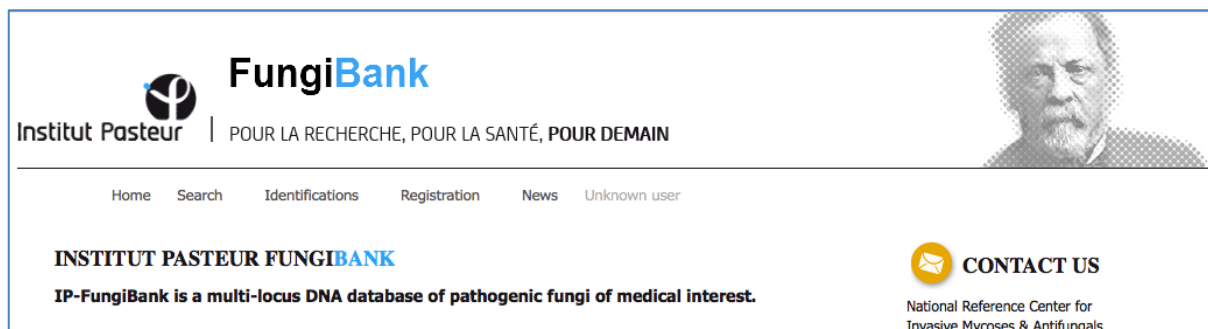


Figure 25 : Portail de la base de données de séquences Institut Pasteur FungiBank

La principale fonction de IP FungiBank est l'identification « moléculaire » en ligne par les biais de recherche de similarité basée sur « pairwise alignments ». IP FungiBank a plusieurs atouts par rapport à d'autres bases de séquences : contrôle de qualité des séquences, mise à jour régulière de la nomenclature fongique, données associées disponibles telles que la sensibilité aux antifongiques, des séquences nucléotidiques et protéiques des gènes *FKS* et *CYP51A* pour les souches résistantes et des profils alléliques de certaines souches (*C. albicans*, *C. parapsilosis*, *C. krusei*, *C. tropicalis* et *A. fumigatus*). Les régions séquencées sont choisies en fonction des différents groupes fongiques rencontrés : le séquençage ITS et 26/28S pour la plupart d'espèces ; factor d'élongation- $\alpha$  ou RPB2 pour *Fusarium* spp.,  $\beta$ -tubuline et/ou calmoduline pour *Aspergillus* spp. ou IGS pour *Trichosporon* spp. et *Cryptococcus* spp, actine pour *Clavispora lusitaniae* et *Debaryomyces* spp., RPB1 pour le complexe *M. guilliermondii*.

Les informations disponibles pour chaque isolat comprennent le site et l'année de prélèvement, le nom de la ville/hôpital, les valeurs de CMI (EUCAST), l'espèce identifiée au CNRMA, la(es) séquence(s) utilisées pour l'identification, et éventuellement, les données de génotypage et/ou présence/absence de mutations (résistance aux antifongiques). La base contient actuellement 2203 séquences (ITS, 26S, IGS, actine, RPB1, FKS) pour 2137 souches de levures et 2623 séquences (18S, 28S, ITS, calmoduline, actine,  $\beta$ -tubuline, EF1- $\alpha$ , RPB1, RPB2, CYP51A) pour 1269 souches de champignons filamenteux. La base de données est implémentée régulièrement avec les nouvelles données disponibles.

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

### 12.4.6 Collection de sérums

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

## 12.5 Démarche qualité du laboratoire

Le CNRMA fait partie des Centres Nationaux de Référence placés sous la responsabilité de l'Institut Pasteur qui sont au nombre de 14. Ils sont organisés en multisite et constituent, avec la Cellule d'Intervention Biologique d'Urgence (CIBU), le Laboratoire de Référence et d'Expertise Multisite

(LREMS). Le LREMS est sous démarche d'accréditation. Le CNRMA a été accrédité selon la **norme NF EN ISO 15189** en mars 2015. La portée d'accréditation est visible [sur le site du COFRAC](https://www.cofrac.fr/annexes/sect8/8-2588.pdf) (<https://www.cofrac.fr/annexes/sect8/8-2588.pdf>).

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

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

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

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

Suite à l'évaluation de Janvier 2018, les 14 CNR de l'Institut Pasteur et la CIBU du LREMS sont accrédités COFRAC selon la norme ISO 15189 version 2012 sous le n° 8-2588. L'annexe d'accréditation est disponible sur le site du COFRAC [www.cofrac.fr](http://www.cofrac.fr).

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

Etapes clés de l'année 2019	Périodes de réalisation
Revue qualité	20 avril 2019
Revue de direction LREMS et ajustement de la demande d'extension	3 juin 2019
Audit interne qualité	28 novembre 2019
Audit interne technique	11 septembre 2019

Perspectives pour l'année 2020	Prévision de réalisation
Revue qualité LRE	Janvier-septembre 2020
Audit de renouvellement COFRAC	Octobre 2020
Audits internes qualité et technique	Septembre - novembre 2020
Revue de direction LRE-MS	Septembre 2020
Portée d'accréditation complète	Courant 2021

## 12.6 Aspects réglementaires

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

Dans le cadre de la mise en œuvre du nouveau Règlement Général sur la Protection des Données (RGPD) entré en application le 25 mai 2018, l'Institut Pasteur a institué un programme permanent de conformité au RGPD. Il a dans cadre de celui-ci :

- désigné un délégué à la protection des données (DPO) depuis juillet 2018 ;
- établi un registre des opérations de traitement pour lesquelles il agit d'une part en qualité de responsable du traitement et d'autre part en qualité de sous-traitant ;
- souscrit auprès de la CNIL un engagement de conformité aux méthodologies de référence MR-01 – MR-02 et MR-03 ;
- pris des initiatives de sensibilisation de ses personnels à la protection des données.

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

### **13.1 Liste des techniques de référence**

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

- ✓ Identification phénotypique complète des levures et des champignons filamenteux avec profils protéiques par spectrométrie de masse, fermentation de certains sucres, croissance sur milieux spéciaux, réalisation de cultures "3 points", de cultures sur lames, détermination des vitesses et des températures maximales de croissance ...
- ✓ Détermination de la sensibilité aux antifongiques par une technique en milieu liquide standardisée par le comité européen (EUCAST)<sup>43,44</sup>. Les antifongiques testés sont le fluconazole (Triflucan®), l'itraconazole (Sporanox®), la 5-fluorocytosine (Ancotil®), l'amphotéricine B (Fungizone®), le voriconazole (V-fend®), le posaconazole (Noxafil®), l'isavuconazole (Cresemba®), la terbinafine (Lamisil®), la caspofungine (Cancidas®), et la micafungine (Mycamine®).
- ✓ Identification des isolats d'espèces communes de champignons par MALDI-TOF (Biotyper Bruker)
- ✓ Extraction d'ADN pour les levures et les champignons filamenteux selon des protocoles optimisés.
- ✓ Séquençage nucléotidique des régions ITS et de la région variable de la grande sous-unité 28S de l'ADN ribosomique pour l'identification moléculaire de tous les champignons, et, pour certaines espèces, séquençage d'autres loci (voir plus loin).
- ✓ Identification de *Candida dubliniensis* par PCR duplex en utilisant les amorces spécifiques d'une partie du gène de l'actine<sup>45</sup> et les amorces universelles ITS1/ITS4 (technique accréditée COFRAC selon la norme 15189).
- ✓ PCR en temps réel permettant l'identification en urgence de *Candida auris*, *S. clavata*
- ✓ Génotypage par marqueurs microsatellites ou MLST pour les espèces *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. tropicalis*, *C. krusei*, *C. parapsilosis*, *C. auris*, *C. neoformans/C. gattii*, *A. fumigatus*
- ✓ Diagnostic anatomopathologique / immuno-histochimie
- ✓ Diagnostic moléculaire sur tissus/échantillons frais, congelés ou fixés
- ✓ PCR diagnostique histoplasmosse, coccidioidomycose, mucormycose (site hôpital Saint-Louis du CNRMA)
- ✓ Détection des mutations dans le gène *Cyp51A* pour les isolats d'*Aspergillus fumigatus* résistants aux antifongiques azolés<sup>46</sup>
- ✓ Détection des mutations dans les gènes *Fks* pour les isolats de *Candida albicans*, *C. glabrata*, *C.*

<sup>43</sup> EUCAST Definitive Document EDef 7.1 (2008) method for the determination of broth dilution MICs of antifungal agents for fermentative yeasts. *Clin Microbiol Infect* 14:398-405.

<sup>44</sup> EUCAST Technical Note on the method for the determination of broth dilution minimum inhibitory concentrations of antifungal agents for conidia-forming moulds (2008) *Clin Microbiol Infect* 14:982

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

<sup>46</sup> Mellado E, et al. Identification of two different 14-alpha sterol demethylase-related genes (*cyp51A* and *cyp51B*) in *Aspergillus fumigatus* and other *Aspergillus* species (2001) *J Clin Microbiol* 39:2431 (erratum p4225).

*tropicalis*, *C. krusei*, *C. lusitaniae*, *C. dubliniensis*, *C. kefyr* ayant des profils de sensibilité anormaux pour les échinocandines.

### 13.1.2 Techniques mises en place en 2019

- Ajout de nouvelles cibles pour l'identification de diverses espèces de levures et de champignons filamenteux
- Génotypage par marqueurs microsatellites pour les espèces *C. auris*

### 13.2 Liste des marqueurs épidémiologiques disponibles

- Pour *C. albicans*, 5 séquences microsatellites (CDC3, HIS3, EF3, STPK, CDR1)<sup>47,48</sup>, et les 7 loci MLST (AAT1a, ACC1, ADP1, MPIb, SYA1, VPS13, ZWF1)<sup>49</sup>
- Pour *C. glabrata*, 5 séquences microsatellites (RPM2, MTI, ERG, Cg4, Cg6)<sup>50</sup>
- Pour *C. parapsilosis*, 3 séquences microsatellites (CP1, CP4, CP6)<sup>51</sup>
- Pour *Aspergillus fumigatus*, 4 séquences microsatellites A, B, C et D<sup>52</sup>
- Pour *Candida auris*, 12 marqueurs microsatellites (M2a, M1b, M2c, M3-Ia, M3-Ib, M3-Ic, M3-Iia, M3-IIb, M3-IIc, M9a, M9b, M9c)<sup>3</sup>
- Pour *C. tropicalis*, 6 loci MLST (MDR1, XYR1, SAPT4, SAPT2, ZWF1a, ICL1)<sup>53</sup>, et 2 séquences microsatellites (URA3 et CT14)<sup>54</sup>
- Pour *Cr. neoformans*, sérotypage par PCR spécifiques (*Pak1* et *Gpa1*), détermination de la ploïdie (cytométrie en flux), et typage par la technique MLST (7 loci : CAP59, URA5, LAC1, IGS1, GPD1, PLB1 et SOD1)<sup>55</sup>
- Pour *Candida krusei*, 6 loci MLST (ADE2, LYS2, HIS3, LEU2, TRP1 et MPD1)<sup>56</sup>
- Pour *Cryptococcus gattii*, 7 loci MLST (IGS1, CAP59, URA5, PLB1, GPD1, SOD1, LAC1)<sup>57</sup>
- Détection par PCR en temps réel du clone épidémique de 2012 pour les souches de *S. clavata*
- Identification des espèces *S. clavata*, *M. capitatus* et *C. auris* par PCR en temps réel
- Comparaison de souches de champignons responsables d'épidémies/cas groupés par séquençage génome entier et développement de techniques de typage / d'identification du clone épidémique éventuel

### 13.3 Liste des techniques recommandées par le CNR

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

<sup>47</sup> Foulet F, et al (2005) Microsatellite markers as a typing system for *Candida glabrata*. *J Clin Microbiol* 43:4574-9.

<sup>48</sup> Stephan F, et al (2002) Molecular diversity and routes of colonization of *Candida albicans* in a surgical intensive care unit, as studied using microsatellite markers. *Clin Infect Dis* 35:1477-83.

<sup>49</sup> Bougnoux ME, et al (2003) Collaborative consensus for optimized multilocus sequence typing of *Candida albicans*. *J Clin Microbiol* 41:5265

<sup>50</sup> Foulet F, et al (2005) Microsatellite marker analysis as a typing system for *Candida glabrata*. *J Clin Microbiol* 43:4574

<sup>51</sup> Irinyi L, et al (2015) ISHAM-ITS reference DNA barcoding database - the quality controlled standard tool for routine identification of human and animal pathogenic fungi. *Med Mycol* 53(4):313-37.

<sup>52</sup> Bart-Delabesse E, et al (1998) Microsatellite markers for typing *Aspergillus fumigatus* isolates. *J Clin Microbiol* 36:2413

<sup>53</sup> Tavanti A, et al (2005) Multilocus sequence typing for differentiation of strains of *Candida tropicalis*. *J Clin Microbiol* 43: 5593-600.

<sup>54</sup> Desnos-Ollivier M, et al (2008) Clonal population of flucytosine-resistant *Candida tropicalis* from blood cultures, Paris, France. *Emerg Infect Dis* 14:557

<sup>55</sup> Meyer W, et al (2009) Consensus multi-locus sequence typing scheme for *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii*. *Med Mycol* 47:561

<sup>56</sup> Jacobsen MD, et al (2007) Strain Typing and Determination of Population Structure of *Candida krusei* by Multilocus Sequence Typing. *J Clin Microbiol* 45:317

<sup>57</sup> Hagen F, et al (2012) Autochthonous and dormant *Cryptococcus gattii* infections in Europe. *Emerging Infect Dis* 10:1618

### 13.3.1 Identification des champignons

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

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

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

Espèce	Gène	Amorces
Complexe d'espèces <i>A. fumigatus</i>	$\beta$ -tubuline	Btub1F/ Btub2R <sup>58</sup>
Complexe d'espèces <i>Fusarium spp</i>	Factor d'élongation (TEF1- $\alpha$ )	EF1 / EF2 <sup>59</sup>
	RNA polymérase II (RPB2)	5F2/ 7CR <sup>60</sup>
Complexe d'espèces <i>Pseudallescheria / Scedosporium</i>	$\beta$ -tubuline	TUB-F/ TUB-R <sup>61</sup>
<i>Phaeoacremonium spp</i>	$\beta$ -tubuline	T1 /Bt2b <sup>62</sup>
Coelomycètes	$\beta$ -tubuline	TUB2-F / TUB4-R <sup>63</sup>
<i>Trichosporon spp.</i>	IGS1 / ADNr	26SF/5SR <sup>41</sup>
<i>Debaryomyces spp.</i>	actine	CA21/CA15R <sup>42</sup>
<i>Clavispora lusitanae</i>	actine	CA16mod/CA5 <sup>64</sup>
Complexe <i>M. guilliermondii</i>	RPBI	

### 13.3.2 Diagnostic des mycoses endémiques

**La sérologie par électro-synérèse a définitivement été abandonnée par le CNRMA en raison de ses mauvaises performances.** Il s'agissait d'une technique "maison" utilisant des réactifs (antigènes et sérums de référence) commercialisés qui sont de qualité inconstante, obligeant à des mises au point répétées lors des changements de lot. Par ailleurs, la reproductibilité des résultats, indépendamment de ces problèmes de réactifs, est très mauvaise. La contribution de la sérologie au diagnostic des mycoses exotiques est très

<sup>58</sup> Balajee S, et al (2005) *Aspergillus lentulus* sp. nov., a new sibling species of *A. fumigatus*. *Eukaryot Cell* 4:625-32.

<sup>59</sup> O'Donnell K. et al (2007) 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* 45:2235-48.

<sup>60</sup> O'Donnell K, Cigelnik E (1997) Two divergent intragenomic rDNA ITS2 types within a monophyletic lineage of the fungus *Fusarium* are nonorthologous. *Mol Phylogenet Evol* 7:103-16.

<sup>61</sup> Cruse M, et al (2002) Cryptic species in *Stachybotrys chartarum*. *Mycologia* 94:814-22.

<sup>62</sup> Mostert L, et al (2005) Species of *Phaeoacremonium* associated with infections in humans and environmental reservoirs in infected woody plants. *J Clin Microbiol* 43:1752-67.

<sup>63</sup> Aveskamp MM, et al (2009) DNA phylogeny reveals polyphyly of *Phoma* section *Peyronellaea* and multiple taxonomic novelties. *Mycologia* 101:363-82.

<sup>64</sup> Guzman et al (2013) Phylogenetic analysis of the angiosperm-floricolous insect-yeast association: Have yeast and angiosperm lineages co-diversified? *Molecular Phylogenetics and Evolution* 68:161-175

faible. Ainsi, sur les 3500 sérologies enregistrées dans la base de données du CNRMA en 9 ans, moins de 8% étaient positives, mais avec de grandes différences en fonction du contexte clinique (<4% de positivité de la sérologie 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 dans le passé d'établir le diagnostic.

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

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

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

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

La meilleure solution est toujours de bien identifier l'espèce, car les CMI des isolats sauvages d'une espèce donnée ont une distribution particulière à l'espèce (**Tableau 10, Tableau 11, Tableau 12, Tableau 13**). Il faut donc considérer qu'en l'absence de pression antifongique, les isolats d'une même espèce ont un profil sauvage et qu'il est donc, par exemple, inutile de tester une souche de *Candida albicans*, même isolée d'une hémoculture, s'il n'y pas eu de pré-exposition à un antifongique. **L'alternative en cas d'espèce rare ou de pression antifongique antérieure, est d'envoyer l'isolat responsable de mycose invasive au CNRMA accompagné d'une justification de la demande** (fiche de demande d'expertise).

### *13.3.4 Désinfection des surfaces*

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

- Pour les principales espèces de levures manipulées au CNRMA, on n'observe aucune croissance résiduelle après un temps de contact inférieur ou égal à 5 minutes.



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

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