Rapport annuel d'activité

2021

Centre de national de référence Mycoses Invasives et Antifongiques

Responsables

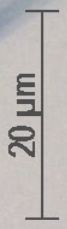
Pr. Françoise Dromer
Pr. Stéphane Bretagne, adjoint
Pr. Olivier Lortholary, adjoint

Collaborateurs

Dr. Alexandre Alanio, médecin mycologue
Mme Christèle Auguste, assistante
Mme Agathe Bertho, technicienne
Mme Marie Desnos-Ollivier, ingénieur
Mme Dea Garcia-Hermoso, ingénieur
Mme Cécile Gautier, technicienne
Pr. Fanny Lanternier, médecin clinicien
Dr. Karine Sitbon, médecin d'études cliniques

Année d'exercice

2020



INSTITUT PASTEUR

TABLE DES MATIERES

1 RESUME ANALYTIQUE 1

2 SUMMARY 2

3 MISSIONS ET ORGANISATION DU CNR 3

4 ACTIVITES D'EXPERTISE 4

4.1 ÉVOLUTIONS DES TECHNIQUES 4
4.2 TRAVAUX D'EVALUATION DES TECHNIQUES, REACTIFS ET TROUSSES 4
4.3 TECHNIQUES TRANSFEREES VERS D'AUTRES LABORATOIRES 4
4.4 COLLECTIONS DE MATERIEL BIOLOGIQUE 5
4.5 ACTIVITES D'EXPERTISE 5
4.5.1 Expertise 2020 sur les levures 6
4.5.2 Expertise 2020 sur les champignons filamenteux 10
4.5.3 Expertise 2020 sur la sensibilité aux antifongiques 14
4.5.4 Expertise 2020 sur les mycoses endémiques 16
4.5.5 Expertise 2020 pour les diagnostics moléculaires 16
4.5.6 Activités de séquençage 16

5 ACTIVITES DE SURVEILLANCE 19

5.1 DESCRIPTION DU RESEAU DE PARTENAIRES 19
5.2 SURVEILLANCE DE L'EVOLUTION ET DES CARACTERISTIQUES DES INFECTIONS 21
5.2.1 Cryptococcoses 22
5.2.2 Fongémies 23
5.2.3 Pneumocystoses 24
5.2.4 Mucormycoses 25
5.2.5 Aspergilloses 26
5.2.6 Fusarioses 27
5.3 SURVEILLANCE DE LA RESISTANCE DES AGENTS PATHOGENES AUX ANTI-INFECTIEUX 28
5.3.1 Définitions utilisées pour exprimer la résistance 28
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 Infection et colonisation à Candida auris 38
5.5.2 Cas groupés d'infections à Saprochaete clavata 39

6 ALERTES 39

7 ACTIVITES DE RETRO-INFORMATION, DE FORMATION ET DE CONSEIL 40

7.1 CONSEIL ET EXPERTISE AUX PROFESSIONNELS DE SANTE 40
7.2 CONSEIL ET EXPERTISE AUX AUTORITES SANITAIRES 40
7.2.1 Au plan national 40
7.2.2 Au plan international 41
7.3 ACTIVITE DE FORMATION 41

8 TRAVAUX DE RECHERCHE ET PUBLICATIONS 42

8.1 ACTIVITES DE RECHERCHE EN LIEN DIRECT AVEC LES MISSIONS ET ACTIVITES DU CNR 42
8.1.1 Diagnostic de la pneumocystose 42
8.1.2 Travaux sur l'aspergillose invasive 42
8.1.3 Travaux sur les infections à levures 43
8.1.4 Travaux sur la cryptococcose 44
8.1.5 Travaux sur les mycoses rares 45
8.1.6 Infections fongiques invasives et COVID-19 46
8.2 PUBLICATIONS ET COMMUNICATIONS EN LIEN DIRECT AVEC LES MISSIONS/ACTIVITES DU CNR 46
8.2.1 Publications 2020 46
8.2.2 Publications 2021 48
8.2.3 Communications 49

9 COOPERATION AVEC LES LABORATOIRES DE SANTE ANIMALE, D'HYGIENE ALIMENTAIRE, ENVIRONNEMENTAUX 50

10 PROGRAMME D'ACTIVITE POUR LES ANNEES SUIVANTES 50

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 Pneumocystis jirovecii 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

11 LISTE DES COLLABORATEURS DU CNRMA 53

11.1 CC-CNRMA FORMANT RESSIF EN 2020 53
11.2 CENTRES PARTICIPANTS A L'ODL EN 2020 53
11.3 PARTICIPANTS A LA SURVEILLANCE DES MYCOSES INVASIVES EN 2020 53

12 ANNEXE 1 : MISSIONS & ORGANISATION DU CNR 55

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 57
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 59
12.4.6 Collection de sérums 60
12.5 DEMARCHE QUALITE DU LABORATOIRE 61
12.6 ASPECTS REGLEMENTAIRES 62

13 ANNEXE 2 : CAPACITES TECHNIQUES DU CNR 62

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 2020 63
13.2 LISTE DES MARQUEURS EPIDEMIOLOGIQUES DISPONIBLES 63
13.3 LISTE DES TECHNIQUES RECOMMANDEES PAR LE CNR 64
13.3.1 Identification des champignons 64
13.3.2 Diagnostic des mycoses endémiques 65
13.3.3 Détermination de la sensibilité aux antifongiques des isolats de champignons pathogènes 66
13.3.4 Désinfection des surfaces 66

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Résumé de l'activité d'expertise en 2020 5
Tableau 2 : Dénominations taxonomiques pour les levures 8
Tableau 3: Profils de sensibilité aux antifongiques des souches cliniques d'*Aureobasidium* 9
Tableau 4 : Dénominations taxonomiques pour les champignons filamenteux 10
Tableau 5 : Mutations dans le gène *Cyp51A* d'*Aspergillus fumigatus* 15
Tableau 6 : Principales caractéristiques des fongémies 24
Tableau 7 : Caractéristiques des pneumocystoses 25
Tableau 8 : Caractéristiques des mucormycoses répertoriées dans RESSIF 25
Tableau 9 : Seuils cliniques EUCAST pour *Candida* and *Cryptococcus* spp. 29
Tableau 10 : Seuils cliniques EUCAST pour *Aspergillus* spp. 29
Tableau 11 : Profil de sensibilité des levures aux antifongiques 31
Tableau 12 : Profil de sensibilité des levures à 4 azolés, dont l'isavuconazole 32
Tableau 13 : Profil de sensibilité des champignons filamenteux aux antifongiques 33
Tableau 14 : Profil de sensibilité des filamenteux à 4 azolés, dont l'isavuconazole 36
Tableau 15 : Proportion d'isolats de levures "résistants" selon les seuils EUCAST 37
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 : Aspect des cultures de *A. pullulans* et *A. melanogenum* 9
Figure 3 : Phylogénie du genre *Aureobasidium* 9
Figure 4 : Morphologie d'*Aspergillus* de la section *nigri* 12
Figure 5 : Caractéristiques morphologiques d'*Histoplasma* spp. et *Talaromyces purpurogenum* 12
Figure 6 : Aspect morphologique de quelques levures noires 12
Figure 7 : Aspect morphologique de membres de l'ordre des *Microascales* 13
Figure 8 : Aspect morphologique de membres de l'ordre des *Mucorales* 14
Figure 9 : Schéma du gène *Cyp51A* d'*A. fumigatus* et principales mutations 15
Figure 10 : Répartition des déclarations à travers le portail dédié 20
Figure 11 : Répartition des principales IFI répertoriées dans RESSIF en 2020 21
Figure 12 : Mortalité globale à 3 mois en fonction de l'infection 21
Figure 13 : Évolution des cryptococcoses déclarées en France au CNRMA (1985-2020) 22
Figure 14 : Caractéristiques des patients atteints de cryptococcose en France 22
Figure 15 : Mortalité à 3 mois au cours de la cryptococcose 23
Figure 16 : Répartition des 6 principales de Mucorales en fonction du terrain 26
Figure 17 : Éléments contribuant au diagnostic de l'aspergillose invasive 27
Figure 18 : Pathologies sous-jacentes selon l'espèce d'*Aspergillus* impliquée 27
Figure 19 : Evolution du pourcentage d'isolats de levures "résistants" 37
Figure 20 : Arbre phylogénétique des souches de *S. clavata* 39
Figure 21 : Locaux du CNRMA 56
Figure 22 : 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) et les avis thérapeutiques dans le service de Maladies Infectieuses et Tropicales de l'hôpital Necker-Enfants Malades (Pr. O. Lortholary). L'épidémie de COVID-19 a évidemment impacté les missions du CNRMA en raison de l'implication de tous collaborateurs dans des activités variées au sein des hôpitaux ou à l'Institut Pasteur.

En 2020, le CNRMA a fourni son expertise biologique pour 672 isolats (levures, filamenteux, champignons dimorphiques) et 804 échantillons biologiques (liquides, tissus pour des diagnostics moléculaires), 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 ».

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 26 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). A ce jour, la base de données RESSIF comprend plus de 16000 cas d'infections fongiques invasives, et représente une base unique que nous avons commencé à exploiter à l'image de l'ODL ou de la surveillance de la cryptococcose. Une analyse préliminaire des données concernant les principales IFIs est présentée dans ce rapport.

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 de séquençage P2M mise en place à l'Institut Pasteur et aux collections du CNRMA (souches historiques, souches types et souches cliniques et environnementales.

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), 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). The COVID-19 epidemic has obviously impacted the missions of CNRMA because of the involvement of all collaborators in various activities within hospitals or at Institut Pasteur.

In 2020, the NRCMA performed expertise on 672 isolates (characterization) and 804 biological specimen or tissues (molecular 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. Nucleotid 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 26 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 also send 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 online on the “renovated” website. As of May 2020, the RESSIF database includes more than 16,000 cases that warrant detailed analysis as done for the ODL or the cryptococcosis survey. A preliminary analysis of all major IFIs is presented in this report.

In 2020, the NCRMA 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 are always used to decipher the origin of infections.

3 Missions et organisation du CNR

Le CNR Mycoses invasives et Antifongiques (CNRMA) a, comme tous les CNR, été impacté par la crise sanitaire. Dès mi-mars 2020, la Direction de l'Institut Pasteur a souhaité restreindre au maximum les activités non essentielles sur le campus pour se mettre en conformité avec les recommandations gouvernementales tout en maintenant et même développant ses capacités de soutien au CNR des virus respiratoires et les projets de recherche sur le virus et la maladie. Dans ses conditions, nous avons décidé de suspendre les expertises sur les souches envoyées dans le cadre des activités de surveillance et de n'assurer que les urgences, la confirmation ou l'identification des levures suspectes d'être *Candida auris* comme demandé par Santé Publique France, les expertises de 2ème intention (CMI ou autre) sur des isolats responsables de complications chez des patients hospitalisés en réanimation (COVID-19) et les diagnostics moléculaires des mycoses endémiques sur le site Saint-Louis du CNRMA. L'activité a progressivement repris à partir de début juin 2020, et nous nous sommes ensuite adaptés aux mesures prises en interne pour garantir la pérenité des activités et la sécurité des personnels.
En parallèle, le personnel de l'unité de mycologie moléculaire s'est mobilisé en renfort du CNR (à temps plein pour l'une des techniciennes du CNR de mi-mars à début juin, et en fonction des besoins, y compris après le premier confinement, pour l'assistante et deux des scientifiques de l'unité). Par ailleurs, le Dr. Karine Sitbon, est allée prêter main forte aux médecins du Centre Médical de l'Institut Pasteur dès lors qu'il est devenu centre de vaccination COVID du 15ème arrondissement.

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, dans les services des collaborateurs et adjoints hospitalo-universitaires (Saint-Louis – diagnostics moléculaires, et Necker-Enfants Malades – avis thérapeutiques).

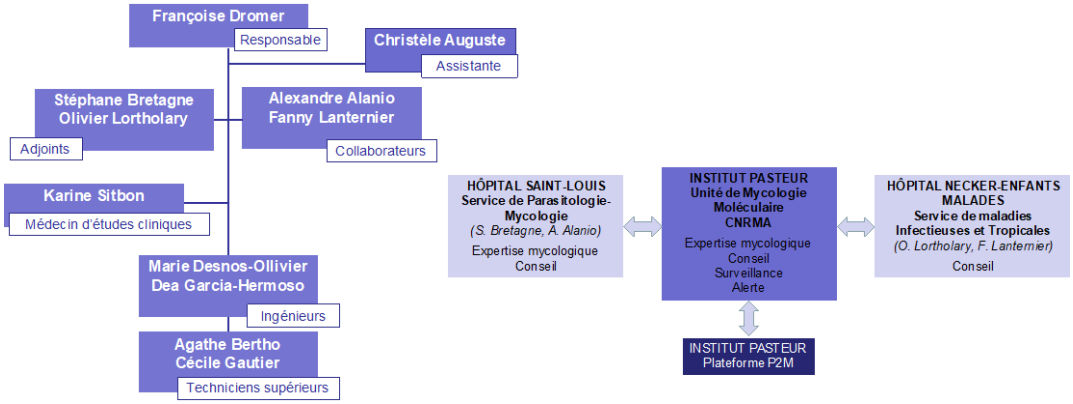


Figure 1 : Organigramme fonctionnel du CNRMA

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 2020, des audits internes ainsi qu'une revue de direction ont été organisés.
Les détails sont disponibles dans l'annexe 1.

4 Activités d'expertise

Le CNRMA a reçu, en 2020, 672 souches dans le cadre de demande d'expertise ou de réseau de surveillance. Aux expertises réalisées au CNRMA se sont ajoutées 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 de *Saprochaete clavata*[1].

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* 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[2].

4.2 Travaux d'évaluation des techniques, réactifs et trousses

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. Les études ont été retardées par la situation sanitaire et les analyses ne sont pas achevées.

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 2392 séquences (ITS, 26S, IGS, actine, RPB1, FKS) pour 2313 souches de levures et 2671séquences (18S, 28S, ITS, calmoduline, actine, β-tubuline, EF1-α, RPB1, RPB2, CYP51A) pour 1273 souches de champignons filamenteux. La base de données est implémentée régulièrement avec les nouvelles données disponibles. Elle fait partie des bases de données "interrrogées" 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.

[1] Vaux S et al (**2014**) Multicenter Outbreak of Infections by *Saprochaete clavata*, an Unrecognized Opportunistic Fungal Pathogen. *MBio* 5(6):e02309–14.
[2] de Groot Tet al. (**2020**) Development of *Candida auris* Short Tandem Repeat Typing and Its Application to a Global Collection of Isolates. *MBio* 11(1):41–9.

4.4 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 29 genres et 111 espèces différentes (1 à près de 3421 isolats/espèces) comprenant près de 5800 souches collectées dans le cadre de l'Observatoire des Levures, plus de 2800 souches d'autres sites profonds ou superficiels, et plus de 3000 souches de cryptocoques, auxquelles s'ajoutent des souches de référence achetées dans des collections internationales.
- Champignons filamenteux correspondant à 102 genres et 383 espèces différentes (1 à 421 isolats/espèces) avec près de 3500 souches d'origine clinique y compris des champignons dimorphiques stockés en P3 et des souches de référence achetées dans des collections internationales.

4.5 Activités d'expertise

Le CNRMA a reçu sur le site IP/CNRMA 756 échantillons dont une faible proportion n'était pas conforme à ses missions [(mycoses superficielles (n=13) 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. A noter que malgré l'annonce de la suspension d'activité pendant le premier confinement, 41 souches ont été adressées au CNRMA (hors urgence) et ont donc été expertisées avec retard. Au total, 672 souches ont été caractérisées. Enfin, d'autres échantillons ont été reçus directement à SLS (n=804).

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

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.

Tableau 1 : Résumé de l'activité d'expertise en 2020

EXPERTISE SUR LES SOUCHES	Levures (n= 442)	Filamenteux (n=221)	Classe 3 (n=10)
MALDI-TOF	442		
Détermination de la sensibilité aux antifongiques	432	196	0
Séquençage Sanger (>2 régions/souches)	182	221	9
PCR en temps réel			
qPCR *Saprochaete clavata* (clone épidémique)	15		
qPCR identification de *Candida auris*	3		
Typage			
MLST de *Candida tropicalis*	6		
Ploïdie et typage de *Cryptococcus neoformans*	56		
Microsatellites *C. albicans* (5 marqueurs)	0		
Microsatellites *C. glabrata* (5 marqueurs)	0		
Microsatellites *C. parapsilosis* (3 marqueurs)	6		
Microsatellites *A. fumigatus* (4 marqueurs)			
Microsatellites *C. auris* (12 marqueurs)	3		
Recherche de mutations			
FKS	9		
CYP51		6	
Séquençage génome entier	18		
AUTRES EXPERTISES			
Diagnostic moléculaire			
Histoplasmose	747		
Coccidioidomycose	57		
Avis thérapeutiques	3 à 5 / jour		

En volume, l'activité de laboratoire du CNRMA est diminuée en lien avec la situation sanitaire (restriction d'activité pendant près de 3 mois pour le CNR, surcharge majeure dans tous les centres hospitaliers rendant plus compliquée la collaboration avec le CNR et la contribution aux données de surveillance). Cependant, les collègues sont en train de combler le retard et nous aurons certainement des données complètes l'an prochain. En ce qui concerne les CMI, 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 2020, 15 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 (92,6%) ou des DOM-TOM (7,4%). Les souches proviennent des laboratoires hospitaliers, en raison même des missions du CNRMA qui couvrent uniquement les mycoses invasives (96 correspondants). Les isolats reçus provenaient d'hémocultures (50,8%), mais aussi des poumons (16,9%), de lésions cutanées (8,3%), du système nerveux central (4,5%), de l'appareil digestif (3,7%), de lésions ostéo-articulaires (4,4%), de lésions oculaires (4,0%), de la sphère ORL (4,4%) et des urines (3,3%). Nous avons également reçu des souches de l'environnement (n=2) dans un contexte d'investigation d'épidémies.

4.5.1 Expertise 2020 sur les levures

Les levures provenaient essentiellement d'hémocultures (76,8%), mais aussi du système nerveux central (5,9%), des poumons (4,8%), de l'appareil digestif (3,4%), de lésions ostéo-articulaires (2,2%), de lésions cutanées (1,6%), et des urines (2,1%).

Le niveau de caractérisation pour les 442 levures identifiées (correspondant à 37 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 182 isolats avec amplification d'un ou plusieurs loci :
    - Régions ITS1-5.8S-ITS2 (143 isolats)

- Région D1D2 de la sous-unité 26S (69 isolats)
- Amplification de la région IGS1 (11 isolats de *Trichosporon* spp. et 17 *Cryptococcus* spp.)
- Amplification du gène codant l'actine (24 isolats de *Clavispora lusitaniae* et 1 isolat de *Arthrographis kalrae*)
- Amplification d'une partie du gène RPBI (6 isolats de *Meyerozyma guilliermondii* et 2 isolat de *Meyerozyma caribbica*)

✓ Un profil de sensibilité des souches aux 8 antifongiques pour 430 isolats

✓ Un typage MLST pour rechercher le clone 5FC-R pour 6 isolats de *C. tropicalis* dont 5 résistants à la 5FC (6 patients, aucune souche du clone R-5FC[3])

✓ Le séquençage des gènes *Fks* pour 9 isolats (2 *C. albicans*, 4 *C. glabrata*, 2 *C. lusitaniae*, 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 15 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 15 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 3 isolats par PCR en temps réel et séquençage en urgence. La confirmation de l'espèce *C. auris* a été faite pour 3 isolats. Le séquençage du génome entier a été effectué par la plateforme P2M de l'Institut Pasteur pour déterminer à quel clade géographique appartenaient les isolats.

✓ La détermination du sérotypage de 56 souches de *Cryptococcus* sp. aboutissant à la caractérisation de 54 souches de *Cr. neoformans* (42 sérotype A, 6 sérotype D, 6 AD) et 2 souches de *Cr. gattii* sérotype B.

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.*

Nous avons poursuivi la constitution d'une base de données complète (caractères phénotypiques CMI et séquences) dans BioloMICS, et alimenté la base de données **Institut Pasteur FungiBank**. Il faut noter que de constantes révisions taxonomiques entrainent des changements de noms, y compris pour des espèces courantes (**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 allociferrii, Candida haemulonii, Candida auris, Candida duobushaemulonii, Candida palmioleophila, Candida intermedia, Pichia cactophila, Candida orthopsilosis, Candida metapsilosis, Candida nivariensis, Clavispora lusitaniae, Cyberlindnera fabianii, Diutina catenulata, Galactomyces candidus, Kodamaea ohmeri, Meyerozyma caribbica, Meyerozyma guilliermondii, Pichia norvegensis, Saccharomyces cerevisiae, Saprochaete clavata, Wickerhamomyces anomalus, Yarrowia lipolytica, Arthrographis kalrae*.

[3] 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.

Tableau 2 : Dénominations taxonomiques pour les levures

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

* *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

Parmi les levures basidiomycètes, outre *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* et var. *grubii*, nous avons identifié *Rhodotorula mucilaginosa*, *Trichosporon asahii*, *Trichosporon japonicum, Trichosporon sp. Cryptococcus gattii.*

Toutes ces espèces sont, rappelons-le, responsables d'infections sévères et il ne s'agit donc pas ici d'une liste purement "botanique". Cependant, certaines espèces rarement impliquées en pathologie humaine ont été identifiées dans des cas d'infection invasive en 2020. C'est le cas d'*Aureobasidium pullulans*.

Aureobasidium pullulans est une levure noire ascomycète très utilisée en biotechnologie dans la production du polysaccharide pullulan et de l'antimycotique aureobasidin A; cette espèce est également utilisée en agriculture comme agent de biocontrôle. Elle est également considérée comme responsable d'infections opportunistes chez l'homme et est décrit comme un étant un organisme polyextrêmotolérant. Elle est en effet retrouvée dans des environnement très variés et extrêmes (régions polaires et tropicales, eaux hypersalées, eaux polluées…).
Depuis 2014, les différentes variétés de l'espèce *Aureobasidium pullulans* ont été élevées au rang d'espèces (*A. pullulans, A. melanogenum, A. subglaciale, A. namibiae)* suite à l'analyse des génomes entiers[4]. Des

[4] Gostinčar C. et al. (2014). Genome sequencing of four *Aureobasidium pullulans* varieties: biotechnological potential, stress tolerance, and description of new species. BMC Genomics, 15 :54

différences phénotypiques et physiologiques existent également entre ces espèces (production de mélanine, préférence écologique, thermotolérance…). *Aureobasidium melanogenum* est la seule espèce capable de pousser à 37°C, ce qui en fait un pathogène potentiel pour l'homme. En effet, l'étude récente de Wang *et al*.[5] a montré que *A. melanogenum* semblait plus virulent dans les modèles expérimentaux, avec une production plus importante de mélanine et une meilleure thermotolérance **(Figure 2**).

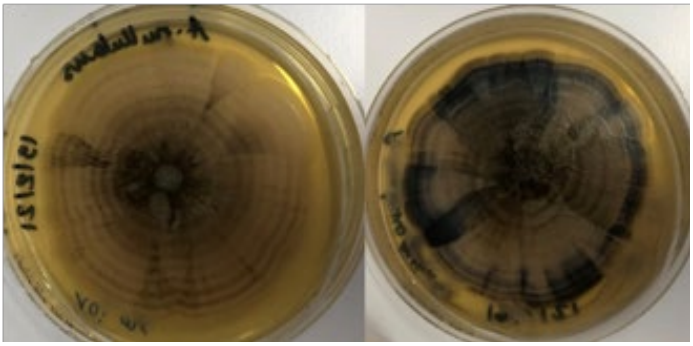


Figure 2 : Aspect des cultures de *A. pullulans* et *A. melanogenum*
A. pullulans (à gauche) et *A. melanogenum* (à droite) après 10 jours de culture sur milieu Sabouraud.

Cependant les deux espèces *A. melanogenum* et *A. pullulans* sont des contaminants hospitaliers fréquemment retrouvés notamment sur les supports plastiques, les laves vaisselles. Des SNPs particuliers de ces deux espèces ont été décrits en 2019 dans les régions ITS, permettant de les différencier facilement. Nous avons donc analysé de façon rétrospective les 8 souches reçues au CNRMA depuis 2003 et identifiées initialement comme *A. pullulans.* Cela nous a permis d'identifier 3 souches comme étant *A. melanogenum* isolés de 3 patients et 5 *A. pullulans* isolés de 3 patients et d'un oustiti (**Figure 3**).

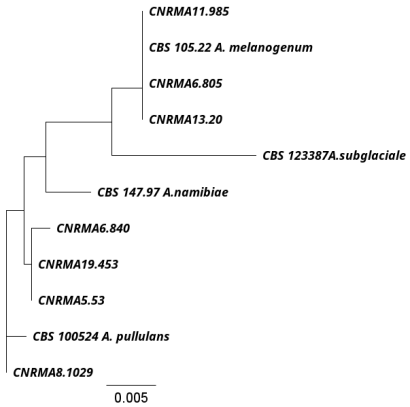


Figure 3 : Phylogénie du genre *Aureobasidium*
Arbre construit avec les séquences des régions ITS pour les souches type des 4 espèces anciennement variétés de *A. pullulans* et les isolats cliniques de la collection du CNRMA

Les valeurs de CMI correspondent aux données disponibles dans le littérature avec des CMI élevées au fluconazole, plutôt basses pour le voriconazole et l'amphotéricine B et des valeurs variables pour les échinocandines. On peut noter que les 3 souches de *A. melanogenum* avaient des CMI élevées à la caspofungine (**Tableau 3**).

Tableau 3: Profils de sensibilité aux antifongiques des souches cliniques d'*Aureobasidium*

				CMI (mg/L)						
espèce	souche	site d'isolement	année	5FC	Fluconazole	voriconazole	posaconazole	caspofungin	micafungin	Amphotericine B
A. pullulans	CNRMA5.53	cornée	2005	1	128	0,125	0,125	1	1	
A. pullulans	CNRMA6.840	foie (ouistiti)	2006	0,3	16	0,03	0,06	0,03	1	0,014
A. pullulans	CNRMA8.1028	liquide de greffon rein	2008	1	64	0,25	0,06	0,125	0,03	0,25
A. pullulans	CNRMA19.453	os	2019	2	8	0,03	0,014	0,03	0,06	0,5
A. melanogenum	CNRMA6.805	peau	2006	0,3	8	0,125	0,125	8	4	0,06
A. melanogenum	CNRMA11.985	hémoculture	2011	1	16	0,125	0,03	8	1	0,5
A. melanogenum	CNRMA13.20	poumon	2013	4	16	0,06	0,03	1	1	0,25

[5] Wang M. et al (2019). Comparative pathogenicity of opportunistic black yeasts in *Aureobasidium*. Mycoses 62(9): 803-811 doi: 10.1111/myc.12931

4.5.2 Expertise 2020 sur les champignons filamenteux

Les champignons filamenteux étaient isolés essentiellement des poumons (37,2%), de la peau (21,2%), de l'œil (11,5%) de la sphère ORL (10,6%), du sang (6,2%), mais aussi des os (8,4%), ou du cerveau (1,3%).

Le niveau de caractérisation pour les 221 champignons filamenteux identifiés cette année (75 espèces de 32 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 4** décrit les changements taxonomiques récents.

Tableau 4 : Dénominations taxonomiques pour les champignons filamenteux

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

*en 2018, plusieurs noms d'espèces appartenant au complexe *Fusarium solani* ont été modifiés[6]. Des nouvelles combinaisons (*Neocosmospora keratoplastica*, *N. petroliphila* entre autres) ont été introduites pour des espèces de *Fusarium solani* d'intérêt médicale. En 2020, O'Donnell et coll.[7] ont alerté la communauté mycologique sur le non-sens de nommer ces espèces de *Fusaria* avec le nom *Neocosmospora*. Nous avons donc modifié à nouveau les binômes par rapport à l'année dernière.

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,

[6] Sandoval-Denis M & Crous P. (**2018**). Removing chaos from confusion: assigning names to common human and animal pathogens in *Neocosmospora*. Persoonia 41: 109-129. doi.org/10.3767/persoonia.2018.41.06

[7] O'Donnell K et al (**2020**). No to *Neocosmospora*: phylogenomic and practical reasons for continued inclusion of the *Fusarium solani* species complex in the genus *Fusarium*. mSphere 5:e00810-20. doi.org/10.1128/mSphere.00810-20.

- 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 (99 isolats)
- pour les genres *Aspergillus* et *Sporothrix,* le gène de la calmoduline a été partiellement séquencé (44 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 (88 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 polymerase II) a été séquencé (46 isolats).
- Pour les genres *Nannizziopsis*, *Paecilomyces* et *Phaeoacremonium,* le gène de l'actine a été partiellement séquencé (5 isolats).
- Pour le genre *Mucor*, le gène codant pour la sous unité *rpb1* (sous-unité RPB1 ARN polymérase II ADN-dépendante) a été amplifié (11 isolats).

✓ La recherche des mutations CYP51A pour 6 isolats d'*A. fumigatus* résistants aux azolés

✓ La détermination du profil de sensibilité à 8 antifongiques pour 196 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 76 souches principalement isolées de lésions respiratoires (72%). Plusieurs espèces appartenant aux 6 sections *d'Aspergillus* ont été identifiées. Les espèces majoritaires étaient *A. fumigatus* (34%) et *A. flavus* (18%) appartenant aux sections *Fumigati* et *Flavi* respectivement.

Parmi les espèces cryptiques d'*Aspergillus* section *Fumigati* nous avons caracterisé une souche d'*Aspergillus lentulus,* isolée d'un LBA dans le contexte d'une infection COVID, avec des valeurs hautes pour l'amphotericine B (16 mg/L), pour le voriconazole (2 mg/L) et pour le posaconazole (1 mg/L). Une autre espèce cryptique, *A. hiratsukae* a été identifiée sur deux souches isolées de la peau et du poumon respectivement.

Dans la section *Nigri* (**Figure 4**)*,* nous avons identifié *Aspergillus brunneoviolaceus* (isolée d'un prélèvement respiratoire chez un patient transplanté de rein vivant en Martinique), *A. welwitschiae* (5 souches, toutes isolées de poumon), *A. tubingensis* (5 souches dont 3 isolées du poumon et deux autres d'une lésion osseusse et du LCR respectivement). Nous avons également caracterisé une souche d' *A. japonicus* et une autre d'*A. luchuensis,* toutes les deux isolées de prélèvements respiratoires. D'autres espèces d'*Aspergillus* ont été repertoriées : *A. terreus* (4 souches), *A. nidulans* (3 souches) et *A. calidoustus* (2 souches).

Figure 4 : Morphologie d'*Aspergillus* de la section *nigri*
Aspect microscopique d'*Aspergillus brunneoviolaceus* avec conidiophore lisse et vesicule globose (A) et croissance sur milieu malt 2% (MEA) après 7 jours d'incubation (B). Têtes aspergillaires de *A. welwitschiae.*

Toujours dans l'ordre *Eurotiales*, nous avons identifié une souche de *Paecilomyces maximus (***Figure 5**) et 3 souches du genre *Talaromyces* toutes isolées de prélèvements respiratoires : *T. marneffei*, *T. purpurogenum*, *T. muroi*, *Talaromyces pinophilus* species complex, une souche très proche de l'espèce *Talaromyces diversus* et la dernière identifiée comme *Talaromyces* section *Talaromyces*. Il reste à poursuivre la caractérisation au niveau d'espèce.

L'ordre des *Onygenales* était représenté majoritairement par 7 souches d'*Histoplasma* spp. **(Figure 5)** responsables de mycoses endémiques, par un isolat du genre *Nannizziopsis* et par deux souches de dermatophytes (*Arthroderma multifidum*, *Microsporum audouinii* et *Trichophyton rubrum*).

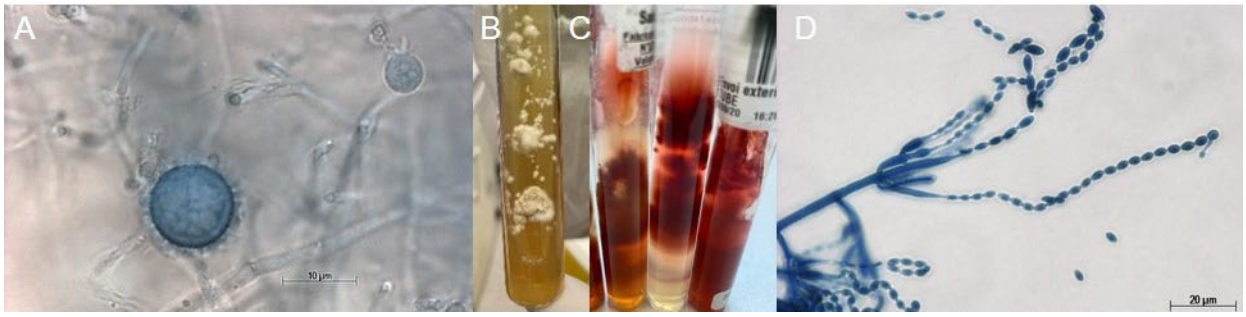


Figure 5 : Caractéristiques morphologiques d'*Histoplasma* spp. et *Talaromyces purpurogenum*
Macroconidie tuberculée typique d'*Histoplasma* spp. (A) et aspect macroscopique sur tube de Sabouraud agar (B). Pigment rouge diffusible produit par *Talaromyces purpurogenum* (C) et conidiogenèse phialidique avec des conidies ovales en chaine chez *Paecilomyces maximus* (D).

Des souches des levures noires et espèces apparentées à **l'ordre des *Chaetothyriales***, dont *Exophiala xenobiotica*, *E. phaeomuriformis*, *Fonsecaea monophora* et *F. nubica* ont été caractérisées **(Figure 6**)

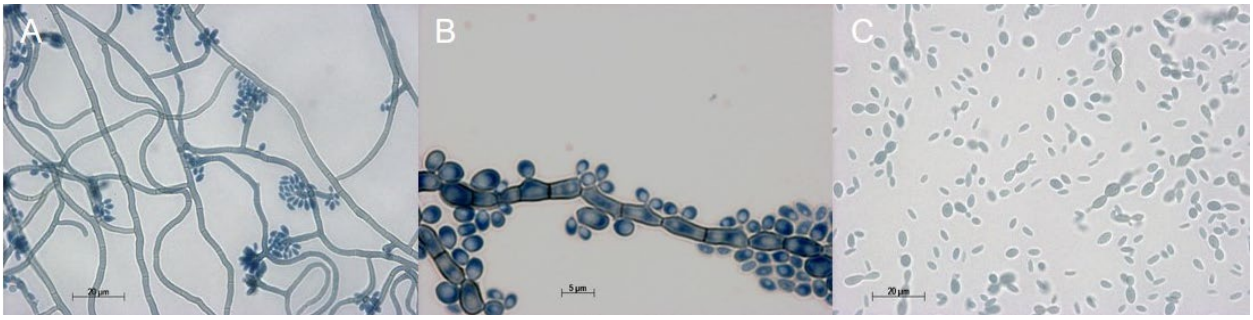


Figure 6 : Aspect morphologique de quelques levures noires
Conidiophores et conidies de *Fonsecaea nubica* (culture sur lame) (A) ; conidies solitaires fixées sur des filaments (B) et forme levures (C) chez *Exophiala* sp.

Dans l'ordre des *Pleosporales*, nous avons identifié 9 souches du genre *Alternaria* dont 5 appartenant aux groupes d'espèces *Alternaria alternata* et le 4 autres au groupe *Alternaria infectoria*. Nous avons également caracterisé 4 phaeohyphomycètes dans le genre *Curvularia* (*C. lunata*, *C. hawaiiensis* et *C. spicifera*), et

trois autres qui correspondaient aux espèces : *Epicoccum keratinophilum*, *Pseudopithomyces chartarum* et *Parathyridaria percutanea*. Trois champignons coelomycètes (deux *Medicopsis romeroi* et un *Paraconiothyrium cyclothyrioides*) ont été également identifiés.

Un seul representant de **l'ordre de *Capnodiales*** (*Cladosporium parahalotolerans*) a été egalement identifié.

Dans l'ordre des *Hypocreales*, nous avons caracterisé 31 souches du genre *Fusarium* appartenant à différents complexes d'espèces. Le complexe *Fusarium solani* (FSSC) était représenté par 10 souches (*F.keratoplasticum*, *F. petroliphilum*, *F. falciforme*). Les 10 souches appartenant au complexe *Fusarium oxysporum* (FOSC), ont été identifiées comme *Fusarium veterinarium.*. D'autres espèces appartenant aux complexe *Fusarium fujikuroi* (FFSC) (*F. proliferatum* et *F. verticillioides)* et *Bisifusarium dimerum* (FDSC) ont été expertisées. Nous avons également reçu des souches de *Purpureocillium lilacinum*, *Trichoderma longibrachiatum*, *Trichoderma orientale*, *Sarocladium kiliense,* espèces appartenant toutes à l'ordre des *Hypocreales*.

Les 11 souches hyphomycètes appartenant à **l'ordre de *Microascales*** correspondaient à 4 espèces différentes groupées dans les genres *Scedosporium* (*S. apiospermum*, *S. boydii*) et *Scopulariopsis* (*S. brevicaulis, S. alboflavescens)* **(Figure 7**).

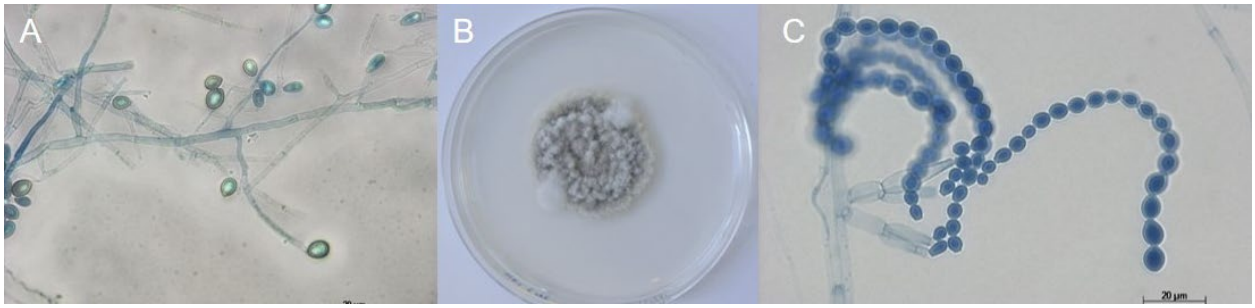


Figure 7 : Aspect morphologique de membres de l'ordre des *Microascales*
Aspect microscopique (conidiophores et conidies ovales) (A) et macroscopique (colonies lanoses sur PDA) (B) de *Scedosporium apiospermum*. Longues chaînes des conidies de *Scopulariopsis alboflavescens*

L'ordre *Diaporthales* était representé par un seul isolat de *Diaporthe sp.* dont la caracterisation au niveau d'espèce est en cours. D'autres hyphomycètes dematiés ont été analysés : *Phaeoacremonium parasiticum*, *P. venezuelense* et *P. kradjenii* (**ordre *Togniniales***), *Acrophialophora levis* (**ordre *Sordariales***), ainsi que d'autres champignons ascomycètes : *Sporothrix globosa* (**ordre *Ophiostomatales***) et *Arthrinium arundis*, membre de la **classe des *Sordariomycetes***.

Nous avons identifié le **champignon basidiomycète** *Tropicoporus tropicalis* appartenant à l'ordre de *Hymenochaetales* isolée d'un prélèvement de l'sphère ORL chez un patient de Martinique.

Dans l'ordre de *Mucorales*, nous avons reçu et caractérisé 41 souches identifiées comme *Rhizopus arrhizus* (27%)*, R. delemar* (7%), *R. microsporus* (17%)**,** *Lichtheimia corymbifera* (7%), *L. ramosa* (12%), *Mucor circinelloides f. circinelloides* (17%), *M. velutinosus* (5%), *Rhizomucor pusillus* (5%) et *Cunninghamella bertholletiae* (2%) (**Figure 8**) .

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

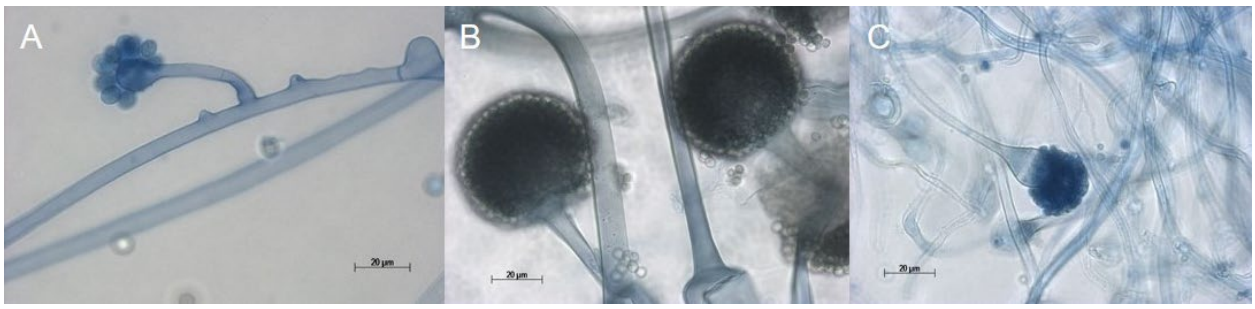


Figure 8 : Aspect morphologique de membres de l'ordre des *Mucorales*
Cunnighamella bertholletiae, vesicule ronde entourée de petits pédoncules des sporangioles (A) ; *Rhizopus microsporus*, sporocystophores et sporangia (B), *Lichthemia ramosa*, sporangiophore avec présence d'apophyse et sporangium (C)

4.5.3 Expertise 2020 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, 631 isolats ont été testés en 2020 pour leur sensibilité aux antifongiques. Le nombre très important d'antifongiques testés, de genres et d'espèces différents rend impossible un compte rendu détaillé, certaines espèces n'étant représentées que par un très petit nombre d'isolats. Nous présentons donc les données de CMI depuis 2003, et en nous limitant : 1) aux espèces pour lesquelles au moins 5 isolats ont été testés et 2) aux antifongiques pertinents pour les espèces concernées. Une analyse des tendances sera faite plus loin sur un nombre limité d'espèces de levures analysées dans le cadre de l'Observatoire des Levures (ODL), pour éviter le biais lié à l'envoi de souches isolées dans un contexte connu d'échec thérapeutique.
En effet, nous recevons des isolats pour confirmation d'une moindre sensibilité décelée en routine, et pour recherche d'une éventuelle mutation dans les gènes cibles.
Ainsi, nous avons fait le séquençage des gènes *Fks* pour 9 isolats de levures résistants aux échinocandines :

- 2 *Candida albicans* (2 patients) avec CMI haute et présence de mutation en région HS1 : S645P pour 1 souche, S645S/P pour 1 souche.
- 4 *Candida glabrata* (2 patients) avec, pour 2 souches, des CMI hautes et présence de mutation en région HS1 du gène *FKS2*: F658Δ pour 1 souche, S663F pour 1 souche ; les autres souches séquencées correspondaient à des prélèvements antérieurs au traitement par échinocandine pour un patient et avaient des CMI basses à la caspofungin et pas de mutation
- 1 souche de *Candida tropicalis* avec CMI hautes et présence d'une mutation S645P en région HS1
- 2 souche de *Clavispora lusitaniae* avec CMI hautes et présence d'une mutation S645P en région HS1

Nous avons également recherché des mutations dans le gène CYP51A pour 6 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 resistantes 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 5**).

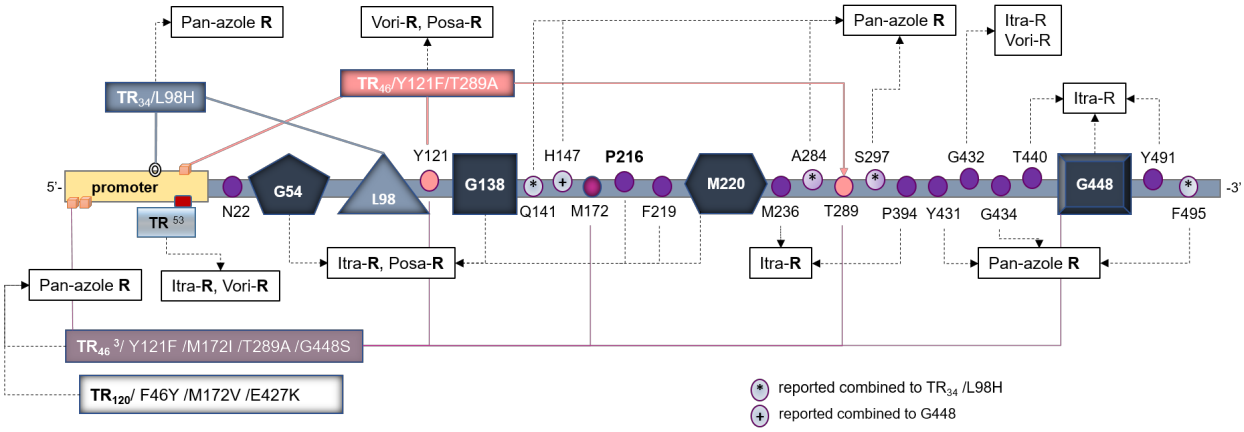


Figure 9 : Schéma du gène *Cyp51A* d'*A. fumigatus* et principales mutations

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

Tableau 5 : Mutations dans le gène *Cyp51A* d'*Aspergillus fumigatus*

Mutations[8,9,10]		Mécanisme
TR$_{34}$/L98H *		Hyper expression de la protéine cible et une affinité d'interaction réduite par modification structural du canal d'accès au ligand
TR$_{46}$/Y121F/T289A		
TR$_{46}$/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 **non connu**
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	**H147Y**	
I246M	**M263I**	
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

[8] Rivero-Menendez O, Alastruey-Izquierdo A, Mellado E, Cuenca-Estrella M. (**2016**) Triazole Resistance in *Aspergillus* spp.: A Worldwide Problem? *J. Fungi* (Basel). doi: 10.3390/jof2030021

[9] 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

[10] Wang F et al. (**2020**) Increased triazole-resistance and *cyp51A* mutations in *Aspergillus fumigatus* after selection with a combination of the triazole fungicides difenoconazole and propiconazole. J. Haz Mat. 2020;400:123200. doi: 10.1016/j.jhazmat.2020.123200.

Nous avons retrouvé la mutation TR34/L98H pour 4 souches isolées de 4 patients différents, toutes ayant des CMI hautes à l'itraconazole, voriconazole et isavuconazole. Une seule de ces souche avait en outre des CMI hautes pour le posaconazole. La mutation TR34/L98H, S297T a été identifié pour une souche ayant des CMI hautes à l'itraconazole, posaconazole et isavuconazole. Nous avons mis en évidence la mutation G54R pour deux souches indépendantes ayant des profils de sensibilité hauts à l'itraconazole et posaconazole.

4.5.4 Expertise 2020 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 2020 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 du 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[11].
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 747 prélèvements (548 patients) adressés au laboratoire Saint-Louis pour une suspicion d'histoplasmose (dont 360 prélèvements sanguins, 45 moelles osseuses/ganglions, 172 prélèvements respiratoires, 61 prélèvements système nerveux central, 43 cutané et 66 autres de diverses origines), 40 étaient positifs correspondant à 24 patients pour lesquels le diagnostic avait été évoqué sur le contexte clinique.
La PCR spécifique pour le diagnostic de coccidioidomycose a été réalisée chez 52 patients (58 prélèvements dont 52 sanguins, et 5 autres), et n'a été positive pour aucun d'entre eux.

4.5.6 Activités de séquençage

L'activité d'expertise et de surveillance du CNRMA concerne des dizaines d'espèces et de genres différents. Pour les espèces les plus fréquentes, les méthodes de génotypages telles que MLST ou microsatellites ont été décrites et sont très utilisées en routine pour les éventuelles études de transmission de souches ou d'acquisition de résistance. Pour les espèces rares, ce type de méthode n'existe pas car leur mise au point nécessite l'étude de nombreux isolats indépendants. Le séquençage du génome entier (WGS) semble donc être l'approche la plus prometteuse pour ces espèces. Son utilisation se heurte cependant à un problème majeur qui est l'absence ou la faible quantité de génome de référence disponibles pour ces espèces plus

[11] 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

rares. Cela nécessite un travail de séquençage *de novo* et d'analyse bioinformatique avant que le WGS puisse être utilisé en routine pour des surveillances épidémiologiques. Nous disposons au CNRMA des collections de souches en nombre suffisant pour de nombreuses espèces, mais nous n'avons pas, à ce jour, la capacité de mettre en œuvre cette analyse sur plusieurs espèces en l'absence de soutien bioinformatique supplémentaire. En effet, ces analyses demandent des compétences que nous n'avons que partiellement acquises depuis quelques années.

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. Les données NGS pour les souches de *C. auris* ont été analysées par l'ingénieure du CNRMA afin de déterminer l'appartenance au clade des isolats. Les données NGS des souches de *S. clavata* sont en cours d'analyse par un bio-informaticien de P2M.

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 d'infections à des pathogènes fongiques rares que le CNR surveille particulièrement (*S. clavata* et *C. auris*). Les capacités de séquençage étant largement utilisées pour le SARS-Cov-2, nous avons limité nos demandes. Le CNRMA a ainsi réalisé en 2020 le séquençage de 18 génomes de champignons (15 *S. clavata,* 3 *C. auris*). L'analyse des données de NGS pour *C. auris* a permis d'identifier l'appartenance au clade des souches et pour *S. clavata* d'identifier le lien entre les isolats cliniques et les prélèvements environnementaux.

Si le séquençage est utilisé par le CNR, décrire les analyses bio-informatiques conduites et préciser si elles sont faites en première ligne ou en complément d'autres techniques.

Le séquençage génome entier est utilisé au CNRMA pour des analyses phylogénétiques et pour des investigations épidémiques concernant les espèces *Magnusiomyces capitatus* et *Saprochaete clavata* depuis 2012. Le séquençage est effectué par la technique NextSeq Illumina par la plateforme P2M de l'Institut Pasteur. Pour ce travail, l'analyse est effectuée par les bioinformaticiens de P2M et majoritairement par Alexis Crisucolo. Ces analyses ne sont pas faites en première ligne actuellement mais en complément des techniques réalisées au CNRMA : séquençage par méthode Sanger des régions ITS et amplification par

PCR en temps réel des régions ITS et des SNPs spécifiques des clones A et B précédemment décrits comme responsables des épidémies nationales et locales en 2012 et 2015.
Le séquençage génome entier est aussi utilisé pour la détermination de clade géographique pour les souches appartenant à l'espèce *Candida auris*. Le séquençage est effectué par P2M et les analyses de déterminations des SNPs et comparaison aux souches de références des 5 clades sont effectués au CNRMA. La détermination du clade géographique peut également être faite par technique de génotypage en utilisant des marqueurs microsatellites. Elle n'est pas utilisée en première ligne car l'identification de l'espèce est le principal résultat à communiquer en urgence à l'hôpital afin de mettre en place des mesures sanitaires pour éviter l'expansion. L'identification de l'espèce est généralement faite directement dans les laboratoires hospitaliers grâce à la mise à jour des bases de données. L'identification du clade géographique est actuellement utilisée à des fins phylogénétiques.
Le séquençage génome entier est également utilisé pour des études de structure de population de façon rétrospective pour des espèces rares comme *Trichospoon asahii*. Ce type d'analyse est faite en collaboration avec des bioinformaticiens du Hub de Bioinformatique et Biostatistique de l'Institut Pasteur et n'est pas faite en première ligne.

Si le séquençage est utilisé à des fins d'investigations d'épidémies : nombre de séquences réalisées dans l'année

Le séquençage des souches de *Saprochaete clavata* a été utilisé à des fins d'investigations épidémiques cette année pour 8 isolats, afin de démontrer le lien éventuel entre des isolats cliniques responsables d'infections invasives et des isolats de l'environnement hospitalier, permettant de déterminer la source des infections.

Si le séquençage est utilisé à des fins de surveillance :

Le séquençage a également été utilisé à des fins de surveillance pour 3 isolats de *Candida auris* reçus au CNRMA en 2020, permettant de déterminer le clade géographique des isolats.

Si le séquençage est utilisé par le CNR, où sont déposées les séquences brutes (fastaq files) :

Les séquences des génomes sont conservées dans le cluster de l'Institut Pasteur. Les séquences de génome entier (fastaq files) sont déposées dans des bases de données publiques (ENA) lors de la soumission de publications associées avec un minimum de métadata (source de l'isolat, espèce, date de prélèvement, pays d'origine de l'isolat).

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 2020 :

- Dans le cadre de la surveillance active par le biais de ses réseaux de partenaires (ODL et RESSIF), 1808 dossiers ont été enregistrés sur le site dédié. Ces déclarations correspondaient à 927 fongémies (dont 282 dans l'ODL) et 881 infections fongiques invasives hors fongémies.
- Dans le cadre de la surveillance passive, 63 cryptococcoses et 50 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 *Saproachaete 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 18) avec 13 centres actifs[12]. 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 actuellement 26 CC-CNRMA[13]. 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 sensibilité aux antifongiques. Le CNRMA reçoit donc un isolat dans environ 25% des cas, mais souvent

[12] Liste des Centres participants à l'ODL par ordre alphabétique des villes, les référents mycologues étant indiqués entre parenthèses : Bobigny - **hôpital Avicenne** (Sophie Brun), 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** (Stéphane Bonarcorci), **hôpital Lariboisière** (Stéphane Bretagne), Le Chesnay-**CH André Mignot** (Odile Eloy), **Institut Gustave Roussy** (Elisabeth Chachaty).

[13] Liste des CC-CNRMA en 2020, 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), **Clermont-Ferrand** (Philippe Poirier), **Dijon** (Frédéric Dalle), **Fort-de-France** (Nicole Desbois), **Limoges** (Bernard Bouteille), **Nice** (Lilia Hasseine), **Nimes** (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** (Antoine Huguenin), **Rennes** (Jean-Pierre Gangneux), **Rouen** (Loïc Favennec), **Saint-Etienne** (Caroline Mahinc), **Strasbourg** (Valérie Bru), **Toulouse** (Sophie Cassaing), **Tours** (Guillaume Desoubeaux), **Versailles** (Odile Eloy), **Villejuif Institut Gustave Roussy** (Elisabeth Chachaty).

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).
- 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://epidemio.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://epidemio.pasteur.fr/cryptococcoses). Cette base de données est, en effet, 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 en demandant l'ouverture d'un compte. Au 10 mai 2021, 1061 déclarations avaient été faites sur la fiche simplifiée (dont 556 au titre de l'ODL) et 15033 sur la fiche complète dont 108 IFI classées possibles et 513 supplémentaires concernant des cas hors surveillance de RESSIF (par exemple les péritonites post-opératoires ou les sinusites non invasives). À ce jour, 75 centres hospitaliers répartis dans 52 départements et 13/14 régions ont utilisé le portail de déclaration en ligne (**Figure 10**).

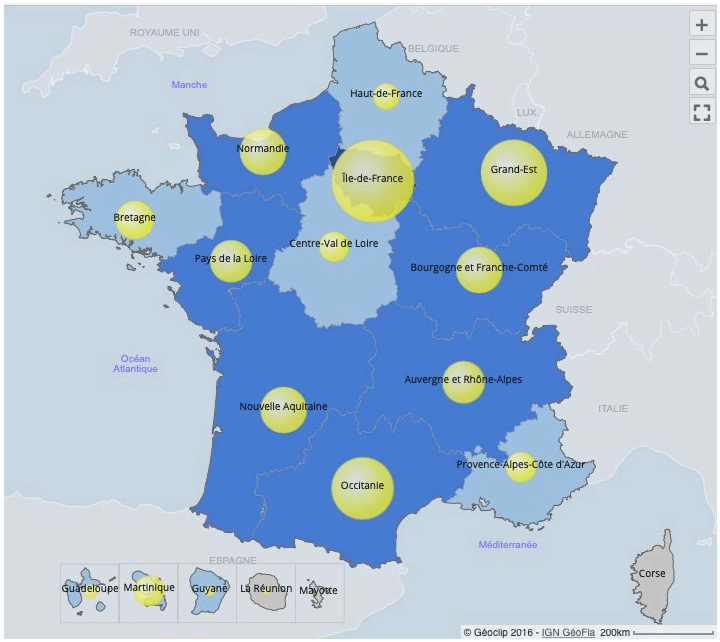


Figure 10 : Répartition des déclarations à travers le portail dédié

Les sphères jaunes sont proportionnelles au nombre de cas déclarés par un ou plusieurs centres situés dans chacune des régions. Pour information, la couleur des régions varie en fonction du nombre de CC-CNRMA (1 en bleu clair, 2 en bleu plus foncé, 4 en Ile-de-France).

5.2 Surveillance de l'évolution et des caractéristiques des infections

En 2020, 1526 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 14150 le nombre d'IFI répertoriées dans la base RESSIF pendant les 9 premières années du réseau avec plus de 90% des souches correspondantes reçues au CNRMA. On peut remarquer que la distribution des IFIs pour l'année 2020 n'est pas très différente de celle des années précédentes (**Figure 11, Figure 12**) même si certains centres n'ont pas encore fait les déclarations complètes pour l'année.

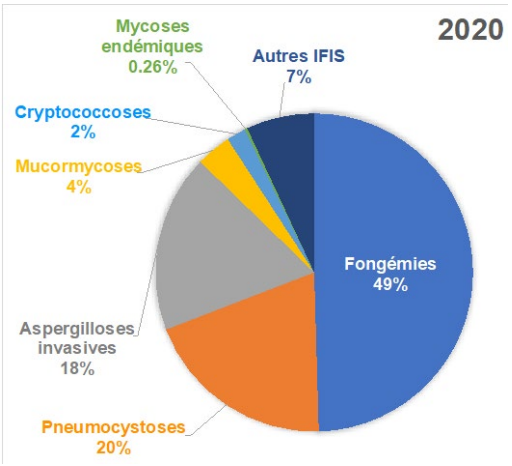


Figure 11 : Répartition des principales IFI répertoriées dans RESSIF en 2020

En 2020, nous avons ajouté au questionnaire RESSIF, l'item COVID-19 pour les circonstances particulières associées au diagnostic d'IFI. A ce jour, 338 épisodes ont été enregistrés dans la base RESSIF, dont 220 pour l'année 2020. Cela concernait 98 aspergilloses invasives (36% des cas déclarés), 82 fongémies à levures (11% des cas déclarés), 17 pneumocystoses et 3 mucormycoses (5% des cas déclarés) et 1 cryptococcose. Il s'agissait essentiellement d'hommes (76%) d'âge moyen 68 ans [19-94 ans]. La mortalité associée était élevée (66% pour les aspergilloses et 63% pour les candidémies).

Nous analyserons succinctement les données globales sur les 9 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 de femmes avec un ratio H/F de 1,7/1. L'âge médian était de 63 ans (extrêmes 0-100 ans). Les principaux facteurs de risque pour les 11485 patients concernés par ces 12353 IFIs se répartissaient en pathologies malignes (42,6%), transplantation d'organes solides (8.1%), infection par le VIH (4,2%), chirurgie récente (17,8%), autres facteurs favorisants (26,1% maladies systémiques, diabète, traitement corticoïdes, traumatisme, …). Rarement, aucune cause n'était rapportée (1,2%).
Dans 5,6% des cas, les infections étaient 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, par exemple. L'épisode déclaré pouvait aussi être, soit la récidive d'une infection antérieure (2,1%), soit un nouvel épisode (4,3%) 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 12)**, le pronostic le plus péjoratif étant associé aux mucormycoses avec une mortalité globale de l'ordre de 57%.

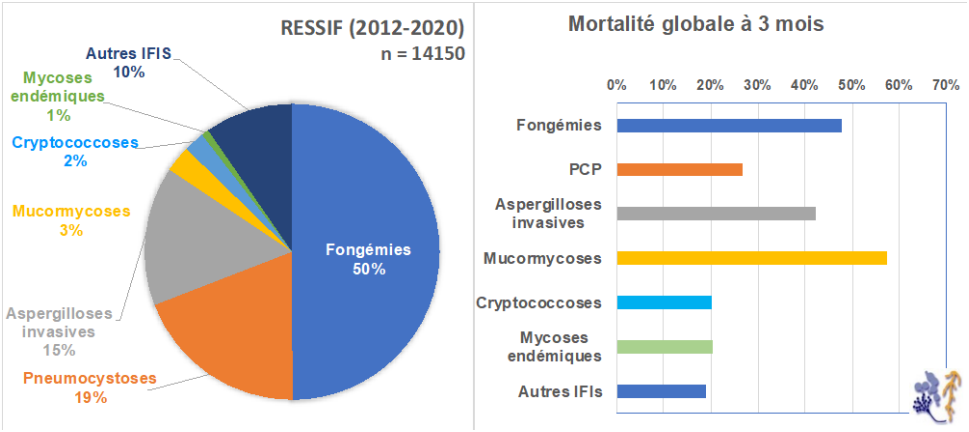


Figure 12 : Mortalité globale à 3 mois en fonction de l'infection
Les chiffres correspondent au nombre de cas pour lesquels l'information était disponible à la date du bilan

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 (mai 2021), 3600 cas de cryptococcose ont été enregistrés dans RESOMYC, avec pour l'année 2020, 51 cas enregistrés contre 72 à la même époque l'an dernier, sans qu'on puisse encore tirer des conclusions en raison d'importants retards de déclaration cette année dans le contexte sanitaire tendu pour tous les laboratoires (**Figure 13**).

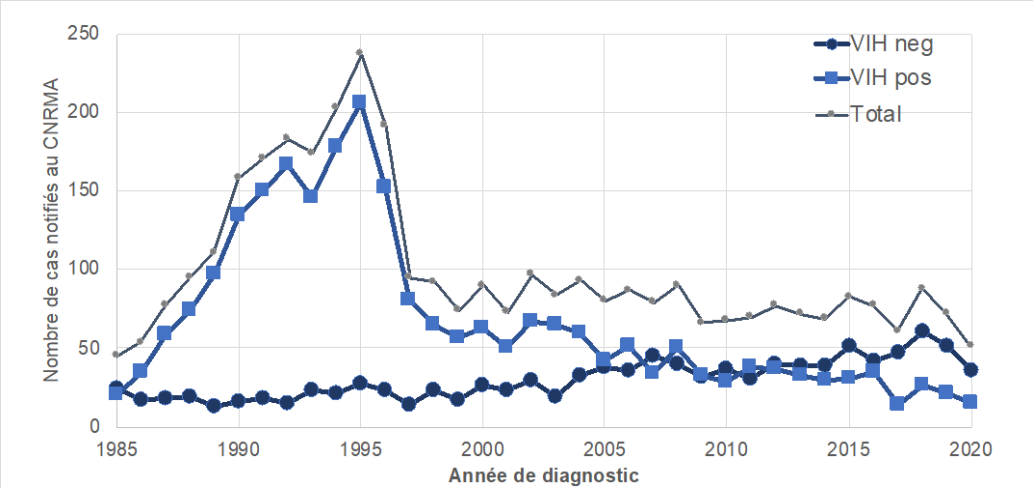


Figure 13 : Évolution des cryptococcoses déclarées en France au CNRMA (1985-2020)
Données non publiées (MAJ mai 2021)

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 « 2007-2020 ». 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 14,** 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 (14,9% *vs.* 42,4%, p<0,001) alors qu'elle était équivalente dans la première période (11,5% *vs.* 15.6%, NS).

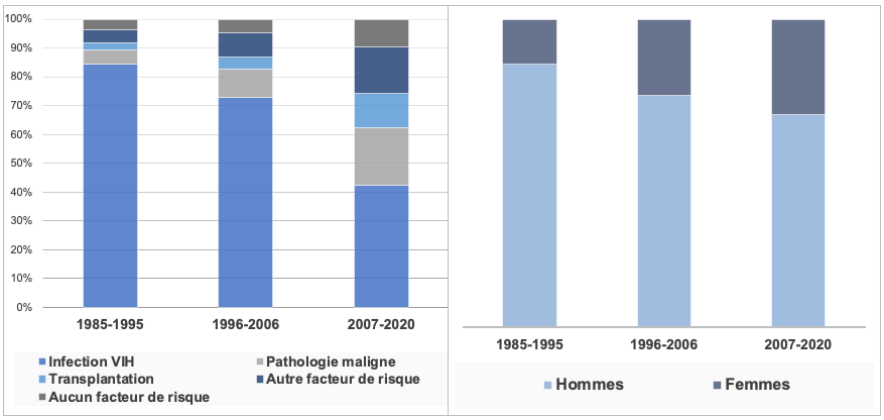


Figure 14 : Caractéristiques des patients atteints de cryptococcose en France

Principaux facteurs de risque et répartition hommes/femmes selon la période de diagnostic chez les patients ayant une cryptococcose en France (1985 -2020)

Si l'on compare la première et la troisième période, le pourcentage de patients ayant une méningoencéphalite n'a pas évolué dans les différentes catégories. Si l'on considère seulement les patients avec méninogencéphalite, la mortalité globale à 3 mois a significativement diminué chez les patients séropositifs pour le VIH et les patients atteints de pathologies malignes, mais pas dans les autres catégories, suggérant des prises en charge différentes et/ou un retard de diagnostic (**Figure 15).** Globalement, pendant la période récente (2006-2020), la mortalité à 3 mois reste significativement plus élevée chez les patients séronégatifs en comparaison des patients séropositifs (27,4% *vs.* 14,1%, p<0,0001).

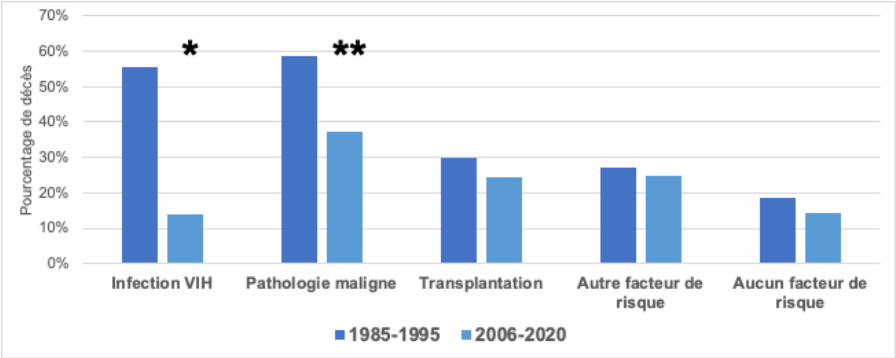


Figure 15 : Mortalité à 3 mois au cours de la cryptococcose
Analyse selon le facteur de risque et la période de diagnostic

5.2.2 Fongémies

Nous ne ferons pas de bilan spécifique de l'ODL car nous venons d'analyser les fongémies en hématologie[14] et les levures rares[15], et nous venons 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, 7306 épisodes avec hémocultures positives comprenant 7208 levures, 25 champignons dimorphiques et 74 filamenteux.

La grande majorité des 6993 patients (95,7%) n'a fait qu'un épisode de fongémie, mais 233 patients (3,3%) en ont fait deux et 30 plus de deux (3 épisodes pour 22 patients, 4 épisodes pour 3 patients, plus de 4 pour 5 patients). Nous rappelons ici que la mortalité globale à 3 mois est de 47,9% en moyenne.

Dans 131 cas, un épisode d'IFI avait été diagnostiqué avant la fongémie dans un délai médian de 21 jours (extrêmes de 0 à 3121 jours). Dans 298 cas, la fongémie impliquait deux espèces, essentiellement (96%) des levures ascomycètes.

Parmi les levures, 2,4% (n=201) étaient des basidiomycètes (115 *Cr. neoformans*, 42 *Rhodotorula mucilaginosa*, 30 *Trichosporon* spp. et 15 *Malassezia* spp.). Parmi les 6878 levures ascomycètes, les principales étaient, comme dans l'observatoire des levures *C. albicans* (50,4%), *C. glabrata* (17,3%), *C. parapsilosis* (12,5%), *C. tropicalis* (7.1%), *C. krusei* (3,1%), *C. kefyr* (1,8%) 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. A noter, une souche de *C. auris* isolée d'une hémoculture dans un centre hors RESSIF.

Quelques diagnostics de mycoses endémiques ont été faits ou confirmés par des hémocultures positives (25 *Histoplasma capsulatum* var. *capsulatum*). A noter qu'une souche de *Talaromyces* (*Penicillium*) *marneffei* a été isolée d'une hémoculture pendant la période dans un centre non RESSIF.

[14] Lortholary O, et al (**2017**) The risk and clinical outcome of candidemia depending on underlying malignancy. *Intensive Care Med* 38(Suppl 7):311–662.
[15] 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.

Enfin, 74 infections dues à des champignons filamenteux ont été associées à des hémocultures positives et en particulier 34 infections à *Fusarium* spp. 3 *Mucorales*, et 37 espèces variées.
Le tableau clinique et l'évolution sont globalement très différents selon les pathogènes fongiques identifiés, comme le montre le tableau suivant (**Tableau 6**).

Tableau 6 : Principales caractéristiques des fongémies

	Levures		Dimorphiques (n=25)	Filamenteux (n=74)
	Ascomycètes (n= 7002)	Basidiomycètes (n = 205)		
Sex ratio H/F	1,6 / 1	2,5 / 1	2,4 / 1	1,6 / 1
Age médian [extrêmes]	64 [0 – 100]	52 [1 – 99]	42 [2 – 70]	59 [1 - 83]
Facteurs de risque				
Pathologie maligne	37,4%	34,2%	4,2%	72,5%
Chirurgie récente	31,8%	9,2%	-	4,4%
Transplantation d'organe	3,2%	9,2%	-	4,4%
Infection VIH	0,2%	22,4%	91,7%	-
Autres	27,1%	23,5%	-	18,8%
Aucun	0,4%	1,5%	4,2%	-
Tt corticoïde prolongé	10,8%	16,5%	4,0%	21,4%
Mortalité globale à 3 mois (évolution connue pour 86% des patients)	47,7%	34,9%	34,8%	52,9%

5.2.3 Pneumocystoses

Depuis 2012, 2711 cas de pneumocystose ont été répertoriés dans RESSIF chez 2680 patients (36 récidives survenant dans un délai médian de 549 jours). Il s'agissait majoritairement d'hommes (64,3%) adultes (âge médiant de 63 ans [15-93 ans]) avec seulement 2,0% d'enfants ([1-14 ans], médiane 1 ans) (**Tableau 7**). Les patients étaient infectés par le VIH dans 18,8% des cas seulement. Les conditions prédisposantes pour les patients séronégatifs se répartissaient entre pathologies malignes (56,1%), transplantation d'organe (18,9%) et autres pathologies (24,2%). A noter que dans 75 cas, la pneumocytose était diagnostiquée en même temps qu'une autre IFI [aspergillose pulmonaire (n=59), cryptococcose (n=11), mucormycose (n=3), histoplasmose (n=1) et scedosporiose (n=1)]. Les co-infections aspergilloses-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 39,3% et la PCR dans 87,6 % des cas en moyenne avec des variations significatives selon le terrain (p<0,0001). Le diagnostic était établi par la seule PCR dans 60,1% des cas (examen direct négatif) et par le seul examen direct dans 12,2% 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 – 45,9%), infections probables (microscopie négative et PCR positive avec un Cq ≤30 – 27,4%) et infections possibles pour les autres cas (26,8%), avec des différences significatives selon le terrain (p<0,0001).
Le pronostic des pneumocystoses était meilleur chez les patients séropositifs pour le VIH comparé aux autres, et en particulier aux patients atteints de pathologie maligne (p < 0,001) (**Tableau 7**).

Tableau 7 : Caractéristiques des pneumocystoses

	VIH	Transplantation d'organe	Pathologie maligne	Autre
Sex ratio H/F	2,9 / 1	1,8/ 1	1,7 / 1	1,4 / 1
Age médian [extrêmes]	48 [2 – 82]	63 [2 – 88]	66 [1 – 93]	66 [1 – 91]
Moyens diagnostiques				
Ex. direct positif	71,5%	47,1%	30,6%	29,7%
PCR positive	75,5%	89,9%	84,7%	93,2%
Type d'infection				
Prouvée	78,3%	58,0%	35,4%	36,6%
Probable	16,5%	26,9%	31,6%	27,5%
Possible	5,2%	15,1%	33,1%	36,9
Mortalité globale à 3 mois	6,9%	16,9%	34,9%	32,0%

5.2.4 Mucormycoses

Pour les 410 cas de mucormycoses rapportés dans RESSIF (63,3% d'hommes, âge médian de 59 ans, 17 enfants), les principaux facteurs de risque se répartissaient en pathologie maligne (62,0%), diabète (7,1%), transplantation (7,1%), et traumatisme/brûlures étendues (13,4%). L'infection invasive était prouvée dans 49,3% des cas. Une infection simultanée par un autre pathogène dans le même site était diagnostiquée pour 87 cas (*Aspergillus* spp. dans 78,2% des cas). Dans 45,1% des cas en moyenne, l'épisode de mucormycose survenait alors que le patient était sous antifongiques, plus fréquemment chez les patients d'hématologie (54,9%) que les autres (23,4%, p<0,001). Les localisations différaient selon le facteur de risque sous-jacent (p<0,001), avec dans la majorité des cas (50,3%) une atteinte pulmonaire, mais aussi ORL (15,9%) et cutanée (18,1%) **(Tableau 8**).

Tableau 8 : Caractéristiques des mucormycoses répertoriées dans RESSIF

	Hémopathies malignes (n =254)	Transplantation d'organe (n = 29)	Diabète (n = 29)	Brulures étendues – traumatisme (n = 55)
Sex ratio	1,5 / 1	2,2 / 1	3,1 / 1	2,2 / 1
Age médian [extrêmes]	60 [3 – 84]	58 [8 – 77]	63 [16 – 83]	52 [12 – 89]
Traitement antifongique précédant le diagnostic	57,4%	35.7%	7.1%	15.1%
Localisation				
Pulmonaire	71,8%	69,2%	33,3%	7,6%
ORL	16,4%	19,2%	55,6%	5,7%
Ostéoarticulaire	-	-	7,4%	22,6%
Cutanées	11,8%	11,5%	3,7%	64,2%
IFI prouvée	42,1%	55,2%	75,9%	67,3%
Moyens diagnostiques				
Isolement en culture	52,8%	82,8%	79,3%	92,7%
Histologie	51,6%	69,0%	93,1%	61,8%
PCR diagnostique	65,8%	37,9%	48,3%	41,8%
Mortalité globale à 3 mois	68,4%	56,0%	48,2%	29,4%

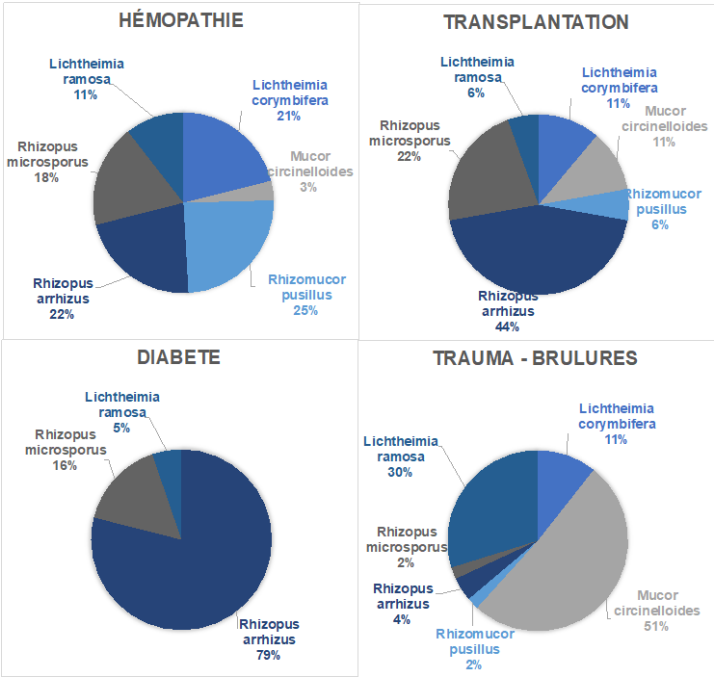


Figure 16 : Répartition des 6 principales de Mucorales en fonction du terrain

Le diagnostic avait été fait par culture (64,2%), histologie/examen direct (57,1%) et/ou PCR (59,0%). On peut noter une augmentation progressive de l'utilisation de la PCR comme outil diagnostique passant de 20% en 2012 à 85% en 202. L'identification polyphasique systématique des isolats permet de mettre en évidence une diversité impressionnante en termes de genres et espèces avec 6 espèces représentant 85,2% du total. On constate des différences de répartition des espèces selon le terrain sous-jacent **(Figure 16)**, 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.

5.2.5 Aspergilloses

De 2012 à 2020, 2155 cas d'AI ont été répertoriés dans RESSIF, dont 84% d'infections probables et 15% d'infections prouvées. L'âge médian des 2123 patients était de 61 ans [1-94 ans] avec 3,1% d'enfants et une majorité d'hommes (64,4%). Dans 39 cas (1,8%), il s'agissait d'un deuxième épisode lié à une nouvelle espèce ou d'une récidive.

Dans près de 10% des cas, le site anatomique était infecté par 2 pathogènes, le plus souvent par deux espèces d'*Aspergillus* (n=60), mais pouvaient être associés à l'*Aspergillus,* une mucorale (n=66), *Pneumocystis jirovecii* (n=57), un *Fusarium* spp. (n=10) ou d'autres filamenteux (n=15). Dans 23 cas supplémentaires, une candidémie concomitante à l'aspergillose était diagnostiquée.

Nous avons analysé les facteurs de risque en utilisant les catégories que nous avions utilisées pour l'analyse de SAIF[16] : lymphomes (24,4%), allogreffes quel qu'en soit le motif (15,6%), leucémies aiguës ± autogreffe (12,1%), autres hémopathies et déficits immunitaires congénitaux (11,5%), transplantations d'organes (11,1%), cancers (6,5%), pathologies respiratoires chroniques (2,4%), maladies de système (3,5%) et diverses pathologies autres (13,0%). Près d'un tiers des patients globalement (30,0%) avait un traitement antifongique au moment du diagnostic de l'aspergillose (39,6% des patients ayant un lymphome, et 51,6% des 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 ($p<0.001$), sauf la PCR qui était utilisée en moyenne dans 24,6% des cas (21-29%) (**Figure 17**).

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

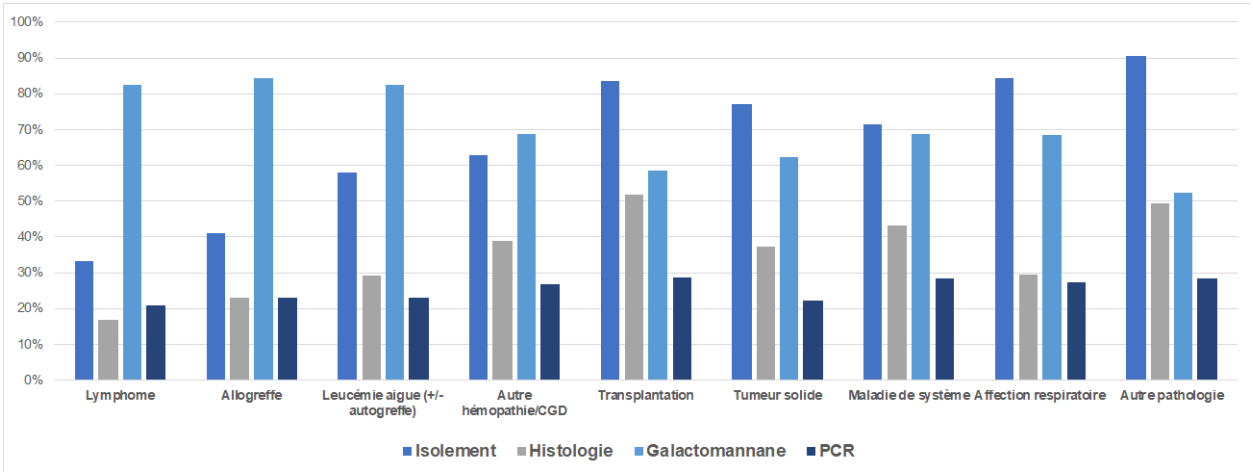


Figure 17 : Éléments contribuant au diagnostic de l'aspergillose invasive

Lorsqu'un *Aspergillus* est isolé, l'espèce en cause était *Aspergillus fumigatus* dans plus de deux tiers des cas (78,8%), et globalement, l'isolat appartenait dans 79,2% des cas à la section *Fumigati*, et plus rarement aux sections *Flavi* (9,7%), *Nigri* (3,7%), *Nidulantes* (3,2%), *ou Terrei* (2,5%). Cette distribution changeait (p=0,004) si le patient avait reçu des antifongiques antérieurement, avec un peu moins d'isolats de la section *Fumigati* (74,4% vs. 81,0%) et davantage de section *Nidulantes* (4,5% vs. 2,8%), ou *Nigri* (5,5% vs. 2,9%). 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 18)**. 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.

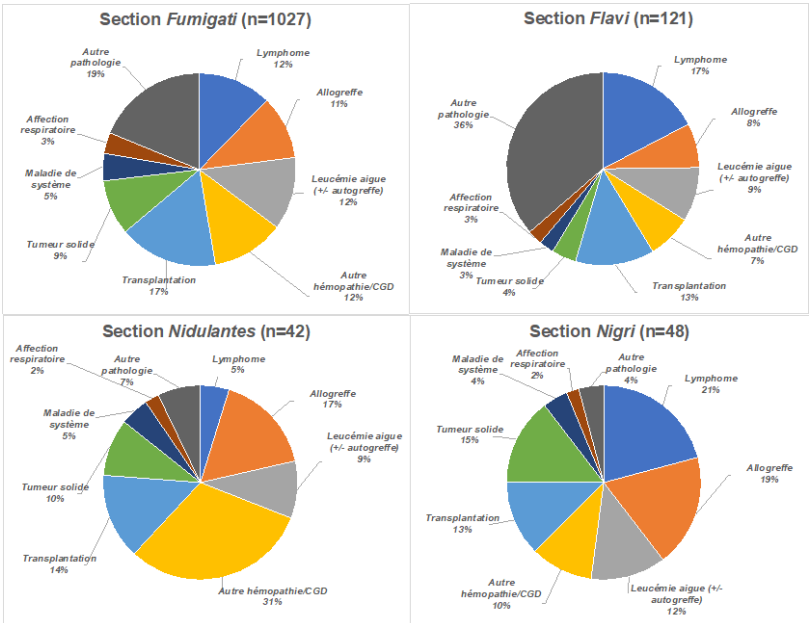


Figure 18 : Pathologies sous-jacentes selon l'espèce d'*Aspergillus* impliquée

En analysant l'évolution globale pour les 1920 patients pour lesquels elle était rapportée, la mortalité globale était de 44,0% à 3 mois. A noter que 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 68,1% en cas de pathologie respiratoire chronique (n=47) à 34,8% chez les patients atteints de lymphomes (n=470) ou transplantés d'organe (n=218).

5.2.6 Fusarioses

Nous avons actuellement répertorié 314 cas d'infection à *Fusarium* spp. dont 57,4% sont des infections prouvées, et 50,3% des infections oculaires. Cette dernière localisation était associée à des traumatismes par corps étrangers et en particulier des lentilles de contact, ce qui explique la prédominance féminine (seulement 36,1% d'hommes) et l'âge médian plus jeune (38 ans [16-80]). Les autres localisations étaient des localisations ostéo-articulaires et/ou cutanées (18,2%), majoritairement liées à des traumatismes locaux et/ou brûlures étendues (68,4%) mais survenant aussi dans un contexte d'immunosuppression (29,8%). Une

immunosuppression (hémopathie, transplantation d'organe solide, autres déficits immunitaires) accompagnait les autres tableaux cliniques dans 81,5% des cas. Ces autres localisations incluaient des fongémies (54,1%), localisation pulmonaires (32,8%) et ORL (6,6%). Une prescription antifongique antérieure était notée pour 16,8% des patients, plus fréquemment dans un contexte hématologique (54,3% des patients) que dans les autres situations (p<0,0001). La mortalité était de 37,9% en cas de fongémies, de 34,8% en hématologie et de 20,0% 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 CMI50 et de CMI90, c'est-à-dire, les concentrations correspondant aux concentrations minimales de l'antifongique inhibant respectivement 50% et 90% des isolats de l'espèce concernée. Soulignons cependant que depuis notre étude publiée en 2008[17], nous recherchons systématiquement une mutation dans le(s) gène(s) *Fks* lorsque la CMI de la caspofungine est ≥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.

5.3.1 Définitions utilisées pour exprimer la résistance

Nous retranscrivons ici les seuils établis par le comité EUCAST[18] pour *Candida* et *Cryptococcus* spp. (**Tableau 9**) et *Aspergillus* spp. (**Tableau 10**). Pour les levures, nous avons modifié la technique en utilisant le milieu AM3 au lieu du milieu RPMI pour la caspofungine et la micafungine, 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*.

[17] 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.

[18] 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 *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 0.5x10^5 – 2.5x10^5 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
	Candida albicans			*Candida dubliniensis*		*Candida glabrata*		*Candida krusei*		*Candida parapsilosis*		*Candida tropicalis*		*Candida guilliermondii*		*Cryptococcus neoformans*		Non-species related breakpoints for *Candida*[1]		
	S ≤	R >	ATU	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[2]	IE[2]	-	-	IE	IE		
Caspofungin	Note[3]	Note[3]				Note[3]	Note[3]	Note[3]	Note[3]	Note[3]	Note[3]	Note[3]	Note[3]	IE[2]	IE[2]	-	-	IE	IE		
Fluconazole	2	4		2	4	0.001[4]	16	-	-	2	4	2	4	IE[2]	IE[2]	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[2]	IE[2]	IE[2]	IE[2]	0.125	0.125	0.125	0.125	IE[2]	IE[2]	IE	IE	IE	IE		
Micafungin	0.016	0.016	0.03			0.03	0.03	IE[5]	IE[5]	2	2	IE[5]	IE[5]	IE[5]	IE[5]	-	-	IE	IE		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 *fks* mutation conferring resistance to the echinocandins". If not S to anidulafungin, report as R and refer to reference laboratory for *fks* sequencing and confirmation of MICs.
Posaconazole	0.06	0.06		0.06	0.06	IE[2]	IE[2]	IE[2]	IE[2]	0.06	0.06	0.06	0.06	IE[2]	IE[2]	IE	IE	IE	IE		
Voriconazole6	0.06[7]	0.25[7]		0.06[7]	0.25[7]	IE	IE	IE	IE	0.125[7]	0.25[7]	0.125[7]	0.25[7]	IE[2]	IE[2]	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.

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

***Aspergillus* 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 as buffer
Inoculum: Final 1x10(5) – 2.5x10(5) cfu/mL
Incubation: 48h
Reading: Visual, complete inhibition for amphotericin B and azoles (MIC), aberrant growth endpoint for echinocandins (MEC).
Quality control: *A. fumigatus* ATCC 204305, *A. flavus* ATCC 204304, *A. fumigatus* F 6919, *A. flavus* CM 1813, *C. parapsilosis* ATCC 22019 (read after 18-24 h) or *C. krusei* ATCC 6258 (read after 18-24 h).

Antifungal agent	MIC breakpoint (mg/L)															Non-species related breakpoints[1]		Comments on the I category	Comments on the ATU
	A. flavus			*A. fumigatus*			*A. nidulans*			*A. niger*		*A. terreus*							
	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			
Caspofungin	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[2]	IE[2]	1	1		IE	IE	Isavuconazole MIC = 2 mg/L should not be interpreted as I but only followed up as an ATU	If voriconazole wild-type (*A. flavus*: voriconazole MIC ≤2 mg/L; *A. fumigatus*: 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 *CYP51A* sequencing and confirmation of MICs[3,*]
Itraconazole[4]	1	1	2	1	1	2	1	1	2	IE[2,5]	IE[2,5]	1	1	2	IE[5]	IE[5]		Report as R with the following comment: "In some clinical situations (non-invasive infections forms) traconazole can be used provided sufficient exposure is ensured".
Micafungin	IE	IE		IE	IE		IE	IE		IE	IE	IE	IE		IE	IE			
Posaconazole[4]	IE[2]	IE[2]		0.125	0.25	0.25	IE[2]	IE[2]		IE[2]	IE[2]	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 S and add the following comment: "The MIC is 0.25 mg/L and thus one dilution above the S breakpoint due to overlapping wt and non-wt populations". If not S to itraconazole report as R and refer to reference laboratory for *CYP51A* sequencing and confirmation of MICs.
Voriconazole[4]	IE[2]	IE[2]		1	1	2	1	1	2	IE[2]	IE[2]	IE[2]	IE[2]		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 concernent actuellement près de 10000 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 11**). Nous venons de publier les données concernant la sensibilité aux antifongiques azolés de plus de 9000 isolats appartenant à 40 espèces communes et rares[19].

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). Comme la caspofungine, la micafungine n'a pas d'activité sur les levures des genres *Cryptococcus, Geotrichum, Rhodotorula et Trichosporon*. La distribution des valeurs de CMI de la micafungine est comparable à celle de la caspofungine sur les espèces de levures « fréquentes ». Il n'y a donc pas d'argument microbiologique pour privilégier l'une ou l'autre des échinocandines disponibles en France.

L'identification 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 thérapeutiques, prescriptions antérieures d'antifongiques). En revanche, l'analyse des CMI générées avec la même technique sur des isolats cliniques circulant en France, est essentielle à la surveillance épidémiologique confiée au CNRMA.

[19] Desnos-Ollivier M et al. Azoles susceptibility profiles of more than 9,000 clinical yeast isolates belonging to 40 common and rare species. AAC 2021 Apr 5 AAC.02615-20. doi: 10.1128/AAC.02615-20.

Tableau 11 : Profil de sensibilité des levures aux antifongiques

Espèces étudiées		Valeurs des CMI50 / CMI90 mg/L pour les antifongiques*						
Nom d'usage en clinique (nbre d'isolats testés)	Nom actuel	AMB	5-FC	Fluco	Vori	Posa	Caspo**	Mica**
C. albicans (n=3454)		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
C. dubliniensis (n=149)		≤0.014/0.03	≤0.12/≤0.12	≤0.12/0.25	≤0.01/≤0.01	0.03/0.06	0.015/0.03	0.015/0.03
C. glabrata (n=1348)		0.12/0.25	≤0.12/≤0.12	16/64	0.25/1	0.5/2	0.06/0.12	0.015/0.03
C. nivariensis (n=16)		0.12/0.25	0.5/1	2/4	0.06/0.12	0.12/0.25	0.03/0.12	0.015/0.03
C. parapsilosis (n=867)		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
C. orthopsilosis (n=62)		0.03/0.06	≤0.12/≤0.12	0.5/8	0.03/1	0.06/0.12	0.06/0.25	0.12/0.25
C. metapsilosis (n=50)		0.06/0.12	≤0.12/≤0.12	1/2	0.03/0.06	0.03/0.12	0.06/0.25	0.12/0.25
C. tropicalis (n=668)		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
C. krusei (n=360)	*Pichia kudriavzevii*	0.12/0.25	2/4	32/64	0.25/0.5	0.12/0.25	0.12/0.25	0.06/0.12
C. inconspicua (n=49)	*Pichia cactophila*	0.12/0.25	2/4	16/32	0.12/0.25	0.12/0.12	0.03/0.06	0.015/0.03
C. kefyr (n=177)	*Kluyveromyces marxianus*	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
C. guilliermondii (n=122)	*Meyerozyma guilliermondii*	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
C. fermentati (n=37)	*Meyerozyma caribbica*	0.12/0.25	≤0.12/≤0.12	8/64	0.12/2	0.25/0.5	0.12/0.5	0.25/2
C. lusitaniae (n=248)	*Clavispora lusitaniae*	0.06/0.12	≤0.12/0.5	0.25/0.5	≤0.01/≤0.01	≤0.01/0.06	0.03/0.06	0.03/0.06
C. haemulonii (n=46)		0.5/2	≤0.12/0.5	32/≥64	≥8/≥8	4/≥8	0.03/0.06	0.06/0.06
C.haemulonii type II (n=46)	*Candida duobushaemulonii*	2/8	≤0.12/≥64	32/≥64	≥8/≥8	1/≥8	0.015/0.03	0.03/0.06
Candida auris (n=13)		0.25/0.5	≤0.12/≥64	32/≥64	0.5/1	≤0.01/0.12	0.015/0.03	0.015/0.03
C.palmioleophila (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
Pichia jadinii (n=23)	*Cyberlindnera jadinii*	0.06/0.12	≤0.12/1	1/4	0.06/0.12	0.12/0.25	0.015/1	0.015/2
Pichia fabianii (n=12)	*Cyberlindnera fabianii*	0.06/0.12	≤0.12/≤0.12	0.5/1	0.03/0.03	0.12/0.25	0.03/0.06	0.03/0.06
C. pelliculosa (n=38)	*Wickerhamomyces anomalus*	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
Pichia ohmeri (n=35)	*Kodamaea ohmeri*	0.06/0.06	≤0.12/1	4/16	0.03/0.12	0.03/0.12	0.06/≥8	0.06/ 0.12
Pichia norvegensis (n=21)		0.12/0.12	4/8	32/64	0.25/0.5	0.12/0.12	0.03/0.06	0.03/0.06
S. cerevisiae (n=69)		0.06/0.12	≤0.12/≤0.12	8/16	0.12/0.25	0.5/1	0.12/0.25	0.06/0.25
C. lipolytica (n=28)	*Yarrowia lipolytica*	0.5/4	32/≥64	4/16	0.06/0.12	0.25/1	0.12/0.5	0.25/0.25
Geotrichum candidum (n=37)	*Galactomyces candidus*	0.25/0.5	0.25/1	16/64	0.25/1	0.25/1	1/≥8	0.12/≥8
G. capitatum (n=56)	*Magnusiomyces capitatus*	0.25/0.5	≤0.12/0.25	8/16	0.06/0.5	0.12/1	≥8/≥8	≥8/≥8
G. clavatum (n=200)	*Saprochaete clavata*	0.25/0.5	0.5/1	16/64	0.25/1	0.5/1	≥8/≥8	≥8/≥8
Cr. neoformans var. *grubii* (n=1000)		0.12/0.5	4/16	4/8	0.03/0.12	0.06/0.25	≥8/ ≥8	4/≥8
Cr. neoformans var. *neoformans* (n=219)		0.06/0.25	4/16	1/4	≤0.01/0.06	0.03/0.12	≥8/ ≥8	1/≥8
Cr. neoformans hybrides AD (n=185)		0.12/0.25	4/16	4/8	0.03/0.12	0.06/0.25	≥8/ ≥8	4/≥8
Cr. gattii (n = 32)		0.12/0.25	2/8	8/16	0.12/0.5	0.25/0.5	≥8/ ≥8	≥8/≥8
Rhodotorula mucilaginosa (n=62)		0.25/0.5	0.25/0.5	≥64/≥64	2/4	0.5/2	≥8/ ≥8	≥8/≥8
Trichosporon asahii (n=63)		2/≥8	32/≥64	4/16	0.12/0.25	0.25/0.5	≥8/≥8	≥8/≥8
Trichosporon inkin (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 (MAJ des données mars 2021)

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 12**). Sur ces espèces, les CMI de l'isavuconazole sont équivalentes à celles du voriconazole sauf sur les isolats de *S. cerevisiae* pour lesquels elles sont un peu plus basses, ceux de *C. neoformans* pour lesquels elles sont un peu plus élevées, mais surtout ceux de *M. capitatus* ou *S. clavata* pour lesquels elles sont très nettement plus élevées[20].

Tableau 12 : Profil de sensibilité des levures à 4 azolés, dont l'isavuconazole
pour les espèces pour lesquelles au moins 10 isolats ont été testés depuis janvier 2015 (technique EUCAST, mise à jour mars 2021)

	CMI50/CMI90 **mg/L** pour les azolés			
Espèce (nbre isolats testés)	**Fluconazole**	**Posaconazole**	**Voriconazole**	**Isavuconazole**
Candida albicans (n=912)	≤0.125/0.25	≤0.015/0.03	≤0.015/≤0.015	≤0.007/≤0.007
Candida dubliniensis (n=74)	≤0.125/0.25	≤0.015/0.03	≤0.015/≤0.015	≤0.007/≤0.007
Candida glabrata (n=386)	8/32	0.5/1	0.125/0.5	0.125/0.5
Candida parapsilosis (n=288)	0.5/2	0.03/0.06	≤0.015/0.06	0.015/0.03
Candida orthopsilosis (n=36)	0.5/8	0.03/0.125	0.03/1	0.015/0.06
Candida metapsilosis (n=28)	½	0.03/0.06	0.03/0.03	0.015/0.015
Candida tropicalis (n=185)	0.25/1	0.03/0.06	0.03/0.06	≤0.007/0.03
Candida auris (n=12)	32/≥64	≤0.015/0.06	0.25/1	0.015/0.06
Candida duobushaemulonii (n=11)	16/≥64	0.12/1	0.25/4	0.12/≥4
Pichia kudriavzevii (n=133)	32/≥64	0.125/0.25	0.25/0.5	0.125/0.25
Pichia cactophila (n=23)	16/32	0.06/0.12	0.12/0.12	0.12/0.25
Kluyveromyces marxianus (n=60)	0.25/0.5	0.06/0.125	≤0.015/≤0.015	≤0.007/≤0.007
Clavispora lusitaniae (n=132)	0.25/0.5	≤0.015/0.03	≤0.015/≤0.015	≤0.007/0.015
Meyerozyma guilliermondii (n=45)	4/≥64	0.12/0.5	0.125/4	0.25/4
Saccharomyces cerevisiae (n=30)	4/16	0.5/1	0.06/0.5	0.03/0.25
Kodamaea ohmeri (n=18)	4/4	0.03/0.125	≤0.015/0.06	0.015/0.06
Wickerhamomyces anomalus (n=16)	2/8	0.25/0.5	0.06/0.25	0.06/0.12
Galactomyces candidus (n=13)	16/≥64	0.25/0.5	0.25/2	0.25/2
Magnusiomyces capitatus (n=30)	4/16	0.12/0.5	0.03/0.12	4/≥4
Saprochaete clavata (n=117)	16/≥64	0.5/0.5	0.25/0.5	2/≥4
Yarrowia lipolytica (n=11)	2/16	0.25/1	0.06/0.12	0.125/2
C. neoformans var. *grubii* (n=332)	4/8	0.03/0.125	0.03/0.12	0.12/0.5
C. neoformans var. *neoformans* (n=57)	1 / 4	≤0.015/0.06	≤0.015/0.03	0.03/0.12
C. neoformans AD hybrid (n=53)	2/8	0.03/0.125	0.03/0.06	0.06/0.125
Rhodotorula mucilaginosa (n=35)	≥64/≥64	0.25/2	¼	1/2
Trichosporon asahii (n=26)	2/16	0.25/0.5	0.06/0.5	0.5/1

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 plus de 3100 isolats de champignons filamenteux (**Tableau 13**). Les données sur l'isavuconazole sont présentées plus loin dans un tableau séparé car le nombre de souches est plus limité.

[20] 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*

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. Pour cette espèce, nous distinguons donc dans le tableau les souches "sauvages" et les souches mutées.
Les profils de sensibilité des espèces pour lesquelles plus de 5 isolats ont été testés sont présentés. Pour les *Mucorales*, nous retrouvons une bonne activité *in vitro* de l'amphotéricine B et une activité du posaconazole variable selon les espèces, et l'absence d'activité du voriconazole et des échinocandines.

Tableau 13 : Profil de sensibilité des champignons filamenteux aux antifongiques
(MAJ avril 2021)

	Valeurs des CMI50 / CMI90 (mg/L) pour les antifongiques*						
Espèce (nombre d'isolats testés)	AMB	Itra	Vori	Posa	Caspo	Mica	Terbi
Cunninghamella bertholletiae (n=17)	0.5/1	2/≥8	≥8/≥8	0.5/1	≥8/≥8	≥8/≥8	0.12/0.25
Cunninghamella spp. (n=8)	4/-	2/-	≥8/-	1/-	≥8/-	≥8/-	0.12/-
Lichtheimia corymbifera (n =78)	0.5/0.5	1/4	≥8/≥8	0.5/0.5	≥8/≥8	≥8/≥8	0.5/1
Lichtheimia ornata (n=7)	0.25/-	0.5/-	≥8/-	0.5/-	≥8/-	≥8/-	0.5/-
Lichtheimia ramosa (n=74)	0.12/0.25	2/≥8	≥8/≥8	0.5/1	≥8/≥8	≥8/≥8	1/2
Mucor circinelloides (n=76)	0.03/0.12	≥8/≥8	≥8/≥8	1/≥8	≥8/≥8	≥8/≥8	≥8/≥8
Mucor velutinosus (n=13)	0.06/0.25	≥8/≥8	≥8/≥8	0.5/2	≥8/≥8	≥8/≥8	≥8/≥8
Mucor indicus (n=15)	0.06/0.12	≥8/≥8	≥8/≥8	1/2	≥8/≥8	≥8/≥8	≥8/≥8
Mucor spp. (n=10)	0.12/0.25	≥8/≥8	≥8/≥8	2/≥8	≥8/≥8	≥8/≥8	≥8/≥8
Rhizomucor pusillus (n=57)	0.06/0.12	0.5/1	≥8/≥8	0.25/0.5	≥8/≥8	≥8/≥8	0.25/0.5
Rhizomucor miehei (n=8)	0.03/-	0.03/-	2/-	0.06/-	≥8/-	2/-	0.25/-
Rhizopus arrhizus (n =111)	0.12/0.25	1/≥8	8/≥8	0.5/2	≥8/≥8	≥8/≥8	≥8/≥8
Rhizopus microsporus (n=73)	0.06/0.12	1/≥8	8/≥8	0.5/2	≥8/≥8	≥8/≥8	0.5/1
Saksenaea vasiformis complex (n=5)	8/-	0.25/-	8/-	0.12/-	≥8/-	≥8/-	0.25/-
Syncephalastrum racemosum (n=5)	0.03/-	≥8/-	≥8/-	0.5/-	≥8/-	≥8/-	0.5/-
Aspergillus fumigatus (n=312)	0.25/0.5	0.25/0.5	0.25/1	0.06/0.12	0.5/0.5	0.015/0.03	1/2
Aspergillus fumigatus CMI itra>1mg/L) (n=106)	0.25/0.5	≥8/≥8	2/8	0.5/2	0.5/0.5	≤0.007/0.03	1/8
Aspergillus lentulus (n=5)	8/-	1/-	1/-	0.25/-	2/-	≤0.007/-	0.25/-
Aspergillus hiratsukae (n=6)	0.5/-	0.125/-	0.25/-	0.06/-	0.5/-	≤0.007/-	0.125/-
Aspergillus flavus (n=177)	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
Aspergillus parasiticus (n=6)	2/-	0.125/-	0.5/-	0.06/-	0.25/-	≤0.007/-	0.015/-
Aspergillus tamarii (n=8)	0.5/-	0.06/-	0.25/-	0.06/-	0.25/-	≤0.007/-	≤0.01/-
Aspergillus section *Nidulantes* (n=9)	1/2	0.25/-	0.12/-	0.12/-	1/-	≤0.007/-	0.06/-
Aspergillus nidulans (n=36)	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
Aspergillus quadrilineatus (n=17)	0.5/1	0.12/0.25	0.12/0.25	0.12/0.25	2/2	≤0.007/0.03	0.12/0.12
Aspergillus section *Nigri* (n=20)	0.25/1	0.5/4	0.5/1	0.25/0.5	0.25/0.5	0.03/0.5	0.12/0.5
Aspergillus tubingensis (n=28)	0.25/-	1/8	1/2	0.25/0.5	0.25/0.5	≤0.007/0.01	0.25/0.25
Aspergillus welwitschiae (n=22)	0.5/1	1/2	0.5/1	0.25/0.25	0.25/0.5	0.007/0.015	0.12/0.25
Aspergillus section *Usti* (n=28)	0.5/1	2/≥8	4/8	≥8/≥8	2/≥8	0.25/4	0.25/0.5
Aspergillus calidoustus (n=24)	1/2	≥8/≥8	4/8	≥8/≥8	0.5/4	0.015/0.06	0.25/0.5
Aspergillus terreus (n=55)	4/8	0.06/0.25	0.5/1	0.06/0.12	0.5/1	≤0.007/0.03	0.06/0.12
Aspergillus sydowii (n=6)	2/-	0.5/-	0.5/-	0.25/-	0.12/-	≤0.007/-	0.06/-
Aspergillus versicolor (n=9)	1/-	0.25/-	0.25/-	0.12/-	0.5/-	0.03/-	0.25/-
Penicillium spp. (n=30)	0.5/8	1/≥8	8/≥8	1/≥8	2/≥8	0.12/2	0.25/1
Penicillium chrysogenum (n=7)	0.5/-	0.25/-	1/-	0.25/-	0.5/-	0.03/-	0.25/-
Paecilomyces variotii (n=15)	0.06/0.5	0.12/0.5	8/≥8	0.12/0.5	2/4	0.03/0.25	1/8

	Valeurs des CMI50 / CMI90 (mg/L) pour les antifongiques*						
Espèce (nombre d'isolats testés)	AMB	Itra	Vori	Posa	Caspo	Mica	Terbi
Fusarium solani complex (n=241)	4/8	≥8/≥8	8/≥8	≥8/≥8	≥8/≥8	≥8/≥8	≥8/≥8
Fusarium falciforme (n=15)	2/8	8/≥8	8/≥8	≥8/≥8	8/8	8/8	≥8/≥8
Fusarium oxysporum complex (n=183)	2/4	≥8/≥8	2/8	2/≥8	≥8/≥8	≥8/≥8	2/4
Fusarium proliferatum (n=133)	4/8	≥8/≥8	4/8	8/≥8	8/≥8	8/≥8	1/2
Fusarium verticillioides (n=27)	8/8	≥8/≥8	2/4	0.5/2	8/≥8	8/≥8	1/2
Fusarium dimerum complex (n= 39)	0.25/0.5	≥8/≥8	2/4	≥8/≥8	≥8/≥8	≥8/≥8	0.5/1
Fusarium incarnatum-equiseti complex (n=6)	1/-	≥8/-	2/-	1/-	≥8/-	≥8/-	4/-
Sarocladium kiliense (n=11)	8/≥8	≥8/≥8	0.5/1	1/≥8	4/≥8	4/≥8	0.5/0.5
Purpureocillium lilacinum (n=52)	8/≥8	2/≥8	0.25/0.5	0.25/0.5	≥8/≥8	2/≥8	0.25/0.5
Trichoderma spp. (n=8)	1/-	≥8/-	1/-	8/-	0.5/-	0.06/-	2/-
Trichoderma longibrachiatum (n=25)	1/2	≥8/≥8	0.5/1	1/2	0.5/1	0.06/0.25	1/2
Phaeoacremonium parasiticum (n=23)	0.5/2	≥8/≥8	0.25/0.25	0.25/0.5	≥8/≥8	≥8/≥8	0.12/0.5
Pleurostomophora richardsiae (n=7)	0.25/-	0.25/-	0.5/-	0.25/-	4/-	1/-	1/-
Coniochaeta hoffmannii (n=6)	0.25/-	0.25/-	1/-	0.12/-	2/-	2/-	0.25/-
Thermothelomyces thermophilus (n=9)	1/-	0.12/-	0.12/-	0.06/-	4/-	0.5/-	2/-
Sporothrix schenckii (n=20)	1/2	0.5/1	8/≥8	0.5/1	≥8/≥8	≥8/≥8	0.06/0.12
Sporothrix globosa (n=5)	8/-	1/-	≥8/≥8	1/2	≥8/-	1/-	0.25
Scedosporium apiospermum (n=115)	8/≥8	1/8	0.5/1	0.5/1	1/2	0.25/1	≥8/≥8
Scedosporium boydii (n=46)	8/≥8	0.5/8	0.25/0.5	0.25/1	1/2	0.25/1	≥8/≥8
Scedosporium ellipsoideum (n=9)	≥8/-	1/-	0.5/-	1/-	0.5/-	0.25/-	≥8/-
Scedosporium aurantiacum (n=6)	8/-	4/-	0.5/-	1/-	8/-	4/-	≥8/-
Scedosporium dehoogii (n=10)	8/≥8	0.5/1	0.25/0.5	0.5/1	2/2	0.25/0.5	≥8/≥8
Scedosporium minutisporum (n=5)	8/-	0.5/-	0.25/-	0.5/-	2/-	0.25/-	≥8/-
Lomentospora prolificans (n=39)	8/≥8	≥8/≥8	8/≥8	≥8/≥8	4/≥8	4/≥8	≥8/≥8
Microascus cirrosus (n=7)	8/-	≥8/-	≥8/-	≥8/-	4/-	≥8/-	2/-
Scopulariopsis brevicaulis (n=21)	8/≥8	≥8/≥8	8/≥8	≥8/≥8	1/4	0.25/1	2/8
Doratomyces spp. (n=5)	2/-	≥8/-	4/-	1/-	1/-	0.12/-	2/-
Chaetomium spp. (n=13)	2/8	0.12/0.5	0.25/1	0.12/0.5	1/2	0.12/0.5	2/16
Curvularia spicifera (n=7)	0.06/-	0.25/	0.5/-	0.06/-	0.5/-	0.06/-	0.5/-
Alternaria infectoria 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
Alternaria alternata complex (n=37)	0.5/1	0.5/8	2/4	0.25/0.5	0.5/≥8	0.25/≥8	4/≥8
Medicopsis romeroi (n=7)	0.5/-	4/-	0.5/-	1/-	4/-	2/-	0.12/-
Neoscytalidium dimidiatum (n=8)	0.12/-	≥8/-	0.12/-	0.5/-	0.5/-	0.12/-	0.5/-
Aureobasidium pullulans (n=7)	0.25/-	0.03/-	0.12/-	0.06/-	1/-	1/-	1/-
Exophiala dermatitidis (n=34)	0.12/0.25	0.5/1	0.06/0.5	0.12/0.5	4/≥8	1/≥8	0.06/0.25
Exophiala jeanselmei (n=10)	0.5/1	0.25/0.5	0.25/0.5	0.25/-	1/-	2/-	0.06/-
Exophiala oligosperma (n=5)	0.25/-	0.25/-	0.25/-	0.25/-	≥8/-	2/-	0.03/-
Exophiala spinifera (n=13)	0.12/0.25	0.03/0.05	0.12/0.25	0.03/0.25	2/2	0.25/2	0.06/0.25
Fonsecaea monophora (n=9)	0.25/-	≤0.01/-	0.06/-	0.06/-	0.5/-	0.5/-	0.03/-
Fonsecaea pedrosoi (n=9)	0.25/-	0.12/-	0.06/-	0.06/-	1/-	1/-	0.03/-
Fonsecaea nubica (n=16)	0.5/1	≤0.01/0.5	0.06/0.12	0.03/0.25	1/2	0.5/4	0.03/0.25
Hormographiella aspergillata (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 artéfactuelle 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.
Parmi les espèces d'*Aspergillus* section *Fumigati,* nous retrouvons *Aspergillus lentulus* qui se caractérise par des CMI très élevées à l'amphotericine B. Nous avons séparé les especes majoritaires *d'Aspergillus* section *Nidulantes* telles qu'*A. nidulans* et *A. quadrilineatus* qui diffèrent dans leurs profils de sensibilité à l'amphotericine B et à la caspofungine. Certaines espèces émergentes, comme les *Aspergillus* de la section *Usti*, particulièrement *Aspergillus calidoustus* (l'espèce la plus fréquemment rencontrée en clinique) ont des profils de sensibilité particuliers avec des CMI élevées pour tous les azolés et les échinocandines. Les membres du genre *Fusarium*, à l'exception du complexe d'espèces *Fusarium dimerum* pour l'amphotericine B, sont caractérisés par une résistance à la plupart des antifongiques systémiques, y compris les nouveaux azolés et les échinocandines. Les espèces *Lomentospora prolificans*, *Scopulariopsis brevicaulis* et *Microscus cirrosus* ont des profils multirésistants.
Les champignons melanisés ont globalement une bonne sensibilité à l'amphotéricine B et aux azolés. On peut remarquer que l'activité des différents azolés n'est pas équivalente, au sein de ma même espèce. 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 14**). Sur ces espèces, les CMI de l'isavuconazole sont très élevées et comparables à celles du voriconazole et de l'itraconazole sur les *Mucorales* et sur les *Fusarium* spp. Pour les autres espèces testées, les CMI de l'isavuconazole sont la plupart du temps plus hautes que pour tout ou partie des autres azolés, ce qui, rappelons-le, ne préjuge pas de l'activité *in vivo* de cet antifongique étant données les différences de pharmacocinétique.

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

Tableau 14 : Profil de sensibilité des filamenteux à 4 azolés, dont l'isavuconazole
pour les espèces pour lesquelles au moins 5 isolats ont été testés depuis janvier 2015 (MAJ avril 2021)

	Valeurs des CMI50/CMI90 (mg/L) pour les azolés *			
Espèce (nbre d'isolats)	Posaconazole	Itraconazole	Voriconazole	Isavuconazole
Cunninghamella bertholletiae (n=11)	1/1	≥8/≥8	≥8/≥8	≥8/≥8
Lichtheimia corymbifera (n=34)	0.5/0.5	0.5/2	≥8/≥8	4/≥8
Lichtheimia ramosa (n=24)	0.5/0.5	1/≥8	≥8/≥8	≥8/≥8
Mucor circinelloides (n=47)	1≥8	≥8/≥8	≥8/≥8	≥8/≥8
Mucor indicus (n=12)	1/2	≥8/≥8	≥8/≥8	≥8/≥8
Mucor velutinosus (n=7)	1/-	≥8/-	≥8/-	≥8/-
Rhizopus arrhizus (n=52)	0.5/≥8	2/≥8	≥8/≥8	2/≥8
Rhizopus microsporus (n=38)	1/≥8	≥8/≥8	8/≥8	4/≥8
Rhizomucor pusillus (n=13)	0.25/0.25	0.5/0.5	≥8/≥8	4/≥8
Aspergillus fumigatus (n=131)	0.06/0.12	0.25/0.5	0.25/1	0.5/1
Aspergillus fumigatus itraR*(CMI>1mg/L) n=57)	0.5/2	≥8/≥8	4/4	4/8
Aspergillus lentulus (n=5)	0.25/-	1/-	1/-	1/-
Aspergillus flavus (n=100)	0.125/0.125	0.125/0.25	0.5/1	0.5/1
Aspergillus parasiticus (n=5)	0.06/-	0.125/-	1/ -	0.5/-
Aspergillus nidulans (n=11)	0.06/0.25	0.125/0.25	0.125/0.25	0.125/0.5
Aspergillus quadrilineatus (n=7)	0.125/-	0.125/-	0.12/-	0.125/-
Aspergillus tubingensis (n=21)	0.25/0.5	1/≥8	1/4	4/>8
Aspergillus welwitschiae (n=21)	1/2	1/2	0.25/0.25	2/2
Aspergillus calidoustus (n=20)	≥8/≥8	≥8/≥8	4/8	2/4
Aspergillus terreus (n=24)	0.06/0.12	0.06/0.25	0.5/1	0.5/1
Fusarium solani complex (n=113)	≥8/≥8	≥8/≥8	8/≥8	≥8/≥8
Fusarium oxysporum complex (n=75)	2/≥8	≥8/≥8	2/4	≥8/≥8
Fusarium proliferatum (n=57)	4/≥8	≥8/≥8	4/8	≥8/≥8
Fusarium verticillioides (n=8)	0.25/-	16/-	1/-	≥8/-
Fusarium dimerum complex (n=23)	≥8/≥8	≥8/≥8	2/4	≥8/≥8
Purpureocillium lilacinum (n=26)	0.25/0.5	4/≥8	0.25/0.5	1/4
Trichoderma longibrachiatum (n=9)	1/-	≥8/-	0.5/-	≥8/-
Phaeoacremonium parasiticum (n=15)	0.25/0.5	≥8/≥8	0.25/0.5	2/4
Scedosporium apiospermum (n=53)	0.5/1	0.5/8	0.5/0.5	2/4
Scedosporium boydii (n=14)	0.25/1	1/≥8	0.25/0.5	2/≥8
Lomentospora prolificans (n=15)	≥8/≥8	≥8/≥8	8/≥8	≥8/≥8
Scopulariopsis brevicaulis (n=9)	≥8/-	≥8/-	8/-	4/-
Chaetomium sp. (n=5)	0.06/-	0.06/-	0.25/-	0.25/-
Alternaria alternata complex (n=**11**)	0.25/0.5	1/8	2/4	4/8
Exophiala dermatitidis (n=9)	0.03/-	0.06/-	0.25/-	1/-
Fonsecaea pedrosoi (n=5)	0.06/ -	0.125/ -	0.06/-	0.125/-
Fonsecaea monophora (n=7)	≤0.01/-	0.015/-	0.06/-	0.03/-
Fonsecaea nubica (n=10)	0.03/0.12	0.015/0.25	0.06/-	0.06/0.12

5.3.4 Analyse des tendances

L'analyse de 18 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 15, Figure 19).**

Pour *Candida albicans,* il existe une proportion très faible (0,5%) d'isolats résistants aux antifongiques azolés prescrits en thérapeutique (fluconazole et voriconazole). Il n'existe donc pas d'argument microbiologique s'opposant à 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, 30% des isolats sont résistants avec des fluctuations et un pic en 2019. La figure permet de comprendre qu'il s'agit 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 (2,3%).

La résistance au fluconazole et au voriconazole concerne un petit pourcentage des isolats de *Candida parapsilosis* (en moyenne 6,4% et 2,5% 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 [21] n'est plus identifié depuis 2014 malgré la persistance de souches résistantes à cet antifongique.

Tableau 15 : Proportion d'isolats de levures "résistants" selon les seuils EUCAST

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

	Seuil (mg/L)	%R [extrêmes]
Fluconazole		
C. albicans	> 4	0,4 % [0 - 1,2]
C. glabrata	> 16*	30,7% [5.2-44.2] **#
C. parapsilosis	> 4	6,2 % [0 – 18,9] **
C. tropicalis	> 4	5.8 % [0 – 27,8] **#
Voriconazole		
C. albicans	> 0,25	0,5 % [0 – 2,4]
C. glabrata	-	-
C. parapsilosis	> 0,25	2,3 % [0 – 6,8]
C. tropicalis	> 0,25	8,3 % [0 - 27,8]**#
Caspofungine		
C. albicans	> 0,25	0,3 % [0 – 1,8]**
C. glabrata	> 0,25	1,9% [0 – 7,3]
C. parapsilosis	-	-
C. tropicalis	> 0,25	1,0% [0 - 3,4]

*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 pa rapport aux données rapportées les années précédentes

** p<0,05 (variation significative du pourcentage de résistance de 2004 à 2020, Chi2) ; # p <0,05 (test de tendance)

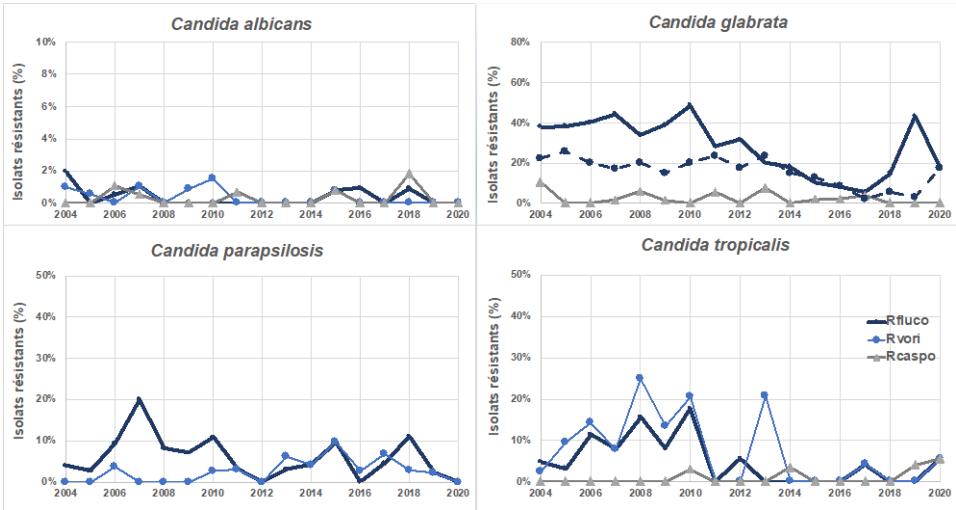


Figure 19 : Evolution du pourcentage d'isolats de levures "résistants"

Analyses des données de l'ODL (2004-2020). 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)

[21] 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.

Pour *A. fumigatus*, le CNRMA n'a pas mis en place d'observatoire, mais les quelques études régionales de monitorage systématique prouvent que le phénomène de résistance ne concerne qu'une très petite proportion des isolats cliniques des patients immunodéprimés. Sur les 2155 aspergilloses invasives recensées depuis 2012 dans RESSIF, 996 ont eu une culture positive à *A. fumigatus*. Nous avons pu confirmer la résistance aux azolés pour les 17 souches que nous avons reçues dans ce cadre (soit 1,7%), les CC-CNRMA n'envoyant pas les souches d'*A. fumigatus* en l'absence d'anomalie du profil de sensibilité. On peut penser que l'incidence de la résistance aux azoles reste très contenue en Francedans le contexte des 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 l'horticulture. Les patients s'infectent alors d'emblée avec des isolats résistants ayant des mutations assez monomorphes dans le gène *cyp*51A.

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, 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 et nous n'avons donc pas de données chiffrées.

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 Infection et colonisation à Candida auris

Au cours de l'année 2020, 3 souches de *Candida auris* ont été reçues au CNRMA pour confirmation d'identification et/ou génotypage. Il s'agissait d'un cas de colonisation dans une hôpital en métropole à Cholet et de deux candidémies chez deux patients différents dans un hôpital sur l'Ile de la Réunion. Une PCR quantitative pour détection de *C. auris* dans les échantillons cliniques a été mise en place à Hôpital Saint-Louis à cette occasion, et a permis de détercer une colonisationn cutanée (axillaire et inguinale) chez l'un des patients avec candidémie.

Le génome entier a été séquencé par la plateforme P2M de l'Institut Pasteur. L'analyse des génomes a démontré que les deux isolats isolés à la Réunion appartenait l'un au clade génétique I, identifié comme étant le clade Indien et l'autre isolat au clade III, identifié comme le clade Sud-Africain, excluant l'éventualité d'une transmission au sein de l'hôpital. Le troisième isolat appartenait au clade I.
Les cas ont fait l'objet de déclaration auprès de Santé Publique France.
Le CNRMA fait aussi partie du *Candida auris* survey collaborative group piloté par l'eCDC qui a publié cette année l'état des lieux en Europe[22].

5.5.2 Cas groupés d'infections à Saprochaete clavata

Au cours de l'année 2020, nous avons reçus 15 isolats de *S. clavata* provenant de 9 patients, et deux isolats environnementaux. Ces isolats provenaient de 7 hôpitaux différents. Aucun isolat n'appartenait aux clades A ou B identifiés lors de l'épidémie de 2012. Les identifications par PCR et PCR en temps réel ont été effectuées en urgence et les résultats rendus dans un délai de moins de 72h ouvrés aux correspondants et à Santé Publique France.
Nous avons finalisé l'étude sur les cas groupés à *S. clavata* survenue au CHU de Marseille. Lors de cet épisode, 9 cas ont été reportés sur une période de 10 mois dans 3 services différents du même hôpital. Des prélèvements de l'environnement hospitalier (machine à laver, vaisselle) ont permis de mettre en évidence la présence de *S. clavata* dans les joints des machines à laver et les brocs de café. Le séquençage des génomes a été effectué par la plateforme P2M de l'Institut Pasteur. La comparaison des génomes avec ceux séquencés lors des épisodes épidémiques précédents, a permis de démontrer que les isolats cliniques et les isolats environnementaux appartenaient à un même clade, différent des autres clades précédemment identifiés (clade C)(**Figure 20**). Le système de chauffage défectueux d'un lave-vaisselle semble être à l'origine de ce nouveau cluster épidémique. Le remplacement du lave-vaisselle défectueux et la mise en place de mesure de surveillance dans l'hôpital a permis de mettre fin aux cas de *S. clavata*.

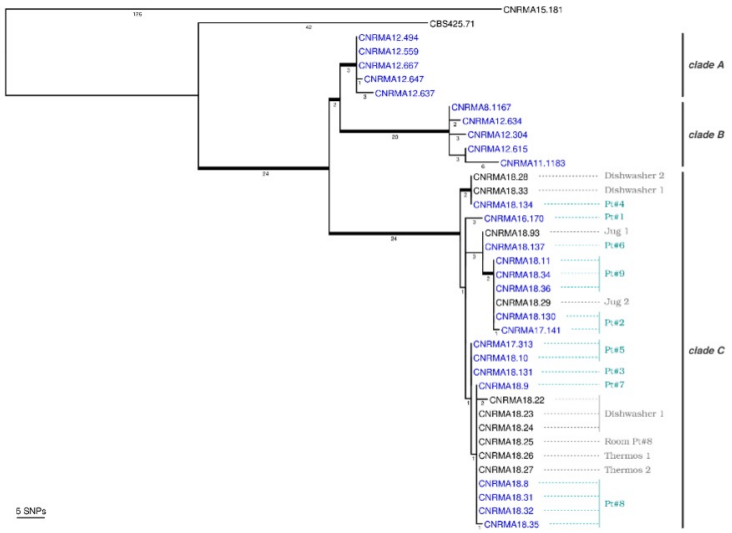


Figure 20 : Arbre phylogénétique des souches de *S. clavata*
Arbre construit à partir du génome entier des isolats cliniques (en bleu) et environnementaux (en gris) isolés au cours de l'épisode épidémique de 2018 (clade C), des isolats des clades A et B précédemment séquencés et de la souche de référence (CBS425.71)

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 une

[22] Plachouras D et al. *Candida auris*: epidemiological situation, laboratory capacity and preparedness in the European Union and European Economic Area*, January 2018 to May 2019. Euro Surveill. 2020 Mar;25(12).

circulation rapide des informations pertinentes. Les informations circulent par messagerie électronique et par téléphone.

- Plusieurs cas de *C. auris* ont été rapidement confirmés grâce à la RT-PCR d'identification mise en place au CNRMA.
- 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[1].

Le CNRMA a, par ailleurs été sollicité par les journalistes en raison de rumeurs autour de la présence de moisissures sur les masques grand public mettant en danger la santé des individus qui les utilisaient.

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

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 par téléphone ou grâce à l'alias 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. Boukris-Sitbon).

Le site internet du CNRMA (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 en 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 concernant les infections fongiques.

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 a 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*
- Fanny Lanternier et Alexandre Alanio font partie de la mission nationale SPARES (Surveillance et Prévention de l'antibiorésistance en établissements de santé) qui a pour objectif initial (défini par Santé publique France) de recueillir les données de consommations d'antibiotiques et de résistances aux antibiotiques pour permettre un suivi épidémiologique local, régional, nationale et même européen. Ils interviennent donc dans le cadre de leur expertise sur les mêmes questions concernant la mycologie

- Fanny Lanternier fait partie du groupe G2I Groupe Infections et Immunodepression créé au sein de la société de Pathologie de Langue Francaise
- Fanny Lanternier a coordonné les recommandations de la COMAI de l'APHP sur l'utilisation des antifongiques, ce qui a donné lieu à une application disponible sur smartphone
- Fanny Lanternier a participé aux relectures des PNDS ***(protocoles nationaux de diagnostic et de soins)*** sur l'aspergillose broncho pulmonaire chronique

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).
- **ECIL**: Fanny Lanternier a participé au groupe de travail de l'ECIL qui a établi les recommandations pour le diagnostic, la prévention et le traitement des IFIs chez les enfants atteints de cancers ou après transplantation de cellules hématopoiétiques[23]
- **eCDC** : Francoise Dromer est membre du *Candida auris* survey collaborative group
- **EORTC** : Olivier Lortholary et Stéphane Bretagne participent aux travaux sur la révision et la mise à jour des definitions consensuelles sur les IFIs [24]
- **ISHAM** (International Society of Human and Animal Mycology):
  - Stéphane Bretagne et Alexande Alanio font partie du FPCRI (Fungal PCR Initiative) de l'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 a standardiser les pratique de séquencage à haut débit pour le séquencage et les analyses du mycobiome.
  - Alexandre Alanio est responsable scientifique des études au sein des Excellence centers de l'ECMM

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).

[23] Groll AH etal. 8th European Conference on Infections in Leukaemia. Lancet Oncol. 2021 Mar 31:S1470-2045(20)30723-3. doi: 10.1016/S1470-2045(20)30723-3.
[24] Donnelly P. 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. Clin Infect. Dis. 2020;71(6):1367–76.

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

Pneumocystis jirovecii est un champignon strictement humain qui se développe dans les alvéoles et qu'on ne sait pas cultiver. La détection et la quantification de *P. jirovecii* dans les prélèvements respiratoires dépend maintenant exclusivement de la PCR. La comparaison des tests disponibles est donc une nécessité 1/ pour identifier les tests les plus sensibles pour le diagnostic individuel, et 2/ pour harmoniser les déclarations entre centres de façon à générer des données épidémiologiques fiables. Le CNRMA à travers le site SLS est partie prenante de ces comparaisons de tests en s'appuyant sur le groupe Européen FPCRI (Fungal PCR Initiative) de l'ISHAM (International Society of Human and Animal Mycology). Les études comparatives confirment que l'extraction d'acides nucléiques totaux au lieu des seuls ADNs, et la cible mtSSU sont les deux éléments majeurs pour assurer la meilleure sensibilité des tests PCR[25].
Ces données montrant la supériorité de la cible mtSSU et de la rtqPCR ont été validée dans une autre publication ayant évalué le nouveau kit commercial Dia-PnJ de la société Diagénode utilisant une rtqPCR triplex incluant les cibles mtLSU et mtSSU[26].

Le deuxième élément du diagnostic de la pneumocystose repose sur la détection du (1,3)-β-d-Glucane (BDG) dans le sérum, outil potentiellement majeur si le LBA ne peut être réalisé. Une étude européenne concernant cinq Centres d'Excellence volontaires de l'ECMM (European Confederation of Medical Mycology) a analysé la correspondance entre le BDG circulant et la charge fongique au niveau pulmonaire. La conclusion est que le BDG n'est pas le meilleur marqueur de l'infection chez les patients non VIH avec de potentiels faux positifs chez les patients présentant d'autres infections fongiques que la pneumocystose, et des faux négatifs quand la charge fongique pulmonaire est faible[27].
La détection du BDG circulant est actuellement essentiellement réalisée avec un kit basé sur une détection colorimétrique. Récemment, un test basé sur la turbidimétrie a été commercialisé et s'est révélé aussi sensible que le premier, et avec deux avantages manifestes : 1/ une fréquence plus faible de faux positifs avec une meilleure reproductibilité des résultats, et 2/ un format individuel plus adapté aux demandes au coup par coup[28]. Des études complémentaires sont nécessaires pour évaluer les performances de ce test à plus grande échelle.
Sur le plan épidémiologiquen, ce champignon est un des rares à pouvoir être transmis directement d'homme à homme[29]. Pour l'investigation de la transmission et des épidémies, certaines étant intra-hospitalières, nous avons montré avec l'aide du centre de BioInformatique et Biostatistiques de l'Institut Pasteur que les marqueurs microsatellites génomiques présentaient des avantages certains en nombre de marqueurs analysables et en faisabilité par rapport à des marqueurs MLST mélangeant des marqueurs génomiques et mitochondriaux[30].

8.1.2 *Travaux sur l'aspergillose invasive*

L'aspergillose est particulièrement étudiée chez les patients immunodéprimés (hématologie et transplantation d'organe solide), mais est de plus en plus rapportée en réanimation, en particulier mais non

[25] Gits-Muselli M et al. The Fungal PCR Initiative's evaluation of in-house and commercial Pneumocystis jirovecii qPCR assays: Toward a standard for a diagnostics assay. Med Mycol. 2020;58(6):779-788
[26] Delliere S et al. Increased sensitivity of a new commercial reverse transcriptase-quantitative PCR for the detection of Pneumocystis jirovecii in respiratory specimens. Med. Mycol 2021 (in press)
[27] Mercier T et al. Variable Correlation between Bronchoalveolar Lavage Fluid Fungal Load and Serum-(1,3)-β-d-Glucan in Patients with Pneumocystosis-A Multicenter ECMM Excellence Center Study. J Fungi (Basel). 2020 Dec 1;6(4):327
[28] Alanio A et al. Prospective comparison of (1,3)-beta-D-glucan detection using colorimetric and turbidimetric assays for diagnosing invasive fungal disease. Med Mycol. 2021 Apr 20:myab016. doi: 10.1093/mmy/myab016.
[29] Dellière S et al. Outbreak-Causing Fungi: Pneumocystis jirovecii. Mycopathologia. 2020;185(5):783-800.
[30] Gits-Muselli M et al. Comparison of MultiLocus Sequence Typing (MLST) and Microsatellite Length Polymorphism (MLP) for Pneumocystis jirovecii genotyping. Comput Struct Biotechnol J. 2020 Oct 15;18:2890-2896.

uniquement, lors de grippes sévères. Or, chez ces patients, l'intérêt des marqueurs fongiques, galactomannane et ADN circulant, a été peu étudié et n'est pour l'instant pas utilisé comme critère diagnostique. Une étude lancée par les collègues de Besançon et s'appuyant sur les cas recueillis au CNR a donc été réalisée et conclut à l'intérêt d'intégrer ces marqueurs dans les algorithmes décisionnels[31].

La durée de traitement des aspergilloses pulmonaires est peu définie ; les données sont quasi inexistantes. Nous avons effectué un sondage sur les pratiques concernant la durée de traitement des aspergilloses pulmonaires invasives dans les différents pays Européens avec 4 sociétés savantes : European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ESCMID) Fungal Infection Study Group (EFISG), Infectious Diseases Working Party-European Society for Blood and Bone Marrow Transplantation (IDWP-EBMT), European Organisation for Research and Treatment-Infectious Disease group (EORTC-IDG) et Sorveglianza Epidemiologica Infezioni nelle Emopatie (SEIFEM). Nous avons obtenu des réponses de 112 cliniciens de 14/16 pays impliqués. La détection du galactomannane était disponible dans le sérum et le LBA dans la majorité des centres, la PCR *Aspergillus* dans 24% et le TEP dans 45%. La durée de traitement était de 6 semaines pour les LAM, 11 pour les patients allogreffés et 6 pour les patients avec lymphoprolifération. La durée de traitement variait en fonction des pays[32].

Les patients avec un déficit immunitaire en STAT3 ont une prédisposition à l'aspergillose. Nous avons cherché à caractériser la réponse immunitaire après une stimulation par *Aspergillus fumigatus* chez les patients avec un déficit en STAT3. Nous avons pu montrer que ces patients avaient une réponse immunitaire adaptative défectueuse en réponse à *A. fumigatus* avec une réponse IFN-γ et IL-17 plus basse chez les patients avec aspergillose[33]. Par ailleurs, certains de ces patients avaient une souche d'*A. fumigatus* résistante aux azolés ce qui compliquait la prise en charge thérapeutique[34].

L'espèce le plus souvent impliquée en pathologie humaine dans les aspergilloses invasives est sans conteste *A. fumigatus* sous nos climats, mais *A. flavus* est prédominant sous les tropiques. Il est donc important de comparer ces deux espèces. Ici, le travail a consisté à regarder les différences concernant les réactions immunes vis-à-vis des spores de ces deux espèces et a objectivé de nombreuses différences liées aux structures différentes des paroi des spores. Ces différences ont un intérêt fondamental mais aussi pratique dans l'optique de développer des tests de détection des anticorps produits lors des infections dues à ces deux espèces[35].

8.1.3 Travaux sur les infections à levures

Alors que les candidoses invasives sont l'infection fongique invasive la plus fréquente, les candidoses du système nerveux central (SNC) sont rares. Nous avons étudié les candidoses cérébrales en France de 2005 à 2018 rapportant 24 cas en dehors du contexte de la néonatalogie. Dans 70% des cas, les patients avaient une atteinte cérébrale secondaire à une candidose disséminée (10/17 avaient une hémopathie maligne), les autres ayant une endocardite. Parmi les patients d'hématologie, sept avaient eu une ponction lombaire thérapeutique, les 3 autres avaient une endocardite. Les patients ayant une atteinte isolée du SNC avaient une méningite et une hypertension intracranienne. La culture du LCS était positive dans 31% des cas. Le

[31] Hamam J et al. New clinical algorithm including fungal biomarkers to better diagnose probable invasive pulmonary aspergillosis in ICU. Ann Intensive Care. 2021;11(1):41.
[32] Lanternier F et al. Invasive pulmonary aspergillosis treatment duration in haematology patients in Europe: An EFISG, IDWP-EBMT, EORTC-IDG and SEIFEM survey. Mycoses 2020;63(5):420-429
[33] Danion F et al. Aspergillus fumigatus Infection in Humans With STAT3-Deficiency Is Associated With Defective Interferon-Gamma and Th17 Responses. .Front Immunol. 2020;11:38.
[34] Danion F. et al. Emergence of azole resistant-Aspergillus fumigatus infections during STAT3-deficiency. J. Med. Microbiol. 2020;69(6):844–9.
[35] Wong SSW et al. Species-Specific Immunological Reactivities Depend on the Cell-Wall Organization of the Two Aspergillus, Aspergillus fumigatus and A. flavus. Front Cell Infect Microbiol. 2021;11:643312.

beta D glucan et l'Ag mannane étaient respectivement positifs dans le LCS de 86% et 80% des cas. La mortalité était de 42% (53% en cas d'atteinte disséminée et 14% en cas d'atteinte localisée)[36].

Les recommandations internationales ont conduit à une modification de la prise en charge initiale des fongémies à levures avec le remplacement du fluconazole par une échinocandine en première intention. Nous avons analysé l'impact de ce changement sur la mortalité globale et l'épidémiologie de ces infections. Pour cela, nous avons analysé les données collectées dans le cadre de l'ODL par les 14 centres participants entre 2004 et 2016. La cohorte comportait 3092 patients (ratio H/F= 1,6; âge médian = 61 ans). La mortalité globale à 30 jours était en moyenne de 38,5%, significativement plus élevée en réanimation (51%) qu'en dehors (27%, p<0.0001). La distribution des espèces était stable au cours du temps (48% de *C. albicans*, 18% de *C. glabrata*, 12% de *C. parapsilosis*, 9% de *C. tropicalis*, 3% de *C. krusei* et 11% d'espèces rares), ainsi que la répartition des patients dans les trois groupes à risque définis (hémopathies malignes, cancers solides et sans pathologie maligne). En revanche, le nombre de patients de plus de 60 ans augmentait (de 49% à 47%, p=0.0002). La prescription de fluconazole diminuait significativement (de 64% à 28%) tandis que celle des échinocandines augmentait (de 12% à 58%) au cours du temps (p<0.0001). La mortalité globale ne différait pas en fonction des traitements. En conclusion, le remplacement progressif du fluconazole par les échinocandines ne s'est pas accompagné de changement significatif de la mortalité quelle que soit l'espèce impliquée et son profil de sensibilité aux antifongiques. Il est donc important de rechercher des facteurs autres que les antifongiques pour améliorer le traitement des fongémies à levures[37].

8.1.4 Travaux sur la cryptococcose

Nous avons réalisé une méta-analyse des données sur la valeur de la détection de l'antigène cryptococcique dans le diagnostic de la cryptococcose neuroméningée. Sur les 11 études inclues (3600 patients adultes séropositifs pour le VIH et suspects d'avoir une cryptococcose neuroméningée), nous avons évalué la sensibilité et spécificité finale de la détection dans le sérum à 99,8% (88,4-100) et 95,2% (88,7-98) respectivement, et celle de la détection dans le LCR à 98.8% (96.2 – 99.6) et 99.3% (96.7 – 99.9) respectivement. En conclusion, la négativité de la détection de l'antigène cryptococcique dans le sérum peut éliminer le diagnostic de cryptococcose neuroméningée, sa positivité doit impérativement entrainer la prescription du traitement antifongique si la ponction lombaire n'est pas réalisable. La positivité de l'antigène cryptococcique dans le LCS signe le diagnostic en l'absence d'antécédent de cryptococcose[38].

La mortalité associée à la cryptococcose neuroméningée est extrêmement élevée en Afrique. L'essai ACTA a démontré qu'en comparaison au traitement de référence de 2 semaines d'amphotericine B (AmB) plus flucytosine (5FC), 1 semaine d'AmB et 5FC était associé à une moindre mortalité et 2 semaines par voie orale de flucanozole (FLU) plus 5FC était non-inferieur. Ces données ont été obtenues au Malawi, Zambie, Cameroun, et Tanzanie. Au Malawi, 236 patients ont été suivis pendant 1 an (au delà donc des 10 semaines du protocole thérapeutique initial). La plus faible mortalité à 1 an était observée pour les patients traités par une semaine d'AmB+5FC (27.5% [95% confidence interval, 16.3 to 44.1])[39].
Une étude de coût/efficacité de l'utilisation de la 5FC en association avec le fluconazole dans le traitement de la méningoencéphalite cryptococcique a été faite en Zambie sur les données de l'étude ACTA. La

[36] Chaussade H et al. Central nervous system candidiasis beyond neonates: Lessons from a nationwide study. Med Mycol. 2021;59(3):266-27
[37] Bretagne S et al. No Impact of Fluconazole to Echinocandins Replacement as First-Line Therapy on the Epidemiology of Yeast Fungemia (Hospital-Driven Active Surveillance, 2004-2017, Paris, France). Front Med (Lausanne) 2021;8:641965
[38] Temfack E. et al. Cryptococcal Antigen in Serum and Cerebrospinal Fluid for Detecting Cryptococcal Meningitis in Adults Living With Human Immunodeficiency Virus: Systematic Review and Meta-Analysis of Diagnostic Test Accuracy Studies. Clin. Infect. Dis. 2021;72(7):1268–78
[39] Kanyama C et al. One-year Mortality Outcomes From the Advancing Cryptococcal Meningitis Treatment for Africa Trial of Cryptococcal Meningitis Treatment in Malawi. Clin. Infect. Dis. 2020;6;70(3):521–4.

conclusion est que l'addition de 5FC est positive et pourrait réduire significativement la mortalité associée chez les patients séropositifs pour le VIH en Afrique[40].

8.1.5 Travaux sur les mycoses rares

L'activité du CNRMA permet de recenser et d'analyser des infections dues à des pathogènes rares.
Les infections invasives à *Scedosporium* et *Lomentospora* sont responsables d'infections particulièrement sévères et résistantes aux antifongiques. Un travail rétrospectif réalisé à partir de l'ensemble des souches reçues au CNRMA sur la période de 2005 à 2017 et responsables d'infections invasives nous a permis de décrire les 90 cas d'infections invasives dues à 90 souches sur la période. *Scedosporium apiospermu*m était responsable de 48 cas, *Scedosporium boydii/S. ellipsoideum* de 20 cas et *Lomentospora prolificans* de 14. Un tiers des infections étaient disséminées avec 41% de localisations cérébrales et 31% de localisations cardiovasculaires. Au vue des révisions taxonomiques récentes, nous voulions évaluer la pertinence clinique de l'identification des espèces de *Scedosporium*. Nous avons pu mettre en évidence pour la première fois une différence clinique entre les différentes espèces. Les infections à *S. apiospermum* sont associées aux pathologies malignes et aux atteintes cutanées en cas de dissémination et les infections à S. *boydii* sont associées à la transplantation d'organe solide et aux atteintes cérébrales, aux fongémies et à une mortalité précoce. La présentation clinique et la mortalité des infections à *L. prolificans* étaient aussi différentes. Nous avons également pu identifier les facteurs impliqués dans la mortalité à 3 mois[41].

Nous avons aussi analysé neuf **infections à *Nannizziopsis obscura***. Elles avaient toutes la caractéristique de survenir chez des patients avec un déficit de l'immunité T dépendante, tous originaires d'Afrique de l'Ouest, suggérant très fortement que les patients s'étaient contaminés dans leur pays d'origine et que l'infection, restée quiescente, ne s'est déclarée que lors de l'immunodépression secondaire aux différents traitements[42].

Le diagnostic des infections à *Mucorales* a bénéficié de l'apport de la PCR dans le sérum. Le groupe FPCRI (Fungal PCR Initiative) de l'ISHAM (International Society of Human and Animal Mycology) a lancé une étude pour comparer les différents tests et promouvoir les bonnes pratiques comme établies précédemment avec le diagnostic de l'aspergillose. Les résultats ont été très satisfaisants, confortant l'usage de ces tests pour le diagnostic des infections disséminées à mucorales[43].

Le CNRMA a eu l'occasion de collaborer dans le cadre d'un consortium international à la caractérisation de la **structure génétique de la population de *Candida auris*** avec l'aide des quelques souches françaises. Cette étude a permis de valider que les souches françaises appartenaient bien au clade I en provenance du sous-continent Indien[44]. Par ailleurs, la récente publication d'une méthode de typage microsatellite de *C. auris* nous a donné l'occasion de discuter les avantages et inconvénients de cette méthode par rapport au séquençage génome complet[45].

Nous avons publié récemment les résultats d'une étude nationale évaluant **l'utilisation d'une PCR *Histoplasma* pour le diagnostic de l'histoplasmose en France**. A partir de l'étude de 907 patients et 1319 échantillons suspects d'histoplasmose, nous avons mis en évidence une sensibilité de 97.7% et une spécificité de 99% de la qPCR en comparaison aux méthodes classiques. Pour ce qui est du diagnostic sur

[40] Shiri T et al. Addition of Flucytosine to Fluconazole for the Treatment of Cryptococcal Meningitis in Africa: A Multicountry Cost-effectiveness Analysis. Clin. Infect. Dis. 2020;70(1):26–9.
[41] Bronnimann D et al. Scedosporiosis/lomentosporiosis observational study (SOS): Clinical significance of Scedosporium species identification. Med. Mycol. 2021;59(5):486–97.
[42] Garcia-Hermoso D et al. Invasive Infections with Nannizziopsis obscura Species Complex in 9 Patients from West Africa, France, 2004-2020. Emerg Infect Dis. 2020;26(9):2022-30.
[43] Rocchi S et al. Interlaboratory evaluation of Mucorales PCR assays for testing serum specimens: A study by the fungal PCR Initiative and the Modimucor study group. Med Mycol. 2021;59(2):126-138
[44] Chow NA et al. Tracing the Evolutionary History and Global Expansion of Candida auris Using Population Genomic Analyses. mBio. 2020 Apr 28;11(2):e03364-19
[45] Cuomo CA et al. Tracking a Global Threat: a New Genotyping Method for Candida auris. mBio. 2020 Mar 10;11(2):e00259-20

prélèvement sanguin, nous atteignons une sensibilité diagnostique de 92.3% chez les patients immunodéprimés avec maladie disséminée[46].

8.1.6 Infections fongiques invasives et COVID-19

Une analyse d'une cohorte déclarative des cas d'infections fongiques durant la première vague au niveau national est actuellement en cours de finalisation.

La pneumocystose survenant chez des patients immunodéprimés, la pandémie COVID a été l'occasion d'analyser la fréquence de cette mycose sévère chez les patients en réanimation. La prévalence observée avec une recherche exhaustive dans deux réanimations parisiennes a été de 9,3% (10/108), ce qui est loin d'être négligeable soulevant la nécessité d'une recherche systématique et la prise en charge thérapeutique en fonction des charges fongiques observées[47].

L'épidémie de COVID a fortement stimulé la recherche sur les infections pulmonaires en réanimation et en particulier la co-infection avec l'aspergillose (CAPA pour Covid-associated pulmonary aspergillosis) pour laquelle les critères diagnostiques ne sont pas établis. En l'absence de critères radiologiques (réalisation difficile en réanimation et analyse des lésions difficiles en raison des atteintes dues au virus), la recherche des marqueurs mycologiques est essentielle pour analyser ces co-infections. Une première surveillance durant la première vague a évalué la fréquence de ces co-infections à environ 1/3 des patients en réanimation, pour les patients chez lesquels les investigations mycologiques ont pu être réalisées[48]. Ces investigations permettent aussi de connaitre la sensibilité aux antifongiques avec toujours la crainte de voir apparaitre une résistance aux azolés chez *A. fumigatus*[49]. Une analyse plus détaillée de ces premiers cas a permis de recenser une probable CAPA chez 21 des 366 (5,7%) patients COVID admis en réanimation, et chez 108 (19,4%) des patients chez lesquels les marqueurs d'infections ont été recherchés. Parmi les facteurs de risque, un traitement par azithromycine > 3 jours et, à un moindre degré, une corticothérapie à fortes doses ont été associés au diagnostic de CAPA. La mortalité globale des CAPA était double de celle des patients sans co-infection (15/21 ; 71,4% *vs.* 32/87 ; 36,8%, $p < 0.01$)[50]. Ces résultats indiquent clairement la nécessité de poursuivre les investigations des associations entre infection fongiques et COVID. Nos travaux nous ont permis de discuter des conditions des déclarations des infections secondaires à la COVID-19 en réponse aux critères mis en place par l'OMS[51].

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

8.2.1 Publications 2020

1. Ahmed EA, Nour BYM, Abakar AD, Hamid S, Mohamadani AA, Daffalla M, et al. The genus *Madurella*: Molecular identification and epidemiology in Sudan. PLoS Negl Trop Dis. Public Library of Science; 2020;14(7):e0008420.
2. Alanio A, Dellière S, Fodil S, Bretagne S, Mégarbane B. High prevalence of putative invasive pulmonary aspergillosis in critically ill COVID-19 patients. medRxiv. Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2020:2020.04.21.20064915.
3. Alanio A, Dellière S, Fodil S, Bretagne S, Mégarbane B. Prevalence of putative invasive pulmonary aspergillosis in critically ill patients with COVID-19. Lancet Respir Med. 2020;8(6):e48–9.

[46] Alanio Aet al. Evaluation of a New Histoplasma spp. Quantitative RT-PCR Assay. J Mol Diagn. 2021.

[47] Alanio A et al. The presence of *Pneumocystis jirovecii* in critically ill patients with COVID-19. J Infect. 2021;82(4):84-123

[48] Alanio A et al. Prevalence of putative invasive pulmonary aspergillosis in critically ill patients with COVID-19. Lancet Respir Med. 2020;8(6):e48-e49

[49] Ghelfenstein-Ferreira T et al. Recovery of a triazole-resistant Aspergillus fumigatus in respiratory specimen of COVID-19 patient in ICU - A case report. Med Mycol Case Rep. 2021 Mar;31:15-18.

[50] Dellière S et al. Risk factors associated with COVID-19-associated pulmonary aspergillosis in ICU patients: a French multicentric retrospective cohort. Clin Microbiol Infect. 2020;27(5):790.e1-5.

[51] Verweij PE et al. Fungal infections should be part of the core outcome set for COVID-19. Lancet Infect Dis. 2020:S1473-3099(20)30591-0

4. Alanio A. Dormancy in *Cryptococcus neoformans*: 60 years of accumulating evidence. Journal of Clinical Investigation. 2020;101(1):177–9.
5. Alufandika M, Lawrence DS, Boyer-Chammard T, Kanyama C, Ndhlovu CE, Mosepele M, et al. A pragmatic approach to managing antiretroviral therapy-experienced patients diagnosed with HIV-associated cryptococcal meningitis: impact of antiretroviral therapy adherence and duration. AIDS. 2020;34(9):1425–8
6. Arastehfar A, Lim W, Daneshnia F, van de Sande WWJ, Fahal AH, Desnos-Ollivier M, et al. *Madurella* real-time PCR, a novel approach for eumycetoma diagnosis. Rinaldi G, editor. PLoS Negl Trop Dis.; 2020;14(1):e0007845.
7. Bouchand C, Nguyen D, Secretan P-H, Vidal F, Guéry R, Auvity S, et al. Voriconazole topical cream formulation: evidence for stability and antifungal activity. Int J Antimicrob Agents. 2020 Jul 10;:106083.
8. Bougnoux ME, Angebault C, Paccoud O, Coignard H, Lanternier F, Lortholary O. Impact of intravenous and subcutaneous immunoglobulins on false positivity of galactomannan and β-D-glucan antigenaemia and detection of circulating *Aspergillus fumigatus* DNA. Clin Microbiol Infect. 2020;26(8):1101–2.
9. Bronnimann D, Garcia-Hermoso D, Dromer F, Lanternier F, French Mycoses Study Group. Scedosporiosis/lomentosporiosis observational study (SOS): Clinical significance of *Scedosporium* species identification. Med Mycol. 2020 Oct 9;21:157.
10. Chow NA, Muñoz JF, Gade L, Berkow EL, Li X, Welsh RM, et al. Tracing the Evolutionary History and Global Expansion of *Candida auris* Using Population Genomic Analyses. mBio; 2020;11(2):84.
11. Cuomo CA, Alanio A. Tracking a Global Threat: a New Genotyping Method for *Candida auris*. mBio. 2020 Mar 10;11(2):41.
12. Danion F, Aimanianda V, Bayry J, Duréault A, Wong SSW, Bougnoux M-E, et al. *Aspergillus fumigatus* Infection in Humans With STAT3-Deficiency Is Associated With Defective Interferon-Gamma and Th17 Responses. Front Immunol. Frontiers; 2020;11:38.
13. Danion F, Duréault A, Gautier C, Sénéchal A, Persat F, Bougnoux M-E, et al. Emergence of azole resistant-Aspergillus fumigatus infections during STAT3-deficiency. J Med Microbiol.; 2020;69(6):844–9.
14. Dellière S, Rivero-Menendez O, Gautier C, Garcia-Hermoso D, Alastruey-Izquierdo A, Alanio A. Emerging mould infections: Get prepared to meet unexpected fungi in your patient. Med Mycol. 2020;58(2):156–62.
15. Desnos-Ollivier M, Letscher-Bru V, Neuvéglise C, Dromer F. Yarrowia lipolytica causes sporadic cases and local outbreaks of infections and colonisation. Mycoses. 2020;63(7):737–45.
16. Desnos-Ollivier M, Maufrais C, Pihet M, Aznar C, Dromer F, French Mycoses Study Group. Epidemiological investigation for grouped cases of *Trichosporon asahii* using whole genome and IGS1 sequencing. Mycoses. 2020;57(2):e01505–951.
17. Garcia-Hermoso D, Hamane S, Fekkar A, Jabet A, Denis B, Siguier M, et al. Invasive Infections with *Nannizziopsis obscura* Species Complex in 9 Patients from West Africa, France, 2004-20201. Emerging Infect Dis. 2020;26(9).
18. Ghelfenstein-Ferreira T, Saade A, Alanio A, Bretagne S, Araujo de Castro R, Hamane S, et al. Recovery of a triazole-resistant *Aspergillus fumigatus* in respiratory specimen of COVID-19 patient in ICU - A case report. Med Mycol Case Rep. 2020 Jul 2.
19. Gits-Muselli M, Campagne P, Desnos-Ollivier M, Le Pape P, Bretagne S, Morio F, et al. Comparison of MultiLocus Sequence Typing (MLST) and Microsatellite Length Polymorphism (MLP) for *Pneumocystis jirovecii* genotyping. Comput Struct Biotechnol J. 2020;18:2890–6.
20. Gits-Muselli M, Villiers S, Hamane S, Bercot B, Donay J-L, Denis B, et al. 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. 2020;63(1):95–103.
21. Gits-Muselli M, White PL, Mengoli C, Chen S, Crowley B, Dingemans G, et al. The Fungal PCR Initiative's evaluation of in-house and commercial P*neumocystis jirovecii* qPCR assays: Toward a standard for a diagnostics assay. Med Mycol. 2020;58(6):779–88.

22. Lanternier F, Seidel D, Pagano L, Styczynski J, Mikulska M, Pulcini C, et al. Invasive pulmonary aspergillosis treatment duration in haematology patients in Europe: An EFISG, IDWP-EBMT, EORTC-IDG and SEIFEM survey. Mycoses. 2020;63(5):420–9.
23. Levy Y, Miltgen G, Rousseau A, Lugagne N, Teysseyre L, Traversier N, et al. Case Report: Emergence of *Candida auris* in the Indian Ocean Region. Am J Trop Med Hyg. 2020;104(2):739–43.
24. Menu E, Criscuolo A, Desnos-Ollivier M, Cassagne C, D'Incan E, Furst S, et al. *Saprochaete clavata* Outbreak Infecting Cancer Center through Dishwasher. Emerging Infect Dis. 2020;26(9):2031–8.
25. Mercier V, Bastides F, Bailly E, Garcia-Hermoso D, Miquelestorena-Standley E, Baz El Z, et al. Successful Terbinafine Treatment for Cutaneous Phaeohyphomycosis Caused by *Trematosphaeria grise*a in a Heart Transplanted Man: Case Report and Literature Review. Mycopathologia. 2020 Jun 19.
26. Mercier V, Desnos-Ollivier M, Lamy A, Mahul M, Sasso M. *Kazachstania slooffiae*: An unexpected journey to a human pleural sample. J Mycol Med. 2020;31(2):101109.
27. Nyuykonge B, Klaassen CHW, Zandijk WHA, de Hoog GS, Ahmed SA, Desnos-Ollivier M, et al. Diagnostic implications of mycetoma derived from *Madurella pseudomycetomatis* isolates from Mexico. J Eur Acad Dermatol Venereol. 2020;34(8):1828–34.
28. Paccoud O, Fontaine H, Bougnoux ME, Lortholary O, Suarez F, Lanternier F. Portal vein thrombosis as a long-term complication of chronic hepatosplenic candidiasis in an allogeneic haematopoietic stem-cell transplant recipient. Clin Microbiol Infect. 2020;26(7):967–8.
29. Perrineau S, Guéry R, Monnier D, Puel A, Lanternier F. Anti-GM-CSF Autoantibodies and *Cryptococcus neoformans* var. *grubii* CNS Vasculitis. J Clin Immunol. 2020;40(5):767–9.
30. Pilmis B, Bougnoux M-E, Guéry R, Senghor Y, Le Monnier A, Lanternier F, et al. Failure of multiplex meningitis/encephalitis (ME) NAT during cryptococcal meningitis in solid organ recipients. Transpl Infect Dis. 2020;4(4):e13263.
31. Plachouras D, Lötsch F, Kohlenberg A, Monnet DL, Candida auris survey collaborative group. *Candida auris*: epidemiological situation, laboratory capacity and preparedness in the European Union and European Economic Area*, January 2018 to May 2019. Euro Surveill. 2020;25(12).
32. Pourbaix A, Lafont Rapnouil B, Guéry R, Lanternier F, Lortholary O, Cohen JF. Smoking as a risk factor of invasive fungal disease: Systematic review and meta-analysis. Clin Infect Dis 2020;5:ofy187.
33. Rocchi S, Scherer E, Mengoli C, Alanio A, Botterel F, Bougnoux ME, et al. Interlaboratory evaluation of Mucorales PCR assays for testing serum specimens: A study by the fungal PCR Initiative and the Modimucor study group. Med Mycol. 2020 13;5:e405.
34. Temfack E, Rim JJB, Spijker R, Loyse A, Chiller T, Pappas PG, et al. Cryptococcal antigen in serum and cerebrospinal fluid for detecting cryptococcal meningitis in adults living with HIV: systematic review and meta-analysis of diagnostic test accuracy studies. Clin Infect Dis 2020 Aug 23.
35. White PL, Alanio A, Cruciani M, Gorton R, Millon L, Rickerts V, et al. Nucleic Acid Tools for Invasive Fungal Disease Diagnosis. Curr Fungal Infect Rep. 2020 ;14(1):76–88.

8.2.2 Publications 2021

1. Alanio A, Gits-Muselli M, Lanternier F, Sturny-Leclère A, Benazra M, Hamane S, et al. Evaluation of a New *Histoplasma* spp. Quantitative RT-PCR Assay. J Mol Diagn. 2021 Mar 9.
2. Bretagne S, Desnos-Ollivier M, Sitbon K, Lortholary O, Che D, Dromer F, et al. No Impact of Fluconazole to Echinocandins Replacement as First-Line Therapy on the Epidemiology of Yeast Fungemia (Hospital-Driven Active Surveillance, 2004-2017, Paris, France). Front Med (Lausanne). Frontiers; 2021;8:641965.
3. Bronnimann D, Garcia-Hermoso D, Dromer F, Lanternier F, French Mycoses Study Group, Characterization of the isolates at the NRCMA. Scedosporiosis/lomentosporiosis observational study (SOS): Clinical significance of *Scedosporium* species identification. Med Mycol. 2021 ;59(5):486–97.

4. Chaussade H, Cazals X, Desoubeaux G, Jouvion G, Bougnoux M-E, Lefort A, et al. Central nervous system candidiasis beyond neonates: Lessons from a nationwide study. Med Mycol. 2021;59(3):266–77.
5. Desnos-Ollivier M, Fekkar A, Bretagne S. Earliest case of *Candida auris* infection imported in 2007 in Europe from India prior to the 2009 description in Japan. J Mycol Med. 2021;31(3):101139.
6. Desnos-Ollivier M, Lortholary O, Bretagne S, Dromer F, French Mycoses Study Group. Azoles susceptibility profiles of more than 9,000 clinical yeast isolates belonging to 40 common and rare species. Antimicrob Agents Chemother. 2021 Apr 5.
7. Gits-Muselli M, Hamane S, Verillaud B, Cherpin E, Denis B, Bondeelle L, et al. Different repartition of the cryptic species of black aspergilli according to the anatomical sites in human infections, in a French University hospital. Med Mycol. 2021 (sous presse)
8. Molloy SF, Ross B, Kanyama C, Mfinanga S, Lesikari S, Heyderman RS, et al. Fungal Burden and Raised Intracranial Pressure Are Independently Associated With Visual Loss in Human Immunodeficiency Virus-Associated Cryptococcal Meningitis. Open Forum Infect Dis. 2021;8(4):ofab066.
9. Nyuykonge B, Eadie K, Zandijk WHA, Ahmed SA, Desnos-Ollivier M, Fahal AH, et al. A Short-Tandem-Repeat Assay (MmySTR) for Studying Genetic Variation in *Madurella mycetomatis*. J Clin Microbiol 2021;18;59(3).
10. Paccoud O, Bougnoux M-E, Desnos-Ollivier M, Varet B, Lortholary O, Lanternier F. *Cryptococcus gattii* in Patients with Lymphoid Neoplasms: An Illustration of Evolutive Host-Fungus Interactions. JoF. 2021;7(3):212.
11. Paccoud O, Nervo M, Alanio A, Garcia-Hermoso D, Bougnoux M-E, Mateo J, et al. Cerebral histoplasmosis caused by *Histoplasma capsulatum* var. *duboisii* in a patient with no known immunodeficiency. J Travel Med. 2021;28(1).

8.2.3 Communications

- **Mycology 2020 Webinar Aspergillosis and COVID-19: lessons learned in diagnosis and treatment**. 11 december 2020. "Putative invasive pulmonary aspergillosis in critically ill patients with COVID-19 : is one positif mycological criterion sufficient for CAPA diagnosis?" (A. ALANIO)
- "**Is COVID-19 a risk for invasive aspergillosis ? – Medical Centre Experience"** - 4 november 2020 (A. ALANIO)
- "**Pneumocystis jirovecii pneumonia: best approach for the Clinical Laboratory**". Brazil. 17 and 24 october 2020. (A. ALANIO)
- **CARE MEETING, Digital from London**, November 2020. COVID and Invasive Fungal Diseases. Moderator (O. LORTHOLARY)
- **De nouveaux critères EORTC/MSGERC: pour quoi faire ?** 5ème édition de FongiLEAD, 26 & 27 novembre 2020. (S. BRETAGNE)

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 mais la crise sanitaire n'a pas permis de réaliser les projets envisagés. Nous avons donc repoussé certains des projets énoncés l'an dernier.

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 l'anidulafungine, 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 tous les isolats classés résistants avec le seuil EUCAST et sensible en utilisant le seuil du CNRMA[17]. Ce travail a été retardé du fait de la situation sanitaire et devrait être finalisé dans les mois qui viennent.

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. Pour ce qui est des levures, nous avons publié une première analyse concernant la sensibilité des levures d'espèces communes et rares aux azolés[19] et à l'isavuconazole[20], Les profils seront également mis en ligne sur le site de the Yeast Trust Database (https://theyeasts.org/), une base de données de taxomonie d'accès libre. Par ailleurs, nous savons que le pronostic associé à chaque espèce "rare" est excessivement variable[15]. Une analyse du pronostic des infections aux levures très rarement rapportées est nécessaire car la seule identification même associée à des CMI ne permet pas de définir une stratégie thérapeutique et ou préventive pour les levures de l'environnement retrouvées exceptionnellement en pathologie humaine.
Des analyses similaires doivent être faites pour les champignons filamenteux.

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 comme initié pour S. clavata.

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'histoplasmose et de la coccidioidomycose par A. Alanio à l'hôpital Saint-Louis[46,] nous développons des tests moléculaires du même type pour le diagnostic des maladies rares dues à des champignons dimorphiques, non-endémiques en France, mais importantes épidémiologiquement dans le monde comme la talaromycose (Asie du Sud-

Est), la sporotrichose (Amérique du Sud), la blastomycose (Amérique du Nord, Afrique du Sud), l'emergomycose (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)[25,52,53] et le génotypage des isolats par microsatellites[54,55] 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[56].

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[57]. Le constat est que ces populations VIH-négatives présentent une mortalité plus importante (**Tableau 7**).

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[57,58]. 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[59]. 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[60]. 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[61]. Ainsi, la prise de cotrimoxazolemême à des doses prphylactiques a le potentiel d'interrompre la chaine de transmission dans un service[56].

---

[52] 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

[53] 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.

[54] Alanio A, et al. (**2017**) Diversity of *Pneumocystis jirovecii* Across Europe: A Multicentre Observational Study. *EBioMedicine* 22:155–163

[55] Alanio A et al (**2017**) Investigating Clinical Issues by Genotyping of Medically Important Fungi: Why and How? *Clin Microbiol Rev* 30(3):671–707

[56]Alanio A, Bretagne S (**2017**) *Pneumocystis jirovecii* detection in asymptomatic patients: what does its natural history tell us? *F1000Res* 6:739–10.

[57] 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.

[58] 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.

[59] Mori S et al. (2009) A followup study of asymptomatic carriers of *Pneumocystis jiroveci* during immunosuppressive therapy for rheumatoid arthritis. J Rheumatol. 36(8): 1600–5.

[60] 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.

[61] 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.

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.

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.

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

Certaines aspergilloses invasives se développent dans un contexte de grippes sévères. L'épidémie de Sars-Cov-2 a permis de découvrir que des aspergilloses invasives pouvaient compliquer l'évolution des COVID-19 en réanimation. De même, les candidoses invasives compliquent parfois le séjour en réanimation des patients. Quant au *Pneumocystis jirovecii*, il est connu pour se multiplier chez les patients aux défenses pulmonaires défaillantes. Nous avons entrepris de colliger les déclarations de ces complications fongiques auprès de tous les collaborateurs du CNRMA et allons en faire la synthèse prochainement pour voir si ces trois infections répondent à un schéma physiopathologique unique ou multiple.

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.
Ainsi, la collaboration avec les réanimateurs de Besançon a abouti à une publication préconisant l'emploi du galactomannan et de la détection d'ADN comme marqueurs pertinents chez les patients de réanimation[31].
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 en 2020

Amiens (Dr. Taieb Chouaki/ Dr. Anne Totet)
Angers (Pr. Jean-Philippe Bouchara/Dr. Marc Pihet)
Besançon (Pr. Laurence Millon/ Dr. Anne-Pauline Bellanger)
Caen (Dr. Julie Bonhomme)
Clermont-Ferrand (Dr. Philippe Poirier / Dr. Maxime Moniot)
Dijon (Pr. Frédéric Dalle)
Fort de France, Martinique (Dr. Nicole Desbois)
Le Chesnay, Hôpital henri Mignot (Dr. Odile Eloy)
Limoges (Dr. Marie-Fleur Durieux)
Nice (Dr. Lilia Hasseine)
Nîmes (Dr. Mylène Sasso, Dr. Victor Mercier)
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)
Pointe-à-Pitre, Guadeloupe (Dr. Muriel Nicolas)
Reims (Dr. Antoine Huguenin)
Rennes (Pr. Jean-Pierre Gangneux)
Rouen (Pr. Loïc Favennec / Dr. Gilles Gargala)
Saint Etienne (Dr. Caroline Mahinc)
Strasbourg (Dr. Valérie Letscher-Bru)
Toulouse (Dr. Sophie Cassaing)
Tours (Pr. Guillaume Desoubeaux/Dr Eric Bailly)
Villejuif, Institut Gustave Roussy (Dr. Elisabeth Chachaty)

11.2 Centres participants à l'ODL en 2020

Bobigny - hôpital Avicenne (Dr. Sophie Brun)
Boulogne – hôpital Ambroise Paré (Dr. Anne-Laure Roux)
Créteil - hôpital Henri Mondor (Pr. Françoise Botterel)
Garches – hôpital Raymond Poincaré (Dr. Anne-Laure Roux)
Le Chesnay - CH André Mignot (Dr. Odile Eloy)
Kremlin-Bicêtre, Hôpital du KB (Adela Angoulvant, Françoise Botterel)
Paris – hôpital Cochin (Dr. André Paugam)
Paris - hôpital Necker-Enfants Malades (Dr. Marie-Elisabeth Bougnoux),
Paris - hôpital Bichat (Dr. Sandrine Houzé/ Dr. Christine Bonnal),
Paris - hôpital Saint-Louis (Pr. Stéphane Bretagne)
Paris - hôpital Robert Debré (Dr. Patricia Marianni)
Paris - hôpital Lariboisière (Pr. Stéphane Bretagne)
Villejuif - Institut Gustave Roussy (Dr. Elisabeth Chachaty)

11.3 Participants à la surveillance des mycoses invasives en 2020

Aix en Provence, Laboratoire de Biologie Médicale, Centre Hospitalier
Annecy, Laboratoire de Biologie Médicale, Centre Hospitalier
Antibes, Laboratoire de Biologie Médicale, Centre Hospitalier

Argenteuil, Laboratoire de Biologie Médicale, Centre Hospitalier
Armentière, Laboratoire de Biologie Médicale, Centre Hospitalier
Aulnay, Laboratoire de Biologie Médicale, Centre Hospitalier
Avignon, Laboratoire de Biologie Médicale, Centre Hospitalier
Beaumont, Laboratoire de Biologie Médicale, Centre Hospitalier
Bordeaux, Laboratoire de Parasitologie-Mycologie, CHU Hôpital Saint-André
Brest, Laboratoire de microbiologie, Centre Hospitalier
Chalon-sur-Saone, laboratoire de microbiologie, Centre Hospitalier
Clichy, Laboratoire de microbiologie, CHU Hôpital Beaujon
Cholet, laboratoire de microbiologie, Centre Hospitalier
Compiègne, Centre Hospitalier de Compiègne
Contamine, laboratoire de microbiologie, Centre Hospitalier
Le Mans, laboratoire de microbiologie, Centre Hospitalier
Levallois Perret, laboratoire de microbiologie, Institution Franco Britannique
Libourne, laboratoire de microbiologie, Centre Hospitalier
Lille, laboratoire de parasitologie-mycologie, CHU
Lyon, Laboratoire de Parasitologie-Mycologie, Hôpital de la Croix-Rousse
Mamoudzou, Centre Hospitalier Mayotte
Neuilly-sur-Seine, laboratoire de microbiologie, hôpital Américain
Nouméa, Centre Hospitalier G. Bouret
Orléans, Laboratoire de microbiologie, Hôpital de la Source
Paris, laboratoire de microbiologie, Hôpital La Croix St-Simon,
Paris, laboratoire de microbiologie, hôpital Saint Joseph
Pau, Laboratoire de Bactériologie, Centre Hospitalier Général,
Le Plessis Robinson, Laboratoire de Microbiologie, Centre Chirurgical Marie-Lannelongue
Saint-Denis, La Réunion, Laboratoire de Biologie, CHD Felix Guyon
Saintes, laboratoire de microbiologie, Centre Hospitalier
Sens, laboratoire de microbiologie, Centre Hospitalier
St Flour, laboratoire de microbiologie, Centre Hospitalier
Suresnes, Laboratoire Central, Centre Medico Chirurgical Foch
Tarbes, laboratoire de microbiologie, Centre Hospitalier
Torcy, laboratoire de microbiologie, Centre Hospitalier
Valence, laboratoire de microbiologie, Centre Hospitalier
Valencienne, laboratoire de microbiologie, Centre Hospitalier

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 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 17**). Il faut ici noter que certaines activités se font en dehors de l'unité de mycologie moléculaire 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 de Paris
Christèle Auguste	Assistante	30%	Secrétaire de Direction	Institut Pasteur
Agathe Bertho	Technicienne	100%	BTS / Technicien supérieur de laboratoire	Institut Pasteur
Stéphane Bretagne	Directeur Adjoint	20%	Docteur en Médecine, Thèse d'université / PUPH Hôpital Saint Louis	AP-HP / Université de Paris
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
Dea Garcia-Hermoso	Collaborateur technique/scientifique	100%	Thèse d'université / Ingénieur	Institut Pasteur
Cécile Gautier	Technicienne	100%	BTS / Technicien supérieur de laboratoire	Institut Pasteur
Fanny Lanternier	Collaborateur clinicien	20%	Docteur en médecine, Thèse d'université, PU-PH Hôpital Necker-Enfants Malades	AP-HP / Université de Paris
Olivier Lortholary	Directeur Adjoint	20%	Docteur en Médecine, Thèse d'université / PUPH Hôpital Necker-Enfants Malades	AP-HP / Université de Paris
Karine Sitbon	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 22**). Ils comprennent :

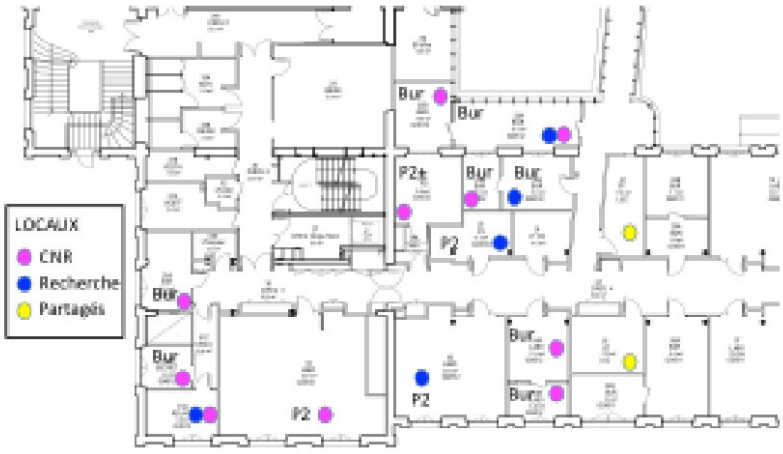


Figure 21 : Locaux du CNRMA

Des locaux dédiés au CNR : un grand laboratoire P2 et un laboratoire P2+ (total 65m^2), 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 CO2, hottes chimiques
- Thermocycleurs (iCycler et C1000 de Bio-Rad et LCR480 de Roche)
- MagNAlyser
- Extracteur semi-automatique KingFisher
- QUBit (fluoromètre pour quantification d'ADN, ARN et protéines)
- Nanodrop
- Caméras numériques, appareil photo Reflex
- Lecteur 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 Eurofins Genomics à Cologne. 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 ≤ 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[62]
- ✓ 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[63]
- ✓ en cas d'identification de *Debaryomyces* sp., de *C. lusitaniae* ou de *Arthrographis sp.*, séquençage systématique d'une partie du gène codant l'actine[64]
- ✓ en cas d'identification de *M. guilliermondii, M. caribbica ou C. carpophila* séquençage systématique des régions ITS, D1D2 et d'une partie du gène *RPB1*
- ✓ en cas d'identification de *C. neoformans* détermination du sérotype par amplification de régions des gènes *Gpa1* et *Pak1* avec des amorces spécifiques du sérotype A ou D et/ou séquençage de la région IGS du gène codant l'ARNribosomique
- ✓ 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≥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 »

La collection du CNRMA comprend ainsi des souches bien caractérisées appartenant à 29 genres et 111 espèces différents (1 à 3421solats/espèce) et se répartissant en :

[62] 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

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

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

- près de 5800 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 2800 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 sur le serveur du CNRMA et des séquences dans une base de données gérée par le logiciel BioloMics.

La collection comprend des souches appartenant à 102 genres et 383 espèces différents, (1 à 421 isolats/espèce) :

- ✓ près de 3500 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 (contrôle qualité, souches type) provenant de diverses collections (CBS, ATCC, IP, NRRL) stockées à -80°C et 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 ACDSee.

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 pour une durée de 3 ans pour les levures. 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 22).** 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.

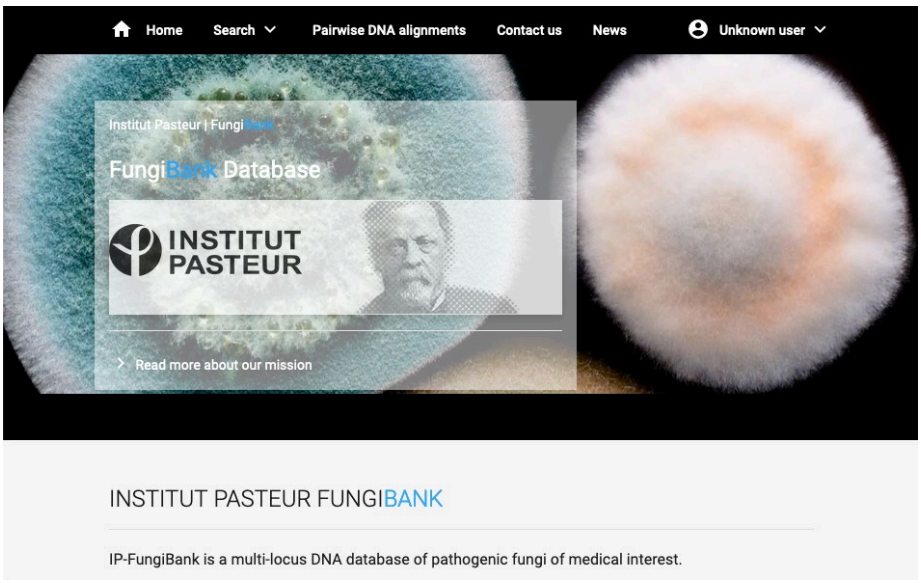


Figure 22 : Portail de la base de données de séquences Institut Pasteur FungiBank

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-α ou RPB2 pour *Fusarium* spp., β-tubuline et/ou calmoduline pour *Aspergillus* spp. ou IGS pour *Trichosporon* spp. et *Cryptococcus* spp, actine pour *Clavispora lusitaniae*, *Debaryomyces* spp. et *Arthrographis* 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 2392 séquences (ITS, 26S, IGS, actine, RPB1, FKS) pour 2313 souches de levures et 2671séquences (18S, 28S, ITS, calmoduline, actine, β-tubuline, EF1-α, RPB1, RPB2, CYP51A) pour 1273 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. 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 de la Recherche Médicale ;
- 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. Ils se font régulièrement auditer dans le cadre de leurs activités, en interne et par les organismes de certification et d'accréditation.

Le LREMS est accrédité selon la norme ISO 15189 version 2012 sous le n° 8-2588. Le CNRMA a été accrédité en mars 2015. La portée d'accréditation est visible sur le site du COFRAC (https://www.cofrac.fr/annexes/sect8/8-2588.pdf).

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 2020	Périodes de réalisation
Audit de renouvellement	6 au 8 octobre 2020
Revue qualité	20 avril 2019
Revue de direction LREMS et ajustement de la demande d'extension	02 octobre 2020
Audit interne qualité	2 décembre 2020
Audit interne technique	26 novembre 2020

Perspectives pouur l'année 2021	Prévision de réalisation
Revues qualité LRE	Janvier-juin 2021
Audits internes qualité et technique	Septembre - décembre 2021
Revue de direction LRE-MS	Juin 2021
Demande d'ouverture nouvelles lignes de portées	Avant le 1er novembre 2021
Audi de surveillance COFRAC	Mars 2022

Malgré le contexte sanitaire, Le LREMS a maintenu son système de management de la qualité et a renouvelé son accréditation lors de l'audit en octobre 2020 avec la confiance accordée des évaluateurs COFRAC.

Les CNR ont été prioritaires dans le Plan de Continuité de l'Activité de l'Institut Pasteur avec un soutien et une mobilisation de l'ensemble des services supports de l'Institut pour permettre au mieux la continuité de leurs missions.

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)[65,66]. 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).

[65] 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.

[66] 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

- ✓ Identification de *Candida dubliniensis* par PCR duplex en utilisant les amorces spécifiques d'une partie du gène de l'actine [67] 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
- ✓ PCRdiagnostique histoplasmose, 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[68]
- ✓ Détection des mutations dans les gènes *Fks* pour les isolats *d'Aspergillus fumigatus* ayant un profil elevé à la caspofungine
- ✓ Détection des mutations dans les gènes *Fks* pour les isolats de *Candida albicans, C. glabrata, C. tropicalis, C. krusei, C. lusitaniae, C. dubliniensis, C. kefyr* ayant des profils de sensibilité anormaux pour les échinocandines.

13.1.2 Techniques mises en place en 2020

- Ajout de nouvelles cibles pour l'identification de diverses espèces de levures et de champignons filamenteux
- Détection des mutations dans le gène *CYP51B* pour les isolats d'*Aspergillus fumigatus* résistants aux antifongiques azolés[68]

13.2 Liste des marqueurs épidémiologiques disponibles

- Pour *C. albicans*, 5 séquences microsatellites (CDC3, HIS3, EF3, STPK, CDR1) [69,70], et les 7 loci MLST (AAT1a, ACC1, ADP1, MPIb, SYA1, VPS13, ZWF1)[71]
- Pour *C. glabrata*, 5 séquences microsatellites (RPM2, MTI, ERG, Cg4, Cg6)[72]
- Pour *C. parapsilosis,* 3 séquences microsatellites (CP1, CP4, CP6)[73]
- Pour *Aspergillus fumigatus*, 4 séquences microsatellites A, B, C et D[74]
- Pour *Candida auris,* 12 marqueurs microsatellites (M2a,M1b,M2c, M3-Ia, M3-Ib, M3-Ic, M3-Iia, M3-IIb, M3-IIc, M9a, M9b, M9c)[2]
- Pour *C. tropicalis,* 6 loci MLST (MDR1, XYR1, SAPT4, SAPT2, ZWF1a, ICL1)[75], et 2 séquences microsatellites (URA3 et CT14) [21]
- 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[76])

---

[67] 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.

[68] 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).

[69] Foulet F, et al (**2005**) Microsatellite markers as a typing system for *Candida glabrata*. *J Clin Microbiol* 43:4574-9.

[70] 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.

[71] Bougnoux ME*,* et al (**2003**) Collaborative consensus for optimized multilocus sequence typing of *Candida albicans*. *J Clin Microbiol* 41:5265

[72] Foulet F, et al (**2005**) Microsatellite marker analysis as a typing system for *Candida glabrata*. *J Clin Microbiol* 43:4574

[73] 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.

[74] Bart-Delabesse E, et al (**1998**) Microsatellite markers for typing *Aspergillus fumigatus* isolates. *J Clin Microbiol* 36:2413

[75] Tavanti A, et al (**2005**) Multilocus sequence typing for differentiation of strains of *Candida tropicalis. J Clin Microbiol* 43: 5593-600.

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

- Pour *Candida krusei*, 6 loci MLST (ADE2, LYS2, HIS3, LEU2, TRP1 et MPD1)[77]
- Pour *Cryptococcus gattii*, 7 loci MLST (IGS1, CAP59, URA5, PLB1, GPD1, SOD1, LAC1)[78]
- 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 :

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 A. fumigatus	β-tubuline	Btub1F/ Btub2R[79]
Espèces d'Aspergillus autres que section Fumigati	β-tubuline	Bt2a/ Bt2b
	Calmoduline	CL1/CL2a[80]
Complexe d'espèces Fusarium spp	Factor d'élongation (TEF1-α)	EF1 / EF2[81]
	RNA polymerase II (RPB2)	5F2/ 7CR[82]
Scedosporium spp.	β-tubuline	TUB-F/ TUB-R[83]

[77] Jacobsen MD, et al (**2007**) Strain Typing and Determination of Population Structure of *Candida krusei* by Multilocus Sequence Typing. *J Clin Microbiol* 45:317

[78] Hagen F, et al (**2012**) Autochthonous and dormant *Cryptococcus gattii* infections in Europe. *Emerging Infect Dis* 10:1618

[79] Glass NL et al (**1995**) Development of primer sets designed for use with the PCR to amplified conserved genes from filamentous ascomycetes. *Appl Environ Microbiol.*61:1323–1330..

[80] O'Donnell K et al (**2000**) A multigene phylogeny of the *Gibberella fujikuroi* species complex: detection of additional phylogenetically distinct species. *Mycoscience* 41, 61–78

[81] 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.

[82] 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.

[83] Cruse M, et al (**2002**) Cryptic species in *Stachybotrys chartarum*. *Mycologia* 94:814-22.

Espèce	Gène	Amorces
Phaeoacremonium spp	β-tubuline	T1 /Bt2b[84]
Sporothrix spp.	Calmoduline	CL1/CL2a
Trichoderma spp.	Factor d'élongation (TEF1-α)	EF1 / EF2
Coelomycètes	β-tubuline	TUB2-F / TUB4-R[85]
Trichosporon spp.	IGS1 / ADNr	26SF/5SR[63]
Debaryomyces spp.	actine	CA21/CA15R[64]
Clavispora lusitaniae	actine	CA16mod/CA5[86]
Arthrographis spp.	actine	Act1/Act4R
Complexe *M. guilliermondii*	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 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 histoplasmose chez les patients VIH positif *vs.* 14% chez les sujets séronégatifs pour le VIH par exemple). C'est donc beaucoup plus le contexte épidémiologique et clinique ainsi que les examens mycologiques (examen direct, histologie, culture et détection du galactomannane) qui ont permis 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 ou **d'une fiche de demande d'expertise** au site SLS du CNRMA :

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

[84] 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.
[85] Aveskamp MM, et al (2009) DNA phylogeny reveals polyphyly of *Phoma* section *Peyronellaea* and multiple taxonomic novelties. *Mycologia* 101:363-82.
[86] Guzman et al (**2013**) Phylogenetic analysis of the angiosperm-floricolous insect–yeast ssociation: Have yeast and angiosperm lineages co-diversified? *Molecular Phylogenetics and Evolution* 68:161–175

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

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

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 marneffei*) 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*