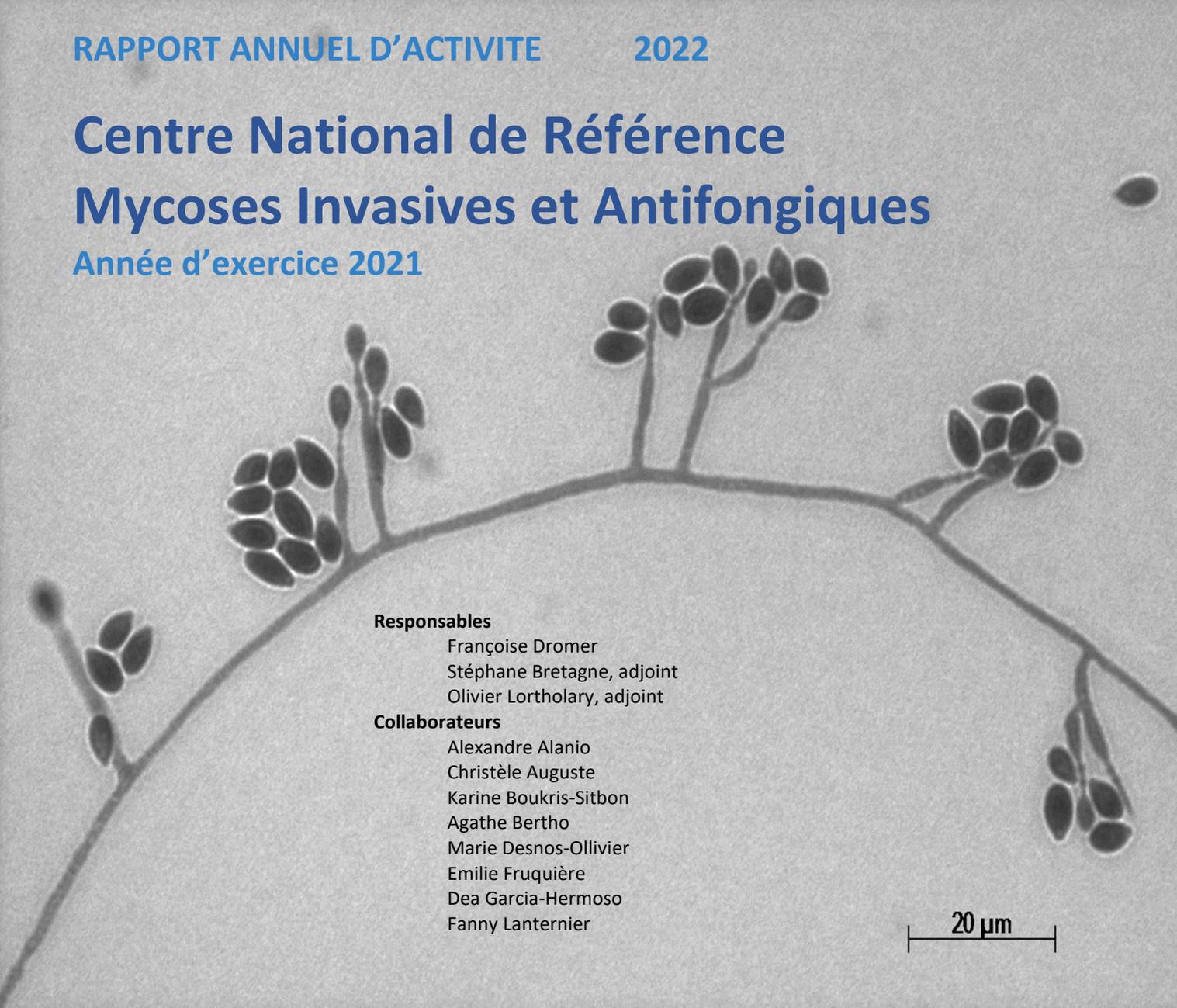


RAPPORT ANNUEL D'ACTIVITE

2022

# Centre National de Référence Mycoses Invasives et Antifongiques

Année d'exercice 2021



**Responsables**

Françoise Dromer  
Stéphane Bretagne, adjoint  
Olivier Lortholary, adjoint

**Collaborateurs**

Alexandre Alanio  
Christèle Auguste  
Karine Boukris-Sitbon  
Agathe Bertho  
Marie Desnos-Ollivier  
Emilie Fruquière  
Dea Garcia-Hermoso  
Fanny Lanternier

20  $\mu$ m

# TABLE DES MATIERES

<b>1. Présentation synthétique.....</b>	<b>7</b>
<b>2. Capacités techniques du CNRMA-IFI.....</b>	<b>9</b>
Liste des techniques disponibles.....	9
Bases de données – collections .....	12
<b>3. BILAN DES ACTIVITES SCIENTIFIQUES ET TECHNIQUES.....</b>	<b>16</b>
<b>3.1. Activité d'expertise mycologique du CNRMA au cours du mandat 2017-2021.....</b>	<b>16</b>
<b>3.1.1. Origine des prélèvements et des souches .....</b>	<b>16</b>
<b>3.1.2. Bilan de l'expertise sur les identifications .....</b>	<b>17</b>
<b>3.1.3. Veille scientifique sur la phylogénie / taxonomie des champignons / nomenclature .....</b>	<b>18</b>
<b>3.1.4. Bilan de l'identification des levures.....</b>	<b>19</b>
<b>3.1.5. Bilan de l'expertise sur les champignons filamenteux.....</b>	<b>23</b>
<b>3.1.6. Bilan de l'expertise sur les champignons dimorphiques et/ou pathogènes de classe 3 .....</b>	<b>28</b>
<b>3.1.7. Bilan de l'étude de la sensibilité aux antifongiques des souches.....</b>	<b>29</b>
Levures .....	30
Filamenteux .....	32
<b>3.1.8. Bilan du diagnostic moléculaire .....</b>	<b>37</b>
Diagnostic sur tissu fixé .....	38
Diagnostic sur prélèvements sanguins, urinaires ou respiratoires .....	38
<b>3.1.9. Phylogénie - Taxonomie - Identification des champignons.....</b>	<b>39</b>
ISHAM ITS database.....	39
Étude européenne sur la diversité de coelomycètes responsables des infections chez l'homme...	39
Implication du pathogène kératinophile <i>Nannizziopsis obscura</i> dans des infections invasives chez des patients originaires d'Afrique de l'Ouest.....	40
Surveillance prospective des fusarioses invasives en France.....	41
<b>3.1.10. Amélioration des techniques de diagnostic .....</b>	<b>41</b>
Mucormycose .....	41
Aspergillose .....	42
Pneumocystose.....	42
<b>3.1.11. Evaluation et développement d'outils de diagnostic.....</b>	<b>43</b>
Intérêt du beta-D-glucane dans le diagnostic des IFI.....	43
Biomarqueurs pour le diagnostic d'aspergillose invasive.....	44
Diagnostic moléculaire des mucormycoses.....	45
Diagnostic moléculaire des histoplasmoses .....	45
<b>3.1.12. Études concernant la pneumocystose .....</b>	<b>45</b>
Diagnostic de la pneumocystose .....	47
<b>3.1.13. Travaux sur l'aspergillose invasive .....</b>	<b>48</b>
<b>3.1.14. Études concernant les candidoses et autres fongémies à levures.....</b>	<b>50</b>
Fongémies dues aux espèces fréquentes de <i>Candida</i> spp. ....	50
Fongémies dues aux levures rares .....	50
Traitement des candidémies sévères.....	51
Traitement des péritonites à <i>Candida</i> spp. ....	51
Candidoses du système nerveux central .....	52
Etude sur les endocardites à <i>Candida</i> spp. sur prothèse valvulaire (ESCAPE, 2001-2015).....	52

Travaux sur <i>Candida auris</i> .....	53
<b>3.1.15. Travaux sur la cryptococcose.....</b>	<b>53</b>
Etude PreCASA .....	53
Etude ACTA .....	54
<b>3.1.16. Travaux sur les mycoses rares .....</b>	<b>55</b>
<i>Scedosporium et Lomentospora</i> .....	56
Etude sur les dermatophytes sévères des patients transplantés d'organe .....	56
Infections fongiques invasives et COVID-19 .....	56
Investigation d'une épidémie d'infections invasives à <i>Mucor circinelloides</i> f. <i>circinelloides</i> .....	57
<b>3.2 Conseils aux professionnels et aux autorités de santé.....</b>	<b>58</b>
<b>3.2.1. Conseils thérapeutiques aux professionnels de santé .....</b>	<b>58</b>
<b>3.2.2. Conseils aux autorités de santé .....</b>	<b>59</b>
<b>3.2.3. Optimisation diagnostique des infections fongiques invasives .....</b>	<b>60</b>
Pneumocystoses .....	60
Aspergilloses.....	61
<b>3.2.4. Optimisation thérapeutique des infections fongiques invasives .....</b>	<b>62</b>
Bilan d'activité et recherche .....	62
<b>3.2.5. Recommandations du CNRMA .....</b>	<b>64</b>
Cibles pertinentes pour l'identification moléculaire des espèces rares .....	64
Détermination de la sensibilité aux antifongiques des isolats de champignons pathogènes .....	65
<b>3.3. Activité de surveillance .....</b>	<b>66</b>
<b>3.3.1. Missions et organisation.....</b>	<b>66</b>
<b>3.3.2. Surveillance de l'évolution des infections et de leurs caractéristiques..</b>	<b>68</b>
Réseaux de partenaires .....	68
L'Observatoire Des Levures (ODL) .....	70
Surveillance de la cryptococcose.....	74
Analyse des infections fongiques invasives à travers RESSIF .....	77
Aspergilloses invasives .....	80
Pneumocystoses .....	82
Mucormycose.....	84
Fusarioses .....	86
Cryptococcoses .....	87
Mycoses exotiques.....	87
Phaeohyphomycoses.....	88
Scédosporioses .....	88
Autres infections fongiques invasives .....	89
Surveillance de la résistance aux antifongiques .....	90
Définitions utilisées pour exprimer la résistance .....	90
Résistance aux échinocandines .....	91
Résistance aux azolés des levures .....	93
Résistance aux azolés des filamenteux.....	95
<b>3.4. Contribution à l'alerte .....</b>	<b>96</b>
<b>3.4.1. <i>Candida auris</i>.....</b>	<b>96</b>
<b>3.4.2. <i>Saprochaete clavata</i> .....</b>	<b>97</b>
<b>3.4.3. <i>Magnusiomyces capitatus</i> .....</b>	<b>98</b>
<b>3.4.4. <i>Histoplasma capsulatum</i> .....</b>	<b>100</b>
<b>3.4.5. <i>Aspergillus fumigatus</i> .....</b>	<b>100</b>

<b>3.4.6. <i>Pneumocystis jirovecii</i></b> .....	<b>100</b>
<b>3.4.7. <i>Trichosporon inkin</i></b> .....	<b>100</b>
<b>4. Management de la Qualité - CNRMA-IFI</b> .....	<b>101</b>
<b>Accréditation ISO 15189</b> .....	<b>101</b>
<b>Garantie de la qualité des résultats</b> .....	<b>101</b>
<b>Liste des examens du CNR</b> .....	<b>101</b>
<b>Gestion de la confidentialité</b> .....	<b>102</b>

## LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Portail de la base de données de séquences Institut Pasteur FungiBank.....	14
Figure 2: Évolution de l'activité d'expertise mycologique depuis 2017.....	17
Figure 3: Arbre phylogénique des souches du genre <i>Diutina</i> .....	21
Figure 4: Répartition des genres identifiés selon l'Ordre correspondant (période 2017-2021).....	24
Figure 5: Distribution des différentes espèces d' <i>Aspergillus</i> par « Sections ».....	25
Figure 6 : Aspect microscopique d' <i>Aspergillus brunneoviolaceus</i> (section <i>Nigri</i> ) avec conidiophore lisse et vesicule globose (A) et croissance sur milieu malt 2% (MEA) après 7 jours d'incubation (B). Têtes aspergillaires d' <i>A. welwitschiae</i> (section <i>Nigri</i> ) (C). .....	26
Figure 7: Caractéristiques morphologiques d' <i>Histoplasma</i> spp (ordre <i>Onygenales</i> ). et <i>Talaromyces purpurogenum</i> (ordre <i>Eurotiales</i> ). Macroconidie tuberculée typique d' <i>Histoplasma</i> spp. (A) et aspect macroscopique sur tube de Sabouraud agar (B). Pigment rouge diffusible produit par <i>Talaromyces purpurogenum</i> (C) et conidiogénèse phialidique avec des conidies ovales en chaîne chez <i>Paecilomyces maximus</i> (ordre <i>Eurotiales</i> )(D).....	26
Figure 8: Aspect morphologique de quelques levures noires et apparentés (ordre <i>Chaetothyriales</i> ). Conidiophores et conidies de <i>Fonsecaea nubica</i> (culture sur lame) (A) ; conidies solitaires fixées sur des filaments (B) et forme levures (C) chez <i>Exophiala</i> sp.....	27
Figure 9: Aspect macroscopique des champignons ascomycètes (ordre <i>Sordariales</i> ) <i>Triadelphia pulvinata</i> (A) et <i>Thermothelomyces thermophilus</i> (C) ; (B) Ascospores mélanisées de <i>Chaetomium globosum</i> .....	27
Figure 10: Aspect microscopique (conidiophores et conidies) des souches de l'ordre de <i>Microascales</i> .....	28
Figure 11: Morphologies caractéristiques des conidiophores et conidies à partir d'une culture sur lame (malt 2%) de <i>Lomentospora prolificans</i> (A) et <i>Pleurostomophora ochracea</i> (C). Dictyospore de <i>Curvularia aeria</i> (ordre <i>Pleosporales</i> ) (B) .....	28
Figure 12: Répartition des champignons dimorphiques de classe 3 identifiés au CNRMA pendant la période 2017-2021.....	29
Figure 13: Schéma du gène <i>Cyp51A</i> d' <i>A. fumigatus</i> et principales mutations.....	37
Figure 14: Répartition des déclarations à travers le portail RESSIF.....	70
Figure 15: Modification des espèces impliquées selon que l'épisode de fongémie était incident ou récurrent .....	73
Figure 16: Influence de la pré-exposition aux antifongiques sur les espèces responsables de la fongémie.....	73
Figure 17: Prescription initiale après le diagnostic de fongémie à levures et mortalité globale associée à 30j .....	74
Figure 18 : Évolution des cas de cryptococcoses notifiés au CNRMA depuis 1985 (A) et des principaux facteurs prédisposant à la cryptococcosse (B) (MAJ 18/4/2022) .....	75
Figure 19 : Répartition des sérotypes de <i>C. neoformans</i> selon les facteurs prédisposants à la cryptococcosse.....	77
Figure 20 : Répartition des 15 846 IFI déclarées dans le cadre de RESSIF (2012-2021).....	78
Figure 21 : Évolution des données démographiques par classe d'âge .....	79
Figure 22 : Répartition des déclarations des 6 principales IFI dans les centres ayant déclaré plus de 350 cas en 10 ans .....	79
Figure 23 : Répartition des facteurs de risque selon les espèces d' <i>Aspergillus</i> impliquées.....	82
Figure 24 : Principales localisations, facteurs de risque et espèces isolées au cours des mucormycoses .....	85
Figure 25 : Survie selon l'espèce identifiée au cours des mucormycoses .....	86
Figure 26 : Répartition des 5 principales espèces de <i>Fusarium</i> en fonction du tableau clinique .....	87
Figure 27 : Répartition des espèces de <i>Scedosporium</i> / <i>Lomentospora</i> en fonction du contexte .....	89
Figure 28 : ML tree construit en excluant les 7 isolats de <i>M. capitatus</i> divergents du cluster principal .....	99

## LISTE DES TABLEAUX

<i>Tableau 1: Liste des couples d'amorces utilisés en fonction des genres étudiés</i> .....	10
<i>Tableau 2: Résumé de l'activité d'expertise entre 2017 et 2021</i> .....	18
<i>Tableau 3: Tableau des dénominations taxonomiques pour les levures</i> .....	20
<i>Tableau 4: Tableau des dénominations taxonomiques pour les champignons filamenteux</i> .....	23
<i>Tableau 5: Profil de sensibilité des levures aux antifongiques (mise à jour le 30/04/2022)</i> .....	31
<i>Tableau 6: Profil de sensibilité des levures à 4 azolés, dont l'isavuconazole</i> .....	32
<i>Tableau 7: Profil de sensibilité des champignons filamenteux aux antifongiques</i> .....	33
<i>Tableau 8 : Profil de sensibilité des filamenteux à 4 azolés, dont l'isavuconazole</i> .....	36
<i>Tableau 9: Mutations dans le gène Cyp51A d'Aspergillus fumigatus</i> .....	37
<i>Tableau 10 : Liste des couples d'amorces utilisés en fonction des genres étudiés</i> .....	65
<i>Tableau 11 : Bases de données du CNRMA (bilan au 20/4/2022)</i> .....	68
<i>Tableau 12 : Caractéristiques des 6091 patients et des 6389 épisodes de fongémies à levures (ODL 2002-2021)</i> .....	72
<i>Tableau 13: Caractéristiques des cryptococcoses diagnostiquées en France depuis 1985</i> .....	76
<i>Tableau 14 : Diagnostic des aspergilloses invasives dans les différentes populations (RESSIF 2012-2021)</i> .....	81
<i>Tableau 15 : Caractéristiques des pneumocystoses diagnostiquées dans RESSIF (2012-2021)</i> .....	83
<i>Tableau 16 : Caractéristiques des 462 épisodes de mucormycose</i> .....	84
<i>Tableau 17 : Caractéristiques des 338 fusarioses répertoriées dans RESSIF (2012-2021)</i> .....	86
<i>Tableau 18 : Seuils cliniques EUCAST pour Candida and Cryptococcus spp.</i> .....	90
<i>Tableau 19 : Seuils cliniques EUCAST pour Aspergillus spp.</i> .....	91
<i>Tableau 20 : Mutations FKS pour des isolats de Candida spp (CNRMA, 2003-2021)</i> .....	92
<i>Tableau 21 : Proportion d'isolats de levures "résistants" selon les seuils EUCAST</i> .....	95

## 1. Présentation synthétique

La mycologie médicale a considérablement évolué. L'éventail des patients développant des infections fongiques invasives (IFI) s'est élargi, la diversité des micro-organismes fongiques est plus grande, les méthodes de diagnostic, d'identification et les expertises mycologiques dans les centres hospitaliers ont évolué. L'importance des IFI est également mieux perçue par les instances de tutelle, comme en témoignent les multiples interactions entre le CNR Mycoses Invasives et des Antifongiques (CNRMA) et Santé Publique France (SPF) ainsi que par les autorités internationales (liste établie par l'OMS des agents fongiques prioritaires) et les équipes prenant en charge des patients à risque. Les antifongiques systémiques représentent toujours un poste de dépense majeur d'anti-infectieux à l'hôpital. Ces éléments justifient la surveillance des mycoses invasives et de la résistance aux antifongiques.

Les missions du CNRMA représentent un nouveau défi. L'équipe sera composée de quatre responsables Adjointes Alexandre Alanio, Dea Garcia-Hermoso, Marie Desnos-Ollivier, Olivier Lortholary, et moi-même, responsable du CNRMA (**Erreur ! Source du renvoi introuvable.**), ayant des compétences dans les domaines des techniques de diagnostic mycologique, d'identification et de génotypage moléculaire des champignons, des tests de sensibilité et de l'expertise clinique et du maniement des antifongiques. Nous renforcerons ces compétences en accueillant trois collaborateurs mycologues hospitalo-universitaires, Eric Dannaoui, Laurence Millon, Florent Morio, investis dans différentes sociétés savantes du domaine pour travailler les aspects associés aux infections fongiques invasives, permettant de diversifier les expertises et dynamiser les liens précieux requis entre les centres et le CNRMA. Aux vues des missions demandées au CNRMA, il nous apparaît naturel d'intégrer deux laboratoires associés au projet, le laboratoire associé des Aspergilloses Chroniques (LA-AspC) et le laboratoire associé Identification Numérique, Surveillance épidémiologique, Alerte (LA-INuSuAl), tous deux articulés étroitement avec les missions du CNRMA centrées sur les infections invasives (CNRMA-IFI). Le CNRMA-IFI se dotera d'un comité scientifique intégrant entre autres, vétérinaire, agronome, hygiéniste et pharmacologue, afin d'avoir une vision large et assurer les missions de surveillance et d'alerte des mycoses invasives avec une approche OneHealth.

Les missions d'**expertises** perdureront tout en évoluant avec la mise au point de nouvelles méthodes diagnostiques ou de génotypage et l'utilisation plus fréquente du séquençage à haut débit (NGS) pour des indications spécifiques.

Les missions de **surveillance** épidémiologique par le CNRMA ont une place importante avec la volonté d'établir (i) un réseau collaboratif élargi, appelé Surveillance des INfections FONgiques Invasives (SINFONI), intégrant de nouveaux centres répartis sur le territoire incluant principalement des CHU et des CH de France métropolitaine et d'Outre-mer, et (ii) la construction de base de données épidémiologiques longitudinales permettant de suivre les caractéristiques des patients atteints de mycoses invasives ainsi que des souches qui y sont associées, constituant un réseau de surveillance national unique au monde. Cette surveillance longitudinale sera incrémentée de projets de surveillances spécifiques limités dans le temps

permettant l'analyse de données plus spécifiques et approfondies sur un type d'infection, de patient ou de pathogène fongique.

Le futur CNRMA fera face à plusieurs défis majeurs dans le périmètre des missions demandées par SPF incluant l'émergence de nouvelles espèces naturellement résistantes aux antifongiques (ATFs), d'espèces devenant résistantes après exposition aux ATFs et l'émergence de nouveaux terrains à risque d'infections fongiques. La surveillance des terrains favorisant les infections fongiques invasives est un élément essentiel en égard aux facteurs favorisant émergeant en particulier les âges extrêmes, biothérapies, infections virales et ainsi permettre une meilleure vision de ces infections. Par ailleurs, l'émergence d'espèces de *Candida* résistants aux azolés comme *Candida parapsilosis* et *Candida tropicalis* et parfois multi-résistants comme *Candida auris* et *Candida haemulonii* souligne l'importance de la surveillance de l'apparition de nouvelles espèces et de leur sensibilité aux ATFs. De même, l'émergence de la résistance des *Aspergillus* dans de nombreux pays survenant après exposition environnementale et/ou exposition prolongée aux ATFs, est un point d'attention particulier pour le CNRMA-IFI (aspergillose invasive) et pour le LA-AspC (aspergilloses chroniques). Le LA-AspC est proposé par les services de Parasitologie-Mycologie des CHU de Bordeaux et de Rennes, adossés à l'équipe 2 de l'U1045 (Inserm Bordeaux) et l'équipe 2 de l'Irset (UMR S\_1085 Inserm) à Rennes. Il aura pour vocation de répondre à la problématique des aspergilloses chroniques (APC), en développant (i) une expertise de surveillance épidémiologique, une réponse en cas d'alerte et de conseils, (ii) une expertise d'identification des *Aspergillus* avec un suivi longitudinal de la résistance aspergillaire aux ATFs, (iii) une expertise en sérologie aspergillaire et (iv) en biologie moléculaire incluant les approches de NGS. Cette approche complète des APC bénéficiera du réseau des 38 CHU partenaires (métropole et outre-mer) et disposant chacun d'un maillage territorial avec les CH régionaux.

L'identification des **phénomènes inhabituels** se fera par une analyse régulière des données épidémiologiques, des espèces et des CMI du réseau SINFONI (CNRMA-IFI) ainsi que par l'analyse numérique en temps réel des données du réseau MSI (LA-INuSuAl). Le LA-INuSuAl est proposé par le service de Parasitologie-Mycologie du CHU de La Pitié-Salpêtrière (AP-HP, Sorbonne Université), adossé à l'Institut Pierre Louis d'Epidémiologie et de Santé Publique (iPLESP, UMR\_S 1136 INSERM/UPMC), et au centre de recherche SCAI - *Sorbonne Center for Artificial Intelligence* (Sorbonne Université). Le LA-INuSuAl s'intègre dans le contexte de (i) l'augmentation de la couverture géographique pour la surveillance, (ii) l'expertise en épidémiologie et (iii) le développement d'outils numériques pour l'identification et la surveillance des pathogènes fongiques. Il sera chargé de la surveillance épidémiologique des agents fongiques par des outils numériques (spectrométrie de masse, intelligence artificielle) et participera à la réponse en cas d'alerte. Ce dispositif original de surveillance est rendu possible par l'existence d'une application en ligne d'identification des agents fongiques par spectrométrie de masse MSI-2 (*mass spectrometry identification*) utilisée par environ 230 laboratoires dans le monde dont 70 laboratoires en France (métropole et Outre-Mer).

## 2. Capacités techniques du CNRMA-IFI

### Liste des techniques disponibles

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

- ✓ 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., pour les champignons filamenteux sur Sabouraud chloramphénicol)
- ✓ Identification phénotypique complète des levures et des champignons filamenteux avec profils protéiques par spectrométrie de masse (MALDI-ToF Bruker Biotyper), 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 la technique standardisée par le comité européen (EUCAST) (<https://eucast.org/astoffungi/>). Les antifongiques testés sont la 5-fluorocytosine (Ancotil®), le fluconazole (Triflucan®), l'itraconazole (Sporanox®), le voriconazole (V-fend®), le posaconazole (Noxafil®), l'isavuconazole (Cresemba®) et la terbinafine (Lamisil®). Pour la caspofungine (Cancidas®), la micafungine (Mycamine®) et l'amphotéricine B (Fungizone®), une version modifiée de la technique est utilisée.
- ✓ Identification des isolats d'espèces communes de champignons (*Candida albicans*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*, *C. krusei*, *C. kefyr*) par MALDI-ToF (Biotyper Bruker)
- ✓ Extraction d'ADN pour les levures et les champignons filamenteux selon des protocoles optimisés par technique semi-automatique (extracteur KingFisher).
- ✓ Amplification par PCR point final et séquençage nucléotidique par technique Sanger, 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 plusieurs groupes fongiques le séquençage d'autres loci (Tableau 1).

Tableau 1: Liste des couples d'amorces utilisés en fonction des genres étudiés (en plus des régions ITS)

Espèce	Gène	Amorces
<i>Aspergillus</i> section <i>Fumigati</i>	$\beta$ -tubuline	Bt2a/ Bt2b <sup>1</sup>
<i>Aspergillus</i> spp	Calmoduline	CL1/CL2a <sup>2</sup>
Complexe d'espèces <i>Fusarium</i> spp	Factor d'élongation (TEF1- $\alpha$ )	EF1 / EF2 <sup>3</sup>
	RNA polymérase II (RPB2)	5F2/ 7CR <sup>4</sup>
<i>Scedosporium</i> spp.	$\beta$ -tubuline	TUB-F/ TUB-R <sup>5</sup>
<i>Phaeoacremonium</i> spp	$\beta$ -tubuline	T1 /Bt2b <sup>6</sup>
<i>Sporothrix</i> spp.	Calmoduline	CL1/CL2a
<i>Trichoderma</i> spp.	Factor d'élongation (TEF1- $\alpha$ )	EF1 / EF2
Coelomycètes	$\beta$ -tubuline	TUB2-F / TUB4-R <sup>7</sup>
<i>Trichosporon</i> spp.	IGS1 / ADNr	26SF/5SR <sup>Erreur ! Signet non défini.</sup>
<i>Debaryomyces</i> spp.	actine	CA21/CA15R <sup>Erreur ! Signet non défini.</sup>
<i>Clavospora lusitaniae</i>	actine	CA16mod/CA5 <sup>8</sup>
<i>Arthrographis</i> spp.	actine	Act1/Act4R <sup>9</sup>
Complexe <i>M. guilliermondii</i>	RPBI <sup>10</sup>	

- ✓ Identification de *Candida dubliniensis* par PCR duplex en utilisant les amorces spécifiques d'une partie du gène de l'actine<sup>11</sup> et les amorces universelles ITS1/ITS4 pour tout isolat envoyé comme *C. albicans* (technique accréditée COFRAC depuis 2015 selon la norme 15189).
- ✓ PCR en temps réel permettant l'identification en urgence de *Candida auris* et *S. clavata* (SybrGreen, LC480)
- ✓ 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*
- ✓ Génotypage par séquençage génome entier pour les souches de *C. auris*

<sup>1</sup> 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..

<sup>2</sup> 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

<sup>3</sup> O'Donnell K. et al (2007) Phylogenetic diversity and microsphere array-based genotyping of human pathogenic *Fusaria*, including isolates from the multistate contact lens-associated U.S. keratitis outbreaks of 2005 and 2006. *J Clin Microbiol* 45:2235-48.

<sup>4</sup> O'Donnell K, Cigelnik E (1997) Two divergent intragenomic rDNA ITS2 types within a monophyletic lineage of the fungus *Fusarium* are nonorthologous. *Mol Phylogenet Evol* 7:103-16.

<sup>5</sup> Cruse M, et al (2002) Cryptic species in *Stachybotrys chartarum*. *Mycologia* 94:814-22.

<sup>6</sup> Mostert L, et al (2005) Species of *Phaeoacremonium* associated with infections in humans and environmental reservoirs in infected woody plants. *J Clin Microbiol* 43:1752-67.

<sup>7</sup> Aveskamp MM, et al (2009) DNA phylogeny reveals polyphyly of *Phoma* section *Peyronellaea* and multiple taxonomic novelties. *Mycologia* 101:363-82.

<sup>8</sup> Guzman et al (2013) Phylogenetic analysis of the angiosperm-floricolous insect–yeast association: Have yeast and angiosperm lineages co-diversified? *Molecular Phylogenetics and Evolution* 68:161–175.

<sup>9</sup> K Voigt, J Wöstemeyer. Reliable amplification of actin genes facilitates deep-level phylogeny. *Microbiol Res* 2000 Sep;155(3):179-95. doi: 10.1016/S0944-5013(00)80031-2.

<sup>10</sup> Desnos-Ollivier et al., JCM, 2008 (46). *Debaryomyces hansenii* (*Candida famata*), a rare human fungal pathogen often misidentified as *Pichia guilliermondii* (*Candida guilliermondii*).

J Clin Microbiol. 2008 Oct;46(10):3237-42. doi: 10.1128/JCM.01451-08.

<sup>11</sup> Donnelly SM et al. Phylogenetic analysis and rapid identification of *Candida dubliniensis* based on analysis of ACT1 intron and exon sequences. *Microbiology*. 1999; 45:1871-1882.

- ✓ Détection des mutations dans le gène *cyp51A* et *cyp51B* pour les isolats d'*Aspergillus fumigatus* résistants aux antifongiques azolés<sup>12</sup>
- ✓ Détection des mutations dans les gènes *fks* pour les isolats d'*Aspergillus fumigatus*, *Candida albicans*, *C. glabrata*, *C. tropicalis*, *C. krusei*, *C. lusitaniae*, *C. dubliniensis*, *C. kefyr* ayant des profils de sensibilité anormaux pour les échinocandines.
- ✓ PCR diagnostique histoplasmosse, coccidioidomycose, mucormycose (site hôpital Saint-Louis)
- ✓ Diagnostic moléculaire sur tissus/échantillons frais, congelés ou fixés (site hôpital Saint-Louis)

### Techniques de typage

Typage moléculaire par analyse du polymorphisme de séquences microsatellites (*Candida albicans*, *Candida glabrata*, *Candida auris*, *Candida parapsilosis*<sup>13,14</sup>, *Aspergillus fumigatus*<sup>15</sup>, *P. jirovecii*<sup>16</sup>), ou par Multilocus Sequence Typing (MLST) (*C. tropicalis*, *Cryptococcus neoformans*<sup>17,18</sup>), ou par séquençage multilocus (*Y. lipoytica*) ou par séquençage génome entier (*S. clavata*, *C. auris*, *T. asahii*).

- ✓ Pour *C. albicans*, les loci des microsatellites CDC3, HIS3, EF3, STPK, CDR1, et les 7 locus MLST (AAT1a, ACC1, ADP1, MPIb, SYA1, VPS13, ZWF1).<sup>19</sup>
- ✓ Pour *C. glabrata*, les loci des microsatellites RPM2, MTI, ERG, Cg4, Cg6
- ✓ Pour *A. fumigatus*, 4 séquences microsatellites A, B, C et D et les 9 marqueurs STRA<sup>f</sup><sup>20</sup>
- ✓ Pour *C. tropicalis*, 6 loci MLST (MDR1, XYR1, SAPT4, SAPT2, ZWF1, ICL1)<sup>35</sup>
- ✓ Pour *C. parapsilosis*, 3 séquences microsatellites (CP1, CP4, CP6)<sup>21</sup>
- ✓ Pour *Candida auris*, 12 marqueurs microsatellites (M2a, M1b, M2c, M3-Ia, M3-Ib, M3-Ic, M3-Iia, M3-IIb, M3-IIc, M9a, M9b, M9c)<sup>22</sup>
- ✓ Pour *Pichia kudriavzevii* (syn. *Candida krusei*), 6 loci MLST (LYS2, HIS3, ADE2, LEU2, NMT, TRP1)<sup>23</sup>

<sup>12</sup> Mellado E, et al. Identification of two different 14-alpha sterol demethylase-related genes (*cyp51A* and *cyp51B*) in *Aspergillus fumigatus* and other *Aspergillus* species (2001) J Clin Microbiol 39:2431 (erratum p4225)

<sup>13</sup> Foulet F et al. Microsatellite markers as a typing system for *Candida glabrata*. J. Clin. Microbiol. 2005; 43:4574-9.

<sup>14</sup> Stephan F et al. Molecular diversity and routes of colonization of *Candida albicans* in a surgical intensive care unit, as studied using microsatellite markers. Clin Infect Dis. 2002; 35:1477-83.

<sup>15</sup> Bart-Delabesse E et al. Microsatellite markers for typing *Aspergillus fumigatus* isolates. J Clin Microbiol 1998; 36:2413-8.

<sup>16</sup> Gits-Muselli et al. New Short Tandem Repeat-Based Molecular Typing Method for Pneumocystis jirovecii Reveals Intrahospital Transmission between Patients from Different Wards. Plos One 2015. 10:e0125763.

<sup>17</sup> Tavanti A et al. Multilocus sequence typing for differentiation of strains of *Candida tropicalis*. J Clin Microbiol. 2005; 43: 5593-600.

<sup>18</sup> Meyer W et al. Consensus multi-locus sequence typing scheme for *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii*. Med Mycol ; 2009; 47:561-70

<sup>19</sup> Bougnoux M E et al. Collaborative consensus for optimized multilocus sequence typing of *Candida albicans*. J. Clin. Microbiol. 2003 ; 41:5265–5266

<sup>20</sup> de Valk HA, Meis JF, Curfs IM, Muehlethaler K, Mouton JW, Klaassen CH. Use of a novel panel of nine short tandem repeats for exact and high-resolution fingerprinting of *Aspergillus fumigatus* isolates. J Clin Microbiol. 2005;43(8):4112-4120. doi:10.1128/JCM.43.8.4112-4120.2005

<sup>21</sup> Sabino R et al. New polymorphic microsatellite markers able to distinguish among *Candida parapsilosis* sensu stricto isolates. J Clin Microbiol 2010; 48: 1677-1682.

<sup>22</sup> Theun de Groot, Ynze Puts, Indira Berrio, Anuradha Chowdhary, Jacques F. Meis. Development of *Candida auris* microsatellite typing and its application on a global collection of isolates. 2019 mBio doi: [10.1128/mbio.02971-19](https://doi.org/10.1128/mbio.02971-19)

<sup>23</sup> Jacobsen et al. Strain Typing and Determination of Population Structure of *Candida krusei* by Multilocus Sequence Typing J. Clin Microbiol 2007 ;45 :317-23

- ✓ Pour *C. neoformans* et *C. gattii* complex, 7 loci MLST (CAP59, URA5, LAC1, IGS1, GPD1, PLB1 et SOD1)<sup>24</sup>
- ✓ Pour *Yarrowia lipolytica*, 5 régions non-codantes décrites pour l'étude des cas groupés<sup>25</sup>
- ✓ Pour *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. tropicalis*, *C. krusei*, *C. lusitaniae*, *C. dubliniensis*, *C. auris* et *C. kefyr*, séquençage d'une partie des gènes codant pour la 1,3 bêta-glucane synthase dans les cas de résistance phénotypique à la caspofungine.
- ✓ Pour *S. clavata*, PCR en temps réel pour identification du clone A épidémique de 2012 et du clone B sporadique en France
- ✓ Pour *S. clavata*, *C. auris*, *T. asahii* séquençage génome entier et comparaison des SNPs avec les souches précédemment analysées au CNRMA (séquençage effectué par la plateforme P2M de l'Institut Pasteur, sur séquenceur Illumina) en collaboration avec les bioinformaticiens du Hub Bioinformatique de l'Institut Pasteur.

## Bases de données – collections

### Collections de matériel biologique

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

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

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

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

<sup>24</sup>W Meyer, D. M. Aanensen, T. Boekhout, M. Cogliati, M. Diaz, M. E. Esposto, M. Fisher, F. Gilgado, F. Hagen, S. Kaocharoen, A. P. Litvintseva, T. G. Mitchell, S. P. Simwami, L. Trilles, M. A. Viviani, and J. Kwon-Chung. 2009. Consensus multi-locus sequence typing scheme for *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii*. *Med Mycol.* Jun 12:1-14.

<sup>25</sup>Desnos-Ollivier M, Letscher-Bru V, Neuvéglise C, Dromer.F. *Yarrowia lipolytica* causes sporadic cases and local outbreaks of infections and colonisation. *Mycoses* 2020 Jul;63(7):737-745. doi: 10.1111/myc.13095. Epub 2020 May 9.

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.

Tous les isolats adressés au CNRMA sont systématiquement conservés après vérification de la pureté et identification de l'espèce. Toutes les souches sont conservées sur le site de l'Institut Pasteur. Tous les congélateurs et containers d'azote sont contrôlés par des sondes et sous alarme.

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

- près de 6500 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.

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 ou des souches type provenant de diverses collections (CBS, ATCC, IP, NRRL) non distribuables.

## Collection d'ADN génomique

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

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/>) (Figure 1) a été créée en collaboration avec Vincent Robert ([société BioAware](#)) avec le logiciel BioloMICS. 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 1 : 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 *CYP51* pour les souches résistantes et des profils alléliques de certaines souches (*C. albicans*, *C. parapsilosis*, *C. krusei*, *C. tropicalis* et *A. fumigatus*). Les régions séquencées sont choisies en fonction des différents groupes fongiques rencontrés : le séquençage ITS et 26/28S pour la plupart d'espèces ; factor d'élongation- $\alpha$  ou RPB2 pour *Fusarium spp.*,  $\beta$ -tubuline et/ou calmoduline pour *Aspergillus spp.* ou IGS pour *Trichosporon spp.* et *Cryptococcus spp.*, actine pour *Clavispora lusitaniae* et *Debaryomyces spp.*

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 géotypage 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 2671 séquences (18S, 28S,

ITS, calmoduline, actine,  $\beta$ -tubuline, EF1- $\alpha$ , 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.

### **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. A terme, les images les plus caractéristiques seront importées dans IP FungiBank. Ceci nécessitera l'investissement important de l'un des membres de l'équipe, ce qui n'a pas été possible pour l'équipe actuelle pendant le dernier mandat.

## 3. BILAN DES ACTIVITES SCIENTIFIQUES ET TECHNIQUES

### 3.1. Activité d'expertise mycologique du CNRMA au cours du mandat 2017-2021

#### 3.1.1. Origine des prélèvements et des souches

Sur les 5 années du mandat (2017-2021), le CNRMA a reçu sur le site IP/CNRMA 4227 échantillons, hors diagnostics histopathologiques et moléculaires, 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. 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.

Le volume des souches à expertiser est stable autour de 800 souches par an (levures, champignons filamenteux et champignons dimorphiques). Le CNRMA ayant dû fermer son site du 17 mars au 31 mai 2020 en raison de la crise sanitaire de la COVID19, l'activité en 2020 a donc légèrement diminué même si la plupart des échantillons ont été envoyés *a posteriori* par les correspondants. 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. Par ailleurs, les adjoints et collaborateurs infectiologues ont été très impactés dans leur activité par le détournement de toute leur activité vers la prise en charge des patients avec COVID-19, puis la vaccination et la prévention. De plus, la responsable du CNRMA, ainsi que l'assistante et une technicienne ont prêté main forte à temps partiel ou complet au CNR Virus et Infections respiratoires pendant la première et deuxième vague. Le médecin d'étude clinique du CNRMA a de son côté renforcé l'équipe de vaccination du CMIP pendant 4 mois.

La grande majorité (99%) des échantillons / souches provenait de France (93% métropole), mais quelques correspondants étrangers nous envoient leurs souches (10 souches Luxembourg, Italie, Algérie, République Centrafricaine). Au total, sur la période, nous avons eu 166 correspondants (1 à 527 expertises par correspondant).

Plus de la moitié des souches envoyées provient d'hémocultures (51.8%), mais nous recevons aussi des souches isolées de prélèvements pulmonaires (15.7%), cutanés profonds (7.9%), LCS (3.2%), oculaires (4.9%), digestifs (2.5%), ORL (3,6%), ou osseux (2,5%).

### 3.1.2. Bilan de l'expertise sur les identifications

Rappelons ici que nombre d'identifications, y compris d'espèces rares, sont faites par les correspondants du CNRMA. Ceci est particulièrement vrai pour les levures avec l'utilisation en routine du MALDI-TOF. Pour les filamenteux, l'utilisation en routine du MALDI-TOF est plus sujette à caution car les bases de données sont encore incomplètes et le recours au séquençage nucléotidique n'est pas encore systématique dans tous les centres.

Les isolats nous sont donc adressés parfois pour identification, mais plus souvent pour confirmation, détermination de la sensibilité aux antifongiques par une méthode de référence, mise en collection, ou participation à la surveillance. Ils nous parviennent soit en temps réel lorsque les correspondants ont besoin de l'expertise du CNRMA, soit avec un délai qui peut être de plusieurs mois dans les autres cas pour la surveillance.

Depuis 2017, notre activité d'expertise a abouti à la caractérisation de 3945 isolats comprenant 2555 levures, 1333 filamenteux et 57 champignons de classe 3. Tous les isolats sont identifiés selon un processus défini comprenant la vérification de la pureté, l'observation macro et microscopique, la caractérisation phénotypique, la détermination de la sensibilité aux antifongiques et selon les genres ou espèces une identification moléculaire. Le processus selon les espèces est détaillé chapitre . Le bilan de l'activité entre 2017 et 2021 est détaillé dans le Tableau 2 et l'évolution de l'activité par année est représentée dans la Figure 2.

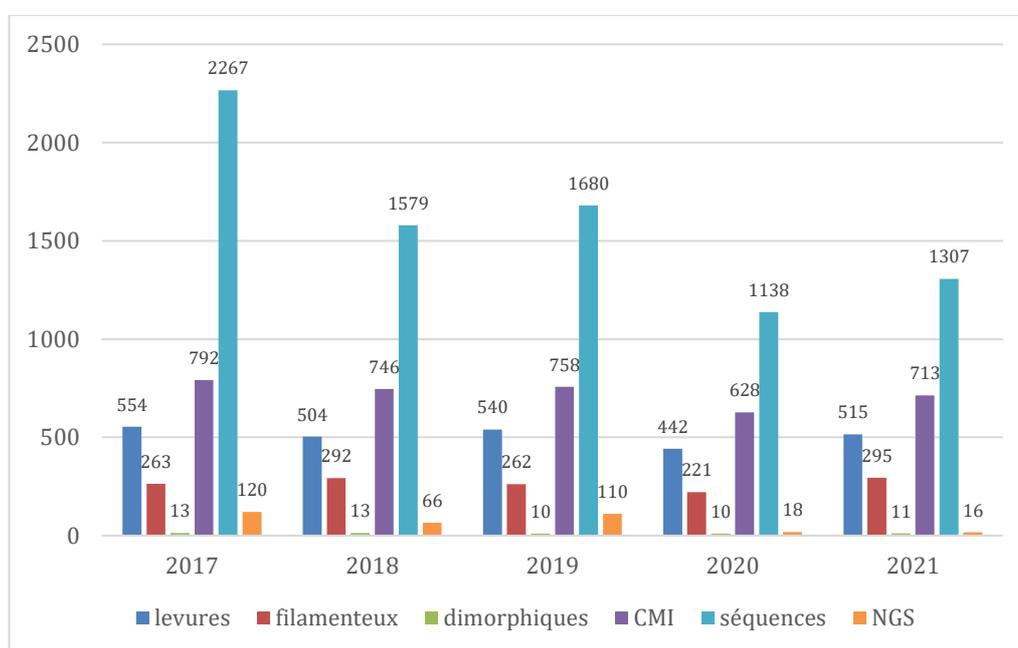


Figure 2: Évolution de l'activité d'expertise mycologique depuis 2017

A noter, en raison de la crise sanitaire le séquençage NGS a fortement été ralenti en 2020 et 2021, d'une part à cause de l'utilisation prioritaire de la plateforme P2M pour les prélèvements respiratoires du CNR virus respiratoires et l'activité réduite des personnes du CNRMA en télétravail et d'autre part.

Au total, 3945 souches ont été caractérisées sur le site IP du CNRMA. Enfin, d'autres échantillons ont été reçus directement à SLS (n=2192).

L'expertise clinique est difficilement chiffrable, mais les deux cliniciens du CNRMA et l'équipe de maladies infectieuses de Necker sont sollicités par mail ou téléphone 3 à 5 fois/jour, soit environ 1000 avis par an. Elle est également une porte d'entrée pour l'envoi d'isolats au CNRMA, pour précision sur une identification ou complément d'antifongogramme.

L'activité d'expertise est résumée dans le tableau suivant (Tableau 2) qui ne prend pas en compte la veille taxonomique impliquant la reprise de certaines souches en complément d'identification.

Tableau 2: Résumé de l'activité d'expertise entre 2017 et 2021

	Nombre de souches concernées		
	Levures	Filamenteux	Classe 3
<b>Nombre de souches expertisées</b>	2555	1333	57
<b>Détermination profil MALDI-Tof</b>	2040		
<b>Détermination de la sensibilité aux antifongiques (EUCAST)</b>	2373	1263	NA
<b>Amplification PCR et Séquençage (Sanger) de plus de 2 régions pour identification</b>	916	1300	57
<b>PCR temps réel pour identification espèce et/ou clade</b>	86		
<b>Sérotypage <i>C.neoformans</i> / <i>C. gattii</i> complex par PCR</b>	332		
<b>Génotypage par MLST</b>	61		
<b>Génotypage par microsatellites</b>	72	36	
<b>Détection mutation liée à la résistance</b>	45	41	
<b>Séquençage génome entier</b>	334		

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.

### 3.1.3. Veille scientifique sur la phylogénie / taxonomie des champignons / nomenclature

Les changements de nomenclature proposés par l'adhésion du nouveau code international de nomenclature (ICN : International Code of Nomenclature for algae, fungi and plants), stipulent l'utilisation d'un nom scientifique unique pour une espèce

fongique donnée. Ceci a donc entraîné l'abandon de la nomenclature « double » (nom anamorphe et téléomorphe) pour les champignons (one fungus=one name).

L'une des difficultés est de concilier l'expertise taxonomique en constante évolution et le service rendu aux cliniciens et microbiologistes hospitaliers pour lesquels ces modifications taxonomiques n'ont que peu de conséquences cliniques. Nous faisons donc une veille scientifique pour rendre des identifications en accord avec les révisions taxonomiques les plus récentes, et reprenons régulièrement les identifications enregistrées pour les isolats de notre collection de façon à utiliser les plus récentes dénominations. Cependant, ces dénominations nouvelles peuvent être perturbantes dans la mesure où elles font perdre les repères antérieurs. C'est la raison pour laquelle un tableau de concordance peut être utile. Pour faciliter la lecture de ce rapport, nous divisons les expertises en « levures », « filamenteux » et « dimorphiques » et proposerons donc un tableau de concordance des termes dans chaque chapitre.

### 3.1.4. Bilan de l'identification des levures

Depuis 2003 nous avons identifié au CNRMA 10524 levures incluant 90 espèces (1 à 2702 isolats/espèce).

Entre 2017 et fin 2021, nous avons identifié 2555 levures correspondant à 68 espèces appartenant à 29 genres différents, majoritairement des levures ascomycètes (Tableau 2). Pour mémoire, ces levures provenaient soit de la surveillance (Observatoire des Levures, RESSIF, RESOMYC), soit de demandes d'expertise sur l'identification (espèce rare à confirmer ou identification impossible dans le laboratoire demandeur), la détermination d'une sensibilité aux antifongiques (échec clinique ou résistance microbiologique à vérifier) ou encore l'investigation d'une épidémie (ex : *Saprochaete clavata*).

Les levures provenaient essentiellement d'hémocultures (77%), mais aussi du système nerveux central (4.9%), des poumons (5.2%), de l'appareil digestif (2.7%), et d'autres localisations plus rares (peau, urines, os et articulation, sphère ORL de 0.8 à 2.3% chacun), de matériel étranger (cathéter veineux central, valve cardiaque, liquide de conservation de greffon), et plus rarement des yeux (0.3%).

Les levures ascomycètes représentaient 83% du total (1820 isolats). Parmi les levures ascomycètes 5 espèces correspondaient à 72% des isolats reçus : *Candida albicans*, *Candida glabrata*, *Candida parapsilosis*, *Candida tropicalis* et *Pichia kudriavzevii* (syn. *Candida krusei*). Cette proportion reflète la distribution des espèces retrouvées dans les hémocultures en France. D'autres espèces déjà décrites occasionnellement comme responsables de mycoses invasives étaient identifiées, souvent chez des patients immunodéprimés en raison d'une maladie hématologique sous-jacente, mais aussi sur d'autres terrains. L'impact de l'exposition antérieure

récente ou en cours à un ou plusieurs antifongiques a été montré par divers groupes dont le nôtre<sup>26,27,28</sup>.

Nous ne listerons pas toutes les espèces et en particulier les espèces fréquemment isolées en pathologie dont nous parlerons plus loin dans le cadre de la surveillance. Nous pouvons cependant indiquer la nomenclature de certaines espèces (Tableau 3) et donner quelques exemples d'espèces rares dont nous avons reçus un ou des isolats durant ce mandat.

Tableau 3: Tableau des dénominations taxonomiques pour les levures

Espèce actuelle	Synonyme usité en clinique	Autre synonyme
<i>Candida albicans</i>	<i>Candida africana</i>	<i>Candida albicans</i>
<i>Candida duobushaemulonii</i>	<i>Candida haemulonii</i> *	<i>Candida haemulonii</i> type II
<i>Clavispora lusitaniae</i>	<i>Candida lusitaniae</i>	
<i>Cyberlindnera fabianii</i>	<i>Candida fabianii</i>	
<i>Cyberlindnera jadinii</i>	<i>Candida utilis</i>	<i>Pichia jadinii</i>
<i>Cryptococcus neoformans</i>	<i>Cryptococcus neoformans</i>	<i>Cryptococcus neoformans</i> var. <i>grubii</i>
<i>Cryptococcus deneoformans</i>		<i>Cryptococcus neoformans</i> var. <i>neoformans</i>
<i>Cryptococcus gattii</i> complex		<i>Cryptococcus neoformans</i> var. <i>gattii</i>
<i>Cutaneotrichosporon dermatis</i>	<i>Trichosporon dermatis</i>	
<i>Naganishia diffluens</i>	<i>Cryptococcus diffluens</i>	
<i>Debaryomyces hansenii</i>	<i>Candida famata</i>	
<i>Galactomyces candidus</i>	<i>Geotrichum candidum</i>	
<i>Kazachstania pintolopesii</i>		<i>Candida pintolopesii</i>
<i>Kluyveromyces marxianus</i>	<i>Candida kefir</i>	
<i>Kodamaea ohmeri</i>	<i>Candida ohmeri</i>	<i>Pichia ohmeri</i>
<i>Kuyveromyces lactis</i>	<i>Candida sphaerica</i>	
<i>Magnusiomyces capitatus</i>	<i>Geotrichum capitatum</i>	
<i>Meyerozyma caribbica</i>	<i>Candida fermentati</i>	
<i>Meyerozyma guilliermondii</i>	<i>Candida guilliermondii</i>	<i>Pichia guilliermondii</i>
<i>Papiliotrema laurentii</i>	<i>Cryptococcus laurentii</i>	
<i>Pichia kudriavzevii</i>	<i>Candida krusei</i>	<i>Issatchenkia orientalis</i>
<i>Saprochaete clavata</i>	<i>Geotrichum clavatum</i>	
<i>Stephanoascus ciferrii</i>	<i>Candida ciferrii</i>	
<i>Torulasporea delbrueckii</i>	<i>Candida colliculosa</i>	
<i>Wickerhamiella pararugosa</i>	<i>Candida pararugosa</i>	
<i>Wickerhamomyces anomalus</i>	<i>Candida pelliculosa</i>	<i>Pichia anomala</i>
<i>Yarrowia lipolytica</i>	<i>Candida lipolytica</i>	

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

<sup>26</sup> Lamoth F, Chung SJ, Damonti L, Alexander BD. 2017. Changing Epidemiology of Invasive Mold Infections in Patients Receiving Azole Prophylaxis. *Clin Infect Dis* 64:1619–1621.

<sup>27</sup> Arendrup MC, Sulim S, Holm A, Nielsen L, Nielsen SD, Knudsen JD, Drenck NE, Christensen JJ, Johansen HK. 2011. Diagnostic Issues, Clinical Characteristics, and Outcomes for Patients with Fungemia. *J Clin Microbiol* 49:3300–3308.

<sup>28</sup> Lortholary O, Desnos-Ollivier M, Sitbon K, Fontanet A, Bretagne S, Dromer F. 2011. Recent Exposure to Caspofungin or Fluconazole Influences the Epidemiology of Candidemia: a Prospective Multicenter Study Involving 2,441 Patients. *Antimicrob Agents Ch* 55:532–538.

### *Starmerella magnoliae*

Une souche isolée d'une hémoculture en 2021, syn. *Candida magnoliae* identifiée comme l'espèce la plus fréquemment retrouvée dans le pain à base de miel due à la fermentation des pollens conservés par les abeilles pour la fabrication du miel. Deux cas d'hémocultures chez des nouveau-nés au Brésil décrits et trois cas reportés également en Italie, aux Etats-Unis et en Chine. Utilisé en biotechnologies et particulièrement dans l'industrie alimentaire pour son activité d'alcool déshydrogénase, conversion du xylose en xylitol, production d'érythritol, mannitol... Cette espèce est osmotolérante et fructophilique et semble sensible aux échinocandines mais avec une moindre sensibilité *in vitro* au fluconazole et à la 5-fluorocytosine.

### *Diutina catenulata*

***Diutina catenulata*** (syn. *Candida catenulata*) : cette espèce de levure ascomycète a été décrite en 1942 mais assignée au nouveau genre *Diutina* en 2015. Ce genre comprend 8 espèces dont l'espèce *D. rugosa* (syn. *Candida rugosa*) décrite en pathologie humaine (Figure 3). Le genre *Diutina* fait partie des *Saccharomycetales* mais semble bien séparé de tous les autres genres décrits jusqu'à présent. La plupart des souches de *D. catenulata* ont été isolées chez l'homme (selles, perlèche) ou dans son environnement proche (nombreux fromages artisanaux et commerciaux). Son activité lipolytique pourrait expliquer sa présence dans les fromages et ses capacités de décontamination des sols pollués par le pétrole et des déchets alimentaires, ce qui en fait une espèce d'intérêt biotechnologique. Un cas de fongémie a été décrit en 1999 et une dizaine de souches ont été identifiées dans le programme de surveillance des infections fongiques en Chine (CHIFNet). D'après les données de la surveillance chinoise la majorité des souches ont une sensibilité diminuée au fluconazole et environ la moitié également aux échinocandines mais sont sensibles aux autres azolés, à l'amphotéricine B et à la 5-fluorocytosine. Nos deux souches testées ont un profil identique avec des valeurs de CMI basses pour tous les antifongiques testés sauf le fluconazole. Nous avons reçu deux souches isolées d'hémoculture entre 2017 et 2021 et une autre souche en 2012 isolées de squames.

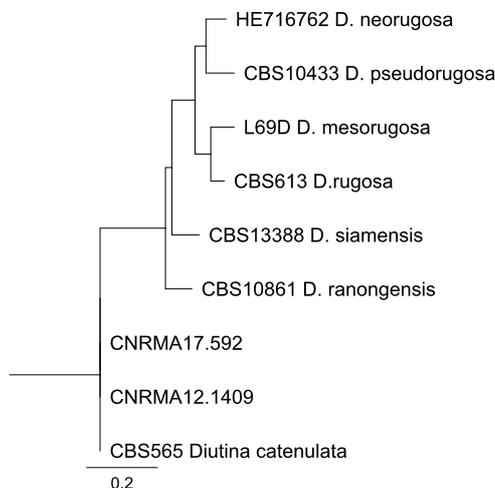


Figure 3: Arbre phylogénique des souches du genre *Diutina*

### *Kwoniella heveanensis*

Levure basidiomycète anciennement dénommée *Cryptococcus heveanensis*, cette espèce est proche en phénotypie de *Papiliotrema laurentii* (synonyme *Cryptococcus laurentii*). Cette espèce a été isolée dans l'environnement (caoutchouc en Indonésie, sol dans l'Oklahoma, insecte en Thaïlande) mais aucun cas de colonisation ou d'infection chez l'homme n'a été reporté à ce jour, cette espèce ayant du mal à pousser généralement au-dessus de 30°C. Nous avons cependant reçu une souche en 2018 provenant d'une hémoculture. Il s'agissait d'un patient toxicomane par voie intraveineuse. L'isolat avait une CMI élevée à la 5FC, au fluconazole et aux échinocandines. L'évolution a été favorable.

### *Naganishia diffluens*

Levure basidiomycète, anciennement dénommé *Cryptococcus diffluens*, appartenant désormais au genre *Naganishia* créé en 2015<sup>29</sup>. Cette espèce a longtemps été considérée comme synonyme ou variété de *Cryptococcus albidus* (nom actuel *Naganishia albida*), les profils physiologiques étant similaires. Le réservoir naturel de cette espèce reste inconnu. Cependant des isolats ont été retrouvés partout dans le monde dans différents environnements (sol, insecte aux Etats-Unis, air au Japon) et elle a récemment été identifiée comme faisant partie du mycobiote de chauve-souris en Europe. D'après une étude au Japon, cette espèce semble aussi coloniser la peau surtout chez des patients présentant des dermatites atopiques<sup>30</sup>. De nombreux isolats cliniques ont été identifiés mais uniquement des cas d'infections superficielles ou de colonisations, dans des lésions de la peau, des crachats, des ongles. Depuis 2003, trois isolats cliniques ont été reçus au CNRMA, une souche provenant d'une hémoculture en 2008 (patient transplanté de rein), une souche issue d'un LCR en 2018 (isolement non pris en compte par les cliniciens et évolution favorable) et une souche isolée d'un liquide péritonéal. Comme toutes les espèces de basidiomycètes, *N. diffluens* est résistant *in vitro* aux échinocandines, et les isolats testés ont des sensibilités diminuées au fluconazole, et à la 5-fluorocytosine<sup>31</sup>.

---

<sup>29</sup> Liu et al (2015) Towards an integrated phylogenetic classification of the *Tremellomycetes*. *Studies in Mycology* 81:85-147 <http://dx.doi.org/10.1016/j.simyco.2015.12.001>

<sup>30</sup> Sugita et al (2003) The basidiomycetous yeasts *Cryptococcus diffluens* and *C. liquefaciens* colonize the skin of patients with atopic dermatitis. *Microbiol Immunol* 47:945.

<sup>31</sup> Kantarciogluo et al (2009) Susceptibility testing of *Cryptococcus diffluens* against amphotericin B, flucytosine, fluconazole, itraconazole, voriconazole and posaconazole. *Med Mycol* 47:169.

### 3.1.5. Bilan de l'expertise sur les champignons filamenteux

Depuis 2003, nous avons identifié 3929 isolats de champignons filamenteux appartenant à 124 genres différents ce qui montre la diversité des espèces de champignons pathogènes et l'intérêt de rassembler au CNRMA les informations concernant les souches et les patients.

Entre 2017 et fin 2021, nous avons identifié 1217 champignons filamenteux (incluant les organismes de classe 3) isolés essentiellement des poumons (30,9%), de la peau (21,5%) et de l'œil (14,4%).

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: Tableau des dénominations taxonomiques pour les champignons filamenteux

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

Les champignons filamenteux caractérisés au CNRMA depuis 2017 seront décrits en parcourant le Règne *Fungi*. Nous discuterons la distribution des espèces pour les ordres fongiques comprenant un nombre important d'isolats ou au contraire une espèce rare.

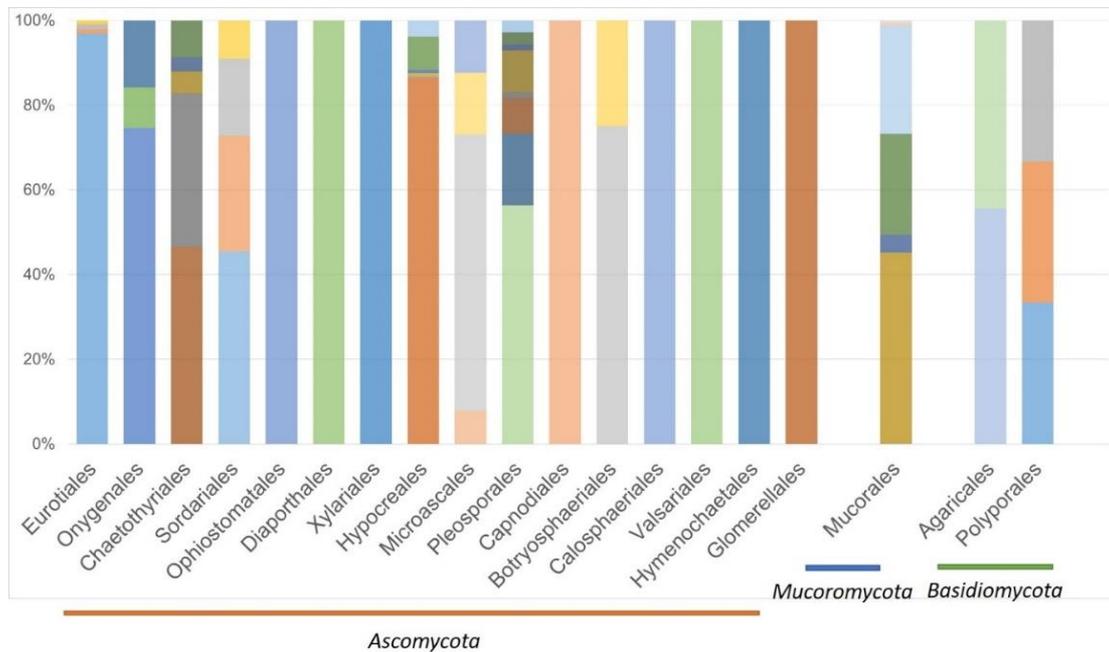


Figure 4: Répartition des genres identifiés selon l'Ordre correspondant (période 2017-2021)

La plupart des champignons ascomycètes identifiées depuis 2012 appartiennent à l'ordre des *Eurotiales* suivi des *Hypocreales* (n=266), *Microascales* (n=89), *Pleosporales* (n=71) et *Chaetothyriales* (n=58). Pour les champignons de la division des *Mucoromycota*, ordre des *Mucorales*, nous avons reçu et identifié 168 souches appartenant à 6 genres différents (en ordre décroissant : *Rhizopus*, *Mucor*, *Lichtheimia*, *Rhizomucor*, *Apophysomyces* et *Saksenaea*).

Les champignons basidiomycètes étaient représentés par les genres *Hormographiella* (5 isolats), et *Schizophyllum commune* (4 isolats) dans l'ordre des *Agaricales*, et par les genres *Pharenodontia* et *Trametes* pour l'ordre des *Polyporales* (Figure 4).

Pour l'ordre des *Eurotiales* plus de 400 souches ont été caractérisées et le **genre *Aspergillus*** a été le plus représenté.

Nous avons identifié 409 souches d'*Aspergillus* distribuées dans 10 sections (Figure 5) principalement dans les sections *Fumigati* (46,9%), *Flavi* (25%) et *Nigri* (10,3%). Les espèces majoritaires identifiées étaient *A. fumigatus* (43%) et *A. flavus* (21%).

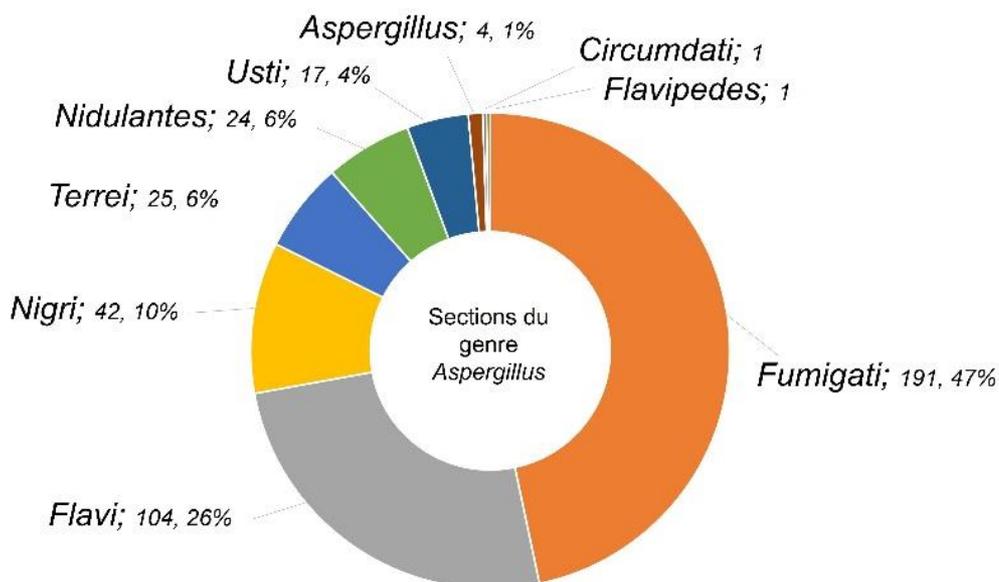


Figure 5: Distribution des différentes espèces d'*Aspergillus* par « Sections »

Plusieurs espèces des différentes sections ont été identifiées : **section Nigri** (*A. japonicus*, *A. tubingensis*, *A. luchuensis*, *A. neoniger*, *A. brunneoviolaceus*, *A. welwitschiae*) ; **section Nidulantes** (*A. montevidensis*, *A. spinulosporus*, *A. quadrilineatus*, *A. latus*, *A. nidulans*, *A. sydowii*) ; **section Usti** (*A. pseudodeflectus*, *A. calidoustus*) ; **section Flavi** (*A. alliaceus*, *A. nomaie*, *A. pseudonomius*, *A. parasiticus*, *A. tamarii*) ; **section Circumdati** (*A. westerdijkiae*) ; **section Terrei** (*A. terreus*, *A. citrinoterreus*, *A. alabamensis*) ; **section Flavipedes** (*A. iizukae*) ; **section Fumigati** (*A. fennelliae*, *A. felis*, *A. udagawae*, *A. lentulus*, *A. hiratsukae*) et **section Aspergillus** (*A. intermedius*).

L'identification uniquement au niveau de la section a été obtenue pour 4 souches dont 2 isolées de lavage broncho alvéolaire et deux autres isolées respectivement de poumon et d'abcès sous cutané. Une étude moléculaire approfondie sur ces souches est en cours.

Les membres d'*Aspergillus* appartenant à la section *Nigri* ont été représentés par: *Aspergillus brunneoviolaceus* isolée d'un prélèvement respiratoire chez un patient transplanté de rein vivant en Martinique; *A. welwitschiae* (5 souches) (Figure X1) toutes isolées de poumon ; *A. tubingensis* (5 souches) dont 3 isolées du poumon et deux autres d'une lésion osseuse et du LCR respectivement. Nous avons également caractérisé une souche d'*A. japonicus* et une autre d'*A. luchuensis*, toutes les deux isolées de prélèvements respiratoires.



Figure 6 : Aspect microscopique d'*Aspergillus brunneoviolaceus* (section *Nigri*) avec conidiophore lisse et vesicule globose (A) et croissance sur milieu malt 2% (MEA) après 7 jours d'incubation (B). Têtes aspergillaires d'*A. welwitschiae* (section *Nigri*) (C).

Toujours dans l'ordre *Eurotiales*, nous avons identifié une souche de *Paecilomyces maximus* 3 espèces appartenant au genre *Talaromyces* toutes isolées de prélèvements respiratoires : *T. marneffeii*, *T. purpurogenum* et *T. muroi*. D'autres isolats ont été identifiés au niveau de complexe d'espèces (*Talaromyces pinophilus* species complex), ou en cours de caractérisation au niveau espèce (Figure 6).

**L'ordre des *Onygenales*** à été représenté majoritairement par 47 souches d'*Histoplasma spp.* (Figure 7) responsables de mycoses endémiques, par 10 isolats du genre *Nannizziopsis* et par trois souches de champignons kératinophiles (*Arthroderma multifidum*, *Microsporium audouinii* et *Trichophyton rubrum*).

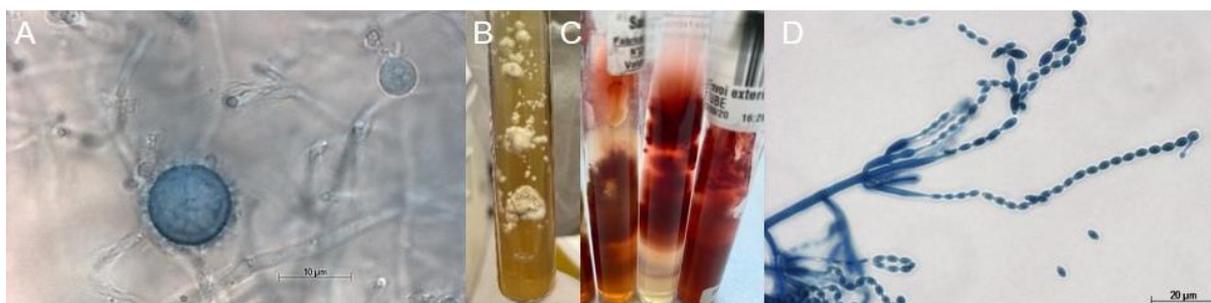


Figure 7: Caractéristiques morphologiques d'*Histoplasma spp.* (ordre *Onygenales*). et *Talaromyces purpurogenum* (ordre *Eurotiales*). Macroconidie tuberculée typique d'*Histoplasma spp.* (A) et aspect macroscopique sur tube de Sabouraud agar (B). Pigment rouge diffusible produit par *Talaromyces purpurogenum* (C) et conidiogénèse phialidique avec des conidies ovales en chaîne chez *Paecilomyces maximus* (ordre *Eurotiales*)(D).

Les membres de **l'ordre des *Hypocreales*** sont des champignons ascomycètes ubiquitaires avec plusieurs familles qui jouent un rôle important dans l'agriculture et la médecine. Durant la période allant de 2017 à 2021, le CNRMA a reçu et caractérisé plusieurs souches appartenant à cet ordre avec une majorité d'isolats du genre *Fusarium* suivi par *Purpureocillium* et *Trichoderma*.

Nous avons caractérisé dans **l'ordre des *Chaetothyriales*** plus de 50 souches de levures noires et espèces apparentées, en majorité *Exophiala dermatitidis*, *E. xenobiotica*, *E. spinifera*, *E. bergeri*, *E. phaeomuriformis*, *E. attenuata*, *Fonsecaea nubica*. *F. monophora* et *F. pedrosoi*. D'autres souches responsables de

phaeophycomycoses ont été identifiés : *Cladophialophora bantiana*, *C. boppii*, *Phialophora chinensis*, *Rhinocladiella similis*, *R. mackenziei*. (Figure 8)

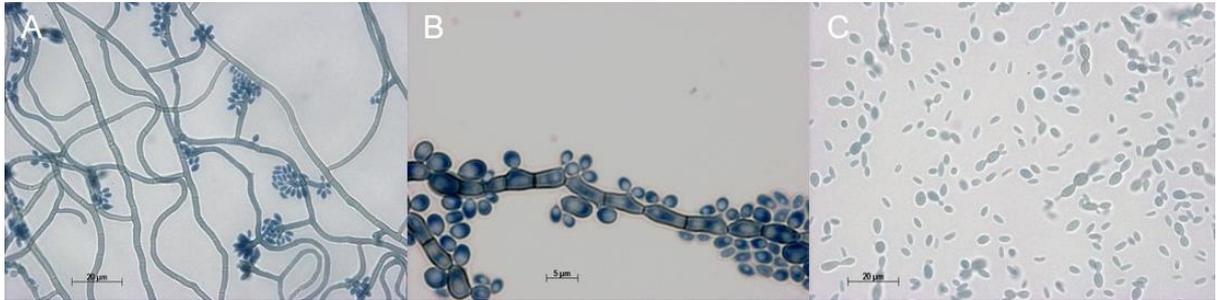


Figure 8: Aspect morphologique de quelques levures noires et apparentés (ordre Chaetothyriales). Conidiophores et conidies de *Fonsecaea nubica* (culture sur lame) (A) ; conidies solitaires fixées sur des filaments (B) et forme levures (C) chez *Exophiala* sp.

Concernant les champignons appartenant à l'**ordre des Sordariales**, nous avons analysé 11 isolats étiquetés comme *Chaetomium globosum* impliqués pour la plupart dans des infections respiratoires ; 2 souches responsables de mycétome (*Madurella fahalii* et *Madurella pseudomycetomatis*) ; 2 *Thermothelomyces thermophilus* (Figure 9) isolées de prélèvements respiratoires et 1 *Subramaniula asteroides* rarement impliquée en pathologie.

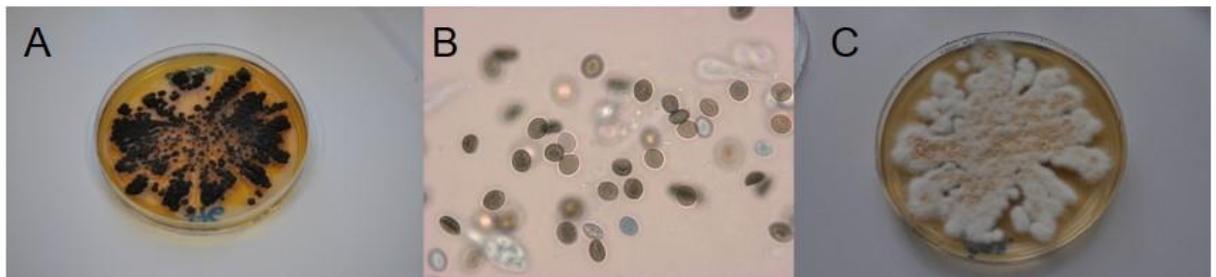


Figure 9: Aspect macroscopique des champignons ascomycetes (ordre Sordariales) *Triadelphia pulvinata* (A) et *Thermothelomyces thermophilus* (C) ; (B) Ascospores mélanisées de *Chaetomium globosum*

Dans l'**ordre des Microascales** les groupes des champignons ayant une importance clinique sont les **genres Scedosporium, Lomentospora** et **Scopulariopsis**. Les anamorphes de ces genres partagent une conidiogénèse annélidique avec une nature hydrophile pour les conidies de *Scedosporium* et *Lomentospora* et hydrophobe pour les membres du genre *Scopulariopsis*. Plus de la moitié des souches identifiées au CNRMA appartenait au genre *Scedosporium* avec *S. apiospermum* comme espèce majoritaire (Figure 10).

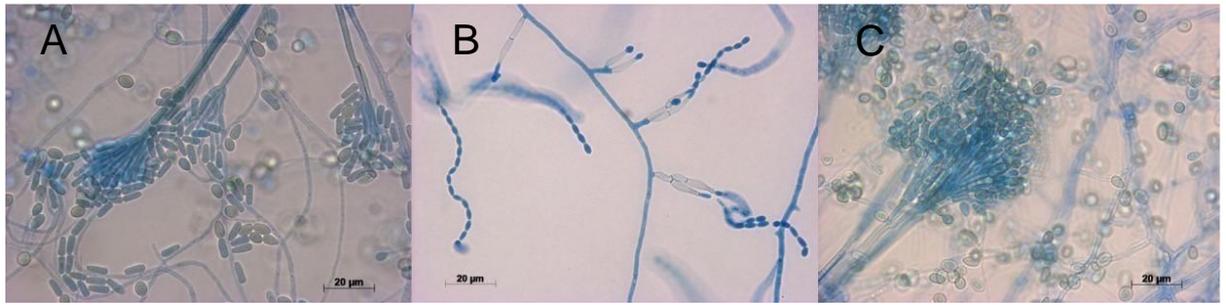


Figure 10: Aspect microscopique (conidiophores et conidies) des souches de l'ordre de Microascales (A) *Scedosporium dehoogii* (B) *Microascus murinus*, (C) *Scedosporium apiospermum*

**Nous avons également observé une grande diversité des genres appartenant à l'ordre des *Pleosporales*.** Nous avons identifié plusieurs membres : les phaeohyphomycètes *Kirschsteiniothelia tectonae*, nombreuses espèces du genre *Curvularia* (*C. aerea*, *C. hominis*, *C. spicifera*, *C. hawaiiensis*, *C. eragrostidis*) (Figure 11), et des membres de groupes d'espèces *Alternaria infectoria* et *A. alternata*. En outre, des champignons appartenant aux coelomycètes tels que *Paraconiothyrium cyclothyrioides*, *Parathyridaria percutanea*, *Medicopsis romeroi* et *Nigrogana mackinnonii* (syn. *Pyrenochaeta mackinnonii*) ont été identifiés.



Figure 11: Morphologies caractéristiques des conidiophores et conidies à partir d'une culture sur lame (malt 2%) de *Lomentospora prolificans* (A) et *Pleurostomophora ochracea* (C). Dictyospore de *Curvularia aerea* (ordre *Pleosporales*) (B)

### 3.1.6. Bilan de l'expertise sur les champignons dimorphiques et/ou pathogènes de classe 3

Depuis 2003, nous avons reçu au CNRMA, 167 champignons pathogènes de classe 3. L'accès au P3 nous permet d'identifier ce type des pathogènes ou bien de confirmer ou évoquer les diagnostics évoqués par nos correspondants. Les isolats reçus entre 2017 et 2021 (Figure 12) au CNRMA comprenaient 4 *Cladophialophora bantiana*, 2 *Coccidioides immitis*, 47 *Histoplasma* spp., 3 *Talaromyces marneffe* (syn. *Penicillium marneffe*) et 1 *Rhinocladiella mackenziei*.

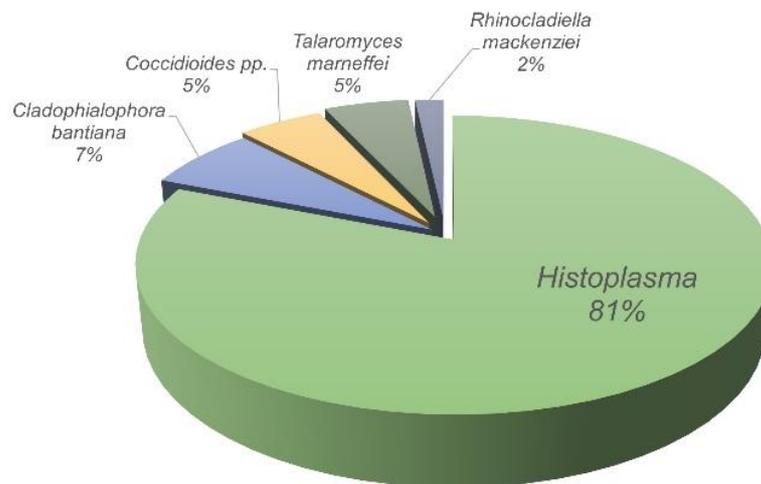


Figure 12: Répartition des champignons dimorphiques de classe 3 identifiés au CNRMA pendant la période 2017-2021

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

### 3.1.7. Bilan de l'étude de la sensibilité aux antifongiques des souches

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 étudiées dans les documents EUCAST. En l'absence de valeur critique (breakpoint) définie pour toutes les espèces et tous les antifongiques et étant donnée l'absence de corrélation *in vivo/in vitro* dans de nombreuses situations cliniques, les résultats de CMI ne sont jamais interprétés en termes de sensibilité et de résistance pour un isolat donné. En revanche, les profils de sensibilité nous servent :

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

Au total, plus de 13000 isolats (10524 levures et 3338 champignons filamenteux) ont été testés depuis 2003 pour leur sensibilité aux antifongiques. Le nombre très important de genres et d'espèces différents rend impossible une analyse détaillée, certaines espèces n'étant représentées que par un très petit nombre d'isolats. Nous présenterons donc les données de CMI, en nous limitant aux espèces pour lesquelles au moins 5 isolats pour les champignons filamenteux ou 10 isolats pour les levures ont été testés. Nous présenterons les résultats en termes de CMI<sub>50</sub> et de CMI<sub>90</sub>, c'est-à-dire, les concentrations correspondant aux concentrations minimales de l'antifongique inhibant respectivement 50% et 90% des isolats de l'espèce concernée.

## Levures

Les données du CNRMA concernent actuellement plus de 10000 isolats de levures dont la sensibilité a été testée à 8 antifongiques systémiques (Tableau 5). Nous avons publié récemment les données concernant la sensibilité aux antifongiques azolés de plus de 9000 isolats appartenant à 40 espèces communes et rares<sup>32</sup> et également les données concernant la sensibilité aux échinocandines<sup>33</sup>.

Il faut remarquer que les CMI<sub>50</sub> et les CMI<sub>90</sub> 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 sensibilité 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.

*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 6). Sur ces espèces, les CMI de l'isavuconazole sont équivalentes à celles du voriconazole sauf sur les isolats de *S. cerevisiae* pour lesquels elles sont un peu plus basses, ceux de *C. neoformans* pour lesquels elles sont un peu plus élevées, mais surtout ceux de *M. capitatus* ou *S. clavata* pour lesquels elles sont très nettement plus élevées<sup>34</sup>.

---

<sup>32</sup> 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.

<sup>33</sup> Desnos-Ollivier M, Bretagne S, Lortholary O, Dromer F; French Mycoses Study Group. Echinocandins Susceptibility Patterns of 2,787 Yeast Isolates: Importance of the Thresholds for the Detection of FKS Mutations. Antimicrob Agents Chemother. 2022 Apr 12:e0172521. doi: 10.1128/aac.01725-21.

<sup>34</sup> Desnos-Ollivier M, Bretagne S, Boullié A, Gautier C, Dromer F, Lortholary O, French Mycoses Study Group (2019) Isavuconazole MICs distribution of 29 yeast species responsible for invasive infections (2015-2017). Clin Microbiol Infect

Tableau 5: Profil de sensibilité des levures aux antifongiques (mise à jour le 30/04/2022)

Espèces étudiées	Valeurs des CMI50 / CMI90 mg/L pour les antifongiques*						
Nom d'usage en clinique (nbre d'isolats testés)	AMB	5-FC	Fluco	Vori	Posa	Caspo**	Mica**
<i>Candida albicans</i> (n=3621)	0.06/0.12	≤0.12/0.5	0.25/0.5	≤0.01/≤0.01	≤0.01/0.06	0.03/0.06	0.03/0.03
<i>C. dubliniensis</i> (n=162)	≤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
<i>C. glabrata</i> (n=1420)	0.12/0.25	≤0.12/≤0.12	16/64	0.25/1	0.5/2	0.06/0.12	0.015/0.03
<i>C. nivariensis</i> (n=17)	0.12/0.25	0.5/1	4/8	0.06/0.12	0.12/0.25	0.03/0.12	0.015/0.03
<i>C. parapsilosis</i> (n=943)	0.06/0.12	≤0.12/0.25	0.5/2	≤0.01/0.06	0.06/0.12	0.25/1	0.25/0.5
<i>C. orthopsilosis</i> (n=70)	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
<i>C. metapsilosis</i> (n=57)	0.06/0.12	≤0.12/≤0.25	1/2	0.03/0.06	0.03/0.12	0.06/0.12	0.12/0.25
<i>C. tropicalis</i> (n=707)	0.06/0.12	≤0.12/32	0.5/4	0.03/0.25	0.06/0.25	0.03/0.06	0.03/0.03
<i>Pichia kudriavzevii</i> (n=376)	0.12/0.25	2/4	32/64	0.25/0.5	0.12/0.25	0.12/0.25	0.06/0.12
<i>P. cactophila</i> (n=51)	0.12/0.25	2/4	16/32	0.12/0.25	0.12/0.12	0.03/0.06	0.015/0.03
<i>Kluyveromyces marxianus</i> (n=185)	0.06/0.12	0.5/8	0.25/1	≤0.01/≤0.01	0.06/0.12	0.015/0.03	0.03/0.06
<i>Meyerozyma guilliermondii</i> (n=125)	0.03/0.06	≤0.12/0.25	8/64	0.06/0.5	0.25/0.5	0.06/0.25	0.12/0.25
<i>M. caribbica</i> (n=39)	0.12/0.25	≤0.12/≤0.12	4/64	0.12/0.5	0.25/0.5	0.12/0.5	0.12/2
<i>Clavispora lusitaniae</i> (n=265)	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
<i>C. haemulonii</i> (n=50)	0.5/2	≤0.12/0.5	32/≥64	≥8/≥8	2/≥8	0.03/0.06	0.06/0.06
<i>C. duobushaemulonii</i> (n=47)	2/8	≤0.12/≥64	32/≥64	≥8/≥8	2/≥8	0.015/0.03	0.03/0.06
<i>C. auris</i> (n=17)	0.25/0.5	≤0.12/≥64	32/≥64	0.5/1	≤0.01/0.25	0.03/0.06	0.015/0.03
<i>C. palmiophila</i> (n=21)	0.12/0.5	≤0.12/0.5	8/32	0.12/0.25	0.12/0.25	0.06/0.25	0.03/0.25
<i>Cyberlindnera jadinii</i> (n=23)	0.06/0.12	≤0.12/1	1/4	0.06/0.12	0.12/0.25	0.015/1	0.015/2
<i>Cyberlindnera fabianii</i> (n=13)	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
<i>Wickerhamomyces anomalus</i> (n=39)	0.06/0.12	≤0.12/16	2/4	0.12/0.25	0.25/0.5	0.03/0.06	0.015/0.03
<i>Kodamaea ohmeri</i> (n=37)	0.06/0.06	≤0.12/1	4/16	0.03/0.12	0.03/0.12	0.06/≥8	0.06/0.12
<i>P. norvegensis</i> (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
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> (n=71)	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
<i>C. pararugosa</i> (n=10)	0.12/0.25	0.25/8	8/8	0.06/0.25	0.12/0.12	0.06/0.12	0.03/0.06
<i>Yarrowia lipolytica</i> (n=29)	0.5/4	32/≥64	4/16	0.06/0.12	0.25/1	0.12/0.5	0.25/0.25
<i>Geotrichum candidum</i> (n=40)	0.25/0.5	0.25/1	16/64	0.25/1	0.25/1	1/≥8	0.5/≥8
<i>Magnusiomyces capitatus</i> (n=60)	0.25/0.5	≤0.12/0.25	8/16	0.06/0.5	0.12/1	≥8/≥8	≥8/≥8
<i>Saprochaete clavata</i> (n=207)	0.25/0.5	0.5/1	16/64	0.25/1	0.5/1	≥8/≥8	≥8/≥8
<i>Cr. neoformans</i> (n=1040)	0.12/0.5	4/16	4/8	0.03/0.12	0.06/0.25	≥8/≥8	4/≥8
<i>Cr. deneoformans</i> (n=228)	0.06/0.25	4/16	1/4	≤0.01/0.06	0.03/0.12	≥8/≥8	1/≥8
<i>Cr. neoformans</i> hybrides AD (n=186)	0.12/0.25	4/16	4/8	0.03/0.12	0.06/0.25	≥8/≥8	4/≥8
<i>Cr. gattii</i> (n=34)	0.12/0.25	2/8	8/16	0.12/0.5	0.25/0.5	≥8/≥8	≥8/≥8
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i> (n=67)	0.25/0.5	0.25/0.5	≥64/≥64	2/4	0.5/2	≥8/≥8	≥8/≥8
<i>Trichosporon asahii</i> (n=68)	2/≥8	32/≥64	4/16	0.06/0.25	0.25/0.5	≥8/≥8	≥8/≥8
<i>Trichosporon inkin</i> (n=16)	0.25/2	64/≥64	1/4	≤0.01/0.06	0.06/0.25	4/≥8	1/≥8

\* AMB (amphotéricine B), 5-FC (5-fluorocytosine), Fluco (fluconazole), Vori (voriconazole), Posa (posaconazole), Caspo (casposfungine), 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 casposfungine ou début 2008 pour la micafungine

Tableau 6: 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 le 30/04/2022)

CMI50/CMI90 mg/L pour les azolés				
Espèce (nbre isolats testés)	Fluconazole	Posaconazole	Voriconazole	Isavuconazole
<i>Candida albicans</i> (n=1076)	≤0.125/0.25	≤0.015/0.03	≤0.015/≤0.015	≤0.007/≤0.007
<i>Candida dubliniensis</i> (n=86)	≤0.125/0.25	≤0.015/0.03	≤0.015/≤0.015	≤0.007/≤0.007
<i>Candida glabrata</i> (n=465)	8/≥64	0.5/1	0.125/0.5	0.125/0.5
<i>Candida nivariensis</i> (n=10)	2/4	0.12/0.25	0.06/0.12	0.03/0.06
<i>Candida parapsilosis</i> (n=365)	0.5/4	0.03/0.06	≤0.015/0.12	0.015/0.03
<i>Candida orthopsilosis</i> (n=43)	0.5/8	0.03/0.125	≤0.015/1	0.015/0.06
<i>Candida metapsilosis</i> (n=35)	1/2	0.03/0.06	0.03/0.03	0.015/0.015
<i>Candida tropicalis</i> (n=222)	0.25/1	0.03/0.06	0.03/0.06	≤0.007/0.03
<i>Candida auris</i> (n=16)	32/≥64	≤0.015/0.12	0.5/2	0.015/0.12
<i>Candida haemulonii</i> (n=13)	≥64/≥64	4/≥8	≥8/≥8	≥4/≥4
<i>Candida duobushaemulonii</i> (n=12)	16/≥64	0.12/2	0.25/4	0.12/≥4
<i>Pichia kudriavzevii</i> (n=149)	32/≥64	0.125/0.25	0.25/0.5	0.125/0.25
<i>Pichia cactophila</i> (n=25)	16/32	0.06/0.12	0.12/0.12	0.12/0.25
<i>Kluyveromyces marxianus</i> (n=68)	0.25/0.5	0.06/0.125	≤0.015/≤0.015	≤0.007/≤0.007
<i>Clavispora lusitaniae</i> (n=149)	0.25/0.5	≤0.015/0.03	≤0.015/≤0.015	≤0.007/0.015
<i>Meyerozyma guilliermondii</i> (n=48)	4/≥64	0.12/0.5	0.125/2	0.25/4
<i>Meyerozyma caribbica</i> (n=10)	4/8	0.12/0.25	0.06/0.25	0.12/0.25
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> (n=36)	4/16	0.5/1	0.12/0.5	0.03/0.25
<i>Kodamaea ohmeri</i> (n=20)	4/8	0.03/0.06	0.03/0.06	0.015/0.03
<i>Wickerhamomyces anomalus</i> (n=17)	2/8	0.25/0.5	0.06/0.25	0.06/0.12
<i>Galactomyces candidus</i> (n=15)	16/≥64	0.25/0.5	0.25/2	0.25/2
<i>Magnusiomyces capitatus</i> (n=34)	8/16	0.12/0.5	0.03/0.25	4/≥4
<i>Saprochaete clavata</i> (n=123)	16/32	0.5/0.5	0.25/0.5	2/≥4
<i>Yarrowia lipolytica</i> (n=11)	2/16	0.25/1	0.06/0.12	0.125/2
<i>C. neoformans</i> (n=372)	4/8	0.03/0.125	0.03/0.12	0.12/0.25
<i>C. deneoformans</i> (n=66)	1/4	≤0.015/0.06	≤0.015/0.06	0.03/0.12
<i>C. neoformans AD hybrid</i> (n=53)	2/16	0.03/0.125	0.03/0.06	0.06/0.125
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i> (n=40)	≥64/≥64	0.5/2	1/4	1/2
<i>Trichosporon asahii</i> (n=30)	2/8	0.25/0.5	0.06/0.5	0.25/1

## Filamenteux

Depuis 2003, le CNRMA a déterminé la sensibilité à 8 antifongiques systémiques de plus de 3900 isolats de champignons filamenteux (Tableau 7). Les données sur l'isavuconazole sont présentées plus loin dans un tableau séparé car le nombre de souches est plus limité.

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

"résistances" observées font partie du profil naturel des espèces et ne représentent pas des résistances acquises sous traitement antifongique. Pour cette espèce, nous distinguons donc dans le tableau les souches "sauvages" et les souches mutées avec résistance phénotypique.

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 7: Profil de sensibilité des champignons filamenteux aux antifongiques

Valeurs des CMI50 / CMI90 (mg/L) pour les antifongiques*							
Espèce (nombre d'isolats testés)	AMB	Itra	Vori	Posa	Caspo	Mica	Terbi
<i>Cunninghamella bertholletiae</i> (n=17)	0.5/1	8/≥8	≥8/≥8	0.5/1	≥8/≥8	≥8/≥8	0.12/0.25
<i>Cunninghamella spp.</i> (n=8)	4/-	2/-	≥8/-	1/-	≥8/-	≥8/-	0.12/-
<i>Lichtheimia corymbifera</i> (n =79)	0.5/0.5	1/4	≥8/≥8	0.5/0.5	≥8/≥8	≥8/≥8	0.5/1
<i>Lichtheimia ornata</i> (n=7)	0.25/-	0.5/-	≥8/-	0.5/-	≥8/-	≥8/-	0.5/-
<i>Lichtheimia ramosa</i> (n=75)	0.12/0.25	2/≥8	≥8/≥8	0.5/1	≥8/≥8	≥8/≥8	1/2
<i>Mucor circinelloides</i> (n=82)	0.06/0.12	≥8/≥8	≥8/≥8	1/≥8	≥8/≥8	≥8/≥8	≥8/≥8
<i>Mucor velutinosus</i> (n=13)	0.06/0.25	≥8/≥8	≥8/≥8	0.5/2	≥8/≥8	≥8/≥8	≥8/≥8
<i>Mucor indicus</i> (n=16)	0.06/0.12	≥8/≥8	≥8/≥8	1/2	≥8/≥8	≥8/≥8	≥8/≥8
<i>Mucor spp.</i> (n=10)	0.12/0.25	≥8/≥8	≥8/≥8	2/≥8	≥8/≥8	≥8/≥8	≥8/≥8
<i>Rhizomucor pusillus</i> (n=57)	0.06/0.12	0.5/1	≥8/≥8	0.25/0.5	≥8/≥8	≥8/≥8	0.25/0.5
<i>Rhizomucor miehei</i> (n=8)	0.03/-	0.03/-	2/-	0.06/-	≥8/-	2/-	0.25/-
<i>Rhizopus arrhizus</i> (n =116)	0.12/0.25	1/≥8	≥8/≥8	0.5/2	≥8/≥8	≥8/≥8	≥8/≥8
<i>Rhizopus microsporus</i> (n=77)	0.06/0.25	2/≥8	≥8/≥8	0.5/2	≥8/≥8	≥8/≥8	0.5/1
<i>Saksenaia vasiformis complex</i> (n=5)	8/-	0.25/-	8/-	0.12/-	≥8/-	≥8/-	0.25/-
<i>Syncephalastrum racemosum</i> (n=6)	0.03/-	1/-	≥8/-	0.5/-	≥8/-	≥8/-	0.5/-
<i>Aspergillus fumigatus</i> (n=344)	0.25/0.5	0.25/0.5	0.25/0.5	0.06/0.1	0.5/0.5	0.015/0.03	1/2
<i>A. fumigatus CMI itra&gt;1mg/L</i> (n=119)	0.25/0.5	≥8/≥8	2/4	0.5/2	0.5/0.5	≤0.007/0.03	1/4
<i>Aspergillus lentulus</i> (n=6)	8/-	1/-	1/-	0.25/-	2/-	≤0.007/-	0.25/-
<i>Aspergillus hiratsukae</i> (n=7)	0.5/-	0.25/-	0.5/-	0.06/-	0.5/-	≤0.007/-	0.125/-
<i>Aspergillus flavus</i> (n=198)	1/4	0.12/0.25	0.5/0.5	0.12/0.2	0.25/0.5	≤0.007/0.03	0.03/0.06
<i>Aspergillus parasiticus</i> (n=6)	2/-	0.125/-	0.5/-	0.06/-	0.25/-	≤0.007/-	0.015/-
<i>Aspergillus tamarii</i> (n=10)	0.5/1	0.06/0.25	0.25/0.5	0.06/0.1	0.25/0.5	≤0.007/0.01	≤0.01/0.03
<i>Aspergillus section Nidulantes</i> (n=12)	1/2	0.25/1	0.12/0.5	0.12/0.2	0.5/2	≤0.007/-	0.06/0.25
<i>Aspergillus nidulans</i> (n=37)	2/8	0.12/0.5	0.12/0.2	0.06/0.2	0.5/4	0.015/0.06	0.12/0.5
<i>Aspergillus quadrilineatus</i> (n=17)	0.5/1	0.12/0.25	0.12/0.2	0.12/0.2	2/2	≤0.007/0.03	0.12/0.12
<i>Aspergillus section Nigri</i> (n=24)	0.25/0.5		0.5/1	0.25/0.5	0.25/0.5	0.01/0.25	0.12/0.25
<i>Aspergillus tubingensis</i> (n=29)	0.25/0.5	1/8	1/2	0.25/0.5	0.25/0.5	≤0.007/0.01	0.25/0.25
<i>Aspergillus welwitschiae</i> (n=22)	0.5/1	1/2	0.5/1	0.25/0.5	0.25/0.5	0.007/0.015	0.12/0.25
<i>Aspergillus section Usti</i> (n=28)	0.5/1	2/≥8	4/8	≥8/≥8	2/≥8	0.25/4	0.25/0.5
<i>Aspergillus calidoustus</i> (n=27)	1/2	≥8/≥8	4/8	≥8/≥8	0.5/4	0.015/0.06	0.25/0.5
<i>Aspergillus terreus</i> (n=58)	4/8	0.06/0.25	0.5/1	0.06/0.1	0.5/1	≤0.007/0.03	0.06/0.12
<i>Aspergillus sydowii</i> (n=7)	2/-	0.5/-	0.5/-	0.25/-	0.12/-	≤0.007/-	0.06/-
<i>Aspergillus versicolor</i> (n=9)	1/-	0.25/-	0.25/-	0.12/-	0.5/-	0.03/-	0.25/-
<i>Penicillium spp.</i> (n=27)	0.5/4	1/≥8	8/≥8	1/≥8	2/≥8	0.12/2	0.25/1
<i>Penicillium chrysogenum</i> (n=8)	0.5/-	0.25/-	1/-	0.25/-	0.5/-	0.03/-	0.25/-

Espèce (nombre d'isolats testés)	AMB	Itra	Vori	Posa	Caspo	Mica	Terbi
<i>Paecilomyces variotii</i> (n=15)	0.06/0.5	0.12/0.5	8/≥8	0.12/0.5	2/4	0.03/0.25	1/8
<i>Fusarium solani complex</i> (n=249)	4/8	≥8/≥8	8/≥8	≥8/≥8	≥8/≥8	≥8/≥8	≥8/≥8
<i>Fusarium falciforme</i> (n=15)	2/8	8/≥8	8/≥8	≥8/≥8	8/8	8/8	≥8/≥8
<i>Fusarium oxysporum complex</i> (n=185)	2/4	≥8/≥8	2/8	2/≥8	≥8/≥8	≥8/≥8	2/4
<i>Fusarium proliferatum</i> (n=138)	4/8	≥8/≥8	4/8	8/≥8	8/≥8	8/≥8	1/2
<i>Fusarium verticillioides</i> (n=29)	8/8	≥8/≥8	2/4	0.5/1	8/≥8	8/≥8	0.5/1
<i>Bisfusarium dimerum</i> (n= 35)	0.25/0.5	≥8/≥8	2/4	≥8/≥8	≥8/≥8	≥8/≥8	0.5/1
<i>Fusarium incarnatum-equiseti complex</i> (n=6)	1/-	≥8/-	2/-	1/-	≥8/-	≥8/-	4/-
<i>Sarocladium kiliense</i> (n=11)	8/≥8	≥8/≥8	0.5/1	1/≥8	4/≥8	4/≥8	0.5/0.5
<i>Purpureocillium lilacinum</i> (n=55)	8/≥8	2/≥8	0.25/0.5	0.25/0.5	≥8/≥8	2/≥8	0.25/0.5
<i>Trichoderma spp.</i> (n=8)	1/-	≥8/-	1/-	8/-	0.5/-	0.06/-	2/-
<i>Trichoderma longibrachiatum</i> (n=25)	1/2	≥8/≥8	0.5/1	1/2	0.5/1	0.06/0.25	1/2
<i>Phaeoacremonium parasiticum</i> (n=25)	0.5/2	≥8/≥8	0.25/0.2	0.25/0.5	≥8/≥8	≥8/≥8	0.12/0.5
<i>Pleurostomophora richardsiae</i> (n=7)	0.25/-	0.25/-	0.5/-	0.25/-	4/-	1/-	1/-
<i>Coniochaeta hoffmannii</i> (n=7)	0.25/-	0.25/-	1/-	0.12/-	2/-	2/-	0.25/-
<i>Thermothelomyces thermophilus</i> (n=9)	1/-	0.12/-	0.12/-	0.06/-	4/-	0.5/-	2/-
<i>Sporothrix schenckii</i> (n=20)	1/2	0.5/1	8/≥8	0.5/1	≥8/≥8	≥8/≥8	0.06/0.12
<i>Sporothrix globosa</i> (n=5)	8/-	1/-	≥8/≥8	1/2	≥8/-	1/-	0.25
<i>Scedosporium apiospermum</i> (n=118)	8/≥8	1/8	0.5/1	0.5/1	1/2	0.25/1	≥8/≥8
<i>Scedosporium boydii</i> (n=48)	8/≥8	0.5/8	0.25/0.5	0.25/1	1/2	0.25/1	≥8/≥8
<i>Scedosporium ellipsoideum</i> (n=9)	≥8/-	1/-	0.5/-	1/-	0.5/-	0.25/-	≥8/-
<i>Scedosporium aurantiacum</i> (n=9)	8/-	8/-	0.5/-	1/-	8/-	8/-	≥8/-
<i>Scedosporium dehoogii</i> (n=10)	8/≥8	0.5/1	0.25/0.5	0.5/1	2/2	0.25/0.5	≥8/≥8
<i>Scedosporium minutisporum</i> (n=5)	8/-	0.5/-	0.25/-	0.5/-	2/-	0.25/-	≥8/-
<i>Lomentospora prolificans</i> (n=40)	8/≥8	≥8/≥8	8/≥8	≥8/≥8	4/≥8	4/≥8	≥8/≥8
<i>Microascus cirrosus</i> (n=9)	8/-	≥8/-	≥8/-	≥8/-	4/-	≥8/-	2/-
<i>Scopulariopsis brevicaulis</i> (n=21)	8/≥8	≥8/≥8	8/≥8	≥8/≥8	1/4	0.25/1	2/8
<i>Doratomyces spp.</i> (n=5)	2/-	≥8/-	4/-	1/-	1/-	0.12/-	2/-
<i>Chaetomium globosum.</i> (n=6)	4/-	0.06/-	0.25/-	0.12/-	0.5/-	0.12/-	8/≥8
<i>Chaetomium spp.</i> (n=7)	1/-	0.25/-	0.25/-	0.25/-	1/-	0.25/-	1/4
<i>Curvularia spicifera</i> (n=8)	0.06/-	0.25/	0.5/-	0.06/-	0.5/-	0.06/-	0.5/-
<i>Alternaria infectoria complex</i> (n=27)	0.25/0.5	0.5/1	4/≥8	0.12/0.5	0.5/1	0.06/0.12	0.5/1
<i>Alternaria alternata complex</i> (n=38)	0.5/1	1/8	2/4	0.25/0.5	0.5/≥8	0.25/≥8	4/≥8
<i>Medicopsis romeroi</i> (n=7)	0.5/-	4/-	0.5/-	1/-	4/-	2/-	0.12/-
<i>Neoscytalidium dimidiatum</i> (n=7)	0.12/-	≥8/-	0.12/-	0.5/-	0.5/-	0.12/-	0.5/-
<i>Aureobasidium spp.</i> (n=7)	0.25/-	0.03/-	0.12/-	0.06/-	1/-	1/-	1/-
<i>Exophiala dermatitidis</i> (n=35)	0.12/0.25	0.5/1	0.06/0.5	0.12/0.5	4/≥8	1/≥8	0.06/0.25
<i>Exophiala jeanselmei</i> (n=11)	0.5/1	0.25/0.5	0.25/0.5	0.25/-	1/-	2/-	0.06/-
<i>Exophiala oligosperma</i> (n=6)	0.25/-	0.25/-	0.25/-	0.25/-	≥8/-	2/-	0.03/-
<i>Exophiala spinifera</i> (n=13)	0.12/0.25	0.03/0.05	0.12/0.2	0.03/0.2	2/2	0.25/2	0.06/0.25
<i>Fonsecaea monophora</i> (n=10)	0.5/2	≤0.01/-	0.06/0.1	0.01/0.0	0.5/-	0.5/1	0.03/0.12
<i>Fonsecaea pedrosoi</i> (n=9)	0.25/-	0.12/-	0.06/-	0.06/-	1/-	1/-	0.03/-
<i>Fonsecaea nubica</i> (n=16)	0.5/1	≤0.01/0.5	0.06/0.1	0.03/0.2	1/2	0.5/4	0.03/0.25
<i>Hormographiella aspergillata</i> (n=6)	0.06/-	≥8	1/-	2/-	4/-	4/-	8/-

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

Dans ce Tableau 7 résumant les données sur les souches testées au CNR, la proportion élevée des souches d'*A. fumigatus* résistantes est totalement artificielle et ne reflète en rien la réalité épidémiologique en France. En effet, plus d'un tiers des souches d'*A. fumigatus* nous sont envoyées dans un contexte d'échec thérapeutique ou de suspicion de résistance. Nous avons séparé, dans le tableau, les souches pour lesquelles les CMI de l'itraconazole étaient élevées (>1 mg/L), avec parfois une résistance croisée pour le voriconazole et le posaconazole, de façon à mieux mettre en évidence le profil des souches sauvages.

Parmi les espèces cryptiques d'*Aspergillus* section *Fumigati*, nous retrouvons *Aspergillus lentulus* qui se caractérise par des CMI très élevées à l'amphotéricine B. Nous avons séparé les espèces majoritaires d'*Aspergillus* section *Nidulantes* telles qu'*A. nidulans* et *A. quadrilineatus* qui diffèrent dans leurs profils de sensibilité à l'amphotéricine 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'amphotéricine 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 *Microascus 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 la 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 8). 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 pharmacologiques entre les triazolés.

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 8 : 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
<i>Cunninghamella bertholletiae</i> (n=11)	1/1	≥8/≥8	≥8/≥8	≥8/≥8
<i>Lichtheimia corymbifera</i> (n=35)	0.5/0.5	0.5/2	≥8/≥8	4/≥8
<i>Lichtheimia ramosa</i> (n=25)	0.5/1	1/≥8	≥8/≥8	≥8/≥8
<i>Mucor circinelloides</i> (n=53)	2/≥8	≥8/≥8	≥8/≥8	≥8/≥8
<i>Mucor indicus</i> (n=13)	1/2	≥8/≥8	≥8/≥8	≥8/≥8
<i>Mucor velutinosus</i> (n=7)	1/-	≥8/-	≥8/-	≥8/-
<i>Rhizopus arrhizus</i> (n=57)	0.5/≥8	2/≥8	≥8/≥8	2/≥8
<i>Rhizopus microsporus</i> (n=42)	1/≥8	≥8/≥8	8/≥8	4/≥8
<i>Rhizomucor pusillus</i> (n=13)	0.25/0.25	0.5/0.5	≥8/≥8	4/≥8
<i>Aspergillus fumigatus</i> (n=163)	0.06/0.12	0.25/0.5	0.25/1	0.5/1
<i>Aspergillus fumigatus itraR*(CMI&gt;1mg/L) n=70</i>	0.5/2	≥8/≥8	4/4	4/8
<i>Aspergillus lentulus</i> (n=6)	0.25/-	1/-	1/-	1/-
<i>Aspergillus flavus</i> (n=121)	0.125/0.125	0.125/0.25	0.5/1	0.5/1
<i>Aspergillus parasiticus</i> (n=5)	0.06/-	0.125/-	1/-	0.5/-
<i>Aspergillus nidulans</i> (n=12)	0.06/0.25	0.125/0.25	0.125/0.25	0.125/0.5
<i>Aspergillus quadrilineatus</i> (n=7)	0.125/-	0.125/-	0.12/-	0.125/-
<i>Aspergillus tubingensis</i> (n=22)	0.25/0.5	1/≥8	1/2	4/≥8
<i>Aspergillus welwitschiae</i> (n=21)	0.25/0.5	1/2	0.5/1	2/2
<i>Aspergillus calidoustus</i> (n=20)	≥8/≥8	≥8/≥8	4/8	2/4
<i>Aspergillus terreus</i> (n=27)	0.06/0.12	0.06/0.125	0.5/1	0.5/1
<i>Fusarium solani complex</i> (n=106)	≥8/≥8	≥8/≥8	8/≥8	≥8/≥8
<i>Fusarium oxysporum complex</i> (n=77)	2/≥8	≥8/≥8	2/4	≥8/≥8
<i>Fusarium proliferatum</i> (n=65)	2/≥8	≥8/≥8	4/8	≥8/≥8
<i>Fusarium verticillioides</i> (n=7)	0.25/-	16/-	1/-	≥8/-
<i>Fusarium dimerum complex</i> (n=19)	≥8/≥8	≥8/≥8	2/4	≥8/≥8
<i>Purpureocillium lilacinum</i> (n=30)	0.25/0.5	4/≥8	0.25/0.5	1/4
<i>Trichoderma longibrachiatum</i> (n=9)	1/-	≥8/-	0.5/-	≥8/-
<i>Phaeoacremonium parasiticum</i> (n=17)	0.25/0.5	≥8/≥8	0.25/0.5	2/4
<i>Scedosporium apiospermum</i> (n=56)	0.5/1	0.5/8	0.25/0.5	2/4
<i>Scedosporium boydii</i> (n=16)	0.25/1	1/≥8	0.25/0.5	2/≥8
<i>Lomentospora prolificans</i> (n=16)	≥8/≥8	≥8/≥8	8/≥8	≥8/≥8
<i>Microascus cirrosus</i> (n=5)	2/-	≥8/≥8	4/≥8	≥8/≥8
<i>Scopulariopsis brevicaulis</i> (n=9)	≥8/-	≥8/-	8/-	4/-
<i>Alternaria alternata complex</i> (n=12)	0.25/0.5	1/8	2/4	4/8
<i>Exophiala dermatitidis</i> (n=10)	0.03/0.25	0.06/0.5	0.25/4	0.5/4
<i>Fonsecaea pedrosoi</i> (n=5)	0.06/-	0.125/-	0.06/-	0.125/-
<i>Fonsecaea monophora</i> (n=8)	≤0.01/-	0.015/-	0.06/-	0.03/-
<i>Fonsecaea nubica</i> (n=12)	0.03/0.12	0.015/0.25	0.06/0.12	0.06/0.25

Nous avons également recherché des mutations dans le gène CYP51A pour plus de 30 isolats d'*A. fumigatus*. Dans la Figure 13 sont représentées les principales substitutions non synonymes décrites pour le gène cible et son promoteur. Les souches résistantes aux azolés portent des mutations ponctuelles dans la région codante soit en combinaison ou en absence de répétitions en tandem dans le promoteur. Les mécanismes pouvant expliquer la résistance sont connus pour un certain nombre des mutations (Tableau 9).

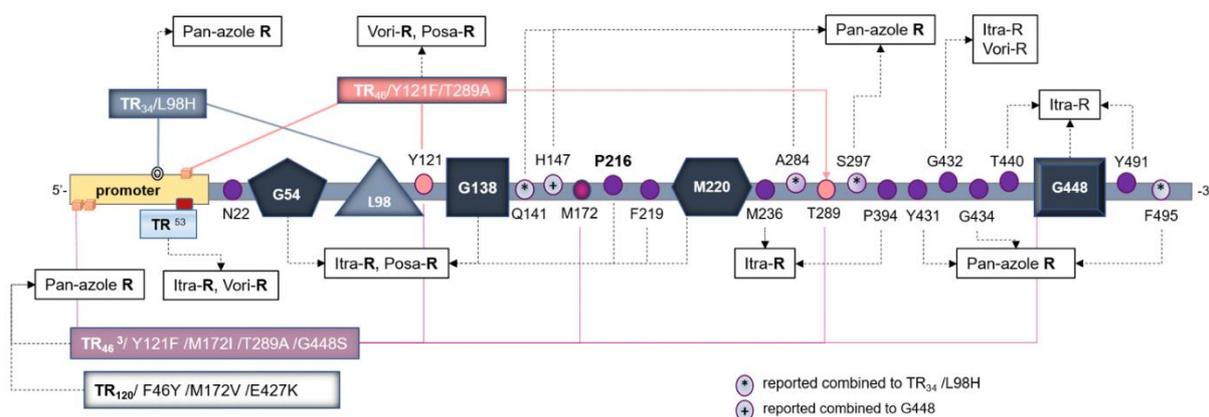


Figure 13: Schéma du gène *Cyp51A* d'*A. fumigatus* et principales mutations  
 Les régions hotspot sont indiquées : G54, L98, G138, M220, G448. Les constructions génétiques ont démontré que ces mutations peuvent être responsables d'un phénotype de résistance aux antifongiques azolés (modifié d'Alanio A. et al.)

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

Tableau 9: Mutations dans le gène *Cyp51A* d'*Aspergillus fumigatus*

Mutations <sup>35,36,37</sup>	Mécanisme	
<b>TR<sub>34</sub>/L98H *</b>	Hyper expression de la protéine cible et une affinité d'interaction réduite par modification structural du canal d'accès au ligand	
<b>TR<sub>46</sub>/Y121F/T289A</b>		
<b>TR<sub>46</sub>/Y121F/M172I/T289A/G448S</b>		
<b>TR<sub>120</sub>/F46Y/M172V/E427K</b>	Acquisition de novo du TR après traitement prolongé aux azolés	
<b>TR<sub>53</sub></b>	Mutation décrite pour des souches résistantes. Mécanisme non connu	
<b>G54W/R/E/V/A/D</b>	<b>M220T/V/I/K/R/L</b>	Mutations décrites pour des souches résistantes (par affinité d'interaction réduite).
<b>G138C/S</b>	<b>G448S</b>	
<b>P216</b>	<b>H147Y</b>	
<b>I246M</b>	<b>M263I</b>	
<b>F46Y/M172V/N248T/D255E/E427K</b>		Polymorphismes décrits pour des souches sensibles aux azolés
<b>N22D</b>	<b>Y431S/C</b>	Polymorphismes nucléotidiques décrits occasionnellement pour des souches résistantes aux azolés
<b>F165L</b>	<b>G432S/A</b>	
<b>F219S/C/I</b>	<b>G434C</b>	
<b>I242V</b>	<b>T440</b>	
<b>D262Y</b>	<b>N479D</b>	
<b>N248K</b>	<b>Y491H</b>	
<b>A284T</b>		

### 3.1.8. Bilan du diagnostic moléculaire

La détection d'acides nucléiques à visée diagnostique pose des problèmes différents selon que l'on s'intéresse à des biopsies diagnostiques ou à d'autres prélèvements (sanguins, urinaires, ou respiratoires). Dans le premier cas, il s'agit de permettre l'identification d'un élément fongique vu en microscopie en association avec

<sup>35</sup> 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

<sup>36</sup> Van der Torre M. et al. (2020) Detecting Azole-Antifungal Resistance in *Aspergillus fumigatus* by Pyrosequencing. *J. Fungi* (Basel), 6, 12; doi:10.3390/jof6010012

<sup>37</sup> 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.

une culture négative. Dans le deuxième cas, il s'agit de détecter un champignon dans un prélèvement non invasif en vue de réaliser un diagnostic d'infection fongique invasive.

### Diagnostic sur tissu fixé

Les expertises anatomopathologiques pour lesquelles aucune souche fongique n'a été isolée sont prises en charge dans le cadre du CNRMA mais dans le laboratoire de Parasitologie-Mycologie de l'hôpital Saint-Louis (A. Alanio, S. Bretagne) en l'absence de parcours diagnostic satisfaisant dans les locaux à l'Institut Pasteur.

Les identifications moléculaires y sont réalisées après extraction d'ADN à partir de tissu paraffiné (3 à 10 coupes faites à partir d'un bloc fourni par les correspondants) par une méthode basée sur purification d'ADN à partir d'un automate d'extraction dédié. Les régions ITS sont ensuite amplifiées puis séquencées. Les régions ITS1 et ITS2 sont analysées à partir des amorces ITS1-ITS2 ou ITS1-ITS5, ITS3-ITS4 et ITS7f-ITS4. Les séquences obtenues sont ensuite analysées dans les bases de données optimisées et contrôlées comme MycoBank (CBS) et Institut Pasteur FungiBank.

Un total de 165 échantillons a ainsi été analysé permettant une identification fongique dans 34% des cas (56 échantillons positifs). Il s'agissait entre autres d'infections par des champignons pathogènes rares en France comme *Paracoccidioides brasiliensis* (1 cas pour lequel la re-lecture des lames anatomopathologiques a rétrospectivement permis de voir les éléments fongiques typiques), *Basidiobolus* spp., ou *Coccidioides immitis* (1 cas de chaque), mais également d'autres pathogènes fongiques plus fréquents comme *Alternaria infectoria* (2 cas) et *Candida albicans* (1 cas).

### Diagnostic sur prélèvements sanguins, urinaires ou respiratoires

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. Ces tests pratiqués en routine concernent l'aspergillose invasive, la pneumocystose, les mucormycoses, et l'histoplasmosse. Pour l'aspergillose invasive et la pneumocystose, l'immense majorité des laboratoires hospitaliers réalisent ces examens. La question est donc l'harmonisation des pratiques. Ces demandes ont principalement concerné les diagnostics d'histoplasmosse.

Le diagnostic d'histoplasmosse a donc été possible à partir de prélèvement invasifs (biopsies de tissu pathologique), superficiel (ex. écouvillon cutané/buccal, etc) et à partir de sang prélevé sur anticoagulant (120 prélèvements de 66 patients ont été détectés positifs sur 1976 tests réalisés chez 1415 patients). Les données ont été

publiées<sup>38</sup> et la PCR développée rendue publique et en cours d'évaluation à travers un programme de validation de contrôle externe européen (Dr Dunja Wilmes, Berlin).

Travaux de recherche en lien direct avec l'activité d'expertise du CNR

### 3.1.9. Phylogénie - Taxonomie - Identification des champignons

#### ISHAM ITS database

Le CNRMA a fourni les séquences de 227 espèces fongiques (93 filamenteux et 134 levures) pour implémenter la base de données "ISHAM ITSdatabase" hébergée à l'université de Sydney (<http://its.mycologylab.org/>). Une publication correspond à cet important travail collaboratif international<sup>39</sup>.

Le CNRMA a aussi participé à un groupe international d'experts en taxonomie fongique. L'objectif était de rechercher des régions géniques et donc des amorces permettant de trouver des codes-barres supplémentaires s'ajoutant aux ITS reconnus comme code barre universel pour le règne des champignons. Le travail a permis d'analyser plus de 1500 espèces et près de 20000 amplicons après sélection de 8 marqueurs potentiels (régions D1/D2 ; régions ITS1/ITS2 ; une partie de la  $\beta$ -tubulin II (TUB2); la  $\gamma$ -actine (ACT); le translation elongation factor 1- $\alpha$  (TEF1 $\alpha$ ); et la plus grande sous-unité de la RNA-polymerase II (RPB2). La conclusion était que TEF1 $\alpha$  permet de générer un deuxième code barre de résolution potentiellement supérieure à celle de ITS<sup>40</sup>.

#### Étude européenne sur la diversité de coelomycètes responsables des infections chez l'homme

En continuité du travail réalisé sur les infections cutanées et sous-cutanées par les coelomycètes en France<sup>41</sup>, une collaboration avec le Pr. Cano de l'Universitat Rovira i Virgili à Reus, Espagne été établie pour participer à l'étude européenne sur la diversité phylogénétique des coelomycètes d'intérêt médical.

Ces organismes sont souvent responsables des phaeohyphomycoses cutanées. Les coelomycètes sont un groupe hétérogène d'organismes qui appartient à divers ordres taxonomiques et qui sont difficilement identifiables par morphologie, ayant la particularité de produire des « conidiomata » (pycnides, acervules, sporodochia) en culture.

Récemment, l'étude sur 230 souches de coelomycètes isolés des mycoses superficielles conduite aux États Unis<sup>42</sup> a montré une majorité de souches appartenant

<sup>38</sup> Alanio A, Gits-Muselli M, Lanternier F, et al. Evaluation of a new *Histoplasma* spp. reverse transcriptase quantitative PCR assay. *J Mol Diagn*. Published online 2021.

<sup>39</sup> Irinyi L, et al. ISHAM-ITS reference DNA barcoding database - the quality controlled standard tool for routine identification of human and animal pathogenic fungi. *Med Mycol*. 2015;001-25

<sup>40</sup> Stielow JB et al. One fungus, which genes? Development and assessment of universal primers for potential secondary fungal DNA barcodes. *Persoonia*. 2015;35:242-63

<sup>41</sup> Guégan S, Garcia-Hermoso D, Sitbon K, Ahmed S, Moguelet P, Dromer F, Lortholary O. 2016. Ten-Year Experience of Cutaneous and/or Subcutaneous Infections Due to Coelomycetes in France. *Open Forum Infect Dis* 3:ofw106.

<sup>42</sup> Valenzuela-Lopez N, Sutton DA, Cano-Lira JF, Paredes K, Wiederhold N, Guarro J, Stchigel AM. 2017. Coelomycetous Fungi in the Clinical Setting: Morphological Convergence and Cryptic Diversity. *J Clin Microbiol* 55:552-567

à l'ordre de *Pleosporales* avec *Neoscytalidium dimidiatum* comme espèce la plus fréquente.

Ce travail européen a donc impliqué deux centres de référence en mycologie : l'Instituto de Salud Carlos III (Madrid) et le CNRMA. Nous avons réalisé l'analyse morphologique et moléculaire (séquençage de la région D1/D2 de la sous unité 28S de l'ADN ribosomique) de 97 souches récupérées entre 2005 et 2015 et isolées principalement de lésions superficielles (peau 44% ; œil 27% ; phanères 18% ; sinus 2%) et des sites profondes (os 4% ; sang 2% et un isolat pour LCR, moelle osseuse et poumon respectivement).

Outre le fait d'avoir identifié une majorité de souches appartenant à l'ordre de *Pleosporales*, comme décrit auparavant dans la littérature, notre travail a décelé d'autres espèces appartenant aux *Botryosphaerales*, *Diaporthales* et *Glomerellales*. Il s'agit de l'étude la plus large en termes de taxonomie sur ce type de champignons. De plus, de nombreux isolats, non identifiables au niveau d'espèce, seront inclus dans un travail futur pour la description de nouvelles espèces.

### Implication du pathogène kératinophile *Nannizziopsis obscura* dans des infections invasives chez des patients originaires d'Afrique de l'Ouest

L'ordre fongique des *Onygenales* et la famille de *Nannizziopsiaceae* inclut le genre *Nannizziopsis*. Ce genre regroupe des champignons kératinophiles responsables des infections superficielles souvent mortelles chez plusieurs espèces de reptiles (lézards, geckos, caméléons, iguanes, etc). Il existe actuellement douze espèces et seulement 3 (*N. hominis*, *N. infrequens* et *N. obscura*) ont été impliquées dans des infections chez l'homme.

Depuis 2017 nous avons reçu et expertisé plusieurs souches de *Nannizziopsis* responsables d'infection invasive. L'espèce identifiée, *N. obscura*, est rarement décrite sur des infections fongiques chez l'homme. Les manifestations cliniques restent peu spécifiques en comparaison aux autres maladies liées aux champignons. Ceci nous a conduits à analyser en détail ces isolats et les données cliniques associés (discussion initiée par S. Bretagne, Dir. Adj. CNRMA).

Nous savons que la caractérisation morphologique de *Nannizziopsis* au niveau de l'espèce est difficile. En effet, l'aspect microscopique de *Nannizziopsis* (présence d'arthrospores, aleurioconidies, etc) peut être confondu avec celui des genres *Trichophyton*, *Chrysosporium*, *Trichosporon* entre autres. L'identification moléculaire est aussi compliquée d'autant plus que les données moléculaires sont rares. Dans l'objectif de savoir si le CNRMA avait reçu dans le passé des souches du genre *Nannizziopsis*, nous avons réalisé une recherche sur notre base des champignons filamenteux qui remonte à 2003. Deux souches reçues en 2004 et 2009 ont pu être classé après réidentification polyphasique comme *Nannizziopsis obscura*.

Finalement nous avons recueilli 9 cas d'infection invasive à *Nannizziopsis* et compilé, en accord avec les correspondants hospitaliers, les données cliniques détaillées pour chaque dossier. De plus on a révisé les 5 cas publiés dans la littérature. La caractérisation phénotypique couplé avec l'analyse multilocus (ITS, 28S, des

régions partielles des gènes de l'actine et facteur d'élongation-1 alpha) a été réalisé pour toutes les souches cliniques et la souche type de *N. obscura*. La phylogénie générée après concaténation a montré le groupement de l'ensemble des souches cliniques dans le clade hétérogène qui inclue la souche type de *N. obscura*. Ce clade diffère de celui des souches responsables des infections chez les reptiles. Nous pouvons dire pour le moment que les souches appartiennent au complexe d'espèces *Nannizziopsis obscura* en attendant des études taxonomiques ultérieures.<sup>43</sup>

### Surveillance prospective des fusarioses invasives en France

Les espèces du genre *Fusarium* sont impliquées dans des infections chez l'homme et chez l'animal. Elles provoquent généralement des kératites mais peuvent provoquer des infections invasives. Au moins six complexes d'espèces ont été incriminés dans ce genre d'infection. La relation entre le complexe d'espèces de *Fusarium* et la présentation clinique est souvent associée à une population spécifique. L'objectif consiste à déceler l'association entre les manifestations cliniques et les différentes espèces de *Fusarium*. Nous sommes en train de décrire plus de 500 cas des fusarioses déclarées entre 2005 et 2018 via RESSIF. Le séquençage de deux loci d'intérêt (TEF1 $\alpha$  et RPB2 (RNA polymérase II)) et l'analyse phylogénétique est en cours de finalisation. Des résultats préliminaires ont montré qu'il existe des différences majeures entre les fusarioses oculaires et les profondes particulièrement en termes de pathologie sous-jacente ou de voie de contamination.

### 3.1.10. Amélioration des techniques de diagnostic

#### Mucormycose

En raison des difficultés d'identification des *Mucorales* dans les prélèvements cliniques, nous avons mis à profit la disponibilité à l'hôpital St Louis d'un nouvel appareil de séquençage (Plex ID) basé sur l'analyse des produits d'amplification par spectrométrie de masse (PCR electrospray-ionization mass spectrometry) et la collection d'échantillons disponibles adossée à l'étude Ambyzygo. Les isolats correspondants, quand la culture avait été positive, avaient tous été re-identifiées au CNRMA. L'étude a montré une excellente sensibilité et spécificité du Plex-ID, en particulier par rapport aux autres méthodes publiées. En particulier, le Plex-ID est supérieur aux méthodes publiées utilisant les amplifications ITS<sup>44</sup>.

Nous avons contribué à l'optimisation et à l'évaluation d'une technique de détection de l'ADN fongique pour le diagnostic et le monitoring des patients atteints

---

<sup>43</sup> Garcia-Hermoso D, Hamane S, Fekkar A, Jabet A, Denis B, Siguiet M, Galeazzi G, Haddad E, Brun S, Vidal V, Nevez G, Le Berre R, Gits-Muselli M, Lanternier F, Bretagne S. Emergence of invasive infections with *Nannizziopsis obscura* species complex in West African patients: Nine new cases. *Emerg Infect Dis.* 2020;26: 2022

<sup>44</sup> Alanio A, *et al.* Molecular identification of *Mucorales* in human tissues: contribution of PCR electrospray-ionization mass spectrometry. *Clin Microbiol Infect.* 2015 [Epub ahead of print]

de mucormycose<sup>45</sup> étude réalisée à l'initiative de L. Millon (Besançon) et « utilisant » pour la première fois RESSIF.

## Aspergillose

En parallèle des méthodes moléculaires, le CNRMA poursuit ses investigations sur d'autres méthodes diagnostiques. La recherche du galactomannane (GM) sérique par un test ELISA (*Platelia Aspergillus fumigatus*, Bio-Rad) est un élément majeur du diagnostic et du suivi thérapeutique des aspergilloses invasives. Ce test est connu pour des faux positifs. Cependant, ces faux positifs sont d'origines diverses, soit techniques (due à l'extraction du galactomannane ou à la réaction ELISA elle-même), soit due au sérum lui-même (*e.g.* contamination d'antibiotiques perfusés par du GM), soit liée à la présence d'un autre champignon produisant du galactomannane. Nous avons entrepris une étude sur 550 sérums consécutifs en comparant les résultats de routine avec ceux obtenus par un technicien Bio-Rad dédié à cette étude. Nous montrons que le taux de positifs non reproductibles opérationnels représente jusqu'à 30% des tests positifs, justifiant amplement la recommandation du fabricant de re-tester le même prélèvement, ou de tester un deuxième prélèvement dans les plus brefs délais pour éviter des investigations ou des traitements inutiles. Cette étude permet également de clore la question de la conservation du GM à -20°C. Certaines études rapportaient la diminution du GM après passage à -20°C, alors que les sérums n'avaient pas été contrôlés avant stockage. Nous montrons ici clairement que la conservation à -20°C ne modifie pas le taux de GM, pour autant que seuls les sérums confirmés positifs soient considérés et que les faux positifs opérationnels soient exclus<sup>46</sup>. D'autres études pour élucider cette fois les faux positifs dus au sérum sont en cours.

A la suite de la publication du protocole d'étude du voriconazole dans l'aspergillose invasive, nous avons participé à une analyse de l'évolution du galactomannane sérique comme facteur prédictif du pronostic de l'aspergillose invasive. Une réduction de plus de 35% de l'index du galactomannane sérique entre le jour du diagnostic et J7 était prédictive d'une réponse clinique satisfaisante<sup>47</sup>.

## Pneumocystose

La surveillance de la pneumocystose est incluse dans le nouveau cahier des charges du CNRMA. La difficulté du recensement réside dans les modifications des outils diagnostiques de ces dernières années. L'apparition de la PCR quantitative (qPCR) permet un diagnostic fiable, en éliminant virtuellement les faux positifs, et une quantification de la charge fongique. Si les fortes charges correspondent bien aux anciennes définitions de la pneumocystose avec microscopie positive, la plus forte

---

<sup>45</sup> Millon L et al. Early diagnosis and monitoring of mucormycosis by detection of circulating DNA in serum: retrospective analysis of 44 cases collected through the French Surveillance Network of Invasive Fungal Infections (RESSIF). Clin Microbiol Infect. 2015 Dec 17 PMID: 26706615

<sup>46</sup> Guigue N, et al. Importance of operational factors in the reproducibility of *Aspergillus* galactomannan enzyme immune assay, Plos One (in press), + e-poster 54th ICAAC Washington, Sept 2014 (e-poster#1863).

<sup>47</sup> Chai LY et al. Early serum galactomannan trend as a predictor of outcome of invasive aspergillosis. J. Clin. Microbiol. 2012; 50:2330

sensibilité de la qPCR confirme la présence de *Pneumocystis jirovecii* dans des contextes cliniques plus divers que la pneumocystose du patient infecté par le VIH. Le problème actuel est donc l'interprétation de la qPCR avec microscopie négative sachant que les patients non-VIH présentent des symptômes pulmonaires marqués avec des charges fongiques beaucoup plus faibles que les patients VIH positifs<sup>48</sup>. Un contrôle de qualité européen organisé par A. Alanio a permis de mettre en évidence une extrême variabilité de la rentabilité diagnostique des PCR utilisées, études réalisées dans le cadre du groupe de travail Fungal PCR Initiative de l'ISHAM<sup>49,50</sup>. Un groupe de travail spécifique pour aboutir à des définitions communes sont nécessaires dans l'espoir d'harmoniser les seuils de positivité entre les laboratoires en sachant que des solutions commerciales meilleures que les autres ont d'ores et déjà été identifiées<sup>42,51</sup>.

### 3.1.11. Evaluation et développement d'outils de diagnostic

#### Intérêt du beta-D-glucane dans le diagnostic des IFI

Les recommandations EORTC/MSG publiée en 2019 ont clarifié l'intérêt du BDG dans le diagnostic des IFI par le retrait du BDG en tant que critère mycologique pour le diagnostic des IFI<sup>52</sup>. Ceci est basé sur les performances inférieures ou identiques du BDG au GM dans le contexte des aspergilloses ou aux hémocultures dans le contexte des candidémies. L'apport du BDG reste centré sur le diagnostic des pneumocystoses quand un prélèvement respiratoire de qualité (lavage bronchoalvéolaire n'est pas possible pour le patient). A noter qu'il existe de plus en plus de rapport de cas de pneumocystose chez le patient VIH négatif avec des BDG négatif. La sensibilité et la VPN du BDG chez le patient non-VIH est donc limitée.

Nous avons participé à une méta-analyse de six cohortes<sup>53</sup> évaluant la contribution de la détection du bêta-D-glucane pour le diagnostic d'infections fongiques invasives chez des patients atteints d'hémopathies malignes (1771 adultes avec 414 épisodes d'infections fongiques invasives). En présence de deux tests consécutifs positifs, la sensibilité de la détection de cet antigène était médiocre

<sup>48</sup> Alanio A, Real-time PCR assay-based strategy for differentiation between active *Pneumocystis jirovecii* pneumonia and colonization in immunocompromised patients. *Clin Microbiol Infect.* 2011;17(10):1531-1537.

<sup>49</sup> Dellièvre S, Gits-Muselli M, White PL, Mengoli C, Bretagne S, Alanio A. Quantification of *Pneumocystis jirovecii*: Cross-Platform Comparison of One qPCR Assay with Leading Platforms and Six Master Mixes. *J Fungi Basel Switz.* 2019;6(1):9.

<sup>50</sup> Gits-Muselli M, White PL, Mengoli C, 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.* 2019;58(6):779-788.

<sup>51</sup> Dellièvre S, Hamane S, Aissaoui N, Gits-Muselli M, Bretagne S, Alanio A. Increased sensitivity of a new commercial reverse transcriptase-quantitative PCR for the detection of *Pneumocystis jirovecii* in respiratory specimens. *Med Mycol.* 2021;59(8):myab029.

<sup>52</sup> Donnelly JP, Chen SC, Kauffman CA, Steinbach WJ, Baddley JW, Verweij PE, Clancy CJ, Wingard JR, Lockhart SR, Groll AH, Sorrell TC, Bassetti M, Akan H, Alexander BD, Andes D, Azoulay E, Bialek R, Bradsher RW, Bretagne S, Calandra T, Caliendo AM, Castagnola E, Cruciani M, Cuenca-Estrella M, Decker CF, Desai SR, Fisher B, Harrison T, Heussel CP, Jensen HE, Kibbler CC, Kontoyiannis DP, Kullberg B-J, Lagrou K, Lamoth F, Lehrnbecher T, Loeffler J, Lortholary O, Maertens J, Marchetti O, Marr KA, Masur H, Meis JF, Morrissey CO, Nucci M, Ostrosky-Zeichner L, Pagano L, Patterson TF, Perfect JR, Racil Z, Roilides E, Ruhnke M, Prokop CS, Shoham S, Slavin MA, Stevens DA, Thompson GR, Vazquez JA, Viscoli C, Walsh TJ, Warris A, Wheat LJ, White PL, Zaoutis TE, Pappas PG. 2019. Revision and Update of the Consensus Definitions of Invasive Fungal Disease From the European Organization for Research and Treatment of Cancer and the Mycoses Study Group Education and Research Consortium. *Clin Infect Dis* 71:1367–1376.

<sup>53</sup> Lamoth F et al. Beta-Glucan antigenemia assay for the diagnosis of invasive fungal infections in patients with hematological malignancies: a systematic review and meta-analysis of cohort studies from the Third European Conference on Infections in Leukemia (ECIL-3). *Clin. Infect. Dis.* 2012; 54:633

(49,6%), mais la spécificité, la valeur prédictive positive et négative étaient respectivement de 98,9%, 83,5% et 94,6%. Une évaluation de l'intérêt du BDG est en cours dans le contexte de l'ECIL-10 avec l'analyse bibliographique des performances du BDG dans les fusarioses et les scedosporioses.

### Biomarqueurs pour le diagnostic d'aspergillose invasive

Une mise au point sur les autres tests sériques (galactomanane et détection d'ADN) pour le diagnostic de l'aspergillose invasive a été réalisée à l'occasion de la réunion ECIL3. Il est maintenant défini que la PCR quantitative permettant la détection d'ADN d'*Aspergillus* fait partie intégrante des critères mycologiques définissant les aspergilloses invasives probables. Néanmoins, des travaux de standardisation dans le contexte du groupe FPCRI (ISHAM) sont toujours en cours pour préciser et évaluer les procédures optimales et requise pour une performance maximale de ces outils. Cela passe par des propositions de recommandations basées sur des contrôles de qualité organisés dans plusieurs pays européens<sup>54</sup>.

Nous participons également ponctuellement à la validation des marqueurs biologiques en collaboration avec certaines équipes demandant notre expertise<sup>55</sup>.

#### Développement d'un test rapide de diagnostic de la cryptococcose

Notre expertise sur la cryptococcose a été sollicitée par la société BioSynex qui a développé un test de détection semi-quantitatif rapide (type bandelettes) en utilisant un anticorps monoclonal développé par l'équipe d'Arturo Casadevall (Albert Einstein College of Medicine, Bronx, NY). Le test BioSynex®CryptoPS permet de détecter l'antigène capsulaire dans les liquides biologiques (sérum et LCS) et de déterminer en une seule analyse si le titre antigénique sérique est très élevé faisant suspecter une infection sévère (méningo-encéphalite, infection disséminée ...). Ce test pourrait largement aussi contribuer au diagnostic des cryptococcoses latentes dans les pays où l'incidence de la cryptococcose est très élevée, ceci afin d'instituer un traitement préemptif le plus rapidement possible (étude pré-CASA,

§3.3.4.). Les premières évaluations dans des études rétrospectives sont très encourageantes et le test est maintenant en cours d'évaluation dans les pays où l'incidence de la cryptococcose est très élevée et des moyens limités justifient un outil de ce type. Une évaluation précise de ce test est en cours à l'hôpital Saint-Louis à travers la mise en place de procédures techniques spécifiques permettant d'optimiser les performances du test en particulier sur le sérum, dont il a été observé un taux de faux positif assez anormal chez les patients asymptomatique qui n'ont pas développé de cryptococcose par la suite.

<sup>54</sup> White PL et al. Evaluation of *Aspergillus* PCR protocols for testing serum specimens J Clin Microbiol. 2011;49:3842

<sup>55</sup> Saliba F et al. Outcomes associated with amphotericin B lipid complex (ABLC) prophylaxis in high-risk liver transplant patients. Med Mycol. 2013;51:155.

## Diagnostic moléculaire des mucormycoses

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<sup>56</sup>.

## Diagnostic moléculaire des histoplasmoses

Nous avons publié récemment les résultats d'une étude nationale évaluant l'utilisation d'une PCR *Histoplasma* pour le diagnostic de l'histoplasmosse en France. A partir de l'étude de 907 patients et 1319 échantillons suspects d'histoplasmosse, 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 prélèvement sanguin, nous atteignons une sensibilité diagnostique de 92.3% chez les patients immunodéprimés avec maladie disséminée<sup>57</sup>.

### 3.1.12. Études concernant la pneumocystose

Le CNRMA participe à la surveillance de la pneumocystose, deuxième infection fongique rapportée après les candidémies. Cette infection est de diagnostic difficile chez les patients non-VIH, qui présentent des tableaux sévères malgré des charges fongiques faibles dans les voies respiratoires<sup>58</sup>. Les recommandations du 5th ECIL ([European Conference on Infections in Leukaemia](#)) coordonnées par A. Alanio et S. Bretagne proposent l'utilisation des techniques de PCR quantitatives (qPCR) pour le diagnostic<sup>59</sup>. De nombreuses trousse commerciales sont disponibles. Une comparaison de 10 protocoles incluant huit trousse commerciales a démontré une plus grande sensibilité des tests techniques de PCR utilisant les acides nucléiques totaux avec une étape de transcription reverse. La cible mitochondriale mtSSU est plus sensible que la cible usuelle mtLSU, elle-même plus sensible que la cible nucléaire MSG (Major Surface Glycoprotein)**Erreur ! Signet non défini.**

Pour distinguer entre portage et infection active qui reste un problème non résolu, une étude de validation est en cours explorant l'intérêt du ratio de différents gènes. Une valeur <6 du ratio d'expression des gènes mtSSU et mtLSU est apparue comme statistiquement corrélée aux formes actives de la maladie<sup>60</sup>.

---

<sup>56</sup> 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

<sup>57</sup> Alanio A et al. Evaluation of a New *Histoplasma* spp. Quantitative RT-PCR Assay. *J Mol Diagn.* 2021.

<sup>58</sup> A. Alanio, S. Bretagne. Review: *Pneumocystis jirovecii* detection in asymptomatic patients: what does its natural history tell us? *F1000 research* 2017, 6.

<sup>59</sup> Alanio A et al. on behalf of ECIL-5, EBMT, EORTC, ICHS, and ELN. ECIL guidelines for treatment of *Pneumocystis jirovecii* pneumonia in patients with haematological malignancies and stem cell transplant recipients. *J Antimicrob Chemother.* 2016; 71(9):2386-96

<sup>60</sup> M. Gits-Muselli, C. Valero, S. Hamane, N. Guigue, S. Bretagne, Alanio A. Mitochondrial *Pneumocystis jirovecii* gene expression: a promising tool for diagnosis. Oral presentation. 27th ECCMID (Avril 2017, Vienna).

Pour étudier la transmission de *P. jirovecii*, des marqueurs microsatellites avaient été développés<sup>61</sup> et un premier travail sur l'hôpital St Louis a démontré une transmission entre patients greffés rénaux. Une deuxième étude dans le service d'hématologie de l'hôpital Henri Mondor utilisant les marqueurs microsatellites a confirmé la transmission entre patients<sup>62</sup>. Ces mêmes marqueurs ont été utilisés pour un travail collaboratif européen<sup>63</sup>. Seize centres européens (dont 5 français) se sont joints à cette analyse de 249 prélèvements respiratoires de patients présentant une pneumocystose. Cette étude a montré une grande variabilité des génotypes, mais toujours avec une tendance à un enrichissement dans certaines populations de greffés d'organe.

Ceci confirme la grande contagiosité de *P. jirovecii*, ce qui doit être pris en compte dans les politiques de prévention chez les patients immunodéprimés. Les méthodes développées par le CNRMA tant au niveau du diagnostic positif que du génotypage, sont des outils performants pour aborder ces questions.

*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<sup>64</sup>.

Ces données montrant la supériorité de la cible mtSSU et de la rtqPCR ont été validées 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<sup>65</sup>.

Le deuxième élément du diagnostic de la pneumocystose repose sur la détection du (1,3)- $\beta$ -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

---

<sup>61</sup> Gits-Muselli, M. *et al.*, 2015. New Short Tandem Repeat-Based Molecular Typing Method for *Pneumocystis jirovecii* Reveals Intrahospital Transmission between Patients from Different Wards. *PLoS one*, 10(5).e0125763.

<sup>62</sup> Robin, C. *et al.*, 2017. Molecular Demonstration of a *Pneumocystis* Outbreak in Stem Cell Transplant Patients: Evidence for Transmission in the Daycare Center. *Frontiers in microbiology*, 8.

<sup>63</sup> Alanio, A. *et al.*, 2017. Diversity of *Pneumocystis jirovecii* Across Europe: A Multicentre Observational Study. *Ebiomedicine*, 22 :155–163.

<sup>64</sup> 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

<sup>65</sup> 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)

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<sup>66</sup>.

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<sup>67</sup>. Des études complémentaires sont nécessaires pour évaluer les performances de ce test à plus grande échelle.

Sur le plan épidémiologique, ce champignon est un des rares à pouvoir être transmis directement d'homme à homme<sup>68</sup>. 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<sup>69</sup>.

## Diagnostic de la pneumocystose

Une première étude <sup>70</sup> a permis de dresser un état des lieux des différents tests de PCR quantitative utilisés pour le diagnostic de la pneumocystose en Europe. Nous avons créé un panel de cinq extraits d'acides nucléiques qui ont été envoyés à 16 laboratoires en Europe. Un total de 20 tests différents de qPCR a pu être analysé par échantillon. Nous avons ainsi montré que la capacité à détecter *P. jirovecii* pouvait varier au maximum de 10.000 fois pour un même échantillon mettant en évidence une grande hétérogénéité dans la façon de faire le diagnostic de pneumocystose par qPCR en Europe. De plus, il a été montré que la méthode donnant les meilleurs résultats étaient basés sur l'amplification d'acides nucléiques totaux et une détection de la cible mtSSU.

La deuxième étude <sup>71</sup> découle de la précédente et avait pour but de montrer quels sont les facteurs techniques qui influençait les résultats de la PCR quantitative. Ainsi nous avons montré que différents thermocycleurs, différentes enzymes de PCR, différentes méthodes influençaient le résultat. Ainsi les méthodes de reverse transcriptase quantitative PCR (one step) étaient les meilleures permettant une

---

<sup>66</sup> Mercier T et al. Variable Correlation between Bronchoalveolar Lavage Fluid Fungal Load and Serum-(1,3)- $\beta$ -d-Glucan in Patients with Pneumocystosis-A Multicenter ECMM Excellence Center Study. *J Fungi* (Basel). 2020 Dec 1;6(4):327

<sup>67</sup> 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.

<sup>68</sup> Dellière S et al. Outbreak-Causing Fungi: *Pneumocystis jirovecii*. *Mycopathologia*. 2020;185(5):783-800.

<sup>69</sup> 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.

<sup>70</sup> Gits-Muselli et al. (2020) The Fungal PCR Initiative's evaluation of in-house and commercial *Pneumocystis jirovecii* qPCR assays: Toward a standard for a diagnostics assay. *Med Mycol*;58(6):779-788

<sup>71</sup> Dellière S et al. (2019) Quantification of *Pneumocystis jirovecii*: Cross-Platform Comparison of One qPCR Assay with Leading Platforms and Six Master Mixes. *J Fungi* Basel Switz;6(1):9

meilleure sensibilité à partir de l'amplification d'acides nucléiques totaux (ARN et ADN) et non seulement à partir d'ADN.

Enfin, une revue de la littérature<sup>72</sup> fait le point sur les épidémies hospitalières dues à *P. jirovecii* et discute les mesures de prophylaxies à mettre en place de façon régulière et dans le cadre de transmission active dans un hôpital.

### 3.1.13. Travaux sur l'aspergillose invasive

Une étude sur les facteurs associés à la survenue d'une aspergillose invasive après greffe de moëlle<sup>73</sup> résultant de la première collaboration entre le CNRMA à travers et la Société Française de Greffe de Moëlle a été publiée. C'est une étude multicentrique cas contrôle qui a utilisé d'un côté les données mycologiques du réseau SAIF de 2005 à 2010 (Institut Pasteur, Paris) et les données du registre ProMISe de l'European Society for Blood and Marrow Transplantation. Ainsi 185 cas d'aspergillose prouvées ou probables ont été appariés à 651 contrôles. La première observation est le décalage vers des temps tardifs de la survenue de l'aspergillose avec 63% des cas survenant à plus de 100 jours après la greffe. Ces aspergilloses tardives sont associées à la survenue de GVHD aiguë de grade II, la rechute de la maladie hématologique, et la survenue d'une neutropénie. Ainsi, bien que les prises en charge thérapeutiques des patients allogreffés de moëlle aient été largement modifiées au milieu des années 2000, ce sont toujours les facteurs post greffe qui restent prépondérants pour la survenue d'une aspergillose invasive.

La participation à l'étude sur la physiopathologie des infections fongiques au cours des déficits immunitaires primitifs a permis de se focaliser sur l'étude des aspergilloses pulmonaires chez les patients avec déficit en STAT3 et de décrire des formes de type aspergillose chronique et des formes de type ABPA<sup>74</sup>. 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-gamma et IL-17 plus basse chez les patients avec aspergillose<sup>75</sup>. Par ailleurs, certains de ces patients avaient une souche d'*A. fumigatus* résistante aux azolés ce qui compliquait la prise en charge thérapeutique<sup>76</sup>.

---

<sup>72</sup> Dellière S et al. (2019) Outbreak-Causing Fungi: *Pneumocystis jirovecii*. Mycopathologia.;1–18

<sup>73</sup> Robin C et al., SAIF (Surveillance des Aspergilloses Invasives en France) and the SFGM-TC (Société Francophone de Greffe de Moëlle et de Thérapie Cellulaire) Aspergillus Group. (2019) Mainly Post-Transplant Factors Are Associated with Invasive Aspergillosis after Allogeneic Stem Cell Transplantation: A Study from the Surveillance des Aspergilloses Invasives en France and Société Francophone de Greffe de Moëlle et de Thérapie Cellulaire. Biol Blood Marrow Transplant. 25(2):354-361. doi: 10.1016/j.bbmt.2018.09.028. Epub 2018 Sep 27.

<sup>74</sup> Duréault A, colleagues and the French Mycoses Study Group (2019). Spectrum of Pulmonary Aspergillosis in Hyper-IgE Syndrome with Autosomal-Dominant STAT3 Deficiency J Allergy Clin Immunol Pract. 7(6):1986-1995.e3. doi: 10.1016/j.jaip.2019.02.041.

<sup>75</sup> 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.

<sup>76</sup> Danion F. et al. Emergence of azole resistant-Aspergillus fumigatus infections during STAT3-deficiency. J. Med. Microbiol. 2020;69(6):844–9.

Les localisations cérébrales d'aspergilloses sont rares mais de diagnostic et de prise en charge complexe. Nous avons donc réalisé une étude nationale étudiant la présentation clinico-radiologique et le diagnostic mycologique de cette infection ainsi que les facteurs pronostic et le traitement (étude CEREALS). Nous avons inclus 119 cas d'aspergilloses cérébrales. Le facteur de risque le plus fréquent était l'hémopathie maligne (40%) et la transplantation d'organe solide (29%). Le galactomannan était présent dans le sérum de 64% des patients. Dans 75% des cas, au moins un marqueur parmi galactomannan, *Aspergillus* PCR, et  $\beta$ -d-glucan était positif dans le LCS. La mortalité à 6 semaines était de 45%<sup>77</sup>.

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 uniquement, lors de gripes 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<sup>78</sup>.

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<sup>79</sup>.

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

---

<sup>77</sup> Serris A, Benzakoun J, Danion F, Porcher R, Sonnevile R, Wolff M, Kremer S, Letscher-Bru V, Fekkar A, Hekimian G, Pourcher V, Bougnoux ME, Poirée S, Ader F, Persat F, Cotton F, Tattevin P, Gangneux JP, Lelièvre L, Cassaing S, Bonneville F, Houze S, Bretagne S, Herbrecht R, Lortholary O, Naggara O, Lanternier F; CEREAL study group. Cerebral aspergillosis in the era of new antifungals: The CEREALS national cohort study Nationwide CEREBRAL Aspergillosis Lesional study (CEREALS). *J Infect.* 2022 Feb;84(2):227-236. doi: 10.1016/j.jinf.2021.11.014. Epub 2021 Nov 24. PMID: 34838593.

<sup>78</sup> 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.

<sup>79</sup> 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

fondamental mais aussi pratique dans l'optique de développer des tests de détection des anticorps produits lors des infections dues à ces deux espèces<sup>80</sup>.

### 3.1.14. Études concernant les candidoses et autres fongémies à levures Fongémies dues aux espèces fréquentes de *Candida* spp.

Nous avons repris toutes les fongémies dues aux espèces communes de *Candida* spp. notifiées dans l'ODL entre 2002 et 2014, pour analyser les facteurs de risque et l'évolution des candidémies<sup>81</sup>.

Pour les 3417 patients (3336 isolats), les principaux facteurs de risque étaient un cancer solide (34%, du tractus digestif dans 46% des cas), ou une hémopathie (17%, essentiellement lymphome (42%) et leucémie aigüe (33,5%)). Les patients d'hématologie étaient plus jeunes, plus souvent pré-exposés aux antifongiques, plus souvent infectés par *C. tropicalis*, *C. krusei* et *C. kefyr*, et plus souvent traités en première intention par une échinocandine. Comparés aux autres, les patients hospitalisés en réanimation étaient significativement moins souvent infectés par *C. parapsilosis*, avaient plus souvent eu une chirurgie récente, avec une plus importante mortalité globale à J8 et J30. Sur la période considérée, la mortalité globale augmentait chez les patients cancéreux en réanimation. Les patients dont la fongémie était connue mais qui ne recevaient pas de traitement antifongique avaient un risque accru de décéder. Enfin, en utilisant les patients infectés par *C. albicans* comme référence, l'analyse multivariée a permis de démontrer que le risque d'être infecté par une espèce donnée était associé à un ou plusieurs facteurs parmi âge, sexe, type d'hémopathie maligne, l'environnement hospitalier (service de réanimation ou non), statut VIH, et pré-exposition éventuelle aux antifongiques.

Ces résultats démontrent que la prise en compte du contexte (réanimation, pathologie sous-jacente ...), avant même l'identification de l'espèce causale, pourrait améliorer la prise en charge des candidémies.

### Fongémies dues aux levures rares

Nous avons utilisé la base de données de l'ODL pour analyser les fongémies aux levures non fréquentes (càd, toutes celles qui n'étaient pas dues à *Candida albicans*, *Candida glabrata*, *Candida parapsilosis*, *Candida tropicalis* et *Candida krusei*). Ces cas font souvent l'objet de cas cliniques et c'est grâce à la constitution de l'ODL et à la participation active des mycologues qui nous envoient données et souches que ce travail a pu être réalisé. C'est aussi toute la force de l'ODL de centraliser les souches au CNRMA et de permettre d'identifier certaines espèces très rares peu représentées dans les bases de données publiques (MALDI-TOF ou séquences).

Les 338 fongémies dues à ces levures rares (UYS) répertoriées entre octobre 2002 et décembre 2014 ont été comparées aux 1998 fongémies dues à *C. albicans* survenues

<sup>80</sup> 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.

<sup>81</sup> Lortholary, O. et al., 2017. The risk and clinical outcome of candidemia depending on underlying malignancy. *Intensive care medicine*, 43(5), 652–662.

pendant la période, ce qui a permis d'avoir une référence commune à tous pour identifier les paramètres spécifiques de ces infections rares. Les principaux résultats ont été :

- La grande diversité des espèces en cause (n=35 incluant 27 ascomycètes et 8 basidiomycètes) dont 11 avaient des CMI élevées de la caspofungine et 15 du fluconazole.
- L'existence d'une hémopathie maligne et la préexposition aux antifongiques étaient des facteurs indépendants de survenue d'une fongémie à UYS en analyse multivariée.
- Si l'on considérait les espèces individuellement ou par groupe, seules les infections due à *Candida kefyr* et à *Trichosporon* spp. restaient associées aux hémopathies malignes et les infections dues à *Geotrichum* spp. (*M. capitatus* et *S. clavata*) aux leucémies aigües, tandis que les infections dues à *Geotrichum* spp. ou à *Trichosporon* spp. étaient associées à une préexposition à la caspofungine.

Une grande diversité d'espèce peut donc être responsable de fongémies. Les facteurs de risque et le pronostic diffèrent en fonction des espèces, ce qui justifie une identification précise de l'espèce dès la positivité de l'hémoculture<sup>82</sup>.

### Traitement des candidémies sévères.

Les recommandations internationales proposent l'utilisation d'une échinocandine dans le traitement de première intention des candidoses invasives. Nous avons comparé le devenir des patients ayant une candidose invasive en France et hospitalisés en réanimation et inclus dans l'étude AmarCAND2 (835 patients) selon le traitement antifongique reçu (échinocandines ou azolés)<sup>83</sup>. 397 patients ont été sélectionnés, 242 traités par échinocandines et 155 traités par azolés ; 179 en choc septique. Après ajustement sur les variables confondantes, il n'y avait pas d'association significative entre le traitement initial et la mortalité. Il y avait cependant une tendance à un bénéfice des échinocandines en cas de choc septique.

### Traitement des péritonites à *Candida* spp.

L'analyse des pratiques thérapeutiques dans les péritonites à *Candida* en réanimation dans le cadre de l'étude AmarCAND2 ne montre pas d'influence du choix antifongique initial sur la survie à J28<sup>84</sup>. La survenue d'une péritonite à *Candida* liée aux soins influençait le pronostic ; il en était de même pour le délai d'institution du traitement antifongique dans le groupe de pronostic favorable.

---

<sup>82</sup> Bretagne, S. *et al.*, 2017. Predisposing factors and outcome of uncommon yeast species-related fungaemia based on an exhaustive surveillance programme (2002-14). *JAC* 72(6):1784–1793.

<sup>83</sup> Bailly, S. *et al.*, 2017. Impact of echinocandin on prognosis of proven invasive candidiasis in ICU: A post-hoc causal inference model using the AmarCAND2 study. *J Infect* 74(4) :408–417.

<sup>84</sup> Montravers, P. *et al.*, 2017. Antifungal therapy for patients with proven or suspected *Candida* peritonitis: Amarcand2, a prospective cohort study in French intensive care units. *CMI* 23(2), 117.e1–117.e8.

## Candidoses du système nerveux central

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 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)<sup>85</sup>.

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<sup>86</sup>.

## Etude sur les endocardites à *Candida* spp. sur prothèse valvulaire (ESCAPE, 2001-2015)

Les endocardites à *Candida* spp. (PVE-C) sur prothèse valvulaire sont rares et de pronostic redoutable. Les recommandations internationales s'appuient sur des avis

---

<sup>85</sup> Chaussade H et al. Central nervous system candidiasis beyond neonates: Lessons from a nationwide study. *Med Mycol.* 2021;59(3):266-27

<sup>86</sup> 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

d'expert et prônent l'association d'une chirurgie suivie d'un traitement prolongé par triazolé. Quarante-six patients ont été suivis pendant une durée médiane de 9 mois. Quarante-huit pour cent présentaient un antécédent d'endocardite ; 65% étaient nosocomiales ou liées aux soins ; 20% des patients étaient toxicomanes. Quarante et un pour cent ont été opérés. Les patients <66 ans et sans co-morbidité étaient plus souvent confiés au chirurgien (adjusted odds ratios [aORs], 6.80 [95% confidence interval [CI], 1.59-29.13] et 10.92 [1.15-104.06], respectivement). La chirurgie n'était pas associée à une survie meilleure à 6 mois. Les patients qui étaient traités par amphotéricine B liposomale avaient une survie à 6 mois meilleure que ceux traités par échinocandine (aOR, 13.52; 95% CI, 1.03-838.10). Un traitement d'entretien par fluconazole a été prescrit chez 21 patients pour une durée médiane de 13 mois (range, 2-84 mois). Nos données devraient permettre d'actualiser les recommandations actuelles<sup>87</sup>.

### Travaux sur *Candida auris*

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 de quelques souches françaises. Cette étude a permis de valider que les souches françaises appartenaient bien au clade I en provenance du sous-continent Indien<sup>88</sup>. 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<sup>89</sup>.

### 3.1.15. Travaux sur la cryptococcose

#### Etude PreCASA

La méningite à cryptocoque est une cause majeure de mortalité au cours du SIDA en Afrique. La détection de l'antigène cryptococcique est prédictive de la survenue de la méningite chez les patients infectés par le VIH à un stade d'immunodépression avancé et naïfs d'anti-rétroviraux. Le screening systématique de l'antigène cryptococcique suivi d'un traitement préemptif par fluconazole oral est recommandé. Nous avons émis l'hypothèse que l'utilisation d'un test antigénique semi-quantitatif pourrait avoir un impact important.

L'étude a été menée à Yaoundé, Cameroun. Les patients ayant une antigénémie détectable ont eu une ponction lombaire. Une évaluation simultanée du test immunochromatographique IMMY était réalisée avec celle du nouveau LFA Biosynex® CryptoPS test et les deux tests étaient ensuite comparés à un test ELISA commercialisé. La prévalence de l'antigénémie chez 186 adultes était de 7.5% (95%CI:

---

<sup>87</sup> Rivoisy C et al (2018) Prosthetic Valve *Candida* spp. Endocarditis: New Insights Into Long-term Prognosis-The ESCAPE Study. *CID* 66(6):825–832.

<sup>88</sup> 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

<sup>89</sup> Cuomo CA et al. Tracking a Global Threat: a New Genotyping Method for *Candida auris*. *mBio*. 2020 Mar 10;11(2):e00259-20

4.5-12.4). Parmi les patients avec une antigénémie, la prévalence de la méningite était de 45.5% (95%CI : 18.3-75.7). Les tests IMMY et Biosynex CryptoPS étaient très concordants dans le sérum, plasma, et LCS (Kappa : 98.4, 99.5, 100%, respectivement,  $p < 0.001$ ), mais pas dans les urines. En comparaison avec le test ELISA, les spécificités respectives étaient de 96.6 and 98.3%. Avec le test Biosynex CryptoPS, tous les patients avec méningite avaient une bande T2 dans le sérum et aucun en l'absence de méningite. Le titre médian en ELISA était de 160 (IQR : 13.5-718.8) et des titres  $>160$  étaient corrélés à la présence d'une méningite et à la présence d'une bande T2 avec le test Biosynex CryptoPS.

Cette étude permet de penser que le test Biosynex pourrait avoir un intérêt pour identifier rapidement les patients ayant une méningoencéphalite à cryptococoques et donc les orienter vers une prise en charge adaptée à la sévérité de cette infection.

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 entraîner 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<sup>90</sup>.

## Etude ACTA

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'amphotéricine B (AmB) plus flucytosine (5FC), 1 semaine d'AmB et 5FC était associé à une moindre mortalité et 2 semaines par voie orale de fluconazole (FLU) plus 5FC était non-inferieur. Ces données ont été obtenues au Malawi, Zambie, Cameroun, et Tanzanie. 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% intervalle de confiance, 16.3 to 44.1])<sup>91</sup>.

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 conclusion est que l'addition de 5FC est

---

<sup>90</sup> 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

<sup>91</sup> 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.

positive et pourrait réduire significativement la mortalité associée chez les patients séropositifs pour le VIH en Afrique<sup>92</sup>.

Nous avons utilisé les bases MEDLINE, EMBASE, et Web of Science et réalisé une méta-analyse<sup>93</sup> avec effet random pour préciser la prévalence de la détection de l'antigène cryptococcique chez les patients infectés par le VIH et avec une lymphopénie CD4 < 100/mm<sup>3</sup> (31 études ; 35,644 participants). La prévalence de la positivité était de 6% et celle de la méningite latente était de 33% parmi les patients ayant un antigène détecté. L'incidence de la méningite était de 21.4% (95% IC, 11.6%-34.4%) sans fluconazole et de 5.7% (95% CI, 3.0%-9.7%) avec le fluconazole préemptif à la posologie de 800 mg/j. Le taux de mortalité globale était plus élevé chez les CrAg-positifs que chez les CrAg-négatifs (risk ratio, 2.2; 95% CI, 1.7-2.9; P < .001)

L'essai ACTA a démontré qu'en comparaison au traitement de référence de 2 semaines d'amphotéricine B (AmB) plus flucytosine (5FC), 1 semaine d'AmB et 5FC était associé à une moindre mortalité et 2 semaines par voie orale de fluconazole (FLU) plus 5FC était non-inferieur. Ces données ont été obtenues au Malawi, Zambie, Cameroun, et Tanzanie. Une première étude ancillaire<sup>94</sup> a consisté en une analyse coût-efficacité de l'association FLU plus 5FC vs. FLU en Zambie. Les coûts moyens par patient étaient US\$847 (95%CI : 776-927) pour FLU+5FC, et US\$628 (95%CI:557-709) pour FLU. La mortalité à 10 semaines était de 35.1% (95%CI 28.9-41.7) avec FLU+5FC et 53.8% (95%CI: 43.1-64.1) avec FLU. L'adjonction de 5FC au FLU était donc cout-efficace.

Dans l'essai ACTA, les couts par patient étaient US \$1442 pour 2 semaines de FLU oral et 5FC, \$1763 pour une semaine d'AmB et FLU, \$1861 pour une semaine d'AmB et 5FC, \$2125 pour 2 semaines d'AmB et FLU, et \$2285 pour 2 semaines d'AmB et 5FC. Comparée à 2 semaines d'AmB et 5FC, 1 semaine d'AmB et 5FC était moins onéreuse et plus efficace et 2 semaines de FLU et 5FC était moins coûteuse et aussi efficace. Une semaine d'AmB et 5FC et 2 semaines de FLU oral et 5FC sont des traitements coûts efficaces<sup>95</sup>.

### 3.1.16. Travaux sur les mycoses rares

L'activité du CNRMA permet de recenser et d'analyser des infections dues à des pathogènes rares.

---

<sup>92</sup> 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.

<sup>93</sup> Temfack E et al. (2019). Cryptococcal antigen (CrAg) screening and targeted preemptive fluconazole in antiretroviral-naive human immunodeficiency virus-infected adults with CD4 cell counts <100/μL seems promising as a strategy to reduce the burden of cryptococcal meningitis (CM). *Clin Infect Dis.* 68(4):688-698.

<sup>94</sup> Shiri T et al. Addition of flucytosine to fluconazole for the treatment of cryptococcal meningitis in Africa: a multi-country cost-effectiveness analysis. *Clin Infect Dis.* 2019 Feb 28. pii: ciz163. doi: 10.1093/cid/ciz163.

<sup>95</sup> Chen T et al. Healthcare Costs and Life-years Gained From Treatments Within the Advancing Cryptococcal Meningitis Treatment for Africa (ACTA) Trial on Cryptococcal Meningitis: A Comparison of Antifungal Induction Strategies in Sub-Saharan Africa. *Clin Infect Dis.* 2019 Mar 13. pii: ciy971. doi: 10.1093/cid/ciy971.

## *Scedosporium et Lomentospora*

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 apiospermum* 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. Aux vues 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<sup>96</sup>.

## Etude sur les dermatophytoses sévères des patients transplantés d'organe

Nous avons repris sur la période 2010 à 2016, les patients qui avaient développé une dermatophytose sévère au décours d'une transplantation d'organe en France. Nous avons ainsi inclus 12 patients dont 10 transplantés rénaux. La plupart avaient présenté des signes de dermatophytose superficielle avant la survenue d'une atteinte sévère. Neuf patients avaient une atteinte invasive et trois une atteinte extensive, huit présentaient des nodules des membres inférieurs. Aucun ne présentait d'atteinte extra cutanée. *Trichophyton rubrum* était isolé dans 11 cas. La plupart des patients ont reçu de la terbinafine (n=7) et trois du posaconazole. Une réponse complète était obtenue après 2.5 mois dans les formes extensives et 7.5 mois dans les formes invasives<sup>97</sup>.

## 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 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<sup>98</sup>.

<sup>96</sup> Bronnimann D et al. Scedosporiosis/lomentosporiosis observational study (SOS): Clinical significance of Scedosporium species identification. *Med. Mycol.* 2021;59(5):486–97.

<sup>97</sup> Rouzaud C et al (2018) Severe dermatophytosis in solid organ transplant recipients: A French retrospective series and literature review. *Transpl Infect Dis* 20(1):e12799.

<sup>98</sup> Alanio A et al. The presence of *Pneumocystis jirovecii* in critically ill patients with COVID-19. *J Infect.* 2021;82(4):84-123

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<sup>99</sup>. Ces investigations permettent aussi de connaître la sensibilité aux antifongiques avec toujours la crainte de voir apparaître une résistance aux azolés chez *A. fumigatus*<sup>100</sup>. 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 a 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)<sup>101</sup>. 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<sup>102</sup>. Des mucormycoses invasives ont été rapportées de manière épidémique en Inde en association avec la COVID-19 en lien avec la corticothérapie, la coinfection virale, le diabète et une plus forte incidence des mucormycoses hors COVID en Inde. Nous avons donc colligé, au niveau de CNRMA et auprès de l'ensemble des correspondants les cas de mucormycoses associés à la COVID 19 et pu rapporter 17 cas et mis en évidence des différences avec ce qui émergeait en Inde avec une moindre fréquence de diabète (47% en France versus 95% en Inde), plus d'hémopathies malignes (35% versus 1%), la localisation (12% versus >80% rhino-orbito-cerebral) et le pronostic (88% mortalité versus <50%).<sup>103</sup>

### Investigation d'une épidémie d'infections invasives à *Mucor circinelloides* f. *circinelloides*

Les *Mucorales* sont des champignons de l'environnement responsables d'infections invasives chez les patients à risque. Les patients brûlés, et notamment les

---

<sup>99</sup> 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

<sup>100</sup> 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.

<sup>101</sup> Dellièvre 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.

<sup>102</sup> 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

<sup>103</sup> Danion F, et al; COVID-Mucor study group.

Coronavirus Disease 2019-Associated Mucormycosis in France: A Rare but Deadly Complication. *Open Forum Infect Dis.* 2021 Nov 6;9(2)

patients dont la surface corporelle brûlée est importante (>30%), sont particulièrement à risque d'infection invasive sous-cutanée à moisissures et notamment à *Mucorales*. La mortalité associée aux mucormycoses invasives chez ces patients avoisine les 100%.

Nous avons identifié récemment un cluster de mucormycoses invasives à *Mucor circinelloides* f. *circinelloides* dans le service des brûlés de l'hôpital Saint-Louis. L'infection invasive a été prouvée chez 5 patients dont le premier a été admis en mars 2013 et le dernier en décembre 2014. L'identification réalisée au CNRMA suggérait que les souches des 5 patients paraissaient identiques en considérant une portion de séquences des gènes *rpb1* et *28S*.

Pour aller plus loin dans l'étude des souches et vérifier l'identité des souches des 5 patients, pouvant suggérer une source commune, le séquençage complet des souches a été réalisé. Nous avons inclus 21 souches dont la souche de référence, 14 souches de l'épidémie de l'hôpital Saint-Louis et des souches provenant d'une autre unité de traitement des Brûlés (Hôpital de Santé des Armées) ainsi que des souches non reliées épidémiologiquement. L'originalité du travail réalisé vient du fait que plusieurs souches par patients ont pu être étudiées au cours du temps et simultanément.

L'analyse des génomes a révélé qu'une seule souche commune n'existait que pour deux patients, et que les autres patients étaient infectés par des souches différentes, et pour certains avec un mélange de souches. Cette épidémie locale a donc été attribuée à une source environnementale, non identifiée malgré les investigations multiples réalisées dans l'environnement du service et sur les consommables utilisés. Cette source environnementale probablement non univoque explique l'infection des patients avec des génotypes multiples et des génotypes différents par patients. L'épidémie s'est éteinte en parallèle avec le renforcement des mesures d'hygiène mises en place à cette occasion dans le service. L'étude a fait l'objet d'une publication dans *mBio*<sup>104</sup>.

## 3.2 Conseils aux professionnels et aux autorités de santé

### 3.2.1. Conseils thérapeutiques aux professionnels de santé

Une activité importante de conseils thérapeutiques est réalisée par les Pr Fanny Lanternier et Olivier Lortholary pour la prise en charge d'infections fongiques complexes documentées ou des suspicions d'infections fongiques invasives.

Cette activité est faite sur sollicitation de collègues mycologues, infectiologues, hématologues, pédiatres, transplantateurs, réanimateurs, chirurgiens, néphrologues, pneumologues des différents centres hospitaliers français universitaires et généraux. Nous sommes sollicités soit par l'adresse mail générique soit sur notre adresse mail personnelle soit par téléphone dans le service de maladies infectieuses de Necker soit sur notre téléphone direct. Nous répondons à ces demandes de conseil soit par téléphone ou mail directement (le plus souvent), soit par une RCP pour les questions les plus complexes avec un compte rendu écrit. Cette activité est clinique est

---

<sup>104</sup> Garcia-Hermoso D et al (2018) Outbreak of Invasive Wound Mucormycosis in a Burn Unit Due to Multiple Strains of *Mucor circinelloides* f. *circinelloides* Resolved by Whole-Genome Sequencing. *mBio* 9(2):e00573–18–12.

difficilement chiffrable, mais les deux cliniciens du CNRMA et l'équipe de maladies infectieuses de Necker sont sollicités par mail ou téléphone 3 à 5 fois/ jour, soit environ 1000 avis par an. Nous répondons au cours de la RCP hebdomadaire de à environ 5 demandes par semaine. Nous favorisons toujours la discussion thérapeutique en incluant le clinicien et le mycologue du centre. Cette activité de conseil est également une porte d'entrée pour l'envoi d'isolats au CNRMA pour précision sur une identification ou complément d'antifongogramme.

Une part importante de l'activité du CNRMA repose sur la réponse à des demandes d'avis diagnostique et/ou thérapeutique pour des patients suspects ou atteints de pathologie fongique invasive. Ces avis complexes sont souvent l'occasion de valoriser l'interaction avec les centres sous forme d'une publication de cas cliniques ou d'initier un travail rétrospectif voire prospectif autour d'une question particulière. Par ailleurs, les cadres du CNRMA sont membres de différents groupes de travail, nationaux, ou européens/internationaux, et à ce titre contribuent aux conseils auprès des professionnels et autorités de santé.

### 3.2.2. Conseils aux autorités de santé

Diverses sollicitations des responsables ou collaborateurs du CNRMA :

- Françoise Dromer a participé à l'élaboration des recommandations du Haut Conseil de la Santé Publique concernant les mesures de prise en charge de patient infecté ou colonisé par *Candida auris* et au rapport bénéfice-risque d'une prescription d'antifongiques en prophylaxie. Les recommandations ont été publiées le 14 juin 2019.
- A l'occasion du deuxième épisode détecté de *C. auris* à l'APHP, le Dr Sandra Fournier (responsable EOH central-APHP) a sollicité Alexandre Alanio pour mettre en place des recommandations de précautions d'hygiène et de prise en charge diagnostique des cas de *C. auris* dans le périmètre des hôpitaux de l'APHP.
- L'ANSM pour la réflexion autour de la rupture d'approvisionnement en 5-Flucytosine intraveineuse (F. Lanternier)
- L'ANSES pour la réflexion autour du risque d'émergence d'*Aspergillus* résistant avec l'utilisation de pesticides azolés (S. Bretagne, F Lanternier)
- La COMAI de l'APHP pour l'écriture de recommandations sur l'utilisation des antifongiques (F. Lanternier)
- Fanny Lanternier et Alexandre Alanio font partie du conseil scientifique de SPARES mission financée par Santé Publique France pour mettre en parallèle consommation d'antibiotique/antifongique et résistance bactérienne/fongique.
- Alexandre Alanio, Stéphane Bretagne avaient été missionnés en septembre 2019 par SPF pour investiguer des cas groupés de Pneumocystose dans un centre hospitalier de la Réunion

### 3.2.3. Optimisation diagnostique des infections fongiques invasives

#### Pneumocystoses

Le cahier des charges du CNRMA inclut la surveillance de la pneumocystose qui se confirme comme la deuxième infection fongique après les candidémies. Elle pose de nombreux problèmes diagnostiques, car comme toute infection opportuniste, la simple détection du champignon ne signe pas une pathologie. Stéphane Bretagne et Alexandre Alanio ont participé, dans le cadre du 5<sup>th</sup> European Conference on Infections in Leukemia (ECIL5) comprenant un groupe d'experts émanant de l'EBMT, EORTC, ICHS, et ELN, à des recommandations sur l'interprétation des résultats dans les maladies hématologiques. Nous avons plus particulièrement en charge l'analyse des moyens diagnostiques, tout en étant associés à la réflexion sur la prise en charge thérapeutique.

Le jeu de diapositives résumant les principales conclusions est disponible depuis avril 2014 ([http://www.kobe.fr/ecil/telechargements2013/ECIL5 - PjP\\_guidelines-Biology.pdf](http://www.kobe.fr/ecil/telechargements2013/ECIL5 - PjP_guidelines-Biology.pdf)). Les recommandations sont maintenant publiées dans 4 manuscrits dans Journal of Antimicrobial Chemotherapy en 2016<sup>105,106,107,108</sup>. Les principales conclusions pour le diagnostic de la pneumocystose sont les suivantes avec la gradation habituelle des recommandations :

#### RECOMMANDATIONS

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

---

<sup>105</sup> Alanio A et al. ECIL guidelines for the diagnosis of *Pneumocystis jirovecii* pneumonia in patients with haematological malignancies and stem cell transplant recipients. J Antimicrob Chemother 2016 (sous press)

<sup>106</sup>Maertens J et al. ECIL guidelines for preventing *Pneumocystis jirovecii* pneumonia in patients with haematological malignancies and stem cell transplant recipients. J Antimicrob Chemother 2016 (sous press)

<sup>107</sup> Cordonnier C et al. *Pneumocystis jirovecii* pneumonia: still a concern in patients with haematological malignancies and stem cell transplant recipients. J Antimicrob Chemother 2016 (sous press)

<sup>108</sup> Maschmeyer G et al. ECIL guidelines for treatment of *Pneumocystis jirovecii* pneumonia in non-HIV-infected haematology patients. J Antimicrob Chemother 2016 (sous press)

mutations in case of treatment failure is not recommended (**B-II**) since these mutations do not affect response to high dose cotrimoxazole.

- The clinical utility of these diagnostic tests for the early management of PCP should be further assessed in prospective, randomized interventional studies

Nous avons en parallèle évalué la possibilité de rechercher de l'ADN de *P. jirovecii* sur les aspirations nasales<sup>109</sup>. Nous avons testé 324 aspirations de 324 patients (61% d'immunodéprimés) prélevées en 2012 pour suspicion de grippe et déjà testées pour 18 virus et 4 bactéries. En utilisant notre PCR diagnostique, 16 aspirations (4.9%) étaient positives (4e rang des 23 pathogènes testés). Six patients avaient eu un autre test sur des expectorations et la charge fongique était toujours moindre dans l'aspiration nasale que dans l'expectoration, confirmant notre recommandation de ne pas exclure un diagnostic sur des résultats négatifs obtenus à partir d'un prélèvement respiratoire autre que le LBA. A l'inverse, une positivité sur des prélèvements respiratoires bas est probablement un fort indice d'une forte charge au niveau alvéolaire. Ainsi, sur 6 patients avec une aspiration nasale PCR positive et qui ont pu avoir des recherches supplémentaires, 5 ont eu *in fine* un diagnostic de pneumocystose. Cela souligne l'intérêt de la recherche d'ADN de *Pneumocystis* dans le cadre de bilan d'une pneumopathie chez des patients immunodéprimés, ne serait-ce que pour instaurer une prophylaxie anti-*Pneumocystis* en cas de charges faibles. Sachant que cela peut être réalisé à peu de frais puisque l'ADN est déjà extrait pour la recherche de virus et de bactérie, notre étude souligne l'intérêt de recherches couplées mieux intégrées dans le cadre d'évaluation par syndrome (ici pneumopathie) plutôt que par discipline.

## Aspergilloses

A la suite de notre participation au 2nd ESCMID Conference on Invasive Fungal Infections, 16-18 January 2013, Rome, Italy et de notre conférence « Update on molecular diagnostic tests for yeast and mould infections : where do we stand? » (Stéphane Bretagne, 2nd ESCMID Conference on Invasive Fungal Infections, Rome, Italy), nous avons détaillé nos analyses dans deux articles. Le premier reprend les problèmes techniques des PCR en temps réel, avec leur validation, et suggère qu'elles devraient arriver à maturité, du moins pour la recherche dans le sérum pour le diagnostic de l'aspergillose invasive, lors des prochaines définitions des infections fongiques<sup>110</sup>. Le deuxième reprend la question du traitement préemptif, qui certes réduit la consommation des antifongiques, mais dont la pertinence clinique et la sûreté restent à confirmer<sup>111</sup>.

---

<sup>109</sup> Guigue N, *et al.* Utility of adding *Pneumocystis jirovecii* DNA detection in nasopharyngeal aspirates in immunocompromised adult patients with febrile pneumonia. *Med Mycol.* 2015; 53 : 241-247.

<sup>110</sup> Alanio A, Bretagne S. Difficulties with molecular diagnostic tests for mould and yeast infections: where do we stand? *Clin Microbiol Infect.* 2014; 20(6):27-35. doi: 10.1111/1469-0691.12428.

<sup>111</sup> Cordonnier C, *et al.* Antifungal pre-emptive strategy for high-risk neutropenic patients: why the story is still ongoing. *Clin Microbiol Infect.* 2014; 20 Suppl 6:27-35.

### 3.2.4. Optimisation thérapeutique des infections fongiques invasives

#### Bilan d'activité et recherche

La société européenne de microbiologie clinique et de maladies infectieuses (ESCMID) publie des recommandations sur le diagnostic et la prise en charge des infections invasives. Le CNRMA (O. Lortholary) a ainsi coordonné les travaux du groupe « infection à *Candida* au cours de l'infection par le VIH »<sup>112</sup> et co-coordonné la conférence de consensus européenne (ECMM/ESCMID) sur la prise en charge des infections à levures rares<sup>113</sup>. Il a coordonné les recommandations nationales sur la prévention des infections (fongiques) survenant au cours des déficits immunitaires primitifs. Ces dernières recommandations ont fait l'objet d'un article invité par le comité éditorial de *Clinical Infectious Diseases*<sup>114</sup>. Il a également activement participé aux conférences de consensus européens (ECMM/ESCMID) sur la prise en charge des mucormycoses, hyalohyphomycoses rares et phaeohyphomycoses<sup>115,116,117</sup> et au consensus européen sur la prévention et la prise en charge des infections fongiques invasives survenant chez les transplantés d'organes solides<sup>118</sup>. Par ailleurs, la 3<sup>e</sup> conférence européenne sur les infections au cours des hémopathies malignes a publié les premières recommandations sur le diagnostic et la prise en charge des mucormycoses chez les patients atteints d'hémopathies malignes auxquelles le CNRMA a participé<sup>119</sup>. Celles-ci devraient aider les cliniciens et microbiologistes européens confrontés à cette mycose invasive dont l'incidence augmente en France.

Suite au travail coordonné par le CNRMA en France sur la mise en évidence de la transmission de *Candida* spp. liée à la contamination du liquide de conservation du greffon rénal lors de la procédure de prélèvements multiples d'organes, nous avons été invités par la société américaine de transplantation à participer à la rédaction des recommandations de prévention de la transmission des champignons par les greffons d'organe solide<sup>120</sup>.

Nous avons contribué à l'écriture de trois articles de synthèse de la littérature sur des entités de mycologie médicale mal connues : une mise au point sur l'utilisation des antifongiques au cours de la grossesse<sup>121</sup> et deux autres sur le diagnostic et la prise en

---

<sup>112</sup> Lortholary O, et al. ESCMID guideline for the diagnosis and management of *Candida* diseases 2012: patients with HIV infection or AIDS. *Clin. Microbiol. Infect.* 2012; 18 Suppl.7: 68

<sup>113</sup> Arendrup MC, et al. ESCMID and ECMM joint clinical guidelines for the diagnosis and management of rare invasive yeast infections. *Clin. Microbiol. Infect.* 2014; 20 Suppl 3:76–98.

<sup>114</sup> Aguilar C, et al. Prevention of infections during primary immunodeficiency. *Clin Infect Dis* 2014. 59:1462–1470.

<sup>115</sup> Cornely OA, et al. ESCMID and ECMM joint clinical guidelines for the diagnosis and management of mucormycosis 2013. *Clin. Microbiol Infect.* 2014; 20 (Suppl. 3): 5–26

<sup>116</sup> Tortorano AM, et al. ESCMID and ECMM joint guidelines on diagnosis and management of hyalohyphomycosis: *Fusarium* spp., *Scedosporium* spp. and others. *Clin Microbiol Infect.* 2014; 20 Suppl 3:27–46.

<sup>117</sup> Chowdhary A, et al. ESCMID and ECMM joint clinical guidelines for the diagnosis and management of systemic phaeohyphomycosis: diseases caused by black fungi. *Clin Microbiol Infect.* 2014; 20 Suppl 3:47–75.

<sup>118</sup> Gavalda J, et al. Invasive fungal infections in solid organ transplant recipients. *Clin Microbiol Infect.* 2014; 20 Suppl 7:27–48.

<sup>119</sup> Skiada A et al. Diagnosis and treatment of mucormycosis in patients with haematological malignancies: guidelines from the 3rd European Conference on Infections in Leukemia (ECIL 3). *Haematologica.* 2012 ([Epub ahead of print] PMID: 22983580

<sup>120</sup> Singh N et al. Donor-Derived Fungal Infections in Organ Transplant Recipients: Guidelines of the American Society of Transplantation, Infectious Diseases Community of Practice. *Am. J. Transplant.* 2012 ; 12 : 2414

<sup>121</sup> Pilmis B, et al. Antifungal drugs during pregnancy: an updated review. *J. Antimicrob Chemother.* 2015; 70:14–22.

charge des atteintes ostéo-articulaires au cours des aspergilloses invasives<sup>122</sup> et au cours des infections à champignons dimorphiques<sup>123</sup>.

Nous avons mené, en partenariat avec les centres français de pharmacovigilance, une étude rétrospective sur dix ans montrant la relation séquentielle entre phototoxicité, kératose actinique et carcinome épidermoïde cutané sous traitement très prolongé par le voriconazole<sup>124</sup>.

Nous avons enfin réalisé une analyse de la littérature et proposé des recommandations de prévention de l'acquisition d'infections fongiques chez les voyageurs immunodéprimés<sup>125</sup>.

Au cours de la dernière mandature, nous avons participé aux recommandations internationales de prise en charge des aspergilloses invasives<sup>126</sup>, des mucormycoses, des infections à levures rares<sup>127,128</sup>, des infections fongiques en pédiatrie.

Nous avons également participé depuis 2002 à toutes les publications sur les critères de définition des infections fongiques invasives, dont la plus récente<sup>129</sup>. Ces dernières ont permis d'élargir le champ des outils moléculaires diagnostiques. Dans ce contexte, nous avons pris l'initiative internationale de réaliser une méta-analyse de la

---

<sup>122</sup> Gamaletsou MN, *et al.* Aspergillus osteomyelitis: Epidemiology, clinical manifestations, management, and outcome. *J Infect.* 2014; 68(5):478-493

<sup>123</sup> Rammaert B, *et al.* Dimorphic fungal osteoarticular infections. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 33:2131–2140.

<sup>124</sup> Epaulard O *et al.* A multistep voriconazole-related phototoxic pathway may lead to skin carcinoma: results from a French nationwide study. *Clin Infect Dis.* 2013; 57:e182-8

<sup>125</sup> Lortholary O *et al.* Fungal infections in immunocompromised travelers. *Clin Infect Dis.* 2013; 56:861-9

<sup>126</sup> Ullmann AJ, Aguado JM, Arikan-Akdagli S, Denning DW, Groll AH, Lagrou K, Lass-Flörl C, Lewis RE, Munoz P, Verweij PE, Warris A, Ader F, Akova M, Arendrup MC, Barnes RA, Beigelman-Aubry C, Blot S, Bouza E, Brüggemann RJM, Buchheidt D, Cadranel J, Castagnola E, Chakrabarti A, Cuenca-Estrella M, Dimopoulos G, Fortun J, Gangneux J-P, Garbino J, Heinz WJ, Herbrecht R, Heussel CP, Kibbler CC, Klimko N, Kullberg BJ, Lange C, Lehrnbecher T, Löffler J, Lortholary O, Maertens J, Marchetti O, Meis JF, Pagano L, Ribaud P, Richardson M, Roilides E, Ruhnke M, Sanguinetti M, Sheppard DC, Sinkó J, Skiada A, Vehreschild MJGT, Viscoli C, Cornely OA. 2018. Diagnosis and management of Aspergillus diseases: executive summary of the 2017 ESCMID-ECMM-ERS guideline. *Clin Microbiol Infect* 24:e1–e38.

<sup>127</sup> Cornely OA, Alastruey-Izquierdo A, Arenz D, Chen SCA, Dannaoui E, Hochhegger B, Hoenigl M, Jensen HE, Lagrou K, Lewis RE, Mellinshoff SC, Mer M, Pana ZD, Seidel D, Sheppard DC, Wahba R, Akova M, Alanio A, Al-Hatmi AMS, Arikan-Akdagli S, Badali H, Ben-Ami R, Bonifaz A, Bretagne S, Castagnola E, Chayakulkeeree M, Colombo AL, Corzo-León DE, Drgona L, Groll AH, Guinea J, Heussel C-P, Ibrahim AS, Kanj SS, Klimko N, Lackner M, Lamoth F, Lanternier F, Lass-Flörl C, Lee D-G, Lehrnbecher T, Lmimouni BE, Mares M, Maschmeyer G, Meis JF, Meletiadis J, Morrissey CO, Nucci M, Oladele R, Pagano L, Pasqualotto A, Patel A, Racil Z, Richardson M, Roilides E, Ruhnke M, Seyedmousavi S, Sidharthan N, Singh N, Sinkó J, Skiada A, Slavin M, Soman R, Spellberg B, Steinbach W, Tan BH, Ullmann AJ, Vehreschild JJ, Vehreschild MJGT, Walsh TJ, White PL, Wiederhold NP, Zaoutis T, Chakrabarti A, Group MEMGGW. 2019. Global guideline for the diagnosis and management of mucormycosis: an initiative of the European Confederation of Medical Mycology in cooperation with the Mycoses Study Group Education and Research Consortium. *Lancet Infect Dis* 19:e405–e421.

<sup>128</sup> Chen SC-A, Perfect J, Colombo AL, Cornely OA, Groll AH, Seidel D, Albus K, Almedia JN de, Garcia-Effron G, Gilroy N, Lass-Flörl C, Ostrosky-Zeichner L, Pagano L, Papp T, Rautemaa-Richardson R, Salmanton-García J, Spec A, Steinmann J, Arikan-Akdagli S, Arenz DE, Sprute R, Duran-Graeff L, Freiburger T, Girmenia C, Harris M, Kanj SS, Roubary M, Lortholary O, Meletiadis J, Segal E, Tuon FF, Wiederhold N, Bicanic T, Chander J, Chen Y-C, Hsueh P-R, Ip M, Munoz P, Spriet I, Temfack E, Thompson L, Tortorano AM, Velegriaki A, Govender NP. 2021. Global guideline for the diagnosis and management of rare yeast infections: an initiative of the ECMM in cooperation with ISHAM and ASM. *Lancet Infect Dis* 21:e375–e386.

<sup>129</sup> Donnelly JP, Chen SC, Kauffman CA, Steinbach WJ, Baddley JW, Verweij PE, Clancy CJ, Wingard JR, Lockhart SR, Groll AH, Sorrell TC, Bassetti M, Akan H, Alexander BD, Andes D, Azoulay E, Bialek R, Bradsher RW, Bretagne S, Calandra T, Caliendo AM, Castagnola E, Cruciani M, Cuenca-Estrella M, Decker CF, Desai SR, Fisher B, Harrison T, Heussel CP, Jensen HE, Kibbler CC, Kontoyiannis DP, Kullberg B-J, Lagrou K, Lamoth F, Lehrnbecher T, Loeffler J, Lortholary O, Maertens J, Marchetti O, Marr KA, Masur H, Meis JF, Morrissey CO, Nucci M, Ostrosky-Zeichner L, Pagano L, Patterson TF, Perfect JR, Racil Z, Roilides E, Ruhnke M, Prokop CS, Shoham S, Slavin MA, Stevens DA, Thompson GR, Vazquez JA, Viscoli C, Walsh TJ, Warris A, Wheat LJ, White PL, Zaoutis TE, Pappas PG. 2019. Revision and Update of the Consensus Definitions of Invasive Fungal Disease From the European Organization for Research and Treatment of Cancer and the Mycoses Study Group Education and Research Consortium. *Clin Infect Dis* 71:1367–1376.

contribution diagnostique de l'antigène cryptococcique pour la méningite chez les patients VIH+<sup>130</sup>.

Sur le plan diagnostique, nous avons également confirmé sur le plan immunologique ce que nous anticipions depuis plusieurs années dans une entité observée en hématologie que sont les candidoses hépato-spléniques, que cette dernière est une manifestation de reconstitution immunitaire (IRIS) avec une réponse interféron-gamma spécifique de *Candida* (ELISPOT)<sup>131</sup>. En parallèle, nous avons été invités à rédiger une mise au point sur les IRIS d'origine fongique<sup>132</sup>. Sur le plan thérapeutique, nous avons participé à l'étude de l'efficacité de l'isavuconazole en comparaison au voriconazole, traitement de référence, dans l'aspergillose invasive, démontrant sa non-infériorité<sup>133</sup>.

Compte tenu de notre reconnaissance dans le domaine de la cryptococcose méningée des patients infectés par le VIH, nous avons contribué à la conception de longue date et à la réalisation de deux études majeures dans cette indication ACTA<sup>134</sup> et AMBITION<sup>135</sup>. Les résultats de ces deux études ont permis l'actualisation des recommandations thérapeutiques de l'OMS en 2018 et tout récemment.

### 3.2.5. Recommandations du CNRMA

#### Cibles pertinentes pour l'identification moléculaire des espèces rares

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

---

<sup>130</sup> Temfack E, Bigna JJ, Luma HN, Spijker R, Meintjes G, Jarvis JN, Dromer F, Harrison T, Cohen JF, Lortholary O. 2018. Impact of routine cryptococcal antigen screening and targeted pre-emptive fluconazole therapy in antiretroviral naive HIV-infected adults with less than 100 CD4 cells/ $\mu$ L: a systematic review and meta-analysis. *Clin Infect Dis Official Publ Infect Dis Soc Am* 68:688–698.

<sup>131</sup> Candon S, Rammaert B, Foray AP, Moreira B, Hernanz MPG, Chatenoud L, Lortholary O. 2019. Chronic Disseminated Candidiasis During Hematological Malignancies: An Immune Reconstitution Inflammatory Syndrome with Expansion of Pathogen-Specific TH1 T Cells. *J Infect Dis* 221:1907–1916.

<sup>132</sup> Dellière S, Guery R, Candon S, Rammaert B, Aguilar C, Lanternier F, Chatenoud L, Lortholary O. 2018. Understanding Pathogenesis and Care Challenges of Immune Reconstitution Inflammatory Syndrome in Fungal Infections. *J Fungi* 4:139.

<sup>133</sup> Maertens JA, Raad II, Marr KA, Patterson TF, Kontoyiannis DP, Cornely OA, Bow EJ, Rahav G, Neofytos D, Aoun M, Baddley JW, Giladi M, Heinz WJ, Herbrecht R, Hope W, Karthaus M, Lee D-G, Lortholary O, Morrison VA, Oren I, Selleslag D, Shoham S, Thompson GR, Lee M, Maher RM, Schmitt-Hoffmann A-H, Zeiher B, Ullmann AJ. 2016. Isavuconazole versus voriconazole for primary treatment of invasive mould disease caused by *Aspergillus* and other filamentous fungi (SECURE): a phase 3, randomised-controlled, non-inferiority trial. *Lancet* 387:760–769.

<sup>134</sup> Molloy SF, Kanyama C, Heyderman RS, Loyse A, Kouanfack C, Chanda D, Mfinanga S, Temfack E, Lakhi S, Lesikari S, Chan AK, Stone N, Kalata N, Karunaharan N, Gaskell K, Peirse M, Ellis J, Chawinga C, Lontsi S, Ndong J-G, Bright P, Lupiya D, Chen T, Bradley J, Adams J, Adams J, Horst C van der, Oosterhout JJ van, Sini V, Mapoure YN, Mwaba P, Bicanic T, Lalloo DG, Wang D, Hosseinipour MC, Lortholary O, Jaffar S, Harrison TS, Team ATS. 2018. Antifungal Combinations for Treatment of Cryptococcal Meningitis in Africa. *New Engl J Medicine* 378:1004–1017.

<sup>135</sup> Jarvis JN, Lawrence DS, Meya DB, Kagimu E, Kasibante J, Mpoza E, Rutakingirwa MK, Ssebambulidde K, Tugume L, Rhein J, Boulware DR, Mwandumba HC, Moyo M, Mzinganjira H, Kanyama C, Hosseinipour MC, Chawinga C, Meintjes G, Schutz C, Comins K, Singh A, Muzoora C, Jjunju S, Nuwagira E, Mosepele M, Leeme T, Siamisang K, Ndhlovu CE, Hlupeni A, Mutata C, Widenfelt E van, Chen T, Wang D, Hope W, Boyer-Chammard T, Loyse A, Molloy SF, Youssouf N, Lortholary O, Lalloo DG, Jaffar S, Harrison TS, Group AS. 2022. Single-Dose Liposomal Amphotericin B Treatment for Cryptococcal Meningitis. *New Engl J Med* 386:1109–1120.

filamenteux). De plus, en raison des ambiguïtés non levées par les séquences ITS et 28S de l'ADNr généralement utilisées en taxonomie, nous avons multiplié, selon les genres étudiés, les gènes cibles et les amorces pour une identification moléculaire polygénique (Tableau 10). Le tableau ci-dessous récapitule les principales cibles utilisées et les références correspondantes, sachant que certains genres nécessitent une analyse multigénique. Il faut aussi savoir que les changements taxonomiques rendent parfois difficile les identifications. Il peut être utile pour suivre ces changements de se référer par exemple au site Index Fungorum (<http://www.indexfungorum.org>) ou de Mycobank (plus à jour pour les levures, (<http://www.mycobank.org/>)). La consultation est gratuite. Le site fournit la liste des espèces dans chaque genre, avec pour chacune d'elle le taxon correct, la citation d'auteur, la date et le support de publication, voire une image de celui-ci, ainsi qu'un rappel de la position de l'espèce dans la classification traditionnelle.

Tableau 10 : Liste des couples d'amorces utilisés en fonction des genres étudiés

Espèce	Gène	Amorces
<b>Complexe d'espèces <i>A. fumigatus</i></b>	$\beta$ -tubuline	<b>Btub1F/ Btub2R</b> <sup>136</sup>
<b>Complexe d'espèces <i>Fusarium spp.</i></b>	Factor d'élongation (TEF1- $\alpha$ )	<b>EF1 / EF2</b> <sup>137</sup>
	RNA polymérase II (RPB2)	<b>5F2/ 7CR</b> <sup>138</sup>
<i>Scedosporium spp.</i>	$\beta$ -tubuline	<b>TUB-F/ TUB-R</b> <sup>139</sup>
<i>Phaeoacremonium spp.</i>	$\beta$ -tubuline	<b>T1 /Bt2b</b> <sup>140</sup>
<b>Coelomycètes <i>Phoma-like</i></b>	$\beta$ -tubuline	<b>TUB2-F / TUB4-R</b> <sup>141</sup>
<i>Trichosporon spp.</i>	IGS1 / ADNr	<b>26SF/5S</b> <sup>142</sup>
<i>Debaryomyces spp.</i>	actine	<b>CA21/CA15R</b> <sup>143</sup>
<i>Clavispora lusitaniae</i>	actine	<b>CA16mod / CA5R</b>

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

La réalisation et l'interprétation des techniques disponibles ne sont pas univoques. 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

<sup>136</sup> Balajee S et al. *Aspergillus lentulus* sp. nov., a new sibling species of *A. fumigatus*. Eukaryot Cell 2005; 4:625-32.

<sup>137</sup> O'Donnell K. et al. Phylogenetic diversity and microsphere array-based genotyping of human pathogenic *Fusaria*, including isolates from the multistate contact lens-associated U.S. keratitis outbreaks of 2005 and 2006. J Clin Microbiol 2007; 45:2235-48.

<sup>138</sup> O'Donnell K., Cigelnik E. Two divergent intragenomic rDNA ITS2 types within a monophyletic lineage of the fungus *Fusarium* are nonorthologous. Mol Phylogenet Evol 1997; 7:103-16.

<sup>139</sup> Cruse M et al. Cryptic species in *Stachybotrys chartarum*. Mycologia 2002; 94:814-22.

<sup>140</sup> Mostert L et al. Species of *Phaeoacremonium* associated with infections in humans and environmental reservoirs in infected woody plants. J Clin Microbiol 2005; 43:1752-67.

<sup>141</sup> Aveskamp MM et al. DNA phylogeny reveals polyphyly of *Phoma* section *Peyronellaea* and multiple taxonomic novelties. Mycologia 2009 ; 101:363-82.

<sup>142</sup> Sugita T et al. Sequence Analysis of the Ribosomal DNA Intergenic Spacer 1 Regions of *Trichosporon* Species. J. Clin. Microbiol. 2002, 40; 1826

<sup>143</sup> Martorell et al. Sequence-based identification of species belonging to the genus *Debaryomyces* FEMS Yeast research 2005,5 :1157

des techniques standardisées et validées, telles les bandelettes E-test<sup>144</sup>. Cependant, la réalisation pratique demande une certaine habitude (en particulier dans la préparation de l'inoculum, et pour les champignons filamenteux) et la lecture des résultats n'est pas toujours simple, rendant compte des différences de résultats en fonction du lecteur, voire du technicien. De plus, l'interprétation des résultats est difficile car les seuils de sensibilité et de résistance publiés ne s'appliquent qu'à certaines espèces et certains antifongiques et ne sont valables que pour des isolats testés avec l'une ou l'autre des techniques de référence (l'interprétation étant différente pour chacune de ces techniques). En pratique, un laboratoire utilisant les bandelettes E-test ne devrait donc pas rendre un résultat S ou R, mais seulement interpréter le résultat comme conforme ou aberrant (> 2 dilutions en log<sub>2</sub>) par rapport à la base de données dont il dispose pour les isolats de la même espèce testés dans les mêmes conditions localement.

La meilleure solution est toujours de bien identifier l'espèce et de considérer qu'en l'absence de pression antifongique, les isolats d'une même espèce ont un profil sauvage et qu'il est donc, par exemple, inutile de tester une souche de *Candida albicans*, même isolée d'une hémoculture, s'il n'y 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.

### 3.3. Activité de surveillance

#### 3.3.1. Missions et organisation

Les missions de surveillance du CNRMA sont vastes puisqu'elles comprennent la surveillance microbiologique des pathogènes responsables de toutes les mycoses invasives humaines et de la résistance aux antifongiques systémiques, mais aussi la surveillance des mycoses invasives, incluant les pneumocystoses, l'investigation de cas groupés et la détection de phénomènes émergents. Il faut noter qu'aucune mycose n'est à déclaration obligatoire.

La tendance de ne considérer que les techniques moléculaires (séquençage nucléotidique, spectrométrie de masse) pour l'identification des champignons, au détriment des observations phénotypiques dans de nombreux centres hospitaliers a pour conséquence de diminuer le recours au CNRMA pour identification. Nous avons opté, en 2012, pour une surveillance à deux niveaux, l'un nécessairement incomplet car relevant d'un recueil passif et l'autre qui se veut exhaustif faisant appel à des observatoires. C'est la recherche de conseils ou la demande d'expertise qui est à l'origine de la déclaration dans le cadre de la surveillance nationale, sauf pour la cryptococcose où les centres envoient le plus souvent spontanément leurs souches pour participer à la surveillance nationale. Pour les surveillances régionales, la participation relève d'une démarche volontaire, mais implique l'engagement d'une déclaration exhaustive et pérenne de tous les cas concernés. L'envoi des souches et des données

---

<sup>144</sup> Dannaoui et al. Comparison of antifungal MICs for yeasts obtained using the EUCAST method in a reference laboratory and the Etest in nine different hospital laboratories CMI 2010 :16 :863-869

correspondantes est parfois retardé par rapport au diagnostic, ce qui peut gêner la détection de phénomènes anormaux concernant plusieurs centres.

Les outils de surveillance développés en partenariat étroit avec EPICONCEPT et l'outil VOOZANOO ont évolué au cours du temps vers une simplification des déclarations avec :

- Le premier portail (RESOMYC, [https://epidemiopasteur.fr/resomyc\\_portail/](https://epidemiopasteur.fr/resomyc_portail/), mis en place en 2005), permet de recueillir les cas de cryptococcoses diagnostiquées en France depuis 1985. Il s'agit d'un système de surveillance passive. Ce portail permettait de surveiller également de façon passive les mycoses rares, les mycoses exotiques et de façon active les fongémies à levures en Ile de France (Observatoire des Levures). Ces surveillances ont été transférées en 2017 sur le deuxième portail.

- Le deuxième portail (RESSIF pour "RESeau de Surveillance des Infections Fongiques invasives en France") mis en place en 2012, pour surveiller de façon exhaustive et active toutes les IFI et les pneumocystoses à travers des centres collaborateurs du CNRMA (CC-CNRMA) répartis sur le territoire métropolitain et les DOM-TOM. Nous avons conçu un questionnaire unique qui permet de décrire toutes ces pathologies et d'offrir aux CC-CNRMA les moyens de récupérer en ligne les données mycologiques (identification et données de sensibilité aux antifongiques) pour chacune des souches envoyées sur le serveur dédié (<https://epidemiopasteur.fr/ressif>). Un questionnaire simplifié est accessible pour les centres non impliqués dans le réseau RESSIF mais souhaitant déclarer occasionnellement des cas d'IFI – hors cryptococcoses qui restent donc répertoriées sur RESOMYC.

Les bases de données correspondantes sont hébergées chez Epiconcept "[hébergeur de données de santé à caractère personnel](#)" (HDS) et membre de l'association française des hébergeurs de données de santé à caractère personnel (AFHADS). Elle respecte les règles de conformité induites par le RGPD.

Le CNRMA comprend donc des bases de données de surveillance épidémiologique, diverses en termes de nombre de cas enregistrés, ancienneté de la surveillance et couverture géographique (Tableau 11).

Tableau 11 : Bases de données du CNRMA (bilan au 20/4/2022)

Pathologie surveillée	Surveillance nationale ou régionale (nb de centres)	Ancienneté de la surveillance (serveur)	Nombre de cas enregistrés*
<b>Fongémies à levures (Observatoire des Levures, ODL)</b>	Régionale : Ile de France (27 → 14 centres <sup>145</sup> )	2002 – 2016 (RESOMYC) 2017 → présent (RESSIF)	6963
<b>Cryptococcose</b>	Nationale (204 centres)	1985 → présent (RESOMYC)	3639
<b>Toutes les IFI + pneumocystoses</b>	Régionale : 13/15 régions (14 → 29 centres)	2012 → présent (RESSIF)	16 279
<b>Mycoses rares incluant les mycoses endémiques</b>	Nationale (156 centres)	2002 – 2016 (RESOMYC) 2017 → présent (RESSIF)	2 340

\*y compris les quelques enregistrements d'infections fongiques « possibles » éliminés ensuite des analyses

### 3.3.2. Surveillance de l'évolution des infections et de leurs caractéristiques

#### Réseaux de partenaires

Les surveillances mises en place par le CNRMA sont donc nationales, couvrant également les DOM-TOM (cryptococcoses), ou des observatoires régionaux couvrant une région (Observatoire des Levures en Ile-de-France, ODL), ou plusieurs régions (RESSIF). Les partenaires diffèrent en fonction de la couverture nationale ou régionale, des données récupérées [mycologues/microbiologistes et cliniciens de diverses spécialités en fonction des mycoses surveillées (réanimateurs, hématologues, infectiologues, internistes, transplantateurs, chirurgiens, dermatologues, ...)] et de l'ancienneté de la surveillance nationale (couverture plus large pour la cryptococcose, que pour les mycoses rares ou exotiques pour lesquelles l'adhésion des participants est limitée, en dehors d'études spécifiques ou de RESSIF depuis 2012).

Tous les laboratoires de mycologie/microbiologie peuvent déclarer un cas de mycose invasive et envoyer la souche correspondante pour expertise au CNRMA. La déclaration se fait sous format papier avec la fiche de déclaration simplifiée ou directement en ligne sur le site sécurisé de RESSIF avec les coordonnées de connexion fournies par l'administrateur du site. *Que tous ceux qui participent aux missions du CNRMA et lui accordent leur confiance soient assurés de notre gratitude et soient vivement remerciés.*

Les centres ODL étaient initialement (en octobre 2002) au nombre de 27, ce qui incluait tous les hôpitaux de court séjour de l'AP-HP et quelques hôpitaux de la périphérie en Ile-de-France. Ils sont actuellement 13 du fait des restructurations et des abandons.

<sup>145</sup> Liste des Centres participants à l'ODL en 2020 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 Angoulvant), Paris – **hôpital Cochin** (André Paugam), **hôpital Necker-Enfants Malades** (Marie-Elisabeth Bognoux), **hôpital Bichat** (Sandrine Houzé), **hôpital Saint-Louis** (Stéphane Bretagne), **hôpital Robert Debré** (Stéphane Bonacorsi), **hôpital Lariboisière** (Stéphane Bretagne), Le Chesnay-**CH André Mignot** (Odile Eloy), **Institut Gustave Roussy** (Elisabeth Chachaty).

En ce qui concerne la surveillance exhaustive et pérenne de toutes les mycoses invasives incluant les pneumocystoses comme indiqué dans le cahier des charges de l'appel d'offres de 2011, nous avons initialement contacté un nombre limité de centres hospitaliers pour évaluer la faisabilité en termes de charge de travail de part et d'autre et l'efficacité de la collaboration. Quinze centres collaborateurs du CNRMA (CC-CNRMA) ont ainsi été inclus dans RESSIF. L'année suivante, l'un a abandonné, et d'autres centres ont été contactés. RESSIF compte actuellement 27 CC-CNRMA<sup>146</sup> répartis géographiquement en France métropolitaine et dans les DOM-TOM (Figure 14). La surveillance des IFI s'appuie sur plusieurs paramètres :

- ✓ Une définition des cas basée sur les critères EORTC 2008<sup>147</sup> et incluant donc toutes les mycoses invasives prouvées ou probables quel que soit le pathogène fongique impliqué (espèce rare ou non), ainsi que les pneumocystoses (un examen direct positif après coloration ou une immunofluorescence positive validant le diagnostic de pneumocystose).
- ✓ Un enregistrement à l'aide d'un questionnaire VOOZANOO avec la possibilité, pour le CNRMA, d'ajouter les données mycologiques (identification, typage éventuel, CMI), ce qui permet aux correspondants de bénéficier d'une extraction de fichier complète s'ils le souhaitent grâce aux fonctionnalités de VOOZANOO.
- ✓ Un envoi régulier des isolats de toutes les espèces non fréquentes (en pratique pas d'envoi de *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. tropicalis*, *C. krusei*, *C. kefyr* et *C. lusitaniae* et *A. fumigatus*) à condition que le centre ait les moyens de détecter des isolats ayant un profil de sensibilité anormal aux antifongiques (détermination systématique de la sensibilité aux antifongiques en cas de pré-exposition à un antifongique, ou de cas groupés).
- ✓ Une validation des cas au CNRMA par le médecin d'études cliniques et/ou l'un des responsables/collaborateurs et la récupération des données manquantes.
- ✓ Une rétro-information en temps réel grâce à l'utilisation du logiciel VOOZANOO, à la mise en place de plans d'analyse et à des réunions annuelles des membres du réseau.

---

<sup>146</sup> Liste des CC-CNRMA en 2021, 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), **Nîmes** (Mylène Sasso), Paris – **hôpital Cochin** (André Paugam), Paris – **hôpital Saint-Louis** (Stéphane Bretagne), Paris – **hôpital des Quinze-Vingt** (Lilia Merabet), Paris – **hôpital Necker-Enfants Malades** (Marie-Elisabeth Bougnoux), Paris – **hôpital Robert Debré** (Patricia Mariani), **Poitiers** (Estelle Perraud-Cateau), **Pointe-à-Pitre** (Muriel Nicolas), **Reims** (Antoine Huguenin), **Rennes** (Jean-Pierre Gangneux), **Rouen** (Loïc Favennec), **Saint-Etienne** (Caroline Mahinc), **Strasbourg** (Valérie Bru), **Toulouse** (Sophie Cassaing), **Tours** (Guillaume Desoubieux), **Versailles** (Odile Eloy), **Villejuif Institut Gustave Roussy** (Elisabeth Chachaty).

<sup>147</sup> De Pauw B et al. 2008. Revised Definitions of Invasive Fungal Disease from the European Organization for Research and Treatment of Cancer/Invasive Fungal Infections Cooperative Group and the National Institute of Allergy and Infectious Diseases Mycoses Study Group (EORTC/MSG) Consensus Group. Clin Infect Dis 46:1813–1821.

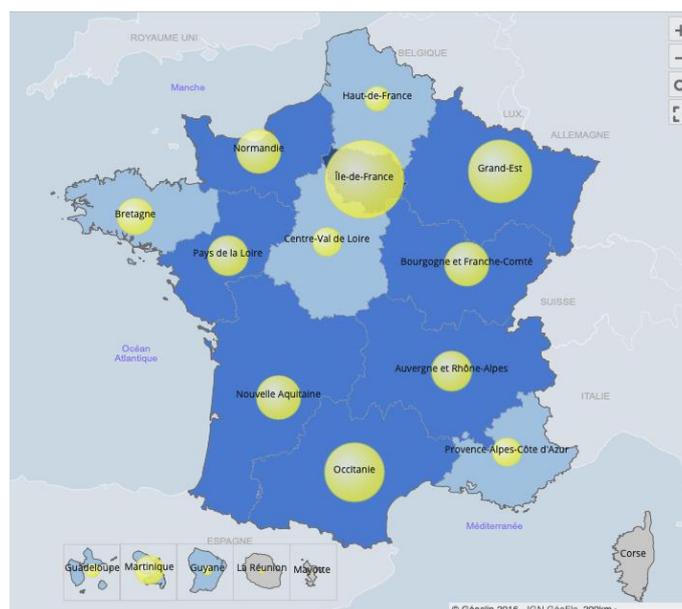


Figure 14: Répartition des déclarations à travers le portail RESSIF

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).

Dans tous les cas, les centres déclarent rarement en temps réel sauf lorsque l'expertise du CNRMA est sollicitée. Il peut donc y avoir un décalage entre le bilan présenté pour la dernière année, sachant que la pandémie de COVID-19 a largement impacté les services/départements de microbiologie qui ont eu du mal à compléter leurs données. C'est donc un bilan non finalisé que nous présentons ici.

Nous présentons ci-dessous une analyse rapide et globale des principales pathologies fongiques en France. Des analyses intermédiaires ont fait l'objet de publications récentes pour l'ODL et RESSIF.

## L'Observatoire Des Levures (ODL)

L'ODL a été mis en place en 2002. La surveillance concerne tous les patients atteints de fongémie à levures (définie par une hémoculture positive), sans sélection liée à l'âge, la pathologie sous-jacente, le type de service de prise en charge ou la levure impliquée. Les informations cliniques et épidémiologiques sur les cas sont recueillies sur un questionnaire standardisé papier ou sur le serveur dédié. Le CNRMA assure la confirmation de l'espèce, la détermination des CMI, et la conservation de tous les isolats.

Le bilan présenté ici porte sur le recueil des données jusqu'à la fin 2021, soit 19 années de surveillance active avec 12 centres pérennes depuis le début. Au cours du dernier mandat, nous avons utilisé cette base de données pour montrer que, comparé à *C. albicans*, le risque d'être infecté par une espèce donnée de *Candida* variait en fonction de l'âge, du sexe, du type de pathologie maligne, de l'hospitalisation en unité de soins intensifs, de la présence d'un cathéter veineux central et de la préexposition à

des antifongiques avant le diagnostic de la fongémie<sup>148</sup>. Nous avons également comparé les paramètres (caractéristiques de l'hôte et de l'épisode infectieux) associés aux fongémies causées par des levures d'espèces rares<sup>149</sup>. Nous avons ainsi démontré que les facteurs prédisposant indépendamment associés à ces fongémies étaient la présence d'une hémopathie maligne et l'exposition antérieure à un traitement antifongique, avec des particularités liées à chaque groupe de levures, rendant important l'identification de l'espèce pour optimiser la prise en charge des patients. Récemment, nous avons analysé l'impact des changements des prescriptions d'antifongiques liées aux nouvelles recommandations internationales sur la mortalité globale et l'épidémiologie des candidémies<sup>150</sup>. Nous avons montré que la réduction de l'utilisation du fluconazole de 64 à 28% entre 2004 et 2017 en parallèle de l'augmentation de la prescription d'échinocandines de 12 à 58% n'avaient pas modifié la mortalité globale quelque que soit les espèces impliquées et leurs profils de sensibilité aux antifongiques. Ces données devraient susciter de nouvelles pistes de réflexion pour améliorer le pronostic de ces infections qui reste très sévère.

A ce jour, la base de données de l'ODL comprend 6389 épisodes de fongémies enregistrés. Ces épisodes concernaient 5689 adultes (sex ratio H/F = 1,6/1 ; âge médian  $\pm$  IQR = 62  $\pm$  22,5 ans) et 402 enfants (H/F= 1,4/1 ; âge médian= 2  $\pm$  7 ans).

Parmi les 6091 patients, les principaux facteurs favorisants étaient une chirurgie récente [n=2100 – 34,5% – digestive dans plus de la moitié des cas (52%)], un cancer [n=1881 – 30,9%) – principalement digestif (45%)], une hémopathie maligne [n= 1141 – 18,7% – essentiellement lymphome (n=434) ou leucémie aigüe (n=425)], une transplantation d'organe [n=401 – 6,6%) – essentiellement de rein (n=152) ou de foie (n=167)], une infection VIH (n=332 – 5,5%), ou d'autres pathologies non malignes ("autres"). Près de la moitié des patients (46%) étaient hospitalisés en unité de soins intensifs, significativement plus fréquemment pour les patients transplantés (70,5%), venant de subir un acte chirurgical (63%) ou le groupe des "autres" (61%) que dans le cadre de pathologies malignes (31%) ou du VIH (37%, p<0,0001). Un cathéter veineux central était rapporté dans 70% des cas.

Sur les 6389 épisodes rapportés, 6091 épisodes incidents et 298 épisodes récurrents (isolement de la même espèce à plus de 10 jours d'intervalle ou d'une autre espèce quel que soit le délai) ont été colligés. Ils étaient dus à des mélanges de levures dans 3,4% des cas.

Les levures impliquées étaient des *Candida* d'espèces communes dans 89% des cas (*Candida albicans*, *Candida glabrata*, *Candida tropicalis*, *Candida parapsilosis*, *Candida krusei*, *Candida kefyr*), des levures ascomycètes rares (7%), *Cryptococcus*

---

<sup>148</sup> Lortholary O, Renaudat C, Sitbon K, Desnos-Ollivier M, Bretagne S, Dromer F, French Mycoses Study Group. 2017. The risk and clinical outcome of candidemia depending on underlying malignancy. *Intensive Care Med* 43:652–662.

<sup>149</sup> Bretagne S, Renaudat C, Desnos-Ollivier M, Sitbon K, Lortholary O, Dromer F, French Mycosis Study Group. 2017. Predisposing factors and outcome of uncommon yeast species-related fungaemia based on an exhaustive surveillance programme (2002-14). *J Antimicrob Chemother* 72:1784–1793.

<sup>150</sup> Bretagne S, Desnos-Ollivier M, Sitbon K, Lortholary O, Che D, Dromer F, Participants of the YEASTS. 2021. 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)* 8:641965.

spp. (*C. neoformans* et *C. gattii*, 3%) et les rares espèces de levures basidiomycètes (1%). Nous avons résumé dans le Tableau 12 les caractéristiques des patients et des épisodes selon les 4 groupes de levures ainsi définis. Nous pouvons remarquer que les espèces rares de levures (ascomycètes et basidiomycètes) étaient plus fréquentes chez les patients atteints de d'hémopathies malignes (2,4% et 10,6%, respectivement) que chez ceux ayant des tumeurs solides (0,3% et 5,6%) ou aucune pathologie maligne (0,9% et 6,2%,  $p < 0,0001$ ).

Tableau 12 : Caractéristiques des 6091 patients et des 6389 épisodes de fongémies à levures (ODL 2002-2021)

Caractéristiques des patients, n/total disponible (%)	<i>Candida</i> spp. (espèces communes)	Rares levures ascomycètes	<i>Cryptococcus neoformans</i>	Rares levures basidiomycètes
<b>Hommes</b>	3277 / 5432 (60.3%)	252 / 414 (60.9%)	141 / 186 (75.8%)	38 / 59 (64.4%)
<b>Enfants (&lt; 15 ans)</b>	347 / 5432 (6.4%)	42 / 414 (10.1%)	1 / 186 (0.5%)	12 / 59 (20.3%)
<b>Age médian (ans) [IQR]</b>	61.1 [24.8]	56.9 [28.0]	44.6 [22.1]	44.6 [40.9]
<b>Patients &gt; 80 ans</b>	614 / 5432 (11.3%)	27 / 414 (6.5%)	5 / 186 (2.7%)	1 / 59 (1.7%)
<b>Terrain sous-jacent / conditions prédisposantes</b>				
<b>Transplantation d'organe</b>	278 / 5432 (5.1%)	27 / 414 (6.5%)	17 / 186 (9.1%)	7 / 59 (11.9%)
<b>Pathologie maligne</b>	2601 / 5432 (47.9%)	211 / 414 (51.0%)	30 / 186 (16.1%)	28 / 59 (47.5%)
<b>Chirurgie récente</b>	1013 / 5432 (18.6%)	52 / 414 (12.6%)	/	10 / 59 (16.9%)
<b>Infection VIH</b>	186 / 5432 (3.4%)	17 / 414 (4.1%)	123 / 186 (66.1%)	6 / 59 (10.2%)
<b>Autre condition</b>	1354 / 5432 (24.9%)	107 / 414 (25.8%)	16 / 186 (8.6%)	8 / 59 (13.6%)
<b>Caractéristiques des épisodes</b>				
<b>Cathéter veineux central</b>	4092 / 5679 (72.1%)	346 / 455 (76.0%)	20 / 192 (10.4%)	50 / 63 (79.4%)
<b>Unité de soins intensifs</b>	2580 / 5679 (45.4%)	190 / 455 (41.8%)	31 / 192 (16.1%)	25 / 63 (39.7%)
<b>Mélanges d'espèces</b>	181 / 5679 (3.2%)	21 / 455 (4.6%)	/	1 / 63 (1.6%)
<b>Épisode récurrent</b>	247 / 5679 (4.3%)	41 / 455 (9.0%)	6 / 192 (3.1%)	4 / 63 (6.3%)
<b>Traitement initial prescrit</b>				
<b>Fluconazole seul</b>	1829 / 4525 (40.4%)	106 / 358 (29.6%)	23 / 164 (14.0%)	6 / 50 (12.0%)
<b>Caspofongine seule</b>	1818 / 4525 (40.2%)	144 / 358 (40.2%)	/	4 / 50 (8.0%)
<b>Autre incluant des associations</b>	588 / 4525 (13.0%)	87 / 358 (24.3%)	134 / 164 (81.7%)	40 / 50 (80.0%)
<b>Sans traitement</b>	290 / 4525 (6.4%)	21 / 358 (5.9%)	7 / 164 (4.3%)	/
<b>Mortalité globale à 30j</b>	1910 / 4915 (38.9%)	133 / 367 (36.2%)	37 / 172 (21.5%)	11 / 53 (20.8%)

Comme rapporté précédemment<sup>151</sup>, les espèces impliquées dans les épisodes incidents ou les épisodes suivants différaient significativement, avec moins de *C. albicans* et plus de *C. glabrata*, *parapsilosis*, *C. krusei* ainsi que de mélanges ou d'espèces rares ( $p < 0,0001$ , Figure 15).

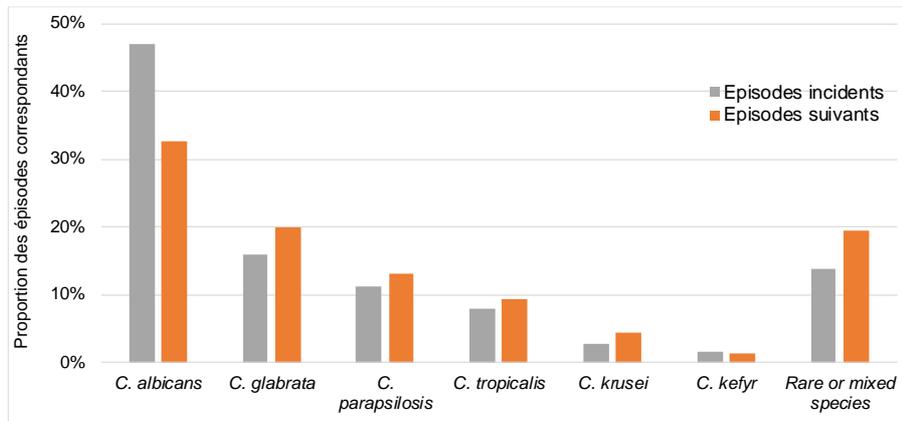


Figure 15: Modification des espèces impliquées selon que l'épisode de fongémie était incident ou récurrent

De même, la pré-exposition aux antifongiques modifiait cette répartition lorsqu'il s'agissait de prescription de caspofongine ( $p < 0,0001$ ) mais pas de fluconazole ( $p = 0,225$ , Figure 16).

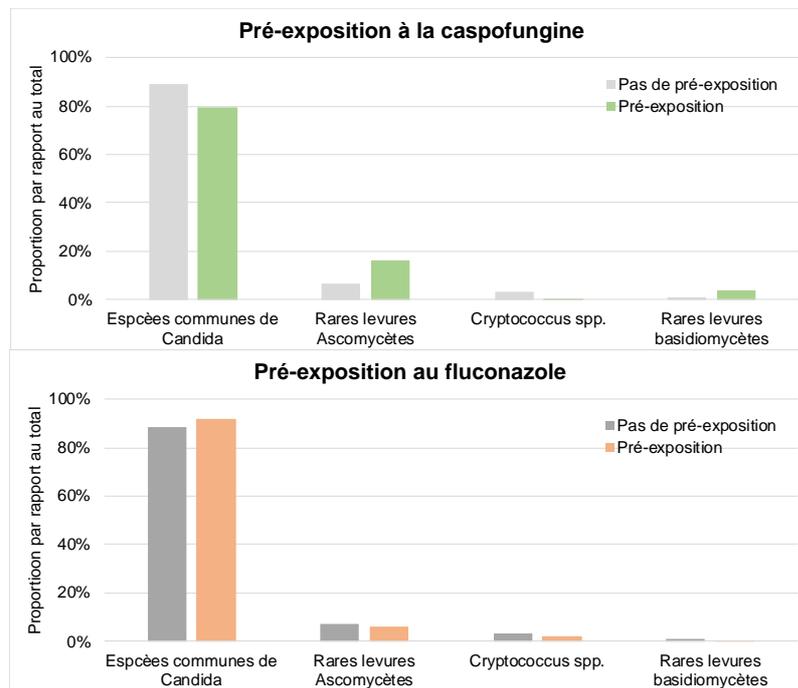


Figure 16: Influence de la pré-exposition aux antifongiques sur les espèces responsables de la fongémie

<sup>151</sup> Lortholary O, Desnos-Ollivier M, Sitbon K, Fontanet A, Bretagne S, Dromer F, French Mycosis Study Group. 2011. Recent exposure to caspofungin or fluconazole influences the epidemiology of candidemia: a prospective multicenter study involving 2,441 patients. *Antimicrob Agents Chemother* 55:532–538.

Les traitements utilisés étaient globalement le fluconazole (38,5%), la caspofungine (39%) et dans près de 17% des cas d'autres molécules ou des associations. Comme récemment montré sur l'analyse des tendances<sup>150</sup>, les prescriptions de fluconazole ont chuté de 54% en 2003 à 9% en 2021, tandis que celle de caspofungine passaient de 4% en 2003 à 68% en 2021 ( $p < 0,0001$ , Figure 17). Dans le même temps, la mortalité globale enregistrée à un mois (38%) a augmenté (36% en 2003 et 52% en 2021,  $p = 0,037$ ). Comme évoqué dans l'analyse récente des données de RESSIF, ceci sans doute lié à une population plus fragile, et en particulier plus âgée (patients de plus de 70 ans passant de 24% en 2003 à 35% en 2021,  $p = 0,0005$ ).

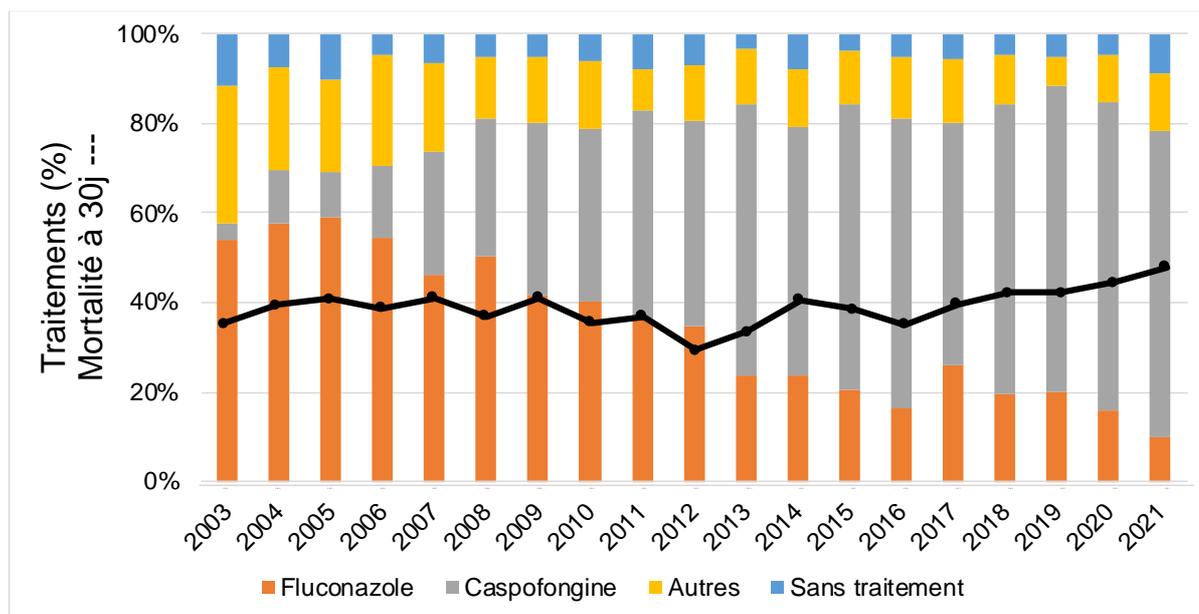


Figure 17: Prescription initiale après le diagnostic de fongémie à levures et mortalité globale associée à 30j

## Surveillance de la cryptococcose

La surveillance nationale de la cryptococcose a été mise en place au CNRMA en 1985. C'est sans doute la plus longue surveillance nationale existante (37 ans). A ce jour (avril 2021), **3641 cas de cryptococcose** ont été déclarés par 204 centres répartis dans 87 départements, avec 1 à 227 cas par centre. Ils concernaient **3492 patients**.

Le nombre de cas de cryptococcose diagnostiqués chez les patients séropositifs pour le VIH reste assez stable depuis 2005 environ (compte-tenu des retards de déclaration), alors que le nombre de cas répertoriés chez les sujets séronégatifs pour le VIH a tendance à augmenter, leur proportion étant voisine de 50% entre 2006 et 2014, et dépassant 60% ensuite (Figure 18).

Chez les patients séronégatifs, on identifiait des **transplantés d'organes** [ $n=206$  (18%), comprenant essentiellement des transplantés de rein (72 %) et de foie (13%)], des patients atteints de **pathologies malignes** [ $n=380$  (33%), comprenant essentiellement des lymphomes (29%), des leucémies lymphoïdes chroniques (23%) et des tumeurs solides (20%)], des **pathologies diverses autres** [ $n=320$  (27%),

comprenant cirrhose (13%), maladies inflammatoires chroniques (17%), lymphocytopénie CD4 idiopathique (8%), sarcoïdose (14%), diabète (8%) et pathologies pulmonaires chroniques (8%)], et, enfin, des **patients sans facteur de risque** (n=206, 18%). Une prescription de corticoïdes était notée pour un tiers (33%) des patients séronégatifs, tandis que 21% des patients sans facteur de risque avait eu un traumatisme cutané antérieur au diagnostic d'une cryptococcose cutanée.

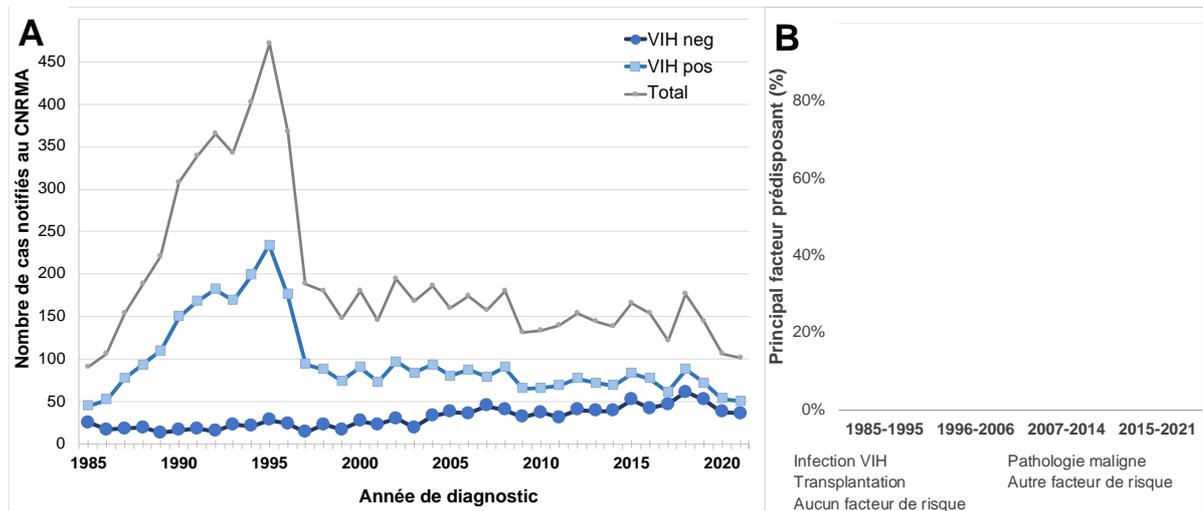


Figure 18 : Évolution des cas de cryptococcoses notifiés au CNRMA depuis 1985 (A) et des principaux facteurs prédisposant à la cryptococcose (B) (MAJ 18/4/2022)

Sur le plan clinique, les localisations pulmonaires (16% vs. 6%,  $p < 0,001$ ), ostéo-articulaires (2% vs. 0,04%,  $p < 0,001$ ) ou cutanées (9% vs. 2%,  $p < 0,001$ ) étaient plus fréquemment notées chez les sujets séronégatifs que chez les sujets séropositifs pour le VIH.

Des recommandations internationales ont été publiées en 2010<sup>152</sup>, auxquelles nous avons participé grâce aux données cliniques du Groupe d'Etude de la Cryptococcose en France et aux données expérimentales générées dans l'unité de Mycologie Moléculaire. Malgré ces recommandations sur la prise en charge des cryptococcoses, les principes du bilan d'extension systématique pour évaluer la sévérité de l'infection ne sont pas suffisamment respectés (Tableau 13) alors que l'atteinte méningée est un élément pronostique capital pour la prise en charge thérapeutique. Il est préoccupant de constater que les ponctions lombaires ne sont pas réalisées chez 13% des patients séropositifs pour le VIH et chez lesquels on a découvert une fongémie, et 36% des patients séronégatifs, sachant que sur les 175 patients sans facteur de risque retrouvés et pour lesquels une ponction avait été réalisée, 86% avaient une méningoencéphalite.

Cependant, on peut noter que la prescription de l'association amphotéricine B liposomale + 5-fluorocytosine (selon les recommandations) est devenue le traitement de première intention (82% des cas) en cas de méningo-encéphalite chez tous les

<sup>152</sup> Perfect JR, Dismukes WE, Dromer F, Goldman DL, Graybill JR, Hamill RJ, Harrison TS, Larsen RA, Lortholary O, Nguyen M-H, Pappas PG, Powderly WG, Singh N, Sobel JD, Sorrell TC. 2010. Clinical practice guidelines for the management of cryptococcal disease: 2010 update by the Infectious Diseases Society of America. Clin Infect Dis 50:291–322.

patients (séronégatifs et séropositifs). Depuis 2007, la **mortalité globale** reste deux fois plus élevée chez les patients séronégatifs que chez les patients séropositifs pour le VIH (28% vs. 14%,  $p < 0,0001$ ), sans doute en raison des retards de diagnostic. On peut aussi noter que ce sont les patients souffrant d'une pathologie maligne qui ont le plus mauvais pronostic globalement.

Tableau 13: Caractéristiques des cryptococcoses diagnostiquées en France depuis 1985

Paramètre	Transplantation d'organe solide	Pathologie maligne	Autre facteur de risque	Aucun facteur de risque	Infection VIH
<b>Caractéristiques des patients</b>					
Ratio H/F	1.7 / 1	1.8 / 1	1.7 / 1	1.6 / 1	5.1 / 1
Age médian [IQR]	55 [18]	66 [19]	53.5 [27]	50 [31]	37 [13]
<b>Bilan mycologique</b>					
PL non faite (%) globalement / dans un contexte de fongémie	(18%) / (22%)	(35%) / (45%)	(39%) / (43%)	(51%) / (45%)	(13%) / (14%)
LCR positif en culture	159 / 171 (93%)	210 / 248 (85%)	169 / 199 (85%)	88 / 102 (86%)	1985 / 2140 (93%)
Hémocultures non réalisées (%) globalement / dans contexte CSF positif	(34%) / (33%)	(30%) / (29%)	(46%) / (37%)	(64%) / (52%)	(48%) / (48%)
Hémocultures positives	65 / 138 (47%)	163 / 267 (61%)	75 / 175 (43%)	20 / 75 (27%)	900 / 1288 (70%)
Hémocultures positives dans contexte LCR négatif	2 / 10 (20%)	9 / 26 (35%)	7 / 19 (37%)	1 / 10 (10%)	43 / 113 (38%)
Pas de culture d'urines	(54%)	(60%)	(64%)	(73%)	(65%)
Urines positives	33 / 96 (34%)	52 / 152 (34%)	36 / 117 (31%)	6 / 57 (11%)	392 / 850 (46%)
Absence de bilan d'extension complet LCR + sang + urines	(64%)	(71%)	(78%)	(84%)	(75%)
<b>Traitement initial (&gt; 2007)</b>					
Amphotéricine B + 5FC	79 / 123 (64%)	100 / 176 (57%)	72 / 140 (51%)	38 / 84 (45%)	304 / 423 (72%)
Fluconazole	35 / 123 (28%)	45 / 176 (26%)	49 / 140 (35%)	31 / 84 (37%)	76 / 423 (18%)
<b>Mortalité à 3 mois (&gt; 2007)</b>					
Globale	26 / 107 (24%)	66 / 175 (38%)	38 / 143 (27%)	9 / 72 (13%)	47 / 333 (14%)
Si méningo-encéphalite	20 / 88 (23%)	25 / 104 (24%)	20 / 77 (26%)	8 / 37 (22%)	37 / 285 (13%)

Les souches isolées étaient principalement de l'espèce *C. neoformans*. Quelques souches de *Cryptococcus gattii* (n=41) ont également été identifiées chez des patients (séronégatifs pour le VIH dans 2/3 des cas) ayant voyagé ou habitant dans les régions tropicales (Guyane en particulier). Depuis le début de la surveillance, nous avons sérotypé 2614 souches de *C. neoformans*, et analysons la ploïdie en identifiant les hybrides depuis plusieurs années. Sur les 1825 souches analysées ainsi, la majorité (73%) était *C. neoformans* var. *grubii* (sérotypage A) tandis que 19% concernait la variété

*neoformans* (sérotypage D) et 8% des hybrides AD avec des différences selon les principales pathologies prédisposantes (Figure 19,  $p < 0,0001$ ).

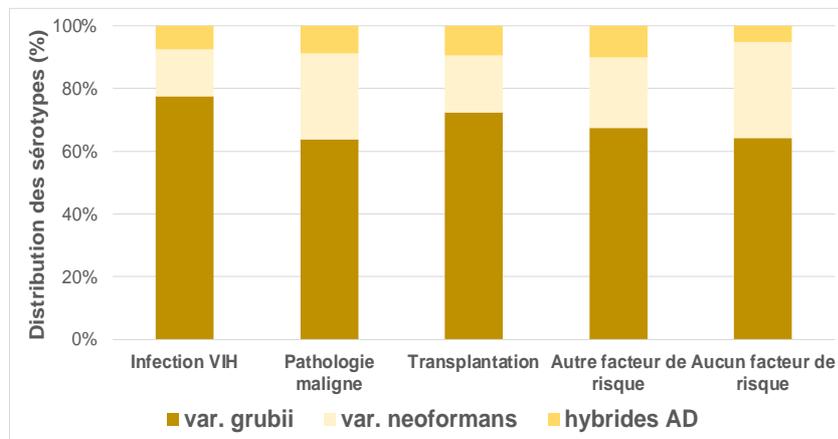


Figure 19 : Répartition des sérotypes de *C. neoformans* selon les facteurs prédisposants à la cryptococcose

## Analyse des infections fongiques invasives à travers RESSIF

Le fonctionnement du réseau et le bilan des 7 premières années de surveillance (2012-2018) à travers RESSIF vient d'être publié dans mBio<sup>153</sup> avec un commentaire de l'éditeur qui nous conforte dans la démarche entreprise "This is an important look at a country wide data system to collect information on IFD. There are few like this in the world and it is good to see this information get published". Nous reprendrons donc ici les principaux résultats mis à jour sur 3 années supplémentaires.

Sur les 11530 épisodes d'IFI pour lesquels une souche avait été isolée, seuls 3837 correspondaient à des espèces justifiant l'envoi au CNRMA ce qui, à ce jour, a été fait dans plus de 94% des cas. Globalement, les identifications faites dans les centres sont validées par l'identification faite au CNRMA, ce qui prouve à la fois les compétences des mycologues et la qualité des bases de données disponibles publiquement. Il faut noter ici que nous contribuons à la qualité des données accessibles au public depuis le lancement de la base de données de séquences [Institut Pasteur FungiBank](#). Les révisions taxonomiques continues, en particulier sur les noms d'espèces, entraînent parfois des changements d'identification au CNRMA et ce, essentiellement pour les champignons filamenteux (en particulier pour les genres *Fusarium*, *Aspergillus* ou pour les *Mucorales*).

Nous décrivons brièvement les principales caractéristiques des infections, pour mettre en évidence leur gravité, les difficultés diagnostiques et la particularité du terrain. Ce qui justifie la surveillance mise en place est la démonstration de l'association, souvent méconnue, entre espèces impliquées et présentations cliniques,

<sup>153</sup> Bretagne S, Sitbon K, Desnos-Ollivier M, Garcia-Hermoso D, Letscher-Bru V, Cassaing S, Millon L, Morio F, Gangneux J-P, Housseine L, Favennec L, Cateau E, Bailly E, Moniot M, Bonhomme J, Desbois-Nogard N, Chouaki T, Paugam A, Bouteille B, Pihet M, Dalle F, Eloy O, Sasso M, Demar M, Mariani-Kurkdjian P, Robert V, Lortholary O, Dromer F, French Mycoses Study Group. 2022. Active Surveillance Program to Increase Awareness on Invasive Fungal Diseases: the French RESSIF Network (2012 to 2018). MBio e0092022.

populations touchées et/ou évolutions. Ce sera tout l'intérêt de la base RESSIF de permettre d'analyser encore plus précisément les éventuelles associations entre les caractéristiques de l'hôte, la maladie engendrée, et son évolution et de valider ainsi l'intérêt potentiel de ces identifications plus précises. *C'est aussi la démonstration du rôle du CNRMA dans la centralisation des cas et la génération de données reposant sur l'identification des isolats par des techniques polyphasiques fiables et standardisées. Mais c'est la qualité de la collaboration et des collègues, dans les CC-CNRMA, qui permet, à ce réseau, d'exister.*

A la date de ce bilan d'avril 2022, **15 846 cas d'infections fongiques invasives (IFI)** ont été déclarés dans la base RESSIF (Figure 20) chez **14 774 patients**.

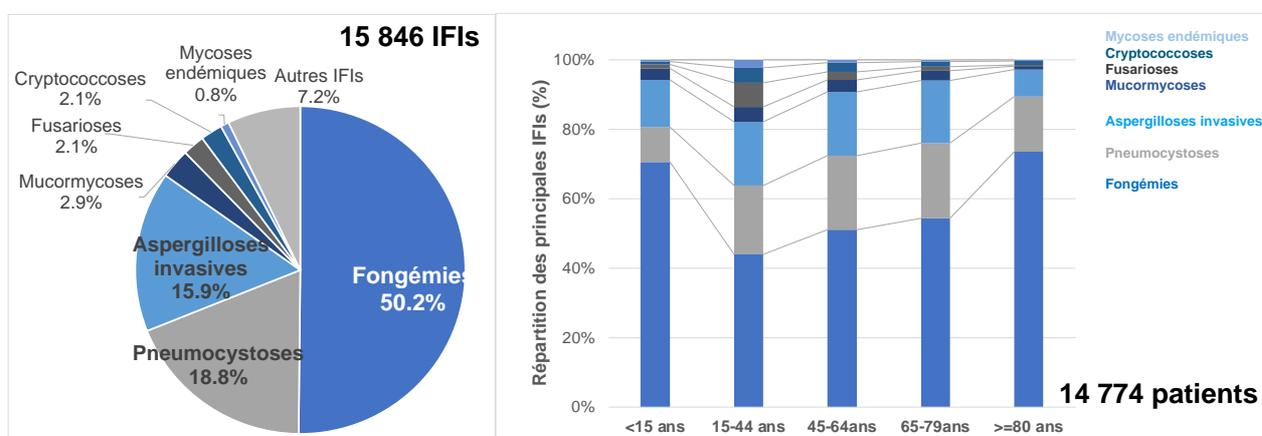


Figure 20 : Répartition des 15 846 IFI déclarées dans le cadre de RESSIF (2012-2021)

Les patients étaient majoritairement des hommes (H/F ratio=1,6/1) avec un âge médian de 62 ans (extrêmes 0-100 ans), mais la prépondérance masculine variait en fonction de l'âge (plus marquée chez les 45-79 ans). On comptait 626 enfants, dont 22% de moins d'un an. La proportion des patients de plus de 65 ans augmentait au cours du temps (Figure 21), dépassant 50% en 2021 ( $p < 0,0001$ ), alors que celle des femmes était stable.

Les principaux facteurs de risque étaient une pathologie maligne (41,5%), une chirurgie récente (18%) une transplantation d'organe solide (8%), une infection par le VIH (4%) et d'autres pathologies ou conditions prédisposantes (28%). On notait aussi que la proportion des patients atteints d'autres pathologies augmentaient au cours du temps avec davantage de patients diabétiques, ou souffrant de maladies inflammatoires chroniques, et spécialement chez les patients âgés, alors que la proportion de patients ayant subi une chirurgie récente avait tendance à diminuer de même que celle des patients atteints de pathologies malignes.

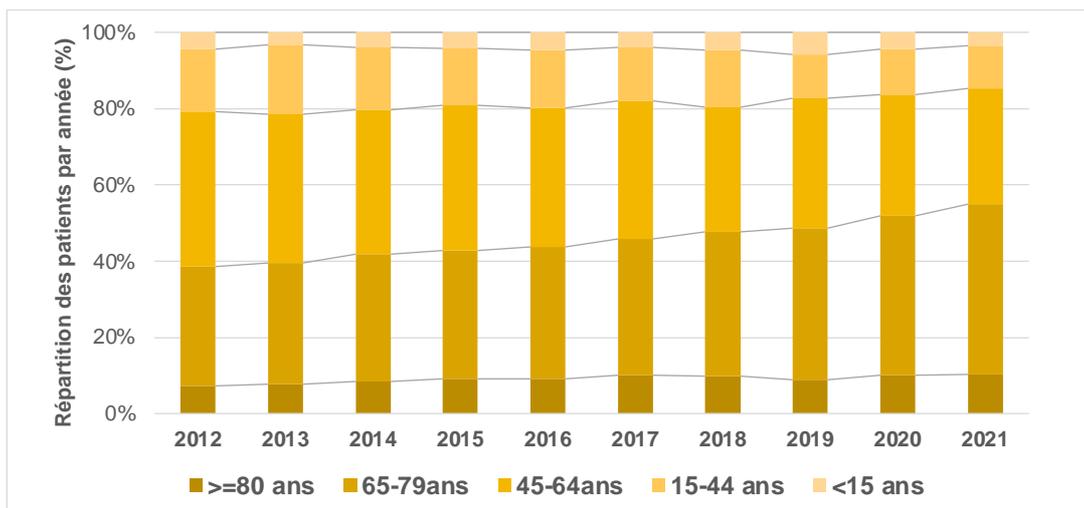


Figure 21 : Évolution des données démographiques par classe d'âge

Les IFI se répartissaient en fongémies, pneumocystoses (PCP), aspergilloses invasives (AI), mucormycoses, fusarioses, cryptococcoses, mycoses endémiques et autres IFI (Figure 20) avec des variations importantes en fonction des centres collaborateurs (Figure 22). Ceci s'explique largement par la répartition inégale des spécialités médicales dans les différents centres hospitaliers et donc des populations de patients à risque. Ces variations valident l'analyse globale des données à l'échelle de RESSIF.

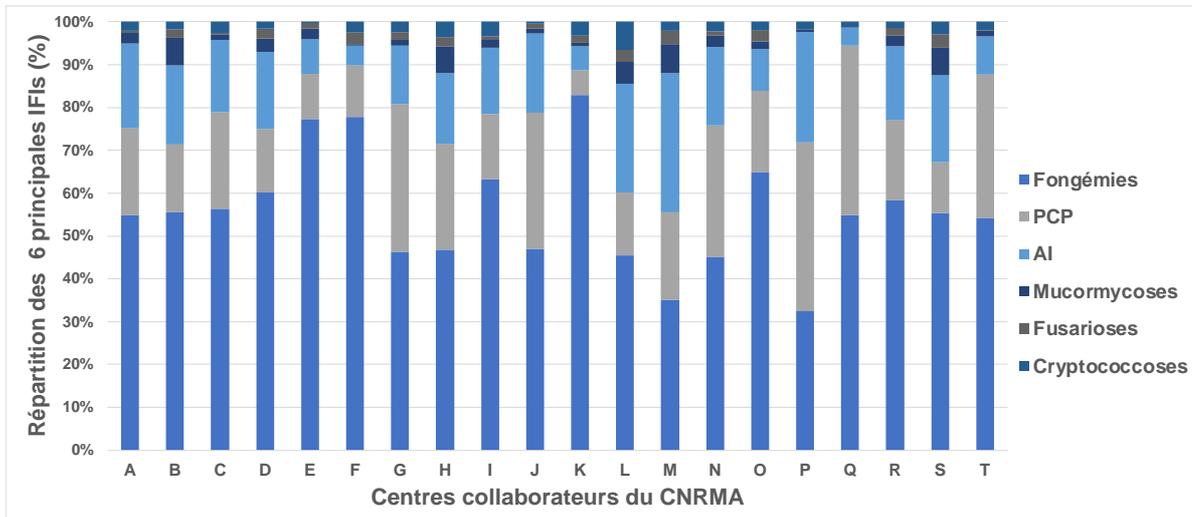


Figure 22 : Répartition des déclarations des 6 principales IFI dans les centres ayant déclaré plus de 350 cas en 10 ans

Les IFI diagnostiquées correspondaient, dans 3% des cas environ, à un mélange de deux ou trois espèces du même genre. La grande majorité des patients n'avait qu'une seule d'IFI diagnostiquée, mais pour un peu plus de 6% des patients, plusieurs pathogènes fongiques étaient identifiés dans le même site ou dans un autre, de façon concomitante ou successive. Les patients les plus à risque de ces infections multiples étaient les patients atteints de pathologies malignes et ceux infectés par le VIH. Sans

surprise, près de 11% d'entre eux étaient sous antifongiques avant le diagnostic d'IFI, comparé à seulement 3% de ceux pour lesquels une seule IFI était identifiée. Les plus fréquentes des 665 co-infections étaient AI/mucormycoses (25%), AI/PCP (22%) et AI/fongémies (20%), les autres étant plus anecdotiques.

La **mortalité globale associées aux IFI était de 40,3%**, significativement plus élevée en cas de pathologie maligne (45,5%) que de transplantation d'organe (26%) ou d'infection par le VIH (9%). Nous présenterons succinctement les différentes IFI, sans refaire le bilan concernant les fongémies colligées dans RESSIF dont nous avons déjà montré qu'elles reflétaient celles de l'ODL.

Il faut aussi noter que sur les 3200 IFI répertoriées depuis 2020, 496 ont été déclarées dans un contexte COVID, sachant que certains centres ont eu du mal à rattraper le retard engendré par la situation sanitaire et que ces chiffres ne sont pas définitifs. Ainsi, 41% des AI, 11% des fongémies, et 7% des PCP étaient survenues dans ce contexte COVID. La mortalité globale associée était plus élevée qu'en l'absence de COVID pour les AI (70% *vs.* 50%,  $p < 0,0001$ ), les fongémies (65% *vs.* 51%,  $p = 0,002$ ), et les PCP (39% *vs.* 29%,  $p = 0,272$ ).

### Aspergilloses invasives

RESSIF comptabilise à ce jour **2512 épisodes d'AI chez 2484 patients**. Il s'agissait en majorité d'hommes (H/F ratio= 1,8/1 pour les 2403 adultes et 1,1/1 pour les 80 enfants), avec un âge médian de 62 ans [extrêmes 15-94 ans] pour les adultes et de 8 ans pour les enfants. Si l'on reprend les 8 catégories utilisées dans une étude précédente<sup>154</sup>, représentant les facteurs de risque principaux : près d'un patient sur quatre avait un **lymphome** (23%), tandis que les **allogreffes**, les **leucémies aiguës avec ou sans autogreffe**, les **autres hémopathies** et les **transplantations d'organe solide** correspondaient à 11-14% des patients, sans oublier les **tumeurs solides** (6%), les maladies de systèmes (3%) et d'autres **pathologies** (17%). Les **pathologies respiratoires chroniques** représentaient, dans la base RESSIF, moins de 3% des patients ce qui rend compte des difficultés de diagnostic de cette pathologie sur ce terrain et du fait que les centres participants à RESSIF ne sont pas nécessairement ceux qui prennent en charge ces patients en première ligne. En moyenne, près de 40% des patients étaient en unité de soins intensifs mais avec de grande différence selon le terrain (80% des patients ayant des pathologies respiratoires chroniques et seulement 14% des allogreffés). Près d'un sur cinq avait un traitement antifongique au moment du diagnostic d'AI (la moitié des allogreffés et seulement 14% des patients avec une tumeur solide).

Pour 213 patients, l'AI n'était pas la première IFI diagnostiquée. Au total, 425 des 2484 patients (17%) avaient plus d'une IFI diagnostiquée sur la période de recueil qu'elles soient simultanées ou successives, dans le même site anatomique ou dans un

---

<sup>154</sup> Lortholary O, Gangneux JP, Sitbon K, Lebeau B, de Monbrison F, Le Strat Y, Coignard B, Dromer F, Bretagne S, French Mycosis Study Group. 2011. Epidemiological trends in invasive aspergillosis in France: the SAIIF network (2005-2007). Clin Microbiol Infect **17**:1882-1889.

autre. Il s'agissait essentiellement de fongémies à levures, de PCP, de mucormycoses ou de fusarioses.

La grande majorité (88%) des infections étaient pulmonaires (signes cliniques et/ou confirmation mycologique) avec quelques localisations ORL (4%), cérébrales (2%), cutanées et/ou articulaires (3%), sachant que ces localisations ne sont pas systématiquement recherchées par imagerie adaptée. L'infection était considérée comme disséminée dans 4% des cas. L'infection était considérée comme prouvée selon les critères EORTC dans 14% des cas, et, plus souvent chez les patients transplantés d'organes (20%) que chez les patients atteints de pathologies malignes (9 %). Les moyens de diagnostic étaient variables selon le terrain (Tableau 14). La PCR était l'unique moyen de diagnostic pour seulement 2% des patients seulement. Les éléments ayant permis le diagnostic variaient également significativement selon les populations de patients ( $p < 0,0001$ ), l'utilisation de la PCR passant de 13% en 2012 à près de 57% des cas en 2021.

Une souche était isolée dans environ 60% des cas, avec une grande majorité de souche de la section *Fumigati* (78%), et plus rarement section *Flavi* (8,5%), *Nigri* (3%), *Terrei* (2%), ou autres, avec des différences selon les facteurs de risque (Figure 23) et selon que le patient avait été pré-exposé à un antifongique. Ainsi, 32% et 42% des patients infectés par une souche de la section *Nigri* et *Nidulantes*, et seulement 22% de ceux infectés par une souche de la section *Fumigati* avaient été pré-exposés à un antifongique. A noter que moins de 2% souches d'*A. fumigatus* avaient des CMI de l'itraconazole  $> 1$  mg/L avec identification d'une mutation *CYP51A*, ce qui confirme l'hypothèse que la résistance aux azolés concerne peu les souches isolées d'AI et davantage celles isolées de patients ayant des infections aspergillaires chroniques traitées de façon prolongée par ces antifongiques.

Tableau 14 : Diagnostic des aspergilloses invasives dans les différentes populations (RESSIF 2012-2021)

Contexte	Isolement en culture	Détection du galactomanane	Diagnostic par PCR
<b>LA ± autogreffe</b>	58.3 %	80.9 %	27.1 %
<b>Allogreffe</b>	40.6 %	85.0 %	24.3 %
<b>Lymphome</b>	31.9 %	81.5 %	23.5 %
<b>Transplantation d'organe solide</b>	81.8 %	57.7 %	35.0 %
<b>Cancer</b>	78.3 %	61.3 %	24.8 %
<b>Autre hémopathie</b>	60.0 %	69.5 %	30.9 %
<b>Pathologie inflammatoire chronique</b>	73.8 %	68.7 %	33.3 %
<b>Pathologie respiratoire chronique</b>	77.3 %	66.7 %	36.4 %
<b>Autre pathologie</b>	86.5 %	55.1 %	36.0 %

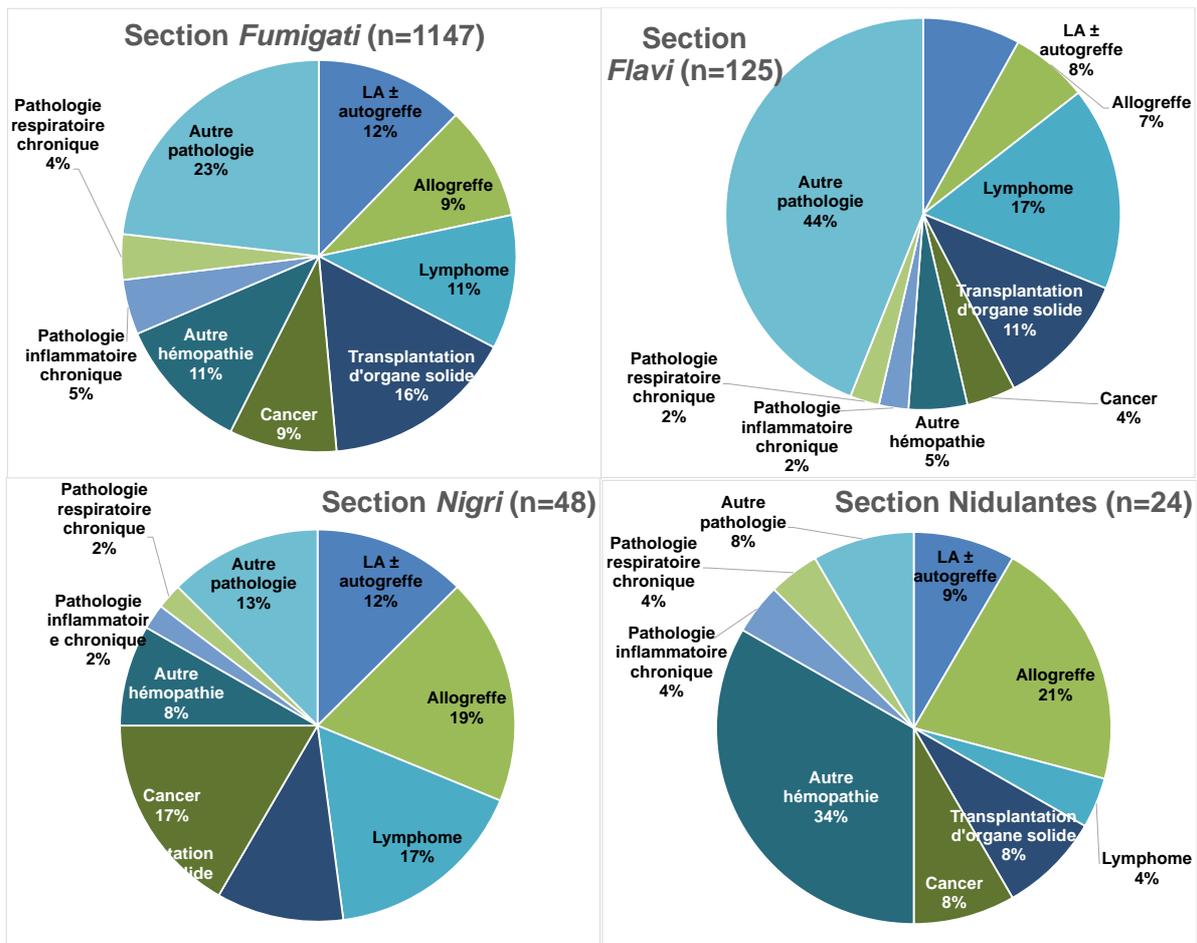


Figure 23 : Répartition des facteurs de risque selon les espèces d'*Aspergillus* impliquées

La grande majorité des épisodes était traitée par voriconazole en première intention (64%).

Le taux de **mortalité globale à 3 mois était de 46%** pour les patients pour lesquels l'information était disponible avec des différences significatives selon le site infecté (localisations cutanées et/ou articulaires (32%), ORL (20%), pulmonaires (48%), cérébrales (42%), et selon le facteur de risque, allant de 35% au cours des lymphomes à plus de 65% pour les pathologies respiratoires chroniques ( $p < 0,001$ ). L'existence d'une co-infection était de plus mauvais pronostic lorsqu'il s'agissait d'une fongémie (mortalité globale de 88%) et d'une mucormycose (66%) que d'une PCP (51%) ou d'une autre IFI (49%).

### Pneumocystoses

La PCP est, en fréquence, la deuxième IFI diagnostiquée en France avec, sur les 10 années de surveillance, **2976 cas de pneumocystoses** enregistrés chez **2945 patients**. Il s'agissait de 2886 adultes (H/F ratio=1,8/1 – âge médian de 63 ans [15 – 93 ans]) et de 59 enfants (H/F ratio=1,7 – âge médian de 1 ans [2 mois – 15 ans]) (Tableau 15).

Les principaux facteurs de risque étaient une pathologie maligne [hémopathie dans 27% des cas – essentiellement leucémie aiguë (42%) et lymphomes (22%), ou tumeur solide dans 21% des cas dont 35% était d'origine pulmonaire], une infection par le VIH (19%), une transplantation d'organe solide (14%) et d'autres conditions prédisposantes comprenant des traitements prolongés par corticostéroïdes (56%), une maladie de système (55%), un séjour en unité de soins intensifs (33%), un diabète (18%), ou une insuffisance respiratoire chronique (15%). A noter que seulement 5,8% des patients étaient sous prophylaxie avant le diagnostic de PCP (cotrimoxazole, atovaquone ou pentamidine) ce qui confirme que la survenue d'une pneumocystose sous prophylaxie est un phénomène rare.

Tableau 15 : Caractéristiques des pneumocystoses diagnostiquées dans RESSIF (2012-2021)

	Infection VIH ( n=549)	Transplantation d'organe solide ( n=425)	Pathologie maligne ( n=1362)	Autres conditions ( n=609)
<b>Ratio H/F</b>	3.0 / 1	1.8 / 1	1.7 / 1	1.4 / 1
<b>Age médian</b>	48	63	66	67
<b>Microscopie positive (% échantillons analysés)</b>	67.0%	45.6%	27.5%	25.3%
<b>PCR positive (% échantillons analysés)</b>	77.8%	85.6%	91.1%	94.8%
<b>Classification de l'épisode</b>				
<b>Prouvé</b>	67.0%	45.6%	27.5%	25.3%
<b>Probable</b>	33.0%	54.4%	72.5%	74.7%
<b>Mortalité globale</b>	9.4%	16.4%	36.0%	32.3%

Pour 73 patients, la PCP n'était pas la première IFI diagnostiquée. Au total, 235 des 2945 patients (8%) avaient plus d'une IFI diagnostiquée sur la période de recueil qu'elles soient simultanées ou successives, dans le même site anatomique ou dans un autre. Il s'agissait essentiellement d'infections pulmonaires (AI, mais aussi cryptococcoses). On enregistre 41 récurrences dans un délai médian de près de 2 ans, et essentiellement chez les patients séropositifs pour le VIH. Le principal traitement était le cotrimoxazole, avec quelques cas traités par atovaquone (6%) ou pentamidine (1%).

Les techniques de diagnostic comprenaient l'examen microscopique et la PCR avec des différences de pratiques selon les centres, les pathologies sous-jacentes et l'année d'observation, la PCR étant réalisée dans plus de 90% des cas depuis 2017 et l'examen microscopique n'ayant plus que 20% d'adeptes en 2019. En l'absence de consensus sur les seuils et les techniques PCR utilisées, nous avons définis comme prouvés les cas pour lesquels la microscopie était positive, et comme probables ceux pour lesquels elle était négative. Nous pouvons ainsi confirmer les charges moindres chez les patients VIH négatifs. La charge moindre n'était pas pour autant associée à un meilleur pronostic puisque la **mortalité globale (27.5%)**, était significativement supérieure chez les patients séronégatifs pour le VIH comparés aux patients séropositifs (31.5% vs. 9.4%,  $p < 0,0001$ ). Le fait d'être en unité de soins intensifs était

associé à une survie moindre ( $p < 0,0001$ ), de même qu'avoir un traitement corticoïdes prolongé ( $p = 0,0010$ ) ou une autre IFI ( $p < 0,0001$ ).

## Mucormycose

A ce jour, 462 épisodes de mucormycoses ont été enregistrés dans la base chez 462 patients. Il s'agissait majoritairement d'hommes (H/F ratio=2/1 chez les adultes de 60 ans d'âge médian [IQR=20,5] et de 1,5/1 chez les 20 enfants de 7 ans d'âge médian [IQR=9]). Les facteurs de risque principaux étaient divisés en 5 catégories : (1) hémopathie dans 63% des cas (et dans près de 2/3 des hémopathies il s'agissait d'un lymphome), (2) traumatisme cutané (13% a – accident de la voie publique, brûlures sévères), (3) diabète décompensé (7%), (4) transplantation d'organe (6%, l'organe transplanté étant le foie dans un tiers des cas, et le poumon dans un quart) et (5) autres) (Tableau 16).

Tableau 16 : Caractéristiques des 462 épisodes de mucormycose

	Hémopathie (n=293)	Transplantation d'organe (n=29)	Diabète (n=32)	Brûlures traumatismes cutanés (n=58)	Autres (n=50)
<b>Age médian (ans) ± IQR</b>	59.8 ± 22.9	59 ± 11.7	62.6 ± 13.35	52.2 ± 38.6	58.6 ± 31.2
<b>Diabète</b>	11 %	34 %	100 %	10 %	10 %
<b>Corticothérapie</b>	25 %	52 %	6 %	0 %	22 %
<b>Pré-exposition aux antifongiques</b>	54 %	31 %	6 %	14 %	30 %
<b>Classification de l'épisode</b>					
<b>Prouvé</b>	38 %	52 %	72 %	66 %	46 %
<b>Probable</b>	31 %	45 %	22 %	29 %	40 %
<b>Diagnostic par PCR seule</b>	31 %	0 %	6 %	5 %	14 %
<b>Mortalité globale à 90 j</b>	66 %	58 %	48 %	27 %	51 %

Au total, un diabète était rapporté pour un patient sur cinq, une neutropénie pour près de la moitié et un traitement favorisant pour plus des deux tiers (chimiothérapie et/ou traitement corticoïdes). Dans 44% des cas, les patients recevaient un traitement antifongique à titre prophylactique/préemptif pour traiter une autre IFI diagnostiquée auparavant, et ce plus souvent dans un contexte d'hémopathie maligne.

Pour 96 patients, ce n'était pas la première IFI diagnostiquée. Au total, 161 des 462 patients (35%) avaient plus d'une IFI diagnostiquée sur la période de recueil qu'elles soient simultanées ou successives, dans le même site anatomique ou dans un autre. Il s'agissait dans 3 cas sur quatre d'une AI, mais aussi de fongémies, de fusarioses ou de PCP.

Les principales localisations étaient classées en pulmonaires (53%), cutanées/articulaires ou osseuses (21%) ou rhino-cérébrales (16%) ou autres, avec d'importantes différences selon le terrain sous-jacent et les principales espèces isolées (Figure 24,  $p < 0,0001$ ). Ainsi, les patients diabétiques avaient majoritairement des lésions rhino-cérébrales, et les patients atteints d'hémopathies majoritairement des lésions pulmonaires. Par ailleurs, *R. arrhizus* était isolé dans plus de 50% des localisations rhino-cérébrales tandis que près de 40% des lésions cutané-articulaires étaient dues à *M. circinelloides*. De même, 70% des isolats de *L. ramosa* étaient isolés dans des lésions cutané-articulaires, alors les lésions pulmonaires prédominaient pour *L. corymbifera*. Outre des différences en termes d'écologie microbienne, il est probable que des différences d'interactions hôte/pathogènes selon les espèces soient en cause dans ces apparents tropismes.

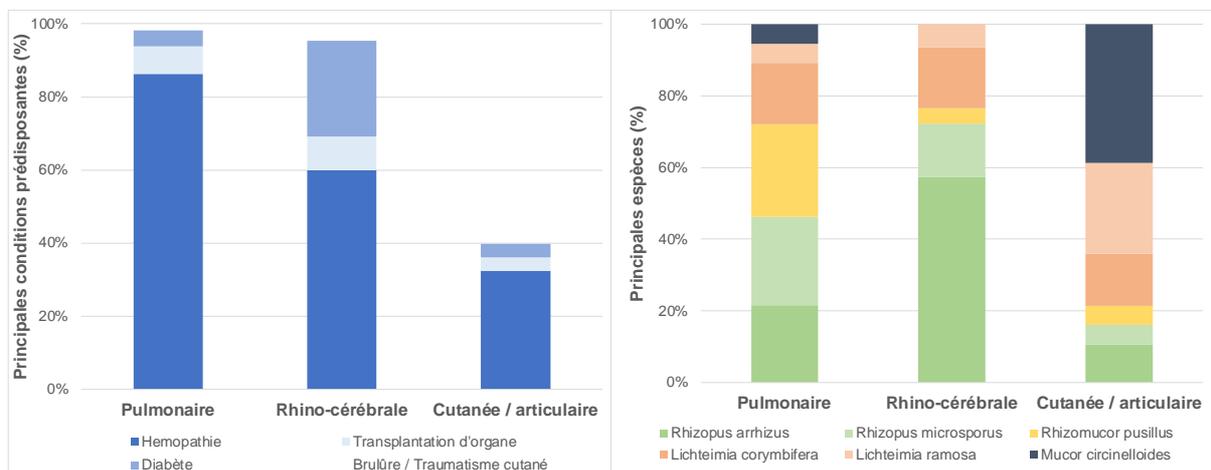


Figure 24 : Principales localisations, facteurs de risque et espèces isolées au cours des mucormycoses

Les moyens de diagnostic des mucormycoses différaient aussi selon le terrain et au cours du temps, la PCR diagnostique ayant une place prédominante depuis 2016<sup>155</sup>. La majorité des patients était traitée par l'amphotéricine B liposomale en première intention (54%). La mortalité globale à 3 mois était de 58%, atteignant 66% chez les patients d'hématologie (Tableau 16) et plus de 80% pour les patients pour lesquels *Rh. pusillus* ou *R. microsporus* avait été isolé en culture (Figure 25).

<sup>155</sup> Millon L, Herbrecht R, Grenouillet F, Morio F, Alanio A, Letscher-Bru V, Cassaing S, Chouaki T, Kauffmann-Lacroix C, Poirier P, Toubas D, Augereau O, Rocchi S, Garcia-Hermoso D, Bretagne S, French Mycosis Study Group. 2016. Early diagnosis and monitoring of mucormycosis by detection of circulating DNA in serum: retrospective analysis of 44 cases collected through the French Surveillance Network of Invasive Fungal Infections (RESSIF). Clin Microbiol Infect 22:810.e1–810.e8.

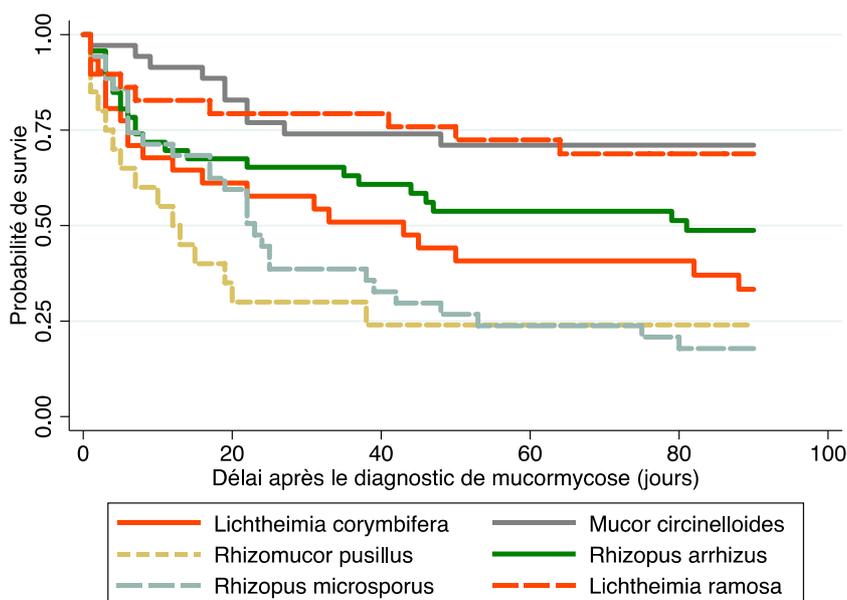


Figure 25 : Survie selon l'espèce identifiée au cours des mucormycoses

## Fusarioses

A ce jour, 338 épisodes de fusarioses ont été enregistrés dans la base chez 338 patients. On pouvait établir trois grands tableaux cliniques : (1) les **infections oculaires** (kératites, abcès de cornée, n=201) étaient dues le plus souvent au port de lentilles de contact (>80%), mais aussi des blessures en particulier par des végétaux ; (2) Le deuxième tableau clinique était constitué des lésions **cutanées/ostéo-articulaires** (n=66) consécutives à des souillures telluriques, des brûlures étendues chez des sujets immunocompétents ou des lésions cutanées chez des patients immunodéprimés; (3) finalement le **troisième tableau clinique** (n=71) rassemblait en majorité des fongémies (58%), mais aussi des atteintes pulmonaires (37%) chez des patients dont la moitié étaient neutropéniques, mais aussi d'autres immunodéprimés. La proportion de femmes et l'âge des patients différaient selon les atteintes (Tableau 17).

Tableau 17 : Caractéristiques des 338 fusarioses répertoriées dans RESSIF (2012-2021)

	Oculaires	Ostéo-articulaires	Autres localisations
<b>Ratio H/F</b>	0.5 / 1	1.8 / 1	1.6 / 1
<b>Age médian ± IQR (ans)</b>	39 ± 27	50 ± 27	61 ± 20
<b>Facteur prédisposant</b>			
Traumatisme oculaire connu ou suspecté	90 %	-	-
Traumatisme cutané	-	64 %	0 %
Neutropénie/déficit immunitaire	-	29 %	87 %
Pré-exposition aux antifongiques	2 %	33 %	45 %
<b>Classification de l'IFI</b>			
Prouvée	49 %	82 %	62 %
Probable	51 %	18 %	37 %
<b>Mortalité globale à 3 mois</b>	-	24 %	40 %

A noter que pour 27 patients, l'épisode de fusariose n'était pas la première IFI diagnostiquée. Au total, 50 des 338 patients (9%) avaient une autre IFI diagnostiquée sur la période de recueil qu'elles soient simultanées ou successives, dans le même site anatomique ou dans un autre (essentiellement des AI et des mucormycoses).

Le principal moyen de diagnostic était la culture et dans moins de 5% des cas la PCR. Les espèces identifiées étaient très diverses mais 5 d'entre elles représentaient plus de 82% des isollements avec, encore une fois, une répartition inégale de ces 5 espèces en fonction des localisations (Figure 26). La prise en charge et l'évolution dépendaient des localisations et du terrain, avec une **mortalité globale à 3 mois était de 37%** chez les patients ayant un déficit immunitaire.

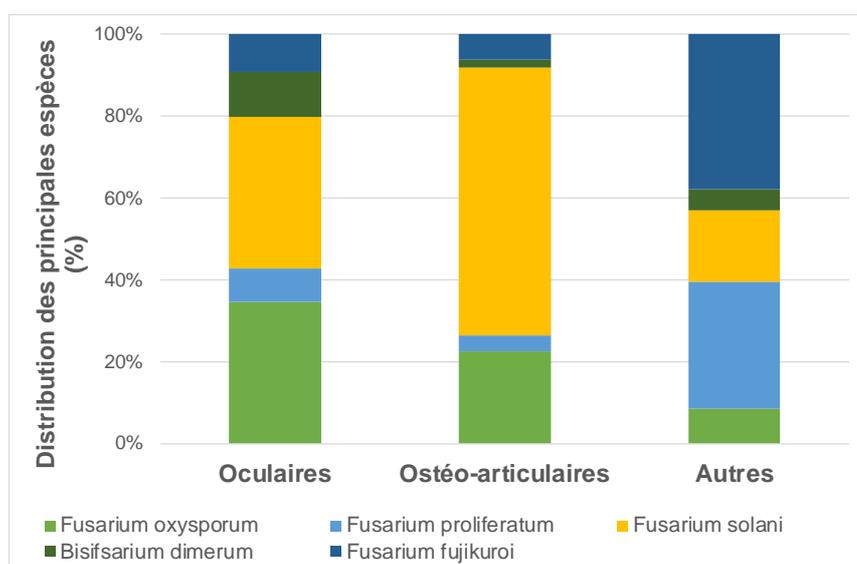


Figure 26 : Répartition des 5 principales espèces de *Fusarium* en fonction du tableau clinique

### Cryptococcoses

Un total de 340 cryptococcoses a été enregistré dans RESSIF sur la période considérée. Nous n'en ferons pas l'analyse puisque ces cas sont inclus dans le bilan présenté plus haut.

### Mycoses exotiques

Au bilan d'avril 2021, **130 épisodes de mycoses exotiques** avaient été déclarés dans RESSIF donc une grande majorité d'histoplasmose à ***Histoplasma capsulatum* var. *capsulatum*** (96 cas déclarés pour la moitié dans les territoires d'Outremer et pour un quart en Île-de-France). Les autres mycoses étaient rares (11 mycétomes, 10 chromomycoses, 4 coccidioidomycoses, 3 paracoccidioidomycoses, 3 histoplasmoses à *H. capsulatum* var. *duboisii*, ainsi qu'une infection à *Talaromyces marneffe*). Il s'agissait essentiellement d'hommes (H/F ratio=1,9/1 ; d'âge médian de 49 ans), mais 3 enfants (2 filles de 11 et 13 ans et 1 garçon de 2 ans) avaient été diagnostiqués avec une histoplasmose (var. *capsulatum*).

Le diagnostic avait été établi pour les histoplasmoses dans 3/4 des cas par culture et dans la moitié des cas par PCR, tandis que les coccidioidomycoses avaient été diagnostiquées pour moitié par culture et pour moitié par PCR, tous les autres diagnostics ayant été fait par isolement du champignon.

**La mortalité globale à 3 mois était de 24% pour les histoplasmoses** (var. *capsulatum*), les autres cas étant en trop petit nombre pour justifier un commentaire à ce stade.

### Phaeohyphomycoses

Parmi les **127 cas colligés**, la majorité avait été diagnostiqué chez des hommes adultes (ratio H/F=2,3/1 ; âge médian = 63 ans) avec seulement 5 enfants (4 garçons et 1 fille, âgés de 5 à 15 ans) identifiés. Il s'agissait dans plus de la moitié des cas (53%) de patients transplantés d'organe (reins et cœur dans 76% et 15% des cas, respectivement), mais aussi de pathologies malignes (18%, cancer et hémopathies) et d'autres pathologies ou conditions prédisposantes telles de traumatismes locaux. La grande majorité des infections était cutanée (66%) et/ou articulaire (9%). Une quarantaine d'espèces différentes avaient été identifiées. Les trois espèces les plus fréquemment isolées étaient *Alternaria infectoria* (28%), *Alternaria alternata* (13%) et *Phaeoacremonium parasiticum* (8%). **La mortalité globale à 3 mois était seulement de 11%**, à mettre en parallèle avec la localisation souvent unique et cutanée.

### Scédosporioses

En avril 2021, **69 cas d'infections dues à des espèces du complexe *Scedosporium/Lomentospora*** avaient été enregistrés dans la base RESSIF. Un certain nombre de ces cas ont été inclus dans l'étude Scedosporiosis/lomentosporiosis observational study (SOS)<sup>156</sup>.

Comme toujours, il y avait une majorité d'hommes adultes (ratio H/F = 1,9/1 ; d'âge médian = 62 ans) et seulement 2 enfants (7 et 14 ans). La majorité des patients (66%) avaient un **déficit immunitaire** comprenant pathologie maligne (21 hémopathies dont 8 lymphomes et 6 leucémies aiguës, et 4 cancers solides), maladie de système (n=4), des traitements par corticostéroïdes (n=3), immunosuppresseurs (n=2), et d'autres conditions prédisposantes telles que diabète de type 2 (n=5), ou une pathologie respiratoire chronique (n=4). Pour 23 patients, un « **traumatisme** » était retrouvé (brûlures étendues (n=2), chirurgie orthopédique (n=6), traumatisme cutané (n=14), ports de lentilles de contact (n=6)) et dans 2 cas, **aucun facteur de risque** n'a été trouvé en dehors d'une sinusite chronique.

L'infection était probable dans 1/5 des cas associé à un déficit immunitaire, et prouvée dans tous les autres cas. Les sites d'infections étaient divers, cutanés (n=21),

---

<sup>156</sup> Bronnimann D, Garcia-Hermoso D, Dromer F, Lanternier F, French Mycoses Study Group, Characterization of the isolates at the NRCMA. 2021. Scedosporiosis/lomentosporiosis observational study (SOS): Clinical significance of *Scedosporium* species identification. Med Myco 59:486–497.

ORL (n=13), pulmonaires (n=12), articulaire (n=10) ou oculaires (n=9) mais aussi cérébral (n=3). L'infection était disséminée dans 7 cas. Dans 6 cas, il existait une infection simultanée par une deuxième espèce (du complexe *Scedosporium* dans un cas, un *Aspergillus* dans 3 cas, une Mucorale dans un autre cas, et *Pneumocystis jiroveci* dans le 3<sup>ème</sup> cas). Un quart des patients avait un traitement antifongique au moment du diagnostic de scédosporiose.

Le diagnostic avait toujours été fait par l'isolement d'une souche. Les espèces n'étaient pas réparties de façon homogène selon le contexte (traumatisme ou déficit immunitaire) (Figure 27). L'évolution était plus sévère chez les patients immunodéprimés (**décès à 3 mois dans 49%** des cas comparés à 18% en cas de « traumatismes », p=0.039).

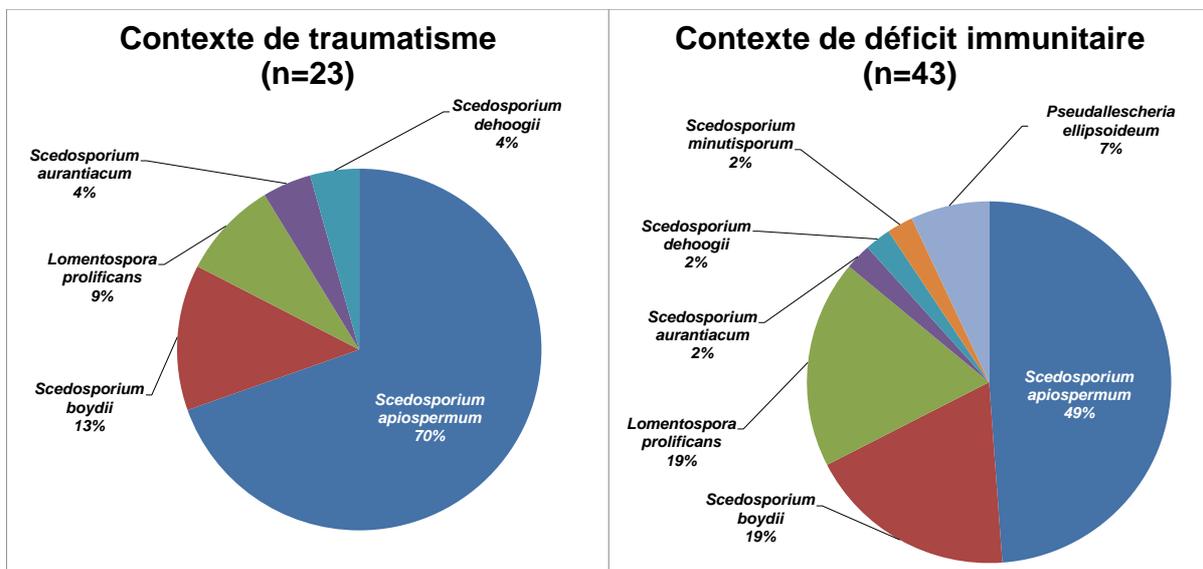


Figure 27 : Répartition des espèces de *Scedosporium* / *Lomentospora* en fonction du contexte

### Autres infections fongiques invasives

Parmi les autres IFI non classables dans les entités précédemment listées, on répertoriait plus d'une centaine de cas liés à des pathogènes rares et plus de 800 cas d'infections de localisations anatomiques rares pour le pathogène incriminé. Il s'agissait ainsi dans près de 40% d'infections ostéo-articulaires, mais aussi de localisation digestive (13%), oculaires (11%), cardiaques et vasculaires (13%), pulmonaires (12%) ou cérébrales (2%). Ainsi, des endocardites/péricardites (n=61), des médiastinites (n=36), des pleurésies (n=115) et des candidoses hépatospléniques (n=24) étaient rapportées.

**En conclusion**, il est impossible d'extraire actuellement toutes les informations disponibles dans RESSIF mais ces analyses préliminaires démontrent l'extraordinaire richesse de cette base de données et la nécessité de faire aussi des analyses par des approches focalisées sur une localisation, un terrain, ou un pathogène/une classe de pathogène. Ce sera aussi l'occasion de multiplier les interactions avec des cliniciens



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.
- 8.

Tableau 19 : Seuils cliniques EUCAST pour *Aspergillus* spp.

*Aspergillus* spp.

EUCAST Antifungal Clinical Breakpoint Table v. 10.0 valid from 2020-02-04

Antifungal agent	MIC breakpoint (mg/L)														Comments on the I category	Comments on the ATU		
	<i>A. flavus</i>			<i>A. fumigatus</i>			<i>A. nidulans</i>		<i>A. niger</i>		<i>A. terreus</i>		Non-species related breakpoints <sup>1</sup>					
	S ≤	R >	ATU	S ≤	R >	ATU	S ≤	R >	S ≤	R >	S ≤	R >	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 <sup>3</sup>	IE <sup>2</sup>	1	1		IE	IE	If voriconazole MIC = 2 mg/L should not be interpreted as I but only followed up as an ATU	If voriconazole wild-type ( <i>A. flavus</i> : voriconazole MIC ≤2 mg/L, <i>A. fumigatus</i> : voriconazole MIC ≤1 mg/L) report as isavuconazole S and add the following comment: "The MIC of 2 mg/L is one dilution above the S breakpoint but within the wild-type isavuconazole MIC range due to a stringent breakpoint susceptibility breakpoint. See rationale documents for more information. If voriconazole non wild-type report as isavuconazole R and refer to reference laboratory for <i>CYP51A</i> sequencing and confirmation of MICs <sup>2</sup> ."
Itraconazole <sup>4</sup>	1	1	2	1	1	2	1	1	2	IE <sup>2,5</sup>	IE <sup>2,5</sup>	1	1	2	IE <sup>4</sup>	IE <sup>4</sup>		Report as R with the following comment: "In some clinical situations (non-invasive infections forms) itraconazole can be used provided sufficient exposure is ensured".
Micafungin	IE	IE		IE	IE		IE	IE		IE	IE	IE	IE		IE	IE		
Posaconazole <sup>5</sup>	IE <sup>2</sup>	IE <sup>2</sup>		0.125	0.25	0.25	IE <sup>2</sup>	IE <sup>2</sup>		IE <sup>2</sup>	IE <sup>2</sup>	0.125	0.25	0.25	IE	IE	Posaconazole MIC = 0.25 mg/L should not be interpreted as I but only as ATU	If S to itraconazole report as R and refer to reference laboratory for <i>CYP51A</i> sequencing and confirmation of MICs.
Voriconazole <sup>4</sup>	IE <sup>2</sup>	IE <sup>2</sup>		1	1	2	1	1	2	IE <sup>3</sup>	IE <sup>2</sup>	IE <sup>3</sup>	IE <sup>2</sup>		IE	IE		Report as R with the following comment: "In some clinical situations (non-invasive infections forms) voriconazole can be used provided sufficient exposure is ensured".

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.

## Résistance aux échinocandines

Depuis notre étude publiée en 2008<sup>158</sup>, nous recherchons systématiquement une mutation dans le(s) gène(s) *Fks* lorsque la CMI de la caspofungine est  $\geq 0,5$  mg/L en AM3 (sauf pour les isolats de *C. parapsilosis* et les espèces basidiomycètes intrinsèquement résistantes aux échinocandines). En pratique, nous interprétons donc les résultats des CMI en fonction du profil de sensibilité obtenu pour les isolats de la même espèce testés dans les mêmes conditions au CNRMA, en sachant que cette interprétation est d'autant plus fiable que le nombre d'isolats déjà testés est grand.

<sup>158</sup> Desnos-Ollivier M, et al (2008) Mutations in the *fks1* gene in *Candida albicans*, *C. tropicalis*, and *C. krusei* correlate with elevated caspofungin MICs uncovered in AM3 medium using the method of the European Committee on Antibiotic Susceptibility Testing. *Antimicrob Agents Chemother* 52:3092-3098.

Tableau 20 : Mutations FKS pour des isolats de *Candida* spp (CNRMA, 2003-2021)  
 Isolats adressés au CNRMA pour diminution de la sensibilité in vitro ou échec thérapeutique

Espèces (nb isolats R / n testés)	Mutation	Gène	Région	nb isolats	nb patients	Valeurs extrêmes (mg/L)	
						Caspo	Mica
<i>Candida albicans</i> (n=49/3584)	F641S	FKS1	HS1	5	4	1-2	0,25-1
	F641S*+ S645P*	FKS1	HS1	1	1	2	0,25
	S645Y	FKS1	HS1	1	1	1	0,5
	S645P	FKS1	HS1	23	16	1-16	0,5-16
	S645P*	FKS1	HS1	12	8	0,5-4	0,25-1
	R647G	FKS1	HS1	3	1	0.25-0,5	0,5
	P649H* + W1358R*	FKS1	HS1+HS2	1	1	1	0,25
	R1361G	FKS1	HS2	3	3	0.5-2	0,25
<i>Candida glabrata</i> (n=58/1396)	F625S	FKS1	HS1	1	1	16	0,5
	F625I + P667T	FKS1+FKS2	HS1	1	1	1	0,06
	S629P	FKS1	HS1	2	1	1-2	0,25
	M1439R +S663P	FKS1+FKS2	HS2+HS1	1	1	4	0,5
	delF658	FKS2	HS1	19	13	0,06-16	0,03-2
	delF658 +K335N	FKS2+FKS3	HS1	1	1	16	1
	F659S	FKS2	HS1	3	2	0,25-0,5	0,015-0,06
	F659Y	FKS2	HS1	1	1	4	0,25
	F659V	FKS2	HS1	3	1	0.25-4	0.03-0,06
	F659S + L664V	FKS2	HS1	1	1	0,5	0,06
	S663P	FKS2	HS1	15	12	1-16	0,125-2
	S663P + F652L	FKS2	HS1	1	1	2	0,5
	S663F	FKS2	HS1	2	1	0.5-1	0,25
	D666E	FKS2	HS1	1	1	0.125	0.015
	R1378S	FKS2	HS2	3	1	1-4	0,06-0.125
<i>Candida krusei</i> (n=6/374)	F645L	FKS1	HS1	2	2	2	1
	S659F	FKS1	HS1	2	1	4	2
	S659P*	FKS1	HS1	2	2	0.5-1	0.25-0,5
<i>Candida tropicalis</i> (n=9/699)	F641L+ I1368S	FKS1	HS1+HS2	1	1	16	2
	S645P	FKS1	HS1	5	4	2-4	0,5-2
	S645P*	FKS1	HS1	2	2	0.5-2	0.25-0.5
	S645P* +V1342I*+V139 6I*	FKS1	HS1+HS2	1	1	0.5	0.125
<i>Clavispora lusitaniae</i> (n=5/260)	S638P	FKS1	HS1	1	1	1	1
	S645P	FKS1	HS1	2	2	1-4	0,5-4
	S645F	FKS1	HS1	2	1	4	0,5-4
<i>Candida kefyr</i> (n=2/183)	F651S*	FKS1	HS1	1	1	0.5	0.5
	S655L*	FKS1	HS1	1	1	0.25	0.125
<i>Candida dubliniensis</i> (n=1/160)	S645P	FKS1	HS1	1	1	2	0.5

\* mutation hétérozygote, HS = hot spot ou région cible

En 2021, nous avons publié les données de distribution des CMI aux échinocandines (anidulafungin, micafungin et caspofungin) pour 2787 isolats de levures reçus au CNRMA entre 2009 et 2014 et appartenant aux 5 espèces fréquentes mais également à 16 espèces plus rarement impliquées en pathologie humaine<sup>159</sup>. Parmi ces isolats, 64 étaient identifiés comme résistant à l’anidulafungin et/ou à la caspofungin et 50 d’entre eux possédaient des mutations dans une régions cibles d’un gène *Fks* (Tableau 20). Nous avons trouvé 21 modifications d’acide aminés différentes. Dans cette étude nous souhaitons valider l’utilisation du milieu AM3 dans la méthode de détermination des CMI en milieu liquide pour la détection des souches mutées. Notre travail a confirmé que ce milieu, comparé au milieu RPMI, permettait une meilleure détection des souches mutées pour les espèces *C. albicans*, *C. glabrata* et *C. krusei*. Cependant des discordances apparaissent pour les souches de *C. glabrata* quelque soit le milieu utilisé.

### Résistance aux azolés des levures

En 2020, nous avons publié une étude portant sur la distribution des CMIs aux azolés, pour plus de 9000 isolats de levures appartenant à 40 espèces impliquées en pathologie humaine, dont les espèces les plus fréquentes<sup>160</sup>. Les azolés sont une classe d’antifongiques regroupant plusieurs molécules notamment le fluconazole très souvent utilisé dans le traitement des infections invasives à levures. Il s’agit de la première étude portant sur un nombre aussi important de souches pour des espèce émergentes ou rares comme *Clavispora lusitaniae* (n=221), *Saprochaete clavata* (n=184), *Meyerozyma guilliermondii* complex (n=150), *Candida haemulonii* complex (n=87), *Rhodotorula mucilaginosa* (n=55). Nos données confirment que les espèces *Candida albicans*, *C. dubliniensis*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *K.marxianus* et *C. lusitaniae* peuvent être considérées comme sensible aux fluconazole, voriconazole et posaconazole tandis que *P. kudriavzevii*, *C. haemulonii* complex, *M. guilliermondii* complex, *P. norvegensis*, *S. clavata*, *G. candidus* et *R. mucilaginosa* sont intrinsèquement résistantes au fluconazole. De plus, notre étude a fourni des données intéressantes sur la sensibilité aux azolés des souches appartenant au complexe *Cryptococcus neoformans*. En effet, les distributions des CMIs sont comparables pour les trois espèces du complexe mais les valeurs de CMI<sub>50</sub> et CMI<sub>90</sub> sont plus basses pour les souches de sérotype D en comparaison aux souches de sérotype A et des hybrides AD. Concernant le complexe *C. parapsilosis*, *C. metapsilosis* est l’espèce la plus sensible *in vitro* aux azoles avec le plus faible pourcentage d’isolats résistants au fluconazole, tandis que *C. orthopsilosis* semble être l’espèce la plus résistance du complexe. Pour les espèces fréquentes, nous avons observé un pourcentage de souches de *C. albicans* et *C. parapsilosis* résistant au fluconazole comparable aux valeurs

---

<sup>159</sup> Desnos-Ollivier M, Bretagne S, Lortholary O, Dromer F; French Mycoses Study Group. Echinocandins Susceptibility Patterns of 2,787 Yeast Isolates: Importance of the Thresholds for the Detection of FKS Mutations. *Antimicrob Agents Chemother.* 2022 Apr 12:e0172521. doi: 10.1128/aac.01725-21

<sup>160</sup> Desnos-Ollivier M, Lortholary O, Bretagne S, Dromer F. Azoles Susceptibility Profiles of More than 9,000 Clinical Yeast Isolates Belonging to 40 Common and Rare Species. *Antimicrob Agents Chemother.* 2021 May 18;65(6):e02615-20. doi: 10.1128/AAC.02615-20.

reportées dans les études internationales. Cependant, les pourcentages d'isolats résistants au posaconazole pour *C. tropicalis* (23,9%) et *C. parapsilosis* (27,3%) sont très variables selon les années. Cette variation de proportion a déjà été décrite avec notamment des pourcentages très variables selon l'origine géographique des isolats et des cas groupés d'infections.

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 21 : Proportion d'isolats de levures "résistants" selon les seuils EUCAST).

Pour *Candida albicans*, il existe une proportion très faible (0,4%) d'isolats résistants aux antifongiques azolés prescrits en thérapeutique (fluconazole et voriconazole). Il n'existe donc pas d'argument microbiologique 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 récemment 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. 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 (1,9%).

La résistance au fluconazole et au voriconazole concerne un petit pourcentage des isolats de *Candida parapsilosis* (en moyenne 6,8% et 3,3% respectivement), avec des variations selon les années et également selon les hôpitaux, 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. Nous souhaitons mettre en place un génotypage plus systématique de ces isolats afin de pouvoir identifier des éventuelles transmissions au sein d'un même service et/ou des particularités génétiques de résistance liées au clade. On rappelle que le complexe *parapsilosis* est intrinsèquement de moindre sensibilité ou résistant aux échinocandines.

Pour *Candida tropicalis*, on note une prévalence variable de la résistance aux deux azolés testés selon les années, mais une tendance globale à la baisse de ce phénomène. Les isolats résistants à la caspofungine sont extrêmement rares. A noter que le clone résistant à la 5FC qui avait été rapporté en 2008 <sup>161</sup> n'est plus identifié depuis 2014 malgré la persistance de souches résistantes à cet antifongique.

---

<sup>161</sup> Desnos-Ollivier M et al. (2008) Clonal population of flucytosine-resistant *Candida tropicalis* from blood cultures, Paris, France. *Emerging Infect Dis* 14(4):557–565.

Tableau 21 : Proportion d'isolats de levures "résistants" selon les seuils EUCAST  
Analyse des CMI du fluconazole, voriconazole et caspofungine des isolats collectés dans l'ODL

Espèces	Fluconazole		Voriconazole		Caspofungine	
	Seuil mg/L	% R [extrêmes]	Seuil mg/L	% R [extrêmes]	Seuil mg/L	% R [extrêmes]
<i>C. albicans</i>	> 4	0.4 % [0 - 1.1]	> 0.25	0.4 % [0 - 2.4]	> 0.25	0.3 % [0 - 1.8]*
<i>C. glabrata</i>	> **16	31.6 % [5.2-46.8] *#	-	-	> 0.25	1.9 % [0 - 7.3]
<i>C. parapsilosis</i>	> 4	6.8 % [0 - 18.9] *	> 0.25	3.3 % [0 - 12.9]	-	
<i>C. tropicalis</i>	> 4	5.8 % [0 - 27.8] *#	> 0.25	7.9 % [0 - 27.8]*#	> 0.25	1.0 % [0 - 5.5]

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

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

## Résistance aux azolés des filamenteux

Pour *A. fumigatus*, le CNRMA n'a pas mis en place d'observatoire, mais les quelques études régionales de monitoring systématique prouvent que le phénomène de résistance ne concerne qu'une très petite proportion des isolats cliniques des patients immunodéprimés. Sur les 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 azolés reste très contenue en France dans 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 l'horticulture. Les patients s'infectent alors d'emblée avec des isolats résistants ayant des mutations assez monomorphes dans le gène *cyp51A*.

En revanche, chez les patients chroniquement colonisés (mucoviscidose, bronchopathie chronique) traités au long cours par des azolés, l'isolement d'*A. fumigatus* résistant aux azolés 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.

### 3.4. Contribution à l'alerte

Le CNRMA est régulièrement sollicité par SPF pour donner son avis sur des alertes internationales. De même, certains signalements faits à Santé Publique France ne sont pas suivis d'investigations par le CNRMA, soit que la demande ne lui est pas faite, soit que les outils manquent.

Les signalements des phénomènes inhabituels se font par le responsable du CNRMA via le mail [noa-signalement@invs.sante.fr](mailto:noa-signalement@invs.sante.fr). A chaque fois, le correspondant est prévenu que le CNR est tenu de prévenir SPF.

En pratique, dès qu'une situation justifie une identification rapide de l'espèce ou la caractérisation d'un clone spécifique, une procédure d'urgence est mise en route pour rendre les résultats en moins de 36h pour permettre l'enquête locale. Cette procédure a essentiellement concerné les souches de *Geotrichum* spp. depuis 2012 pour identification de l'espèce *Saprochaete clavata*, et de *Candida auris*.

#### 3.4.1. *Candida auris*

*Candida auris* est considéré depuis le début des années 2010 comme un pathogène émergent multirésistant à la suite de l'apparition de nombreux cas groupés identifiés en milieu hospitalier dans divers pays situés sur les cinq continents. L'analyse des données de génome entier et épidémiologique a permis de mettre en évidence l'apparition « simultanée » de cinq clades majoritaires distincts ayant des spécificités géographiques. Cette levure étant très persistante sur les supports hospitaliers (matériels et mobiliers médicaux), le risque de transmission entre patients est très élevé. Ceci a donc entraîné des procédures d'isolement des patients porteurs de cette espèce. Peu de cas ont été reportés en France, mais le CNRMA a initialement mis en place une PCR en temps réel permettant d'identifier rapidement cette espèce à partir de souches mais également à partir d'échantillons primaires (technique mise en place et effectuée à l'hôpital Saint Louis). Jusqu'en 2021, les cas avérés ou les suspicions de *C. auris* étaient traités en urgence par le CNRMA. Depuis plusieurs années, les données disponibles dans les bases d'identification MALDI-Tof ont été complétées et les laboratoires hospitaliers sont à même d'identifier rapidement les souches de *Candida auris*, nous avons donc décidé de traiter les cas de *C. auris* en routine mais nous continuons à signaler à SPF les cas de colonisations et/ou infections déclarées au CNRMA. De plus le séquençage génome entier pour les souches reçues au CNRMA est systématiquement effectué et l'analyse nous permet en quelques jours de déterminer l'appartenance au clade géographique.

Entre 2017 et 2021, 11 souches de *C. auris* ont ainsi été reçues au CNRMA. De plus, 7 souches suspectées ont été reçues mais après identification il s'agissait de *C. haemulonii*, *W. anomalous* et *C. pseudohaemulonii*.

Le CNRMA participe à la surveillance européenne des cas de *C. auris* en déclarant dans le fichier du CDC « *Candida auris* - update on epidemiological situation, laboratory capacity and preparedness ».

En 2019, le CNR a également été saisi par des collègues mycologues ayant appris que des laboratoires de microbiologie avaient reçu dans un panel de souches bactériennes et fongiques pour contrôle qualité MALDI-TOF (MALDI-TOF EQA scheme de QCMD), une souche de *C. auris*. L'envoi de cette souche n'avait été accompagné d'aucune recommandation particulière. Ceci est apparu comme potentiellement dangereux étant donnée la propension de cette levure à adhérer aux surfaces et donc la nécessité d'utiliser des procédés de nettoyage/désinfection particulier au laboratoire. SPF et l'ANSM ont laissé le CNRMA contacter le distributeur du panel. Après notre intervention, le distributeur a envoyé un message aux adhérents du programme leur suggérant de nous contacter en cas de doute "*As you are aware the panel contains a range of viable bacterial and fungal species. It is therefore important that your laboratory has the appropriate procedures for the handling and disposal of the EQA panel materials. If you have any concerns regarding the treatment and disposal of the fungal pathogens included within this EQA scheme please contact the NRCMA.*"

### 3.4.2. *Saprochaete clavata*

Au cours des 5 dernières années du mandat du CNRMA, des cas d'infection et/ou de colonisation à *S. clavata* ont été régulièrement signalés à SPF suite à la description d'une épidémie nationale en 2012 due à un clone. Entre 2017 et 2021, des 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.

En janvier 2018, l'hôpital de Marseille a signalé au CNRMA des cas groupés d'infections invasives dues à *S. clavata*. A la demande du CNRMA, des prélèvements effectués dans l'environnement hospitalier ont mis en évidence la présence de *S. clavata* dans les lave vaisselles de l'hôpital ainsi que dans des thermos et brocs de lait et de café utilisés dans le service d'hématologie. Au total, le génome entier a été séquencé pour les 15 isolats cliniques de *S. clavata* provenant de 8 patients, principalement des hémocultures isolées entre janvier 2017 et janvier 2018, ainsi que 2 souches cliniques de deux autres patients provenant du même hôpital mais isolées en janvier 2015 et février 2016 et 10 souches environnementales isolées entre décembre 2017 et janvier 2018. Le séquençage et l'analyse des données WGS ont été réalisés à P2M en collaboration avec Vincent Enouf et Alexis Criscuolo, par technique Illumina. Le génome de la souche type (CBS425.71) ainsi que celui de souches appartenant aux deux clades décrits en 2012 ont été utilisés comme génome de référence. L'analyse phylogénétique nous a permis de conclure que les souches cliniques et environnementales isolées à l'hôpital de Marseille entre janvier 2017 et juin 2018 appartiennent toutes à un même clade différent des clades A et B précédemment décrits, suggérant une source commune sans doute d'origine environnementale <sup>162</sup>.

---

<sup>162</sup> Menu E, Criscuolo A, Desnos-Ollivier M, Cassagne C, D'Incan E, Furst S, Ranque S, Berger P, Dromer F. *Saprochaete clavata* Outbreak Infecting Cancer Center through Dishwasher. *Emerg Infect Dis.* 2020 Sep;26(9):2031-2038. doi: 10.3201/eid2609.200341.

De nouveaux cas groupés d'infections à *S. clavata* ont également été signalés dans d'autres hôpitaux en 2019 et 2020. Grâce aux prélèvements environnementaux rapidement effectués dans les services concernés et au séquençage des génomes nous avons pu dans les deux cas montrer le lien entre les isolats retrouvés dans les lave-vaisselles et les isolats cliniques. Des mesures d'hygiène prises rapidement ont également permis de limiter l'expansion de ces infections.

Depuis 2021, les souches de *S. clavata* reçues au CNRMA ne sont plus traitées en urgence, cependant le séquençage génome entier est effectué systématiquement et l'intégration des données aux données précédemment analysées nous permet en quelques jours de déterminer le lien éventuel du nouvel isolat avec les clades existants.

### 3.4.3. *Magnusiomyces capitatus*

En Octobre 2017, un correspondant (Hôpital 1) a contacté le CNRMA pour l'informer que deux patients (P1 et P2) avaient des hémocultures positives à *Magnusiomyces capitatus* qui est une espèce rare de levures proches de l'espèce *Saprochaete clavata* responsable d'une épidémie en France en 2012 chez des patients leucémiques. De plus ce correspondant avait isolé une souche de *M. capitatus* dans un circuit de lavage de l'hôpital et souhaitait donc savoir si cela pouvait être la source de la contamination.

Cette espèce étant rare, il n'existe aucune méthode de génotypage rapide pour déterminer le lien éventuel entre des isolats. Le séquençage génome entier et l'analyse des données WGS ont été réalisés à P2M en collaboration avec Vincent Enouf et Alexis Criscuolo, par technique Illumina. Le panel des souches analysées comprenait la souche type (CBS162.80, isolée en Angleterre en 1979 du lait d'une vache ayant une mammite), 2 souches environnementales, 1 souche animale et 58 souches cliniques isolées entre 2005 et 2017, de 53 patients hospitalisés en France, Suisse et Espagne. Ce panel comprenant des souches historiques, des souches liées ou non épidémiologiquement, et, pour certains patients, plusieurs souches d'un même épisode, nous ont permis d'interpréter la variabilité au sein de l'espèce et au cours de l'infection chez un même individu.

Le génome de la souche type CBS 162.80 a été assemblé *de novo* en 2500 contigs et utilisé comme génome de référence pour l'analyse phylogénétique. Une matrice de 15M de caractères alignés a été construite à partir de l'agglomération des résultats de mapping de chacune des 60 souches contre la souche type. Cette matrice contenant environ 342000 sites variables a été utilisée pour inférer un arbre Maximum Likelihood (ML).

De l'analyse phylogénétique, nous pouvons conclure que, parmi les isolats étudiés, 7 isolats sont très divergents dont la souche du système de lavage isolé en 2017 de l'hôpital 1, très éloignée donc de celle des patients P1 et P2, ce qui permet de l'exclure comme source commune de contamination (Figure 28). L'analyse des souches pour les 4 patients (A à D) pour lesquels plusieurs souches étaient disponibles (sites et/ou dates de prélèvements différents), a permis de découvrir qu'elles étaient très peu différentes

(moins de 10 SNPs de différence), tandis que des souches isolées dans un même hôpital ne se retrouvaient pas nécessairement groupées ensemble. Toutefois, des souches isolées dans un même hôpital sur une courte période (une année, exemple hôpital 2) peuvent appartenir à un même cluster. Cette analyse préliminaire nous a permis de conclure que les souches de patients P1 et P2 étaient *a priori* différentes (CNRMA17.775 et CNRMA17.635). Des séquençages supplémentaires (génomique d'une même souche avant et après passage dans un modèle animal) sont nécessaires afin de déterminer précisément le taux de mutations de l'espèce et ainsi pouvoir déterminer précisément si les variations entre souches très proches sont dues à des artefacts techniques ou des variations génétiques.

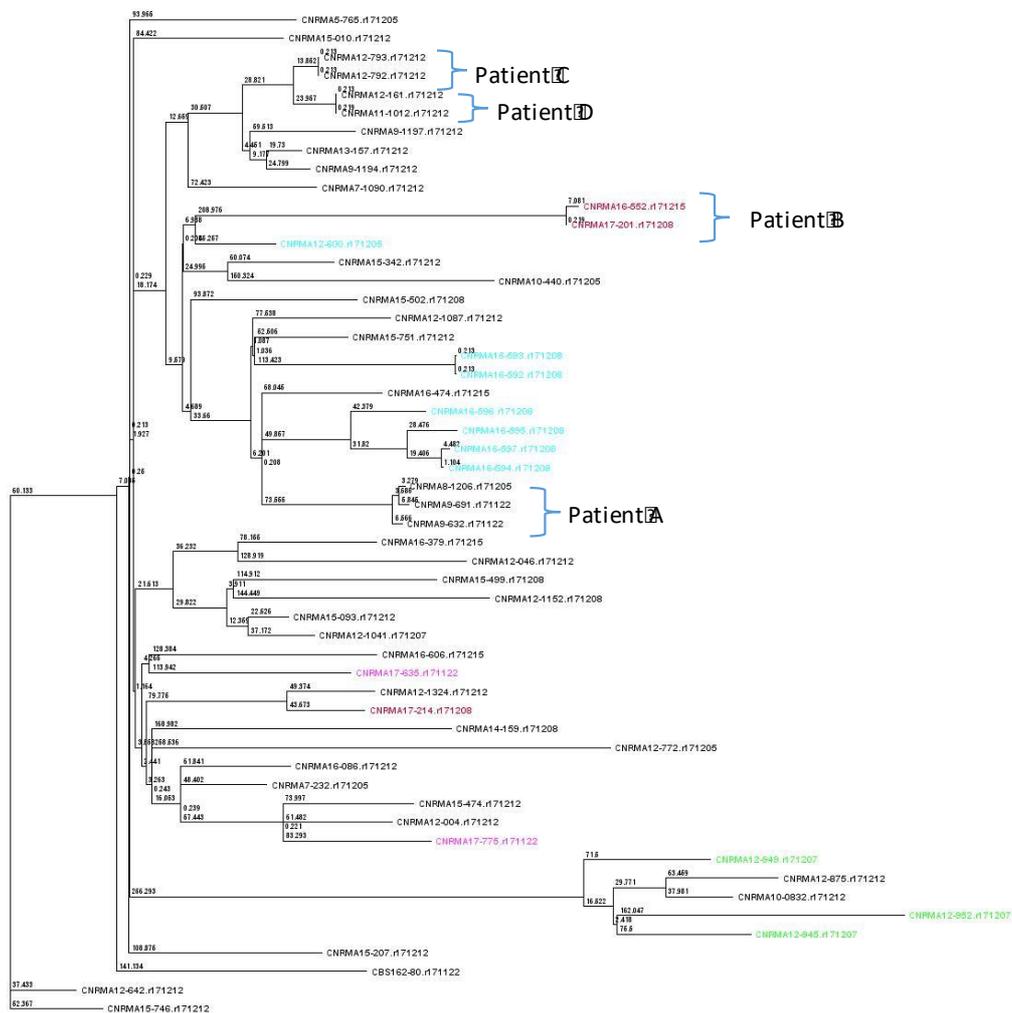


Figure 28 : ML tree construit en excluant les 7 isolats de *M. capitatus* divergents du cluster principal. En rose, les 3 souches de l'hôpital 1 ; en vert, les isolats isolés en 2012 en Suisse ; en turquoise, les isolats de l'hôpital 2 prélevés en 2009 et 2016 ; en rouge, les isolats de l'hôpital 3 prélevés en 2011, 2015 et 2016. Nombre de SNPs indiqués sur les branches. Les patients A à D avaient des souches de sites et/ou de dates de prélèvements différents.

#### 3.4.4. *Histoplasma capsulatum*

En 2018, le CNRMA a été sollicité en raison d'au moins un cas d'histoplasmosse aiguë (prouvée par isolement du champignon), et de plusieurs cas suspects au retour du Mexique. Les voyageurs faisaient partie d'un voyage organisé et avaient visité des grottes au Mexique. Cet incident a fait l'objet d'un signalement du CNRMA auprès de SPF. Le département de maladies infectieuses tropicales de SPF a pris en charge le contact avec l'ONG concernée et les patients. La Direction Générale de la Santé s'est impliquée en envoyant en particulier un courrier rédigé par les experts du CNRMA recommandant aux patients, symptomatiques ou asymptomatiques, de contacter un médecin et d'être conscients du contexte épidémiologique et du fait que qu'il leur faudra notifier ce contact aux médecins qui les prendraient en charge pour une pathologie sévère, y compris dans un futur lointain.

#### 3.4.5. *Aspergillus fumigatus*

En 2019, deux cas d'aspergillose invasive survenus en l'espace de 2 mois dans le même service de réanimation, dans un contexte de grippe grave et de travaux dans l'environnement immédiat des patients. Le typage des souches par la technique de microsatellites a identifié deux génotypes différents. Ceci excluait une contamination croisée mais bien entendu pas le fait que la même source environnementale (travaux) soit à l'origine de l'infection.

En 2020, 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.

#### 3.4.6. *Pneumocystis jirovecii*

En 2019, des cas groupés de pneumocystose chez des patients transplantés de rein et suivis dans le même centre hospitalier avec une alerte envoyée à Santé publique France par les hygiénistes du centre hospitalier. L'investigation microbiologique dans le cadre du CNRMA a été réalisée par Alexandre Alanio en utilisant le génotypage mis en place à l'hôpital Saint-Louis en 2015<sup>163</sup>. Elle a pu mettre en évidence un même clone circulant chez 10 patients transplantés rénaux et 1 transplanté pulmonaire, s'étalant entre août 2018 et septembre 2019. Cette épidémie a mis en évidence la nécessité de renforcer les mesures de prophylaxie chez les patients transplantés de rein.

#### 3.4.7. *Trichosporon inkin*

En décembre 2021, des cas de médiastinite à *Trichosporon inkin* chez 6 patients hospitalisés à la Pitié Salpêtrière ont été signalés à SPF. Cette espèce étant très rarement responsable d'infections invasives, la source commune est fortement

---

<sup>163</sup> Gits-Muselli M, Peraldi M-N, Castro N de, Delcey V, Menotti J, Guigue N, Hamane S, Raffoux E, Bergeron A, Valade S, Molina J-M, Bretagne S, Alanio A. 2015. New Short Tandem Repeat-Based Molecular Typing Method for *Pneumocystis jirovecii* Reveals Intrahospital Transmission between Patients from Different Wards. Plos One 10:e0125763.

suspectée. Cependant il n'existe pas de technique de typage permettant de déterminer le lien éventuel entre les isolats. Les isolats concernés ont été reçus au CNRMA en février 2022. Le séquençage génome entier pour ces isolats ainsi que 32 isolats cliniques conservés au CNRMA et de souches de référence a été effectué par la plateforme P2M. Les données de génome pour cette espèce étant très limitées, l'analyse est en cours et nécessite le séquençage de novo, la collaboration de bio-informaticiens et d'experts de ce groupe de champignon.

Chaque processus est suivi et mesuré à l'aide d'indicateurs répartis comme suit permettant de répondre aux objectifs définis :

## 4. Management de la Qualité - CNRMA-IFI

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.

### Accréditation ISO 15189

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) (<https://www.cofrac.fr/annexes/sect8/8-2588.pdf>).

### Garantie de la qualité des résultats

Le CNR participe 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/participent à des essais inter laboratoires avec des laboratoires homologues ou confrères européens ou mondiaux.

### Liste des examens du CNR

Le CNR Mycoses Invasives et Antifongiques (CNRMA) est accrédité pour la technique suivante :

« Distinction moléculaire entre les levures *Candida albicans* et *C. dubliniensis* »

Une **demande d'extension a été déposé au COFRAC le 29 octobre 2021** pour la technique « *Identification des champignons d'espèces courantes par spectrométrie de masse* ». Les dossiers de validation de méthode pour la technique à accréditer seront constitués à l'automne 2022.

Perspectives	Prévision de réalisation
Revue de direction LREMS	Juin 2022
Préparation des dossiers de validation de méthode	Novembre 2022
Audit de surveillance COFRAC	Juin 2022

## Gestion de la confidentialité

Au sein de l'Institut Pasteur, tout est mis en œuvre pour garantir aux patients la stricte confidentialité des données les concernant. Le personnel est, par son contrat de travail, soumis à la confidentialité. L'accès à l'Institut Pasteur et aux laboratoires est réglementé selon les dispositions internes du pôle Sûreté. Concernant les interventions par les sociétés extérieures, une clause de confidentialité est cadrée avec le service juridique dans les contrats d'intervention.

Au CNR, la confidentialité des données est assurée par le contrôle d'accès sur tous les ordinateurs. L'accès aux données de Lagon est assuré par un par l'attribution d'un identifiant et mot de passe personnels gérés par le système ldap de l'Institut Pasteur. Chaque personnel habilité dispose de privilèges d'accès différents dépendant de sa fonction (saisie de données uniquement pour l'assistante et les techniciens du CNR ou accès intégral pour responsable et adjoints). Cette information est fournie par le responsable du CNRMA à EpiConcept qui attribue alors l'accès à la base Lagon.

L'accès aux bases de données épidémiologiques créées sous RedCap est assuré par un contrôle de l'accès par identifiant et mot de passe personnels. Chaque personnel habilité dispose de privilèges d'accès différents dépendant de sa fonction. Les droits d'accès sont gérés par le responsable administratif du questionnaire.

Les dossiers nominatifs (format papier) des analyses (dossiers patients) sont classés et conservés dans une armoire fermée pour assurer la confidentialité. La consultation est limitée aux membres du CNRMA.