



RAPPORT ANNUEL

D'ACTIVITE 2023

Année d'exercice 2022

CNR Mycoses invasives et antifongiques

	Organisme / Structure d'hébergement	Responsable
Laboratoire CNR	Institut Pasteur, Paris	Fanny Lanternier
Laboratoire Associé	Cliquez ou appuyez ici pour entrer du texte.	Cliquez ou appuyez ici pour entrer du texte.
Laboratoire Associé	Cliquez ou appuyez ici pour entrer du texte.	Cliquez ou appuyez ici pour entrer du texte.
Laboratoire Associé	Cliquez ou appuyez ici pour entrer du texte.	Cliquez ou appuyez ici pour entrer du texte.
Laboratoire Associé	Cliquez ou appuyez ici pour entrer du texte.	Cliquez ou appuyez ici pour entrer du texte.

GUIDE DE REMPLISSAGE

Conformément à l'arrêté du 2 mars 2022 fixant leur cahier des charges, les Centres Nationaux de Référence (CNR) sont tenus de transmettre chaque année un rapport annuel portant sur l'activité du CNR pour l'année « N » à Santé publique France avant la fin du premier semestre de l'année « N+1 ». Ce rapport doit être conforme au rapport-type national défini par le Comité des CNR aux fins de définir un cadre de présentation homogène des activités du CNR et de ses éventuels laboratoires associés.

Si le CNR comporte un ou plusieurs laboratoires associés, le CNR – Laboratoire coordonnateur doit présenter un rapport commun faisant la synthèse des activités des laboratoires concourant aux missions du CNR.

Ce rapport décrit les activités du CNR et produit une analyse des données recueillies au cours de l'année « N ». Il doit être concis, éviter les redondances, privilégier les illustrations pour les résultats (graphes, cartes, tableaux). Il s'agit de fournir un travail de synthèse mettant en exergue les points forts du bilan d'activité de l'année.

Ce rapport doit inclure un résumé analytique, en français et en anglais, de 300 mots maximum (2700 caractères) destiné à être publié sur le site de Santé publique France.

Ce rapport comporte 3 annexes, regroupées à la fin du document :

- Les annexes 1 et 2 ont pour objet de rappeler les missions et l'organisation du CNR d'une part, ses capacités techniques d'autre part. Ces éléments sont pour la plupart déjà disponibles dans votre dossier de candidature. Seuls les éléments nouveaux (changement d'organisation, de locaux, nouvelles capacités ...) doivent figurer dans le corps du rapport.
- L'annexe 3 regroupe des informations confidentielles, à l'attention de Santé publique France et de son Comité des CNR, non destinées à être rendues publiques : permanence du CNR, détenteurs d'autorisations MOT (Micro-Organismes et Toxines), détenteurs d'autorisations d'exercer la biologie médicale (AEBM), résultats de recherche non encore publiés ou sous embargo, difficultés rencontrées, liste des activités menées par le CNR en lien avec des entreprises ou établissements industriels ou commerciaux dont les produits entrent dans le champ d'expertise du CNR (cf déclarations d'intérêts et engagement déontologique signé par les responsables des CNR (en précisant la nature des activités, les financements éventuels obtenus et la destination de ces financements). Cette annexe 3 doit figurer dans un document PDF distinct ou être détachable de la version papier fournie.

Il vous est demandé de respecter rigoureusement ce plan-type qui concorde avec celui de la grille d'évaluation utilisée par les experts du Comité. A l'exception de son annexe 3, ce rapport annuel d'activité a vocation à être publié sur le site web du CNR.

NB : Les contrôles de contenus insérés dans la matrice du document sont supprimés dès que vous commencez la saisie, ils rappellent ce qui est attendu par les experts du Comité des CNR

Guide de remplissage	2
Résumé analytique	5
Faits marquants	5
Executive summary	6
Highlights	6
1. Missions et organisation du CNR	7
Mission et Organisation	8
Démarche Qualité	9
2. Activités d'expertise	10
2.1 Evolution des techniques	10
2.2 Travaux d'évaluation des techniques, réactifs et trousse	10
2.3 Techniques transférées vers d'autres laboratoires	12
2.4 Collections de matériel biologique	12
2.5 Activités d'expertises	12
2.6 Activités de séquençage	15
2.7 Partage de séquences produites par les CNR	17
3. Activités de surveillance	18
3.1 Description du réseau de partenaires	18
3.2 Surveillance de l'évolution et des caractéristiques des infections	20
3.3 Surveillance de la résistance des agents pathogènes aux anti-infectieux	22
3.4 Interfaces avec les réseaux de surveillance nationaux ou internationaux	34
3.5 Enquêtes ou études ponctuelles concourant à la surveillance	34
4. Alertes	35
5. Activités de mise à disposition de l'information, de formation et de conseil	38
5.1 Conseil et expertise aux professionnels de santé	38
5.2 Conseil et expertise aux autorités sanitaires	38
5.3 Conseil et expertise pour d'autres cibles (médias, grand public ...)	38
6. Travaux de recherche et publications en lien direct avec l'activité du CNR	39
6.1 Activités de recherche en cours lors de l'année N, concernant uniquement celles ayant un lien direct avec les missions et activités du CNR	39
6.2 Liste des publications et communications de l'année N, concernant uniquement celles ayant un lien direct avec les missions et activités du CNR	41
7. Coopération avec les laboratoires de santé animale, de sécurité sanitaire des aliments, environnementaux	46
8. Programme d'activité pour les années suivantes	47
1. Annexe 1 : Missions & organisation du CNR	49
1.1 Missions du CNR et de ses éventuels laboratoires associés	49
1.2 Organisation du CNR et de ses éventuels laboratoires associés	49
1.3 Locaux et équipements	49

1.4 Collections de matériel biologique	50
1.5 Démarche qualité du laboratoire	51
2. Annexe 2 : Capacités techniques du CNR	53
2.1 Liste des techniques de référence	53
2.2 Liste des techniques recommandées par le CNR	54

RESUME ANALYTIQUE

FAITS MARQUANTS

Le Centre National de Référence des Mycoses Invasives et Antifongiques (CNRMA) a pour mission la surveillance, l'expertise, l'alerte et le conseil pour l'ensemble des infections fongiques invasives en France. Ces infections surviennent majoritairement chez des patients présentant une diminution de leurs défenses immunitaires (immunodépression) et sont associées à une mortalité élevée. Les modifications de traitement des patients ainsi que les modifications de l'environnement (eg : réchauffement climatique) peuvent avoir un rôle important dans leur épidémiologie. L'OMS a récemment établi la liste des pathogènes fongiques prioritaires.

La fin de l'année 2022 a été marquée par le départ du Pr Françoise Dromer ayant dirigé et construit ce CNR avec deux adjoints le Pr Stéphane Bretagne et le Pr Olivier Lortholary. L'année 2022 a été une année de construction du projet du futur mandat du CNR ainsi qu'une année de reprise après les années de la crise COVID.

En 2022, 1395 cas ont été déclarés dans le cadre de la surveillance RESSIF, (52% de fongémies, 18% de pneumocystoses, 13% d'aspergilloses et 5% de mucormycoses), avec un taux de mortalité globale de 35%. Les pathologies malignes sont présentes chez 48% des patients diagnostiqués pour une infection fongique invasive. Douze pourcents des patients avaient comme risque associé une infection par le SARS CoV-2. Concernant les fongémies, le nombre d'isolats résistants aux échinocandines reste très faible en 2022 (<1%), le pourcentage d'isolats de *C. parapsilosis* et *C. glabrata* résistants au fluconazole est en augmentation depuis 2020, respectivement de 27% et 69% en 2022. Par ailleurs, pour les champignons filamenteux, la réalisation de CMI à l'olorofilm a été implémentée en 2022.

Plus de 800 avis thérapeutiques ont été donnés et plus de 200 dossiers discutés en RCP avec l'équipe du service de maladies infectieuses de l'Hôpital Necker.

Plus de 850 demandes de qPCR en 2022 pour des suspicions d'histoplasmoses et de coccidioidomycoses ont été réalisées à l'hôpital Saint-Louis.

Les alertes au cours de l'année 2022 ont concernées en particulier *Candida auris* avec 7 cas en 2022 (24 au total depuis 2007), un cas associé à deux cas secondaires a pu être mis en évidence en 2022 et des cas de médiastinites à *Trichosporon inkin* au décours de chirurgie cardiaque.

Par ailleurs un travail national sur les infections à *Candida haemulonii* a permis de montrer la fréquence de ce pathogène proche de *Candida auris* chez des patients vivants ou ayant séjourné en zone tropicale ainsi qu'une augmentation récente du nombre de cas d'infections invasives à *Cladophialophora bantiana*.

EXECUTIVE SUMMARY

HIGHLIGHTS

The National Reference Center for Invasive Mycoses and Antifungals aim is to monitor, assess, alert and advise on invasive fungal infections in France. These infections occur mainly in patients with impaired immune defenses, and are associated with high mortality. Changes in patient treatment and environmental factors (e.g. global warming) may play an important role in their epidemiology. The WHO has recently drawn up a list of priority fungal pathogens.

2022 was marked by Prof. Françoise Dromer departure, who led the reference center for numerous years.

In 2022, 1,395 cases were reported as part of RESSIF surveillance (52% fungemia, 18% pneumocystis, 13% aspergillosis and 5% mucormycosis) with an overall mortality rate of 35%. Malignancies were present in 48% of patients diagnosed with an invasive fungal infection. Twelve percent of patients had SARS CoV-2 infection as an associated risk. Concerning candidemia, the number of echinocandin-resistant isolates remains very low in 2022 (<1%), while the percentage of *C. parapsilosis* and *C. glabrata* isolates resistant to fluconazole has been increasing since 2020, up to 27% and 69% respectively in 2022. In addition, for filamentous fungi, MIC testing with olorofilm has been implemented in 2022.

More than 800 therapeutic advices have been given and over 200 cases discussed in RCP with the infectious diseases team at Necker Hospital.

Over 850 requests for qPCR in 2022 for suspected histoplasmoses and coccidioidomycosis have been made at Hôpital Saint-Louis.

Alerts in 2022 concerned *Candida auris* in particular, with 7 cases in 2022 (24 in total since 2007), a case associated with two secondary cases was identified in 2022, and cases of *Trichosporon inkin* mediastinitis following cardiac surgery.

In addition, a national study of *Candida haemulonii* infections revealed the frequency of this pathogen, closely related to *Candida auris*, in patients living or having lived in tropical zones, as well as a recent increase in the number of cases of invasive *Cladophialophora bantiana* infections.

1. Missions et organisation du CNR

Aucun changement n'est intervenu au cours de l'année 2022 concernant les missions du CNRMA (cf Annexe 1). Des changements au-niveau du personnel sont intervenus depuis le début du précédent mandat (changement de techniciens, Tableau 1). Nous indiquons ici (Figure 1), l'organigramme du CNRMA durant l'année 2022 mais également celui existant depuis le début du nouveau mandat (Figure 2). Depuis le 1er janvier 2023, le CNRMA est rattaché au Département de Mycologie de l'Institut Pasteur et comprend dans sa structure un groupe de recherche intitulé Mycologie Translationnelle. De plus, trois laboratoires associés ont également été créés. Le laboratoire associé des Aspergilloses Chroniques (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'rsset (UMR S_1085 Inserm) à Rennes; et le laboratoire associé Identification Numérique, Surveillance épidémiologique, Alerte (LA-INuSuAI) 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). L'activité de ces laboratoires ayant débuté en janvier 2023, nous ne reporterons aucun fait les concernant dans le présent rapport.

ORGANIGRAMME

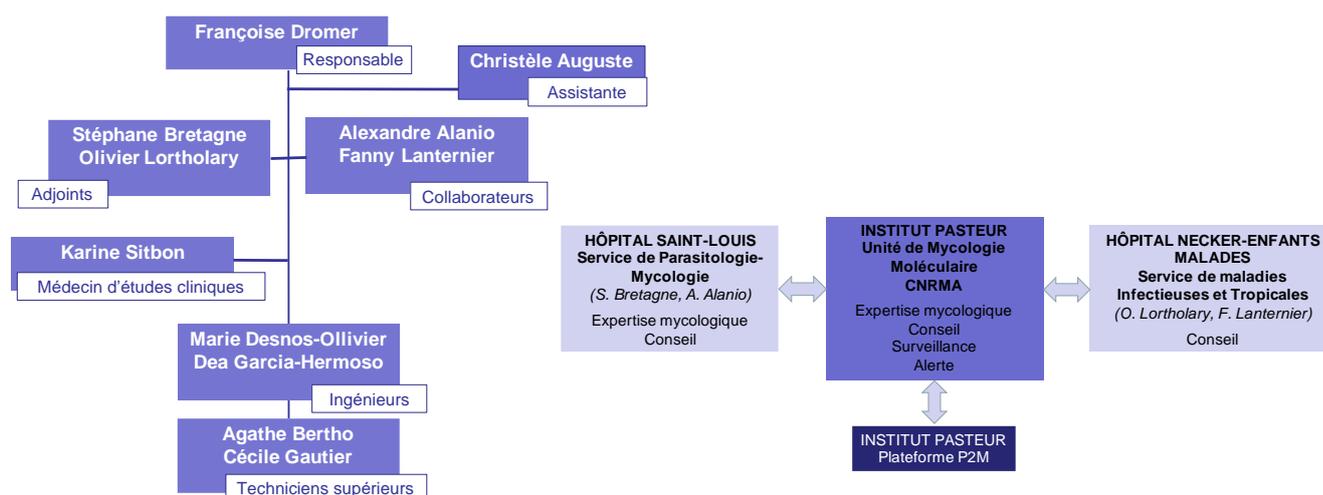


Figure 1. Organigramme du CNRMA du 1er janvier au 31 décembre 2022

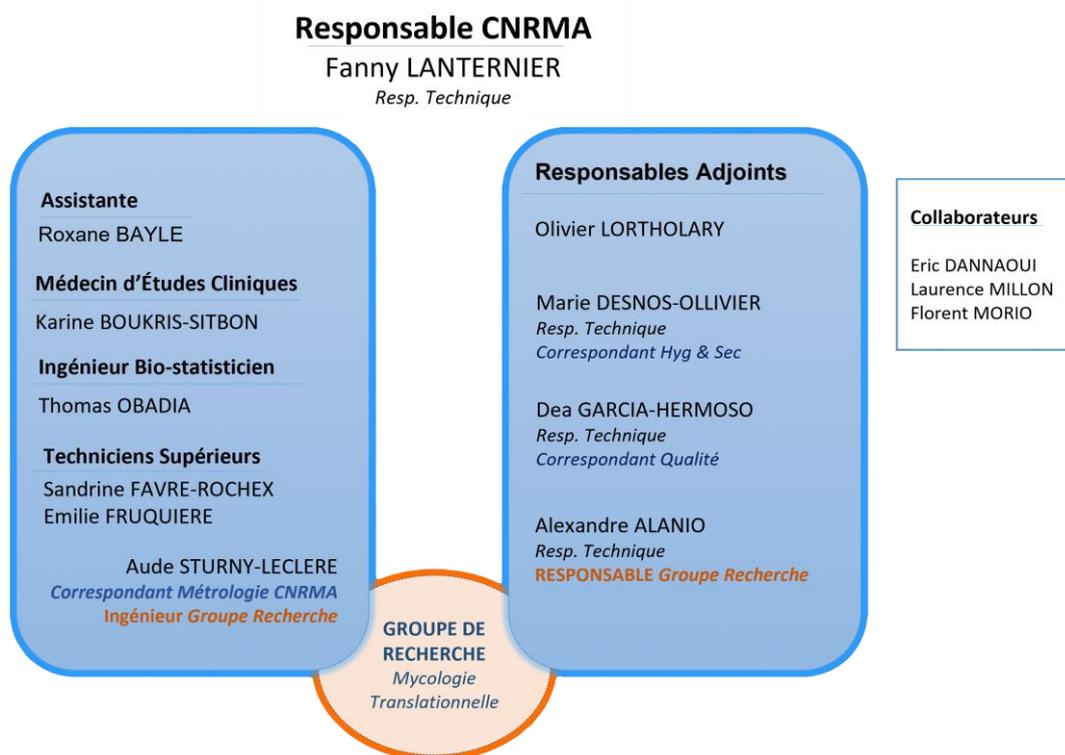


Figure 2. Nouvel organigramme du CNRMA-IFI depuis le 1^{er} janvier 2023

MISSION ET ORGANISATION

Les Missions, les locaux et équipements, les collections et la démarche qualité sont détaillés en Annexe 1. Depuis le 1^{er} janvier 2023 et le début du nouveau mandat, les locaux sont identiques à l'exception d'un espace de bureau qui a été réattribué à un autre groupe de recherche.

Tableau 1. Liste du personnel travaillant au CNRMA entre janvier 2022 et décembre 2022

Nom	Fonction	ETP	Qualification/statut	Organisme payeur
Alexandre Alanio	Collaborateur scientifique	20%	Docteur en médecine, Thèse d'université, PU-PH Hôpital Saint Louis	AP-HP / Université Paris Diderot P7
Christèle Auguste	Assistante	30%	Secrétaire de Direction	Institut Pasteur
Agathe Bertho (départ décembre 2022)	Technicienne	100%	BTS / Technicien supérieur de laboratoire	Institut Pasteur
Stéphane Bretagne	Directeur Adjoint	20%	Docteur en Médecine, Thèse d'université / PUPH Hôpital Saint Louis	AP-HP / Paris Diderot P7
Marie Desnos-Ollivier	Collaborateur technique/scientifique	80% (100% depuis juin 2022)	Thèse d'université / Ingénieur	Institut Pasteur
Françoise Dromer	Directeur du CNRMA	40%	Docteur en Médecine, Thèse d'université / Professeur Institut Pasteur	Institut Pasteur

Emilie Fruquière (depuis septembre 2021)	Technicienne	100%	BTS / Technicien supérieur de laboratoire	Institut Pasteur
Dea Garcia-Hermoso	Collaborateur technique/scientifique	100%	Thèse d'université / Ingénieur	Institut Pasteur
Fanny Lanternier	Collaborateur clinicien	20%	Docteur en médecine, Thèse d'université, PU-PH Hôpital Necker-Enfants Malades	AP-HP / Université Paris Cité
Olivier Lortholary	Directeur Adjoint	20%	Docteur en Médecine, Thèse d'université / PUPH Hôpital Necker-Enfants Malades	AP-HP / Université Paris Cité
Karine Boukris-Sitbon	Médecin d'Etudes Cliniques	50%	Docteur en Médecine / Médecin d'études cliniques / Cadre Administratif et Technique	Institut Pasteur

DEMARCHE QUALITE

Le CNRMA a été accrédité selon la norme NF EN ISO 15189 en mars 2015 (n°8-2588). La portée d'accréditation est visible sur le site du COFRAC. Le CNR poursuit la démarche d'accréditation selon les conditions imposées par la Loi du 30 mai 2013 (2013-442).

Ci-après le récapitulatif des analyses réalisées en 2022 déclaré à l'ARS

CNR	Famille	Sous famille	Activités de biologie médicale	Nb analyses 2022	Accrédité A ou Non Accrédité NA
CNR Mycoses invasives & Antifongiques	Microbiologie	Parasito-Mycologie	Distinction moléculaire entre <i>Candida albicans</i> et <i>C. dubliniensis</i>	148	A

La dernier **audit COFRAC** a eu lieu le **27 juin 2022** et aucune fiche d'écart a été établi par l'auditrice.

Demande d'extension prévue

CNR	Famille	Sous famille/ ligne de portée	Activités de biologie médicale	Méthode
CNR Mycoses invasives & Antifongiques	Microbiologie	Parasito-Mycologie / BM PM04	Identification des champignons d'espèces courantes	Spectrométrie de masse de type MALDI-TOF (<i>Matrix-Assisted Laser Desorption Ionisation-Time of Flight</i>).

2. Activités d'expertise

Les techniques disponibles au CNRMA sont détaillées en Annexe 2.

2.1 Evolution des techniques

Génotypage des espèces rares responsables de cas groupés

Suite à des cas groupés d'infections invasives dues aux espèces *Magnusiomyces clavatus* (syn. *Saprochaete clavata*) et *M. capitatus*, en collaboration avec P2M et le HUB Bio-informatiques et Bio-statistiques de l'Institut Pasteur, nous avons effectué le séquençage génome entier de nombreux isolats de ces espèces. La comparaison des données associées aux données cliniques des souches nous a permis d'améliorer nos connaissances quant à la diversité génétique de ces espèces. Nous avons désormais une collection importante de données de génome entier et mis en place un pipeline d'analyses, ce qui nous permet en cas d'infections à *M. clavatus*, *M. capitatus* et également *C. auris* de pouvoir rapidement déterminer le lien génétique éventuels entre les isolats.

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 disséminée¹.

Diagnostic moléculaire des fusarioses

Nous avons publié récemment les résultats d'une étude évaluant l'utilisation d'une PCR *Fusarium spp.* pour le diagnostic des fusarioses. A partir de l'étude de 15 cas de fusariose prouvée et 80 échantillons de sérum. Nous avons mis en évidence une sensibilité de 93% et une spécificité de 100% de la qPCR en comparaison aux méthodes classiques. Le diagnostic pouvait être anticipé de 6 jours par rapport au diagnostic microbiologique conventionnel².

PCR Cryptococcose

Nous avons également développé et validés (publication en cours) une PCR *Cryptococcus* que nous proposons aux centres français qui le souhaitent pour les diagnostics de cryptococcose (en particulier localisés). Enfin nous proposons également une PCR *C.auris* pour le criblage des patients à risque³.

2.2 Travaux d'évaluation des techniques, réactifs et trousse

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 IFI⁴. Ceci est basé sur les performance 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.

¹ Alanio A et al. Evaluation of a New *Histoplasma spp.* Quantitative RT-PCR Assay. J Mol Diagn. 2021.

² 1. Dellière S, et al. 2022. Detection of circulating DNA for the diagnosis of invasive fusariosis: retrospective analysis of 15 proven cases. Med Mycol <https://doi.org/10.1093/mmy/myac049>.

³ Alanio et al 2021 ,Microbiology Spectrum

⁴ Donnelly JP, et al. 2019. Revision and Update of the Consensus Definitions of Invasive Fungal Disease From the European Organization for Research and Treatment of Cancer and the Mycoses Study Group Education and Research Consortium. Clin Infect Dis 71:1367–1376.

Récemment, une évaluation de l'intérêt du BDG a été mise en place dans le contexte de l'ECIL-9 (A. Alanio) avec l'analyse bibliographique des performances du BDG dans les fusarioses et les scedosporioses⁵. Notre évaluation de la littérature (nombre de cas analysable restreints) a abouti à des valeurs de sensibilité de 76,7% et 81,5% pour le diagnostic des fusarioses et des scedosporioses, respectivement.

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 (Johns Hopkins University, Baltimore, USA). 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.

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 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.

Une évaluation du test dans le sérum chez des patients asymptomatiques à risque a montré un taux de faux positif important qui a pu être diminué avec l'utilisation d'un protocole de chauffage simple (100°C 5min) avec un impact existant mais minime sur la sensibilité⁶. Par ailleurs, ce test a montré des limites en termes de sensibilité pour le diagnostic des cryptococcoses liés à *C. gattii* complex⁷.

Mucormycose

Nous avons évalué le kit MucorGenius comparé à la qPCR utilisée à l'Hopital Saint Louis⁸. Un total de 25 échantillons de sérum (13 échantillons de cas de mucormycoses prouvée ou probable) a été évalué. Les résultats montrent que le kit MucorGenius est moins sensible (4/13, 31% positif uniquement) que la PCR locale (9/13, 69%) en particulier avec une diminution importante de la sensibilité pour le genre *Lichtheimia*.

Histoplasmosse

L'histoplasmosse est une infection négligée dans nombreux pays Africains du fait d'un tableau clinique similaire à la tuberculose, de la complexité du diagnostic, de la nécessité de prélèvements par des procédures invasives difficilement envisageables dans des zones aux ressources limitées et aussi du manque de formation du personnel de santé de première ligne (cliniciens et techniciens de laboratoire). La mise en place d'outils de diagnostic non invasifs permettrait d'améliorer le diagnostic de l'histoplasmosse chez les patients les plus exposés mais aussi d'évaluer la prévalence de cette infection fongique dans les pays Africains où les données sont encore insuffisantes. Les tests de diagnostic rapides (TDRs) tels que le TB Urinary-Lam pour le diagnostic de la tuberculose ou le CrAg Lateral Flow Assay pour le diagnostic de la cryptococcose ont démontré leur impact sur la prise en charge des pathologies associées aux patients VIH. Ces TDRs reposent sur des procédures simples et réalisables pour la plupart des centres de soins de santé primaires ou pour une utilisation au lit du patient.

Notre objectif est d'évaluer deux nouveaux TDRs basés sur la détection urinaire de l'antigène Galactomannan de Histoplasma, pour étudier leurs performances et la prévalence de l'histoplasmosse, sur des échantillons récoltés en Afrique (Afrique de l'Ouest et SSA), où la prévalence de l'infection à VIH et de la tuberculose est élevée. Ces TDRs ont une sensibilité (Se \geq 93 %) et une spécificité (Sp \geq 95 %) élevées dans des études menées au Mexique et en Colombie, et semblent très prometteurs.

⁵ Lamoth et al. 2023 in Press, Med Mycol

⁶ Aissaoui N, et al. 2022. Investigation of CryptoPS LFA-positive sera in patients at risk of cryptococcosis. Med Mycol <https://doi.org/10.1093/mmy/myac078>.

⁷ Shi D, et al. 2021. Neglecting genetic diversity hinders timely diagnosis of Cryptococcus infections. J Clin Microbiol <https://doi.org/10.1128/jcm.02837-20>.

⁸ Ghelfenstein-Ferreira T, Verdurme L, Alanio A. 2022. Analytical Performance of the Commercial MucorGenius® Assay as Compared to an In-House qPCR Assay to Detect Mucorales DNA in Serum Specimens. J Fungi 8:786.

Identification de l'espèce par test multiplex dans les hémocultures

Nous avons évalué le panel BCID 2 méthode Biofire (Biomérieux) pour l'identification des *Candida* dans les hémocultures⁹. Sur les 3 hémoculture à *Candida albicans* incluse dans cette étude, seules 2 (66%) ont pu être détectées par la méthode BCID2.

2.3 Techniques transférées vers d'autres laboratoires

Techniques transférées	par	vers Laboratoire	lieu
Caractérisation morphologique des levures et champignons filamenteux (principes conidiogénèse des principaux groupes fongiques, cultures sur lame, etc.)	Dea Garcia-Hermoso	CRBIP pour collection fongique Institut Pasteur (CFIP)	Institut Pasteur
Identification moléculaire des levures et champignons filamenteux			
Extraction ADN			
Amplification des loci fongiques par PCR			
Analyse des chromatogrammes et séquences pour recherche des similarités dans les bases de données disponibles			

2.4 Collections de matériel biologique

L'organisation, les conditions de stockage et de mise à disposition des collections de matériel biologique du CNR sont détaillées en annexe 1. Tous les isolats reçus au CNRMA pour expertise ou dans le cadre des surveillances sont stockés selon les conditions détaillées dans l'annexe 1.

Au cours de l'année 2022 : **784 isolats** ont été reçues et stockées au CNRMA. De plus, à la demande de certains laboratoires nous avons transmis des isolats cliniques, après accords des correspondants expéditeurs et signature d'un MTA et selon les normes de sécurité en vigueur (Tableau 2).

Tableau 2. Matériel biologique distribué par le CNRMA en 2022

Nature du matériel biologique	Quantité	Destinataire
souche	2	CHU Reims
souche	28	Unité Biologie et Pathogénicité Fongiques, IP

Depuis le début du mandat actuel, **251 isolats** ont été reçus et stockés au CNRMA. Les conditions de stockage des isolats sont identiques à celles du précédent mandat.

Actuellement le CNRMA conserve **3927 souches de champignons filamenteux**, **147 de souches de champignons dimorphiques** et **13 420 souches de levures**, provenant d'isolats cliniques. Le détail des espèces et des conditions de stockage est donné dans l'annexe 1.

2.5 Activités d'expertises

Le CNRMA a reçu 833 échantillons en 2022 dont une faible proportion n'était pas conforme à ses missions [mycoses superficielles (n=10) et demandes de sérologie (n=3)]. Conformément à notre revue de contrat 97% des résultats ont été rendus dans un délai de moins de 10 jours. En cas de sollicitation pour une urgence, les résultats sont fournis généralement en moins de 48h ouvrés par courriel et/ou appel téléphonique.

Des avis concernant la prise en charge diagnostique et thérapeutiques des infections fongiques est réalisé par le Pr Fanny Lanternier et Olivier Lortholary en collaboration avec l'ensemble des cliniciens du service de maladies infectieuses et tropicales de l'hôpital Necker Enfants malades via une ligne téléphonique dédiée et l'adresse

⁹ Caméléna F, et al.. 2022. Multicenter Evaluation of the FilmArray Blood Culture Identification 2 Panel for Pathogen Detection in Bloodstream Infections. Microbiol Spectr e02547-22.

générique cnrma@pasteur.fr, en particulier le Dr Perrine Parize. Par ailleurs a été mise en place une RCP nationale par visioconférence avec des mycologues, infectiologues et pharmacologues ainsi que le support du secrétariat du service de maladies infectieuses et tropicales de l'Hôpital Necker Enfants Malades. Six avis environ sont délivrés chaque semaine. Un compte rendu résumant les recommandations est envoyé par mail aux médecins ayant sollicités l'avis.

La totalité des échantillons reçus provenaient des hôpitaux français, de France métropolitaine (91,4%) et des DOM-TOM (8,6) avec des localisations diverses : sang (52,46%), poumon (16,7%), peau (7,56%), système nerveux central (3,96%), os/articulations (4,32%), sphère ORL (2,52%), urines (1,80%), œil (1%) entre autres.

Le bilan pour l'année 2022 est présenté dans le tableau 3.

Tableau 3. Bilan des expertises pour l'année 2022

	Nombre de souches concernées			
	TOTAL	levures	filamenteux	Classe 3
Nombre d'avis cliniques donnés en dehors de la RCP	>800			
Nombre d'avis donnés dans le cadre de la RCP nationale	250			
Nbre de fiches de déclarations monitorées	2069**	1203	514	7
Nbre de souches expertisées	784/833*	506	257	7
Détermination profil MALDI-Tof		506		NA
Détermination de la sensibilité aux antifongiques (EUCAST)		505	257	NA
nb. souches/amplification PCR et Séquençage Sanger		316	257	7
Sérotypage <i>C. neoformans</i> complex par PCR		66		
Génotypage par MLST		79		
Génotypage par microsatellites		15	16	
Détection mutation liée à la résistance		14	12	
Séquençage génome entier	80	80		
Diagnostic moléculaire échantillons biologiques (envoi CNRMA=> SLS)	12			

* certaines souches ne sont pas expertisées car soit annulées soit aucune croissance et donc analyse complète impossible

** 344 épisodes de PCP

Les techniques utilisées pour l'expertise des souches reçues au CNRMA sont détaillées dans l'annexe 2.

Expertise 2022 sur les champignons filamenteux

En 2022, les champignons filamenteux reçus au CNRMA étaient isolés principalement des poumons (44,2%), de la peau (18,3%), des os (8%), de l'œil (7,2%), du sphère ORL (6 %), du sang (4,4%), mais aussi des urines (2,8%), du cerveau (2%), de l'appareil digestif (1,6%) ou des articulations (1,6%).

Nous avons caractérisé cette année 90 espèces de 41 genres différents appartenant au 13 Ordres. Dans l'ordre d'*Eurotiales* le genre *Aspergillus* était majoritaire suivi par les genres *Penicillium*, *Talaromyces*, *Paecilomyces* et *Rasamsonia*.

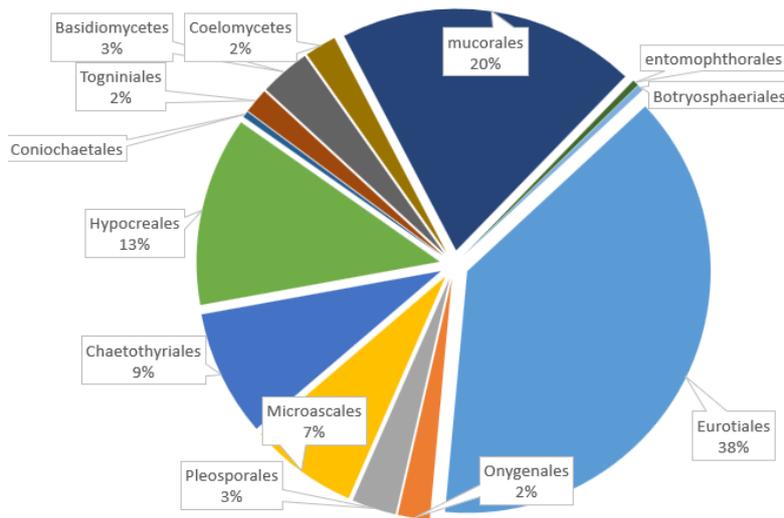
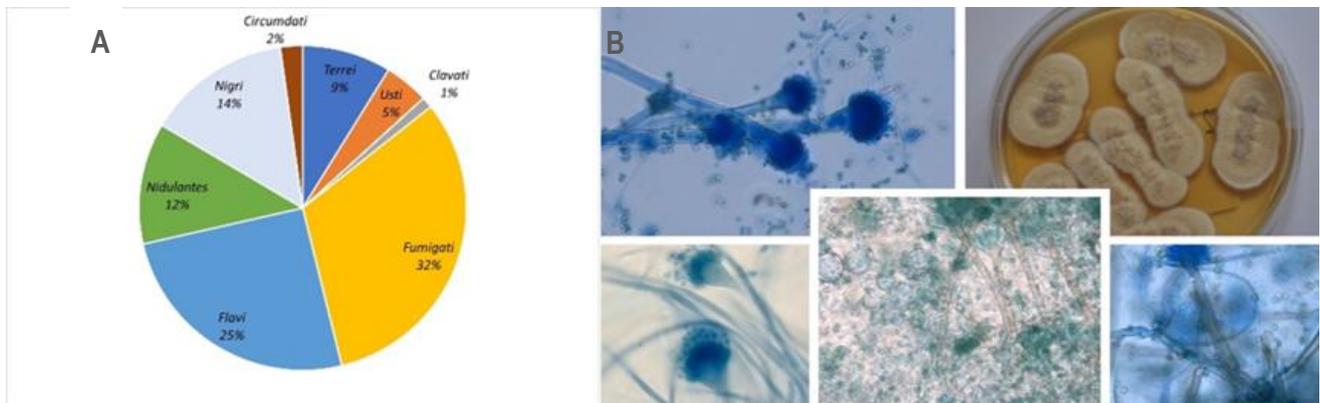


Figure 3. Répartition des genres identifiés selon l'Ordre correspondant en 2022

Le genre *Aspergillus* a été représenté principalement par des espèces des sections *Fumigati* (32%) et *Flavi* (25%) suivi des sect. *Nigri* (14%), sect. *Nidulantes* (12%), sect. *Terrei* (9%), sect. *Usti* (5%), sect. *Circumdati* (2%) et un représentant de la section *Clavati* (Fig 4).



Pour l'ordre des Mucorales, le genre *Rhizopus* était le plus représenté avec *R. arrhizus* comme espèce majoritaire (21%) (Fig 5).

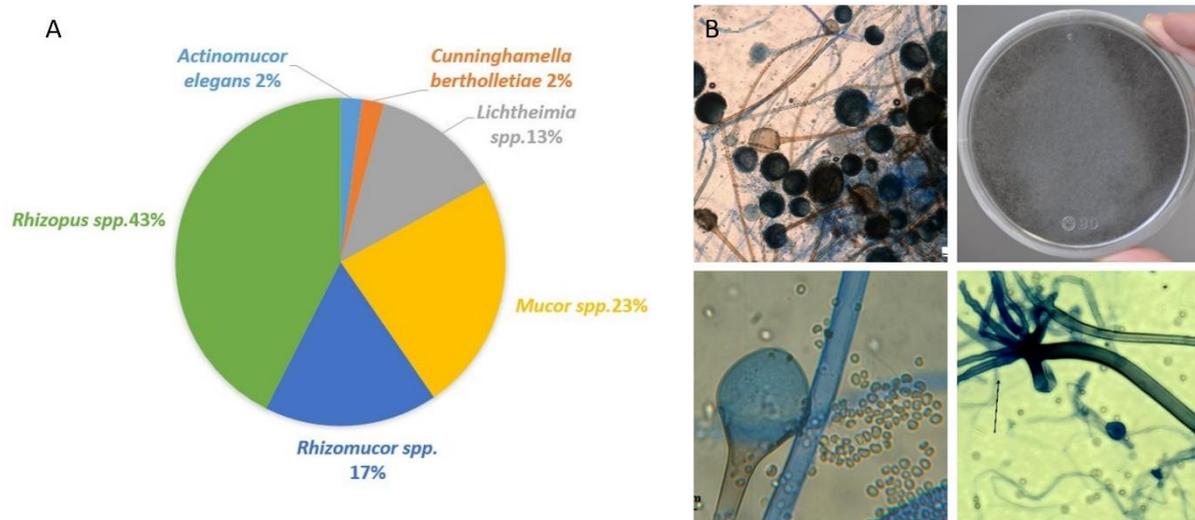


Figure 5. Ordre Mucorales (A) Distribution de différents genres et (B) aspects macro- et microscopiques

Nous avons accès au laboratoire de confinement type 3 ce qui nous permet de manipuler des champignons pathogènes de classe 3. Cette année nous avons réalisé la confirmation ou l'identification de 2 souches d'*Histoplasma* et 6 *Cladophialophora bantiana*.

2.6 Activités de séquençage

En 2022, 573 isolats ont été séquencés soit après amplification PCR de plusieurs loci, soit par séquençage génome entier. Le total des produits PCR envoyés est de 2547, le nombre d'isolat dont le génome entier a été séquencé est de 80.

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

* NON	Le séquençage Sanger est réalisé par la société EUROFINS, situé à Cologne. Le séquençage en urgence par la technique Sanger peut-être demandé et effectué par le pôle génotypage de la CIBU sur le site de l'Institut Pasteur.
* OUI	L'Institut Pasteur est doté d'une plateforme dite Plateforme de Microbiologie Mutualisée (P2M) pour le séquençage génome entier, qui est ouverte à l'ensemble des CNRs ainsi qu'aux laboratoires de référence dans le Réseau International des Instituts Pasteur et instituts associés. La technologie utilisée par cette plateforme de séquençage est la technologie Illumina (fabrication des bibliothèques + séquençage). Les banques sont préparées avec le kit Nextera XT et engagées sur le séquenceur NextSeq 500. Une série de matériels est également utilisée pour réaliser les contrôles de qualité tout au long du processus de fabrication de séquence. Des robots pipeteur et extracteur permettent d'homogénéiser et de normaliser les ADN et amplicons avant d'entrer dans le pipeline de production.

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

✗ NON	Le CNRMA ne dispose pas de bioinformaticien dans l'équipe, mais les ingénieurs sont autonomes pour l'analyse des données de séquençage Sanger, génotypage par microsatellites et se forment pour travailler en collaboration avec les bioinformaticiens du HUB à l'analyse des données NGS.
✗ OUI	<p>Le CNR a la possibilité de faire appel à une expertise bio-informatique, en sollicitant les services supports en interne à l'Institut Pasteur. Ils ont actuellement accès aux bio-informaticiens du HUB, qui qualifient et réalisent une analyse de premier niveau (contaminations, qualité, assemblage) sur les données sortantes. Ces bioinformaticiens peuvent également apporter leur aide aux CNR, pour le développement de méthodes de génotypage et d'autres pipelines d'analyses des séquences, y compris en cas d'épidémie. Malheureusement, la demande est très supérieure à l'offre.</p> <p>Les outils pour l'édition et l'analyse des données de séquençage Sanger sont des licences de Geneious, Sequencher. Les analyses phylogénétiques sont effectuées avec Geneious, Mega.</p> <p>Les données de génotypage par microsatellites sont analysées avec le logiciel d'accès gratuit PeakScanner.</p> <p>Les données de génome entier sont analysées sur le cluster de l'Institut Pasteur avec des outils en accès libre : modules samtools, minimap, bwa, freebayes, vcftools, IQtree, et/ou mis au point par des bio-informaticiens du HUB : SAM2MSA</p>

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

<input type="checkbox"/> NON	Si NON, est-ce prévu ? A quelle échéance ?
✗ OUI	Dans le cas de la surveillance et comme détaillé dans l'annexe 2, nous faisons du séquençage multi-locus pour l'ensemble des champignons filamenteux et des levures rares. De plus, dans le cas d'épidémies nous faisons selon le groupe fongique du séquençage multilocus et/ou génome complet.

Si le séquençage est utilisé par le CNR, décrivez ci-dessous les analyses bio-informatiques conduites (cgMLST, wgMLST, serogroupe/serotype prediction, resistome prediction, analyse phylogénétique, ...) et précisez si elles sont faites en première ligne ou en complément d'autres techniques (indiquez alors lesquelles)

Les analyses bio-informatiques utilisés au CNRMA consistent principalement en des analyses phylogénétiques et cgMLST. La majorité des analyses sont faites dans le cadre de l'activité d'expertise ou de surveillance et ne sont donc pas faites en première ligne. Cependant, certaines analyses sont réalisées selon la procédure d'urgence au CNR (première ligne), généralement pour des agents pathogènes de classe 3.

Séquençage utilisé à des fins d'investigations d'épidémies :

En 2022, le séquençage génome entier de 70 souches a été réalisé dans des investigations de cas groupés pour des souches de *Candida auris* et *Trichosporon inkin*. De plus, le génotypage par microsatellites a été fait pour 16 souches et par MLST pour 3 souches de *P. kudriavzevii*.

Séquençage utilisé à des fins de surveillance :

	Nbre d'espèces concernées	Nbre de souches
Séquençage Sanger pour identification	140	2547
Séquençage FKS	4	14
Séquençage CYP51A	1	12
Génotypage par microsatellites	2	15
Génotypage par MLST	5	76

Pour l'identification au-niveau de l'espèce dans le cadre de la surveillance, toutes les souches, en dehors des espèces fréquentes de levures (*C. albicans*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*, *C. krusei*, *C. kefyr*, *C. dubliniensis*) sont identifiées par séquençage Sanger d'un ou plusieurs loci (détails des loci en annexe 1). Le génotypage par MLST ainsi que la détection de mutation liée à la résistance aux antifongiques sont réalisés par séquençage Sanger dans le cadre de la surveillance en cas de profil de résistance *in vitro* et/ou d'isolats provenant d'un même patient ou recueillis lors de suspicion de cas groupés.

Séquençage utilisé par le CNR, où sont déposées les séquences :génomés assemblés ou séquences brutes (fastQ files) ?

Dans les bases de données fermées : Toutes les données de séquences issues du séquençage Sanger ainsi que les données de génotypage sont stockées dans notre base de données fermée Biologics et une grande partie est consultable en ligne sur le site Institut Pasteur-FungiBank dont le CNRMA est le responsable et le curateur.

Les données de séquençage génome entier (données brutes, fastq files) ainsi que les séquences issues du séquençage Sanger (fasta files) sont déposées dans les bases de données publiques, généralement NCBI, lorsque ces données sont utilisées pour des publications dans des journaux à comité de lecture. Les données de séquences correspondant aux séquences MLST sont déposées régulièrement dans les bases de données accessibles en ligne existantes (pour *C. tropicalis*, *C. glabrata*, *C. neoformans*).

2.7 Partage de séquences produites par les CNR

Toutes les données de séquences issues du séquençage Sanger ainsi que les données de génotypage sont stockées dans notre base de données fermée Biologics dont une grande partie est consultable en ligne sur le site Institut Pasteur-FungiBank dont le CNRMA est le responsable et le curateur. La base de données est gérée en collaboration avec la société Bioaware qui a créé le logiciel Biologics. Elle est constituée des séquences nucléotidiques et protéiques des souches fongiques expertisées au CNRMA, associées aux données de CMI et éventuellement de génotypage. Cette base est publique. Les données mises sur Institut Pasteur FungiBank <https://fungibank.pasteur.fr/> sont également accessibles pour l'alignement de séquences (pairwise alignment) sur le site MycoBank https://www.mycobank.org/Pairwise_alignment. La base contient actuellement 2392 séquences (ITS, 26S, IGS, actine, RPBI, FKS) pour 2313 souches de levures et 2671 séquences (18S, 28S, ITS, calmoduline, actine, betat-tubuline, EF1-alpha, RPB1, RPB2, CYP51A) pour 1273 souches de champignons filamenteux.

3. Activités de surveillance

En 2022, 1395 cas ont été déclarés dans le cadre de la surveillance RESSIF, avec un taux de mortalité globale de 35% (incluant 52% de fongémies, 18% de pneumocystoses, 13% d'aspergilloses et 5% de mucormycoses). La principale maladie sous-jacente est une pathologie maligne (48%). Douze pourcent des patients avaient comme risque associé une infection par le SARS CoV-2. Le taux de mortalité global était de 35%. Concernant les fongémies, le nombre d'isolats résistants aux échinocandines reste très faible sur l'année 2022 (<1%), le pourcentage d'isolats de *C. parapsilosis* et *C. glabrata* résistants au fluconazole est en augmentation depuis 2020, respectivement de 27% et 69% en 2022.

Les alertes au cours de l'année 2022 ont concernées en particulier *Candida auris* avec 7 cas en 2022 (24 au total depuis 2007), un cas avec deux cas secondaires a pu être mis en évidence en 2022 et des cas de médiastinites à *Trichosporon inkin* au décours de chirurgie cardiaque.

Par ailleurs un travail national sur les infections à *Candida haemulonii* a permis de montrer la fréquence de ce pathogène proche de *Candida auris* chez des patients vivants ou ayant séjourné en zone tropicale. De plus, une étude en cours a mis en évidence une augmentation récente du nombre de cas d'infections invasives à *Cladophialophora bantiana*.

3.1 Description du réseau de partenaires

Les surveillances mises en place par le CNRMA sont nationales, incluant les DOM-TOM, ou des observatoires régionaux couvrant une région (Observatoire des Levures en Ile-de-France, ODL), ou plusieurs régions (RESSIF). 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.

La surveillance spécifique des fongémies en 2022 était faite par l'ODL, le nombre de centre en Ile de France était de 13 en 2022. Toutes les souches étaient envoyées pour détermination de la sensibilité aux antifongiques avec la méthode EUCAST et identification.

En ce qui concerne la surveillance exhaustive et pérenne de toutes les mycoses invasives incluant les pneumocystoses, nous avons poursuivi en 2022 la surveillance avec 27 centres collaborateurs du CNRMA (CC-CNRMA), répartis géographiquement en France métropolitaine et dans les DOM-TOM (Figure 6). La surveillance des IFI s'appuie sur plusieurs paramètres :

- ✓ Une définition des cas basée sur les critères EORTC 2008¹⁰ 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.

¹⁰ 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.

- ✓ 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.

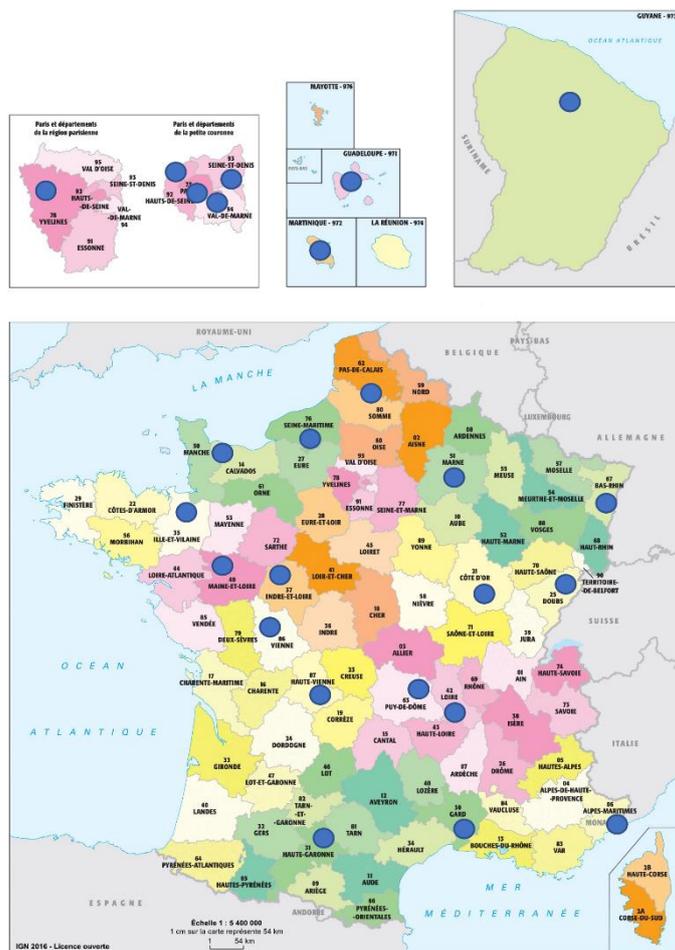


Figure 6. Répartition des centres participant à la surveillance RESSIF

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. Nous présentons ci-dessous une analyse synthétique des principales pathologies fongiques en France basée principalement sur les épisodes déclarés en 2022.

Une analyse détaillée des données issues de la surveillance RESSIF entre 2012 et 2018 a été publiée en 2022¹¹. Nous la présentons brièvement ici. Le CNRMA a mis en place en 2012 un nouveau programme de surveillance active nationale (RESSIF) des infections fongiques invasives (IFI) prouvées ou probables, pour préciser leur épidémiologie en France. Entre 2012 et 2018, un total de 10,886 IFI a été collecté. L'incidence des IFI a augmenté au cours de la période (2,16 à 2,36/10,000 hospitalisation jours, $P = 0,0562$) en raison de l'augmentation de l'incidence des fongémies (1,03 à 1,19/10,000, $P = 0,0023$), alors que les autres incidences restent stables. La proportion des sujets âgés de 65 ans ou plus a augmenté ; 38,4% à 45,3% ($P < 0,0001$). Les fongémies à levures ($n = 5,444$) sont principalement causées par *Candida albicans* (55,6%) avec une stabilité de la proportion des autres espèces. Les échinocandines sont devenues la famille d'antifongiques (46,7% à 61,8%) la plus prescrite, mais la mortalité globale reste inchangée (36,3% à un mois). L'infection pulmonaire à *Pneumocystis jirovecii* ($n = 2,106$) était majoritairement observée chez des patients séronégatifs pour le VIH (80,7%) avec une mortalité significativement accrue par rapport à celle observée chez les patients infectés par le VIH (21,9% versus 5,4% à un mois, $P < 0,0001$). L'aspergillose invasive ($n = 1,661$) et les mucormycoses ($n = 314$) étaient diagnostiquées principalement en hématologie avec une mortalité globale de 42,5% à 59,3%, respectivement, à 3 mois malgré les

¹¹ Bretagne et al., 2022 doi: 10.1128/mbio.00920-22

améliorations obtenues, dans les services de soins intensifs ou non. Au moins deux cas simultanés étaient diagnostiqués (5,4% à 9,4%) pour les infections à filamenteux ($P = 0.0115$).

Le réseau de surveillance a été modifié depuis le mois de janvier 2023

3.2 Surveillance de l'évolution et des caractéristiques des infections

Au cours de l'année 2022, 2097 fiches de déclarations ont été remplies par les correspondants hospitaliers et monitorées, principalement par Karine Boukris-Sitbon, sur le serveur Voozanoo. Parmi ces déclarations, 1705 correspondaient à des cas d'infections fongiques diagnostiqués en 2022 en France, provenant de 48 centres hospitaliers. La majorité correspondaient à des épisodes d'infection fongiques invasive déclarés dans le cadre de la surveillance des infections fongiques invasives en France (réseau RESSIF, $n=1395$). Les autres déclarations étaient faites dans le cadre de la surveillance des fongémies en Ile de France (ODL, $n=234$), dans le cadre de la surveillance de la cryptococcose ($n=49$), ou uniquement pour des demandes d'expertise.

Nous présenterons ici un bilan synthétique des cas diagnostiqués en 2022, puis une analyse globale des surveillances RESSIF, ODL et cryptococcose pour l'année 2022 également.

Les déclarations de 2022 correspondaient pour une grande majorité à des épisodes de fongémies (54.9%), suivi par des cas de pneumocystose (15.1%) puis d'aspergillose (12.4%) et de mucormycose (4.7%). Le taux de mortalité global était de 34.62%. Ces données provenant de centres ne participant pas tous à une surveillance active et donc les déclarations n'étant pas exhaustive, nous ne pouvons donc pas effectuer d'analyses supplémentaires.

RESSIF

Concernant les cas de la surveillance RESSIF, parmi les 1395 cas, 52% correspondent à des épisodes de fongémies, 18% des PCP, 13% des aspergilloses, 5% des mucormycoses). La majorité des patients sont des hommes (63,15%), la moyenne d'âge est de 61.57 ans (0 à 101 ans) avec seulement 47 épisodes chez des patients de moins de 15 ans. Parmi ces patients, 30.47% étaient hospitalisés en service de réanimation. Les principales maladies sous-jacentes sont une pathologie maligne (cancer solide (26.57%, 371/1395) ou une hémopathie (22.36%, 312/1395)). Les autres principaux facteurs de risques associés aux IFI sont une chirurgie récente (18.87%) ou une transplantation d'organe (10.6%). 12.11% des patients avaient comme risque associé une infection au Covid19 et seulement 3.68% étaient séropositifs pour le VIH. Le taux de mortalité globale était de 35.27%. A noter cependant que toutes les déclarations n'ont pas été monitorées complètement et que nous avons des données manquantes notamment sur le devenir des patients ($n=301$). Les calculs des pourcentages ont été faits en excluant les données manquantes.

ODL

L'observatoire des levures permet le suivi des fongémies à levures en Ile de France depuis octobre 2002. En 2022, 14 centres hospitaliers ont participé de façon active en déclarant tous leurs épisodes via le portail Voozanoo ($n=234$ épisodes). La majorité des patients sont des hommes (67.52%), la moyenne d'âge est de 58.38 ans (1-99 ans) avec seulement 19 épisodes chez des enfants de moins de 15 ans. Le taux de mortalité à 30 jours est de 39.7%, à noter cependant que toutes les déclarations n'ont pas été monitorées complètement et que nous avons des données manquantes notamment sur le devenir des patients ($n=56$). Les principales maladies sous-jacentes sont une pathologie maligne (cancer solide (32.14%, 72/224) ou une hémopathie (35/224, 15.6%)). Les autres facteurs de risques associés sont un séjour en USI (35.47%), une chirurgie récente (28.63%), une transplantation (8%) et 81.82% des patients avaient un cathéter. La majorité des patients étaient traités par échinocandines en première ligne après le diagnostic de fongémie (159/201).

La majorité des isolats cliniques correspondant aux épisodes de fongémies déclarés dans la surveillance ODL ont été envoyés au CNRMA pour une identification et détermination des profils de sensibilité aux antifongiques uniforme, seuls 13 isolats n'ont pas été envoyés à l'heure actuelle. Nous pouvons donc analyser les proportions des espèces responsables de fongémies (figure 7) ainsi que le pourcentage d'isolats ayant un profil de sensibilité inhabituel et une éventuelle évolution des résistances *in vitro* aux antifongiques.

En 2022, 16 espèces différentes de levures ont été identifiées parmi les épisodes de fongémies en Ile de France (Figure 7). Les 4 espèces majoritaires restent *C. albicans* (44,34%), *C. glabrata* (23.08%), *C. parapsilosis* (12.67%) et *C. tropicalis* (8.14%) et représentent 88% des isolats. Cette année, *Pichia kudriavzevii* et *Clavispora lusitaniae* sont en 5^{ème} position (2.71%).

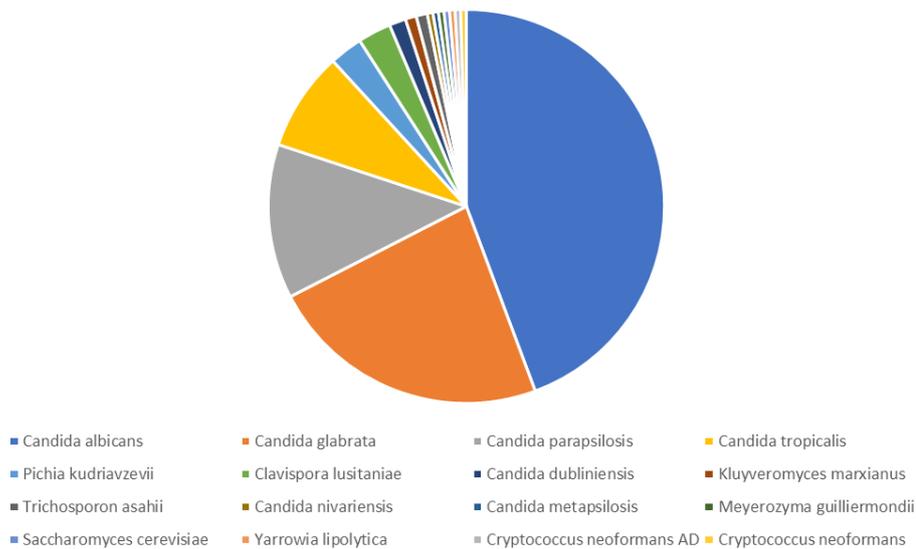


Figure 7. Répartition des espèces responsables de fongémies en Ile de France en 2022

Cryptococcose

En 2022, 49 cas de cryptococcoses diagnostiquées en France ont été déclarées auprès du CNRMA. La majorité des patients sont des hommes (61.22%), la moyenne d'âge est de 56.36 ans (17-93 ans). Seuls 21% des patients étaient séropositifs pour le VIH (Figure 8). Les patients séronégatifs pour le VIH avaient comme facteur de risque principalement une transplantation (41%), ou un cancer (28%). La majorité des cas correspondaient à des premiers épisodes (47/48). Dans la majorité des cas, les patients ont été traités par une combinaison d'amphotéricine B liposomale et de 5FC (n=33).

La répartition des espèces correspond à celle généralement décrite en Europe, avec une majorité d'isolats de l'espèce *C. neoformans* (sérotypage A, 68%) et une proportion similaire pour les autres espèces *C. deneoformans* (sérotypage D, 13%) et les hybrides AD (15%). Seuls 2 cas de cryptococcose dues à *C. gattii*. La majorité des souches étaient isolées dans le LCR (n=28) ou dans les poumons (n=15).

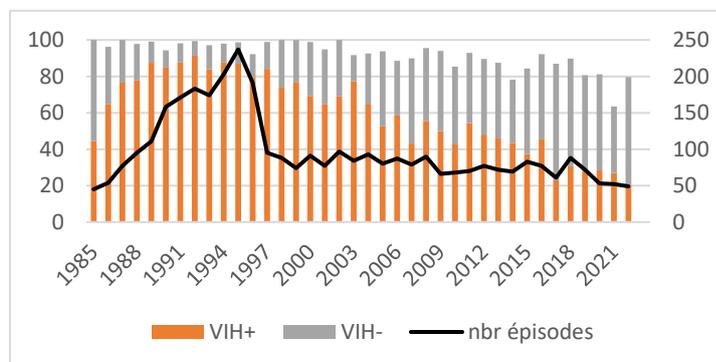


Figure 8. Nombre d'épisodes de cryptococcose déclarés en France et pourcentage de patients séropositifs et séronégatifs pour le VIH, au cours du temps

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 (TEF1α 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.

3.3 Surveillance de la résistance des agents pathogènes aux anti-infectieux

Toutes les souches de levures et champignons filamenteux reçus au CNRMA sont testées pour leur sensibilité aux antifongiques par une méthode standardisée adaptée de la technique EUCAST.

Définitions utilisées pour exprimer la résistance

Nous retranscrivons ici les seuils établis par le comité EUCAST¹² pour *Candida* et *Cryptococcus* spp. (Tableau 4) et *Aspergillus* spp. (Tableau 5). Pour les levures, nous avons modifié la technique en utilisant le milieu AM3 au lieu du milieu RPMI pour la caspofungine et la micafungine, et établi qu'une CMI de la caspofungine au-dessus de 0,25 mg/L pour une espèce de *Candida* autre que celles du complexe *C. parapsilosis/orthopsilosis/metapsilosis*, était habituellement associée à une mutation dans le hot spot d'un ou plusieurs gènes *Fks*.

Tableau 4. Seuils cliniques EUCAST pour *Candida* and *Cryptococcus* spp.

Candida and Cryptococcus spp.

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

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

1. Non-species related breakpoints have been determined mainly on the basis of PK/PD data and are independent of MIC distributions of specific *Candida* species. They are for use only for organisms that do not have specific breakpoints.
2. The ECOFFs for these species are in general higher than for *C. albicans*.
3. Isolates that are susceptible to anidulafungin as well as micafungin should be considered susceptible to caspofungin, until caspofungin breakpoints have been established. EUCAST breakpoints have not yet been established for caspofungin, due to significant inter-laboratory variation in MIC ranges for caspofungin.
4. The entire *C. glabrata* is in the I category. MICs against *C. glabrata* should be interpreted as resistant when above 16 mg/L. Susceptible category (≤0.001 mg/L) is simply to avoid misclassification of "I" strains as "S" strains.
5. MICs for *C. tropicalis* are 1-2 two-fold dilution steps higher than for *C. albicans* and *C. glabrata*. In the clinical study successful outcome was numerically slightly lower for *C. tropicalis* than for *C. albicans* at both dosages (100 and 150 mg daily). However, the difference was not significant and whether it translates into a relevant clinical difference is unknown. MICs for *C. krusei* are approximately three two-fold dilution steps higher than those for *C. albicans* and, similarly, those for *C. guilliermondii* are approximately eight two-fold dilutions higher. In addition, there were only a small number of cases involved these species in the clinical trials. This means there is insufficient evidence (IE) to indicate whether the wild-type population of these pathogens can be considered susceptible to micafungin.
6. For *Candida* the I category is introduced to acknowledge that the increased exposure obtained by iv dosing is sufficient (potentially confirmed by TDM). There is not enough information available for the response to voriconazole of infections caused by *Candida* isolates with higher MICs.
7. Strains with MIC values above the S/I breakpoint are rare or not yet reported. The identification and antifungal susceptibility tests on any such isolate must be repeated and if the result is confirmed the isolate sent to a reference laboratory. Until there is evidence regarding clinical response for confirmed isolates with MIC above the current resistant breakpoint they should be reported resistant. A clinical response of 76% was achieved in infections caused by the species listed below when MICs were lower than or equal to the epidemiological cut-offs. Therefore, wild type populations of *C. albicans*, *C. dubliniensis*, *C. parapsilosis* and *C. tropicalis* are considered susceptible.

¹² http://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/AFST/Clinical_breakpoints/AFST_BP_v10.0_200204.pdf

Tableau 5. Seuils cliniques EUCAST pour *Aspergillus* spp.

Aspergillus spp.

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

MIC method (EUCAST standardized broth microdilution method)
 Medium: RPM1940-2% glucose, MOPS as buffer
 Inoculum: Final 1x10⁵ - 2.5x10⁵ c.f.u./mL
 Incubation: 48h
 Reading: Visual, complete inhibition for amphotericin B and azoles (MIC), aberrant growth endpoint for echinocandins (MEC)
 Quality control: *A. fumigatus* ATCC 204305, *A. flavus* ATCC 204304, *A. fumigatus* F 9919, *A. flavus* CM 1813, *C. parapsilosis* ATCC 22019 (read after 18-24 h) or *C. lusitana* ATCC 6259 (read after 18-24 h).

Antifungal agent	MIC breakpoint (mg/L)												Non-species related breakpoints ¹		Comments on the I category	Comments on the ATU			
	<i>A. flavus</i>			<i>A. fumigatus</i>			<i>A. nidulans</i>			<i>A. niger</i>							<i>A. terreus</i>		
	S ≤	R >	ATU	S ≤	R >	ATU	S ≤	R >	ATU	S ≤	R >	ATU					S ≤	R >	ATU
Amphotericin B	-	-		1	1		-	-		1	1		-	-		IE	IE	No data to support an "I" category according to the new definition of "I"	
Anidulafungin	IE	IE		IE	IE		IE	IE		IE	IE		IE	IE		IE	IE		
Caspofungin	IE	IE		IE	IE		IE	IE		IE	IE		IE	IE		IE	IE		
Fluconazole	-	-		-	-		-	-		-	-		-	-		-	-		
Isavuconazole	1	2	2	1	2	2	0.25	0.25		IE ²	IE ²		1	1		IE	IE	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 CYP51A sequencing and confirmation of MICs." ²	
Itraconazole ⁴	1	1	2	1	1	2	1	1	2	IE ^{2,5}	IE ^{2,5}		1	1	2	IE ⁵	IE ⁵	Report as R with the following comment: "In some clinical situations (non-invasive infections forms) itraconazole can be used provided sufficient exposure is ensured".	
Micafungin	IE	IE		IE	IE		IE	IE		IE	IE		IE	IE		IE	IE		
Posaconazole ⁴	IE ²	IE ²		0.125	0.25	0.25	IE ²	IE ²		IE ²	IE ²		0.125	0.25	0.25	IE	IE	Posaconazole MIC = 0.25 mg/L should not be interpreted as I but only as ATU If not S to itraconazole report as R and refer to reference laboratory for CYP51A sequencing and confirmation of MICs.	If S to itraconazole report as S and add the following comment: "The MIC is 0.25 mg/L and thus one dilution above the S breakpoint due to overlapping wt and non-wt populations".
Voriconazole ⁴	IE ²	IE ²		1	1	2	1	1	2	IE ³	IE ³		IE ³	IE ³		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.

LEVURES

Détection des résistances des levures aux azolés et aux échinocandines

Le nombre d'isolats résistants aux échinocandines reste très faible sur l'année 2022 et sur la totalité de la surveillance ODL (Tableaux 6-7). La résistance aux échinocandines est principalement dues à une préexposition à cette classe d'antifongique par le patient et correspond donc à des cas sporadiques.

Tableau 6. Pourcentage des isolats résistants aux azolés ou à la caspofungin pour les espèces fréquentes sur l'année 2022 (Données sur les isolats testés en 2022 dans le cadre de la surveillance de l'ODL)

espèce	Pourcentage (nb isolat) résistant				Nb isolats testés	
	fluconazole ¹	voriconazole ²	posaconazole ³	caspofungin ⁴	en 2022	mutation FKS
<i>C. albicans</i>	0	0	0	0,9% (1)	109	S645P (HS1)
<i>C. glabrata</i>	69,4% (41)	NA	NA	0	59	
<i>C. parapsilosis</i>	27,3% (9)	27,3% (9)	24,2% (8)	NA	33	
<i>C. tropicalis</i>	0	0	0	0	22	
<i>P. kudriavzevii</i>	NA	NA	NA	0	7	
<i>C. dubliniensis</i>	0	0	0	0	3	

valeur de CMI au-delà de laquelle la souche est considérée comme résistante d'après EUCAST Antifungal Clinical Breakpoint Table v. 10.0 valid from 2020-02-04 ; ¹CMI > 4mg/L, pour *C. glabrata* CMI>16mg/L ; ²CMI > 0,25 mg/L ; ³CMI > 0,06 mg/L ; ⁴ valeur seuil utilisée au CNRMA CMI >0,25 mg/L

Tableau 7. Proportion d'isolats de levures résistants aux azolés ou à la caspofungin collectés dans l'ODL (entre 2004 et 2022 pour les azolés et entre 2006 et 2022 pour la caspofungin)

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	33.6 % [5.2-69.5]	-	-	> 0.25	1.8 % [0 - 7.3]
<i>C. parapsilosis</i>	> 4	7.9 % [0 - 27.3]	> 0.25	4.2 % [0 - 27.3]	-	
<i>C. tropicalis</i>	> 4	5.6 % [0 - 27.8]	> 0.25	7.5 % [0 - 27.8]	> 0.25	0.9 % [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

La proportion d'isolats de *C. glabrata* résistants fluconazole est quant à elle assez importante de façon globale sur la totalité des données de la surveillance (Tableau 7). De plus, le pourcentage d'isolats de *C. parapsilosis* et *C. glabrata* résistants au fluconazole est en augmentation depuis 2020 (Figures 8 et 9). Il est important de noter que pour les cas de *C. parapsilosis* ce phénomène est observé uniquement dans deux centres hospitaliers de la région parisienne. Nous allons mettre en place un génotypage systématique des isolats de *C. parapsilosis* ainsi que la détection de la mutation Y132F dans le gène ERG11, car cette modification en acide aminé est souvent rapportée comme étant responsable de la résistance in vitro au fluconazole. Cette augmentation est également rapportée dans la littérature au niveau national ¹³ et internationale ¹⁴, surtout depuis la pandémie de Covid19 et est souvent liée à un clone persistant dans un hôpital. Pour les souches de *C. glabrata* une analyse plus détaillée des données épidémiologiques et microbiologiques des souches est également nécessaire pour voir si cette augmentation est générale ou uniquement observée dans certains centres, si elle est en lien avec une caractéristique clinique ou s'il y a un bien de recrutement des isolats dans notre surveillance.

¹³ Presente et al., 2003, AAC, doi: 10.1128/aac.01130-22

¹⁴ Trevijano-Contador et al. OFI 2022, doi: 10.1093/ofid/ofac605

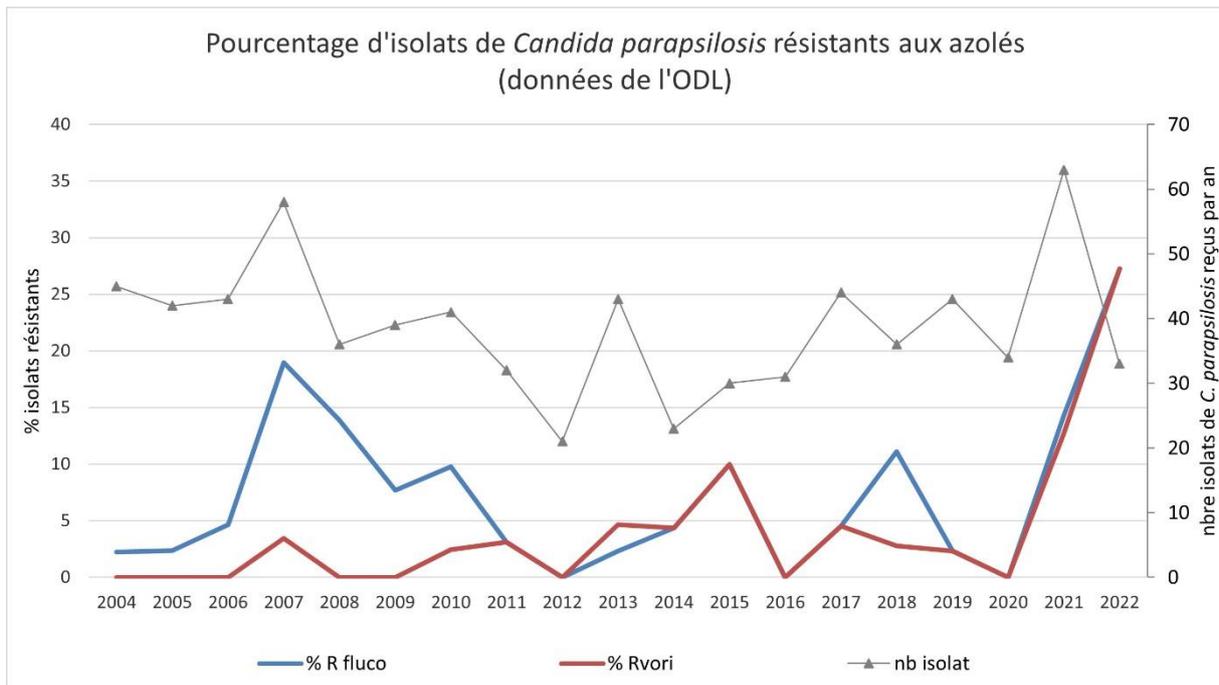


Figure 8. Quantité d'isolats de *Candida parapsilosis* et pourcentage d'isolats résistants aux azolés

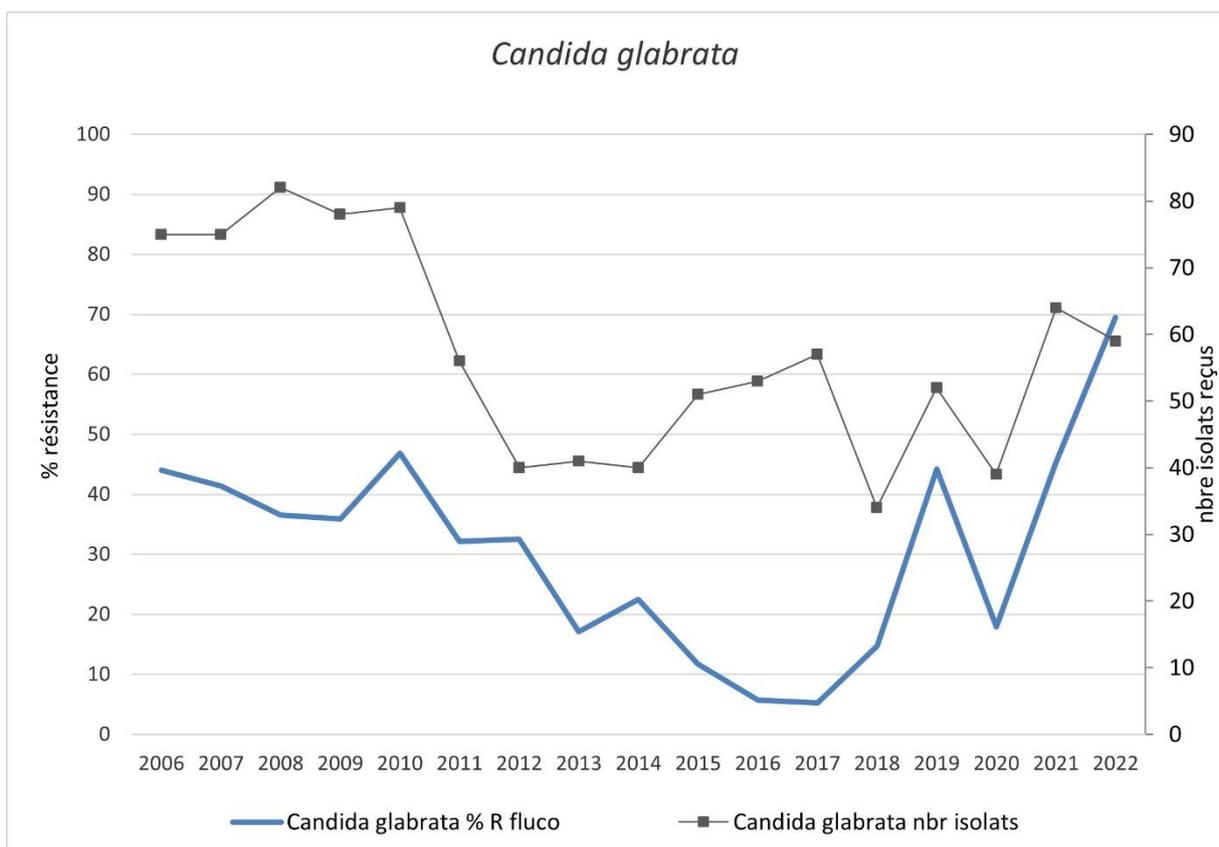


Figure 9. Quantité d'isolats de *Candida glabrata* et pourcentage d'isolats résistants au fluconazole depuis 2006

Les données du CNRMA concernent actuellement plus de 10000 isolats de levures dont la sensibilité a été testée à 8 antifongiques systémiques. Les données présentées ici correspondent aux espèces pour lesquelles nous avons au moins 10 isolats distincts (Tableau 8). Nous avons publié récemment les données concernant la sensibilité aux antifongiques azolés de plus de 9000 isolats appartenant à 40 espèces communes et rares¹⁵ et également les données concernant la sensibilité aux échinocandines¹⁶.

Il faut remarquer que les CMI50 et les CMI90 du voriconazole et du posaconazole sont nettement plus hautes pour *C. glabrata* et *C. krusei* que pour *C. albicans* confirmant l'existence fréquente de "résistances" croisées. A quelques exceptions près, les CMI hautes observées font partie du profil naturel des espèces (comme *C. krusei* et le fluconazole, *C. haemulonii* et l'amphotéricine B et les azolés, *C. parapsilosis* et les échinocandines). Comme la caspofungine, la micafungine n'a pas d'activité sur les levures des genres *Cryptococcus*, *Geotrichum*, *Rhodotorula* et *Trichosporon*. La distribution des valeurs de CMI de la micafungine est comparable à celle de la caspofungine sur les espèces de levures « fréquentes ». Il n'y a donc pas d'argument microbiologique pour privilégier l'une ou l'autre des échinocandines disponibles en France.

L'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. 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 élevées¹⁷.

¹⁵ 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.

¹⁶ Desnos-Ollivier M, et al.. 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.

¹⁷ Desnos-Ollivier M, et al. (2019) Isavuconazole MICs distribution of 29 yeast species responsible for invasive infections (2015-2017). *Clin Microbiol Infect*

Tableau 8. Profils de sensibilité des levures aux antifongiques (mise à jour 30/03/2023)

Espèces étudiées	Valeurs des CMI50 / CMI90 mg/L pour les antifongiques*								
Nom d'usage en clinique (nbre d'isolats testés)	Nom actuel	AMB	5-FC	Fluco	Vori	Posa	Isavu**	Caspo**	Mica**
<i>C. albicans</i> (n=3732)		0.06/0.12	≤0.12/0.5	0.25/0.5	≤0.01/≤0.01	≤0.01/0.06	≤0.007/≤0.007	0.03/0.06	0.015/0.03
<i>C. dubliniensis</i> (n=175)		≤0.014/0.06	≤0.12/≤0.12	≤0.12/0.25	≤0.01/≤0.01	0.03/0.06	≤0.007/≤0.007	0.015/0.03	0.015/0.03
<i>C. glabrata</i> (n=1486)		0.12/0.25	≤0.12/≤0.12	16/64	0.25/1	0.5/2	0.12/0.5	0.06/0.12	0.015/0.03
<i>C. nivariensis</i> (n=18)		0.12/0.25	0.5/1	2/4	0.06/0.12	0.12/0.25	0.03/0.06	0.03/0.12	0.015/0.03
<i>C. parapsilosis</i> (n=986)		0.06/0.12	≤0.12/0.25	0.5/4	≤0.01/0.06	0.06/0.12	0.015/0.03	0.25/1	0.25/0.5
<i>C. orthopsilosis</i> (n=77)		0.03/0.06	≤0.12/≤0.12	0.5/8	0.03/1	0.06/0.12	0.015/0.06	0.06/0.25	0.12/0.25
<i>C. metapsilosis</i> (n=61)		0.06/0.12	≤0.12/0.25	1/2	0.03/0.06	0.03/0.06	0.015/0.015	0.06/0.12	0.12/0.25
<i>C. tropicalis</i> (n=728)		0.06/0.12	≤0.12/32	0.5/4	0.03/0.25	0.06/0.12	≤0.007/0.03	0.03/0.06	0.03/0.03
<i>C. krusei</i> (n=385)	<i>Pichia kudriavzevii</i>	0.12/0.25	2/4	32/64	0.25/0.5	0.12/0.25	0.12/0.25	0.12/0.25	0.06/0.12
<i>C. inconspicua</i> (n=55)	<i>Pichia cactophila</i>	0.12/0.25	2/4	16/32	0.12/0.25	0.12/0.12	0.12/0.25	0.03/0.06	0.015/0.03
<i>C. kefir</i> (n=190)	<i>Kluyveromyces marxianus</i>	0.06/0.12	0.5/8	0.25/1	≤0.01/≤0.01	0.06/0.12	≤0.007/≤0.007	0.015/0.03	0.03/0.06
<i>C. guilliermondii</i> (n=135)	<i>Meyerozyma guilliermondii</i>	0.03/0.06	≤0.12/0.25	8/64	0.12/0.5	0.25/0.5	0.25/4	0.06/0.25	0.12/0.25
<i>C. fermentati</i> (n=39)	<i>Meyerozyma caribbica</i>	0.12/0.25	≤0.12/≤0.12	4/64	0.12/0.5	0.25/0.5	0.12/0.25	0.12/0.5	0.12/2
<i>C. lusitanae</i> (n=298)	<i>Clavispora lusitanae</i>	0.06/0.12	≤0.12/0.5	0.25/0.5	≤0.01/≤0.01	≤0.01/0.06	≤0.007/0.015	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	≥4/≥4	0.03/0.06	0.06/0.06
<i>C. haemulonii</i> type II (n=48)	<i>Candida duobushaemulonii</i>	2/8	≤0.12/≥64	32/≥64	≥8/≥8	2/≥8	0.12/≥4	0.015/0.03	0.03/0.06
<i>Candida auris</i> (n=24)		0.25/0.5	≤0.12/≥64	≥64/≥64	0.25/1	≤0.01/0.12	0.015/0.12	0.03/0.03	0.015/0.03
<i>C. palmiophila</i> (n=22)		0.12/0.5	≤0.12/0.5	8/32	0.12/0.25	0.12/0.25	-/-	0.06/0.25	0.03/0.25
<i>Pichia jadinii</i> (n=25)	<i>Cyberlindnera jadinii</i>	0.06/0.12	≤0.12/1	1/4	0.06/0.12	0.12/0.25	0.03/-	0.015/1	0.015/2
<i>Pichia fabianii</i> (n=13)	<i>Cyberlindnera fabianii</i>	0.06/0.12	≤0.12/≤0.12	0.5/1	0.03/0.03	0.12/0.25	≤0.007/-	0.03/0.06	0.03/0.06
<i>C. pelliculosa</i> (n=40)	<i>Wickerhamomyces anomalus</i>	0.06/0.12	≤0.12/16	2/4	0.12/0.25	0.25/0.5	0.06/0.12	0.03/0.06	0.015/0.03
<i>Pichia ohmeri</i> (n=39)	<i>Kodamaea ohmeri</i>	0.06/0.06	≤0.12/1	4/16	0.03/0.12	0.03/0.12	0.015/0.03	0.06/≥8	0.06/0.12
<i>Pichia norvegensis</i> (n=23)		0.06/0.12	4/8	16/64	0.25/0.5	0.12/0.12	0.12/0.5	0.03/0.06	0.03/0.06
<i>S. cerevisiae</i> (n=79)		0.06/0.12	≤0.12/≤0.12	8/16	0.12/0.25	0.5/1	0.03/0.25	0.12/0.25	0.06/0.25
<i>C. pararugosa</i> (n=10)	<i>Wickerhamiella pararugosa</i>	0.12/0.25	0.25/8	8/8	0.06/0.25	0.12/0.12	0.12/-	0.06/0.12	0.03/0.06
<i>C. lipolytica</i> (n=31)	<i>Yarrowia lipolytica</i>	0.5/2	32/≥64	4/16	0.06/0.25	0.25/1	0.12/2	0.12/0.5	0.25/0.25
<i>Geotrichum candidum</i> (n=40)	<i>Galactomyces candidus</i>	0.25/0.5	0.25/1	16/64	0.25/1	0.25/1	0.25/2	1/≥8	0.5/≥8
<i>G. capitatum</i> (n=61)	<i>Magnusiomyces capitatus</i>	0.25/0.5	≤0.12/0.25	8/16	0.06/0.5	0.12/0.5	4/≥4	≥8/≥8	≥8/≥8
<i>G. clavatum</i> (n=214)	<i>Saprochaete clavata</i>	0.25/0.5	0.5/1	16/64	0.25/1	0.5/1	2/≥4	≥8/≥8	≥8/≥8
<i>Cr. neoformans</i> var. <i>grubii</i> (n=1081)	<i>Cr. neoformans</i>	0.12/0.5	4/16	4/8	0.06/0.12	0.06/0.25	0.12/0.25	≥8/ ≥8	4/≥8
<i>Cr. neoformans</i> var. <i>neoformans</i> (n=236)	<i>Cr. deneoformans</i>	0.06/0.25	4/16	1/4	≤0.01/0.06	0.03/0.12	0.03/0.12	≥8/ ≥8	1/≥8
<i>Cr. neoformans</i> hybrides AD (n=198)		0.12/0.25	4/8	4/8	0.03/0.12	0.06/0.12	0.06/0.25	≥8/ ≥8	4/≥8
<i>Cr. gattii</i> (n = 35)	<i>Cr. gattii</i> complex	0.12/0.25	2/8	8/16	0.12/0.25	0.25/0.5	0.25/0.25	≥8/ ≥8	≥8/≥8
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i> (n=74)		0.25/0.5	0.25/1	≥64/≥64	2/4	0.5/2	1/2	≥8/ ≥8	≥8/≥8
<i>Trichosporon asahii</i> (n=74)		2/≥8	≥64/≥64	4/8	0.06/0.25	0.25/0.5	0.5/1	≥8/≥8	≥8/≥8
<i>Trichosporon inkin</i> (n=20)		0.25/1	64/≥64	1/2	≤0.01/0.06	0.06/0.12	0.03/0.12	4/≥8	1/≥8

* AMB (amphotéricine B), 5-FC (5-fluorocytosine), Fluco (fluconazole), Vori (voriconazole), Posa (posaconazole), Isavu (Isavuconazole, testé depuis 2015), Caspo (caspofungine), Mica (micafungine). ** En raison d'un changement du milieu test (RPMI remplacé par AM3), les résultats ne concernent que les souches testées depuis début 2005 pour la caspofungine ou début 2008 pour la micafungine. L'isavuconazole est testé depuis 2015.

FILAMENTEUX

Tableau 9. Profil de sensibilité des champignons filamenteux aux antifongiques

Espèce (nombre d'isolats testés)	Valeurs des CMI50 / CMI90 (mg/L) pour les antifongiques*						
	AMB	Itra	Vori	Posa	Caspo	Mica	Terbi
<i>Cunninghamella bertholletiae</i> (n=20)	0.5/1	8/≥8	≥8/≥8	0.5/1	≥4/≥4	≥4/≥4	0.12/0.25
<i>Cunninghamella</i> spp. (n=8)	4/-	2/-	≥8/-	1/-	≥4/-	≥4/-	0.12/-
<i>Lichtheimia corymbifera</i> (n=81)	0.5/0.5	1/4	≥8/≥8	0.5/0.5	≥4/≥4	≥4/≥4	0.5/1
<i>Lichtheimia ornata</i> (n=7)	0.25/-	0.5/-	≥8/-	0.5/-	≥4/-	≥4/-	0.5/-
<i>Lichtheimia ramosa</i> (n=79)	0.12/0.25	2/≥8	≥8/≥8	0.5/1	≥4/≥4	≥4/≥4	1/2
<i>Mucor circinelloides</i> (n=87)	0.06/0.12	≥8/≥8	≥8/≥8	1/≥8	≥4/≥4	≥4/≥4	≥8/≥8
<i>Mucor velutinosus</i> (n=16)	0.06/0.25	≥8/≥8	≥8/≥8	0.5/2	≥4/≥4	≥4/≥4	≥8/≥8
<i>Mucor indicus</i> (n=16)	0.06/0.12	≥8/≥8	≥8/≥8	1/2	≥4/≥4	≥4/≥4	≥8/≥8
<i>Mucor</i> spp. (n=12)	0.12/0.25	≥8/≥8	≥8/≥8	2/≥8	≥4/≥4	≥4/≥4	≥8/≥8
<i>Rhizomucor pusillus</i> (n=62)	0.06/0.12	0.5/1	≥8/≥8	0.25/0.5	≥4/≥4	≥4/≥4	0.25/0.5
<i>Rhizomucor miehei</i> (n=11)	0.03/0.06	0.06/0.12	2/-/≥8	0.06/0.12	≥4/≥4	2 /≥4	0.25/0.5
<i>Rhizopus arrhizus</i> (n=128)	0.12/0.25	1/≥8	≥8/≥8	0.5/2	≥4/≥4	≥4/≥4	≥8/≥8
<i>Rhizopus microsporus</i> (n=85)	0.06/0.25	2/≥8	≥8/≥8	0.5/2	≥4/≥4	≥4/≥4	0.5/1
<i>Saksenaia vasiformis</i> complex (n=5)	8/-	0.25/-	8/-	0.12/-	≥4/-	≥4/-	0.25/-
<i>Syncephalastrum racemosum</i> (n=6)	0.03/-	1/-	≥8/-	0.5/-	≥4/-	≥4/-	0.5/-
<i>Aspergillus fumigatus</i> (n=356)	0.25/0.5	0.25/0.5	0.25/0.5	0.06/0.12	0.5/0.5	0.015/0.03	1/2
<i>Aspergillus fumigatus</i> CMI itra>1mg/L (n=133)	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)	>4/-	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=216)	1/4	0.12/0.25	0.5/0.5	0.12/0.25	0.25/0.5	≤0.007/0.03	0.03/0.06
<i>Aspergillus parasiticus</i> (n=7)	2/-	0.125/-	0.5/-	0.06/-	0.25/-	≤0.007/-	0.015/-
<i>Aspergillus tamarai</i> (n=10)	0.5/1	0.06/0.25	0.25/0.5	0.06/0.12	0.25/0.5	≤0.007/0.01	≤0.01/0.03
<i>Aspergillus</i> section <i>Nidulantes</i> (n=14)	1/2	0.25/1	0.25/0.5	0.12/0.25	0.5/2	≤0.007/-	0.06/0.25
<i>Aspergillus nidulans</i> (n=38)	2/>4	0.12/0.5	0.12/0.25	0.06/0.25	0.5/4	0.015/0.06	0.12/0.5
<i>Aspergillus quadrilineatus</i> (n=17)	0.5/1	0.12/0.25	0.12/0.25	0.12/0.25	2/2	≤0.007/0.03	0.12/0.12
<i>Aspergillus</i> section <i>Nigri</i> (n=24)	0.25/0.5	1/4	0.5/1	0.25/0.5	0.25/0.5	0.01/0.25	0.12/0.25
<i>Aspergillus tubingensis</i> (n=35)	0.25/0.5	1/8	1/2	0.25/0.5	0.25/0.5	≤0.007/0.015	0.25/0.25
<i>Aspergillus welwitschiae</i> (n=29)	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</i> section <i>Usti</i> (n=28)	0.5/1	2/≥8	4/8	≥8/≥8	2/≥4	0.25/4	0.25/0.5
<i>Aspergillus calidoustus</i> (n=29)	1/2	≥8/≥8	4/8	≥8/≥8	0.5/4	0.015/0.06	0.25/0.5
<i>Aspergillus terreus</i> (n=62)	4/>4	0.06/0.25	0.5/1	0.06/0.12	0.5/1	≤0.007/0.03	0.06/0.12
<i>Aspergillus sydowii</i> (n=8)	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</i> spp. (n=30)	0.5/4	1/≥8	8/≥8	1/≥8	2/≥4	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/-
<i>Paecilomyces variotii</i> (n=16)	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</i> complex (n=255)	4/>4	≥8/≥8	8/≥8	≥8/≥8	≥4/≥4	≥4/≥4	≥8/≥8
- <i>Fusarium falciforme</i> (n=17)	2/>4	8/≥8	8/≥8	≥8/≥8	≥4/≥4	≥4/≥4	≥8/≥8
<i>Fusarium oxysporum</i> complex (n=186)	2/4	≥8/≥8	2/8	2/≥8	≥4/≥4	≥4/≥4	2/4
<i>Fusarium proliferatum</i> (n=138)	4/>4	≥8/≥8	4/8	8/≥8	≥4/≥4	≥4/≥4	1/2
<i>Fusarium verticillioides</i> (n=23)	>4/>4	≥8/≥8	2/4	0.5/1	≥4/≥4	≥4/≥4	0.5/1
<i>Bisfusarium dimerum</i> (n=35)	0.25/0.5	≥8/≥8	2/4	≥8/≥8	≥4/≥4	≥4/≥4	0.5/1

<i>Fusarium incarnatum-equiseti</i> complex (n=6)	1/-	≥8/-	2/-	1/-	≥4/-	≥4/-	4/-
<i>Sarocladium kiliense</i> (n=11)	>4/>4	≥8/≥8	0.5/1	1/≥8	4/≥4	4/≥4	0.5/0.5
<i>Purpureocillium lilacinum</i> (n=58)	>4/>4	2/≥8	0.25/0.5	0.25/0.5	≥4/≥4	2/≥4	0.25/0.5
<i>Trichoderma orientale</i> (n=5)	1/-	≥8/-	1/-	1/-	0.5/-	0.03/-	0.5/-
<i>Trichoderma longibrachiatum</i> (n=26)	1/2	≥8/≥8	0.5/1	1/2	0.5/1	0.06/0.25	1/2
<i>Phaeoacremonium parasiticum</i> (n=27)	0.5/2	≥8/≥8	0.25/0.25	0.25/0.5	≥4/≥4	≥4/≥4	0.12/0.5
<i>Pleurostoma 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=10)	1/2	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	≥4/≥4	≥4/≥4	0.06/0.12
<i>Sporothrix globosa</i> (n=6)	8/-	1/-	≥8/≥8	1/2	≥4/-	1/-	0.25
<i>Scedosporium apiospermum</i> (n=124)	>4/>4	1/8	0.5/1	0.5/1	1/2	0.25/1	≥8/≥8
<i>Scedosporium boydii</i> (n=48)	>4/>4	0.5/8	0.25/0.5	0.25/1	1/2	0.25/1	≥8/≥8
<i>Scedosporium ellipsoideum</i> (n=9)	>4/-	1/-	0.5/-	1/-	0.5/-	0.25/-	≥8/-
<i>Scedosporium aurantiacum</i> (n=10)	>4/>4	4/≥8	0.5/1	1/2	8/8	8/8	≥8/≥8
<i>Scedosporium dehoogii</i> (n=12)	>4/>4	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=43)	>4/>4	≥8/≥8	8/≥8	≥8/≥8	4/≥4	4/≥4	≥8/≥8
<i>Microascus cirrosus</i> (n=11)	>4/>4	≥8/-	≥8/-	≥8/-	4/-	≥4/-	2/-
<i>Scopulariopsis brevicaulis</i> (n=22)	>4/>4	≥8/≥8	8/≥8	≥8/≥8	1/4	0.25/1	2/8
<i>Doratomyces</i> spp. (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/-
<i>Chaetomium</i> spp. (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</i> complex (n=28)	0.25/0.5	0.5/1	4/≥8	0.12/0.5	0.5/1	0.06/0.12	0.5/1
<i>Alternaria alternata</i> complex (n=39)	0.5/1	1/8	2/4	0.25/0.5	0.5/≥4	0.25/≥4	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</i> spp. (n=8)	0.25/-	0.03/-	0.12/-	0.06/-	1/-	1/-	1/-
<i>Exophiala dermatitidis</i> (n=37)	0.12/0.25	0.5/1	0.06/0.5	0.12/0.5	4/≥4	1/≥4	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/-	≥4/-	2/-	0.03/-
<i>Exophiala spinifera</i> (n=14)	0.12/0.25	0.03/0.05	0.12/0.25	0.03/0.25	2/2	0.25/2	0.06/0.25
<i>Fonsecaea monophora</i> (n=13)	0.5/2	≤0.01/-	0.06/0.12	0.01/0.06	0.5/-	0.5/1	0.03/0.12
<i>Fonsecaea pedrosoi</i> (n=11)	0.25/1	0.12/0.25	0.06/0.25	0.06/0.12	0.5/1	1/-	0.03/0.12
<i>Fonsecaea nubica</i> (n=20)	0.5/1	≤0.01/0.5	0.06/0.12	0.03/0.25	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 (casprofungine), Terbi (terbinafine), Mica (micafungine) ; - : non déterminable pour moins de 10 isolats testés - (filamenteux testés au CNRMA depuis 2003)

Tableau 10. 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 17/05/23)

Espèce (nbre d'isolats)	Valeurs des CMI50/CMI90 (mg/L) pour les azolés			
	Posaconazole	Itraconazole	Voriconazole	Isavuconazole
<i>Cunninghamella bertholletiae</i> (n=14)	1/1	≥8/≥8	≥8/≥8	>4/>4
<i>Lichtheimia corymbifera</i> (n=37)	0.5/0.5	0.5/2	≥8/≥8	4/>4
<i>Lichtheimia ramosa</i> (n=29)	0.5/1	1/≥8	≥8/≥8	>4/>4
<i>Mucor circinelloides</i> (n=53)	2≥8	≥8/≥8	≥8/≥8	>4/>4
<i>Mucor indicus</i> (n=13)	1/2	≥8/≥8	≥8/≥8	>4/>4
<i>Mucor velutinosus</i> (n=10)	1/-	≥8/-	≥8/-	>4/-
<i>Rhizopus arrhizus</i> (n=69)	0.5/4	4/≥8	≥8/≥8	4/>4
<i>Rhizopus microsporus</i> (n=50)	1/≥8	≥8/≥8	8/≥8	4/>4
<i>Rhizomucor pusillus</i> (n=18)	0.25/0.25	0.5/0.5	≥8/≥8	4/>4
<i>Rhizomucor miehei</i> (n=6)	0.06/0.125	0.06/0.125	2/≥8	0.5/1
<i>Aspergillus fumigatus</i> (n=163)	0.06/0.12	0.25/0.5	0.25/1	0.5/1
<i>Aspergillus fumigatus itraR</i> (CMI>1mg/L) n=70)	0.5/2	≥8/≥8	4/4	4/>4
<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	>4/>4
<i>Fusarium oxysporum complex</i> (n=77)	2/≥8	≥8/≥8	2/4	>4/>4
<i>Fusarium proliferatum</i> (n=65)	2/≥8	≥8/≥8	4/8	>4/>4
<i>Fusarium verticillioides</i> (n=7)	0.25/-	16/-	1/-	>4/-
<i>Fusarium dimerum complex</i> (n=19)	≥8/≥8	≥8/≥8	2/4	>4/>4
<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/-	>4/-
<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/>4
<i>Lomentospora prolificans</i> (n=16)	≥8/≥8	≥8/≥8	8/≥8	>4/>4
<i>Microascus cirrosus</i> (n=5)	2/-	≥8/≥8	4/≥8	>4/>4
<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

Détection des résistances champignons filamenteux aux antifongiques

Depuis 2003, le CNRMA a déterminé la sensibilité à 8 antifongiques systémiques de plus de 3900 isolats de champignons filamenteux (Tableau 9). Les données sur l'isavuconazole sont présentées plus loin dans un tableau séparé (Tableau 10) 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.

Détermination des profils de sensibilité des champignons filamenteux d'intérêt médicale au nouvel antifongique Olorofim

Les maladies fongiques invasives (MFI) sont en constante augmentation et les options thérapeutiques sont limitées. Pour améliorer le traitement des espèces résistantes, de nouvelles molécules antifongiques ont été développées. L'olorofim est la molécule la plus représentative de la classe chimique des orotomides. Bien qu'inactif contre les membres des *Mucorales* et les levures, l'olorofim a montré une bonne activité *in vitro* contre les champignons dimorphiques (*Histoplasma* spp., *Blastomyces dermatitidis*, *Coccidioides* spp, *Talaromyces marneffe*), *Penicillium*, *Rasamsonia*, *Scedosporium*, *Lomentospora*, *Fusarium*, *Trichophyton*, *Madurella mycetomatis* et les espèces d'*Aspergillus* cryptiques et résistantes aux azolés.

Nous sommes conscients du défi que représente la gestion des espèces difficiles à traiter ou des nouvelles espèces. Nous avons donc décidé de mettre en place la détermination de la sensibilité à l'olorofim pour ces souches. Nous avons expertisé pour le moment une collection de 160 isolats cliniques identifiés par séquençage. Nous avons obtenu des résultats reproductibles pour les valeurs basses de CMI pour plusieurs isolats multi-résistants tels que le complexe d'espèces *Fusarium fujikuroi* et *F. oxysporum*; *Microascus* et *Scopulariopsis*. Notre objectif est de constituer une base de données qui sera un atout majeur pour les cliniciens et mycologues.

Recherche des mutations dans le gène CYP51A

En 2022, nous avons recherché des mutations dans le gène *CYP51A* pour 12 isolats d'*A. fumigatus*. Dans la Figure 10 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 Erreur ! Source du renvoi introuvable.. Dans ce Tableau 11 résumant les données sur les souches testées au CNR, la proportion élevée des souches d'*A. fumigatus* résistantes est artéfactuelle et ne reflète en rien la réalité épidémiologique en France. En effet, plus d'un tiers des souches d'*A. fumigatus* nous sont envoyées dans un contexte d'échec thérapeutique ou de suspicion de résistance. Nous avons séparé, dans le tableau, les souches pour lesquelles les CMI de l'itraconazole étaient élevées (>1 mg/L), avec parfois une résistance croisée pour le voriconazole et le posaconazole, de façon à mieux mettre en évidence le profil des souches sauvages.

Parmi les espèces 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 ma même espèce. Certaines espèces ont des CMI basses pour l'itraconazole et le posaconazole et des CMI hautes pour le voriconazole (*Mucorales*, *Exophiala dermatitidis*, ou la forme mycélienne de *Sporothrix schenckii*). A l'inverse, des CMI basses

pour le voriconazole et hautes pour l'itraconazole et le posaconazole sont observées pour d'autres espèces (*Trichoderma* spp.).

Dans la mesure où l'isavuconazole n'est testé que depuis janvier 2015, nous présentons la comparaison des CMI sur des espèces pour lesquelles plus de 5 isolats ont été testés en parallèle avec les différents azolés (Tableau 9). 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).

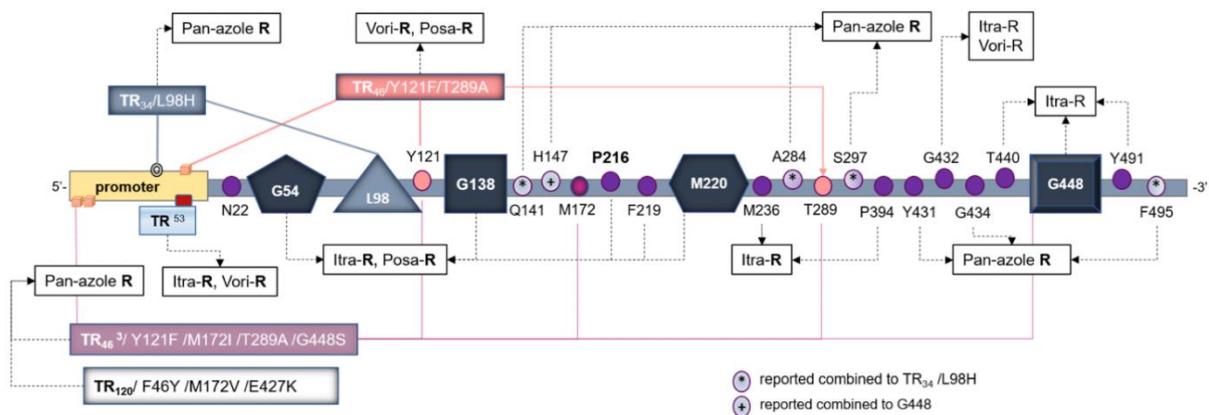


Figure 10. Schéma du gène *Cyp51A* d'*A. fumigatus* et principales mutations. Les régions hotspot sont indiquées : G54, L98, G138, M220, G448. Les constructions génétiques ont démontré que ces mutations peuvent être responsables d'un phénotype de résistance aux antifongiques azolés (modifié d'Alanio A. et al.) Itra: itraconazole ; Vori : voriconazole ; Posa : posaconazole ; TR, tandem repeat ; R, résistant

Mutations ^{18,19,20}		Mécanisme
TR ₃₄ /L98H *		Hyper expression de la protéine cible et une affinité d'interaction réduite par modification structural du canal d'accès au ligand
TR ₄₆ /Y121F/T289A		
TR ₄₆ /Y121F/M172I/T289A/G448S		
TR120/F46Y/M172V/E427K		Acquisition de novo du TR après traitement prolongé aux azolés
TR53		Mutation décrite pour des souches résistantes. Mécanisme non connu
G54W/R/E/V/A/D	M220T/V/I/K/R/L	Mutations décrites pour des souches résistantes (par affinité d'interaction réduite).
G138C/S	G448S	
P216	H147Y	
I246M	M263I	
F46Y/M172V/N248T/D255E/E427K		Polymorphismes décrits pour des souches sensibles aux azolés
N22D	Y431S/C	Polymorphismes nucléotidiques décrits occasionnellement pour des souches résistantes aux azolés
F165L	G432S/A	
F219S/C/I	G434C	
I242V	T440	
D262Y	N479D	
N248K	Y491H	
A284T		

Tableau 11. Mutations dans le gène *Cyp51A* d'*Aspergillus fumigatus*

Bilan des diagnostics moléculaires

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 diagnostic, 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, la fusariose²¹ et l'histoplasmose²². 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'histoplasmose et des fusarioses.

Le diagnostic d'histoplasmose a donc été possible à partir de prélèvement invasifs (biopsies de tissu pathologique), superficiel (e.g. écouvillon cutané/buccal) et à partir de sang prélevé sur anticoagulant. Un total de 40 prélèvements de 21 patients a été détecté positif sur 894 tests réalisés en 2022. Les données de l'évaluation, de cette qPCR ont été publiées²³ et la qPCR développée rendue publique et en cours d'évaluation à travers un programme de validation de contrôle externe européen (Dr Dunja Wilmes, Berlin) (Dunja Wilmes Mycoses 2023).

Après avoir développé une qPCR *Fusarium* spp., nous proposons cet examen pour les centres français. En 2022, nous avons réalisés 225 tests avec 31 prélèvements positifs chez 17 patients principalement à partir du sang et de prélèvements cutanés.

¹⁸ 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

¹⁹ 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

²⁰ 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.

²¹ Dellièrre et al., 2022, *Med Mycol*

²² Alanio et al, 202, *J Mol Diag*

²³ Alanio A, et al. Evaluation of a new Histoplasma spp. reverse transcriptase quantitative PCR assay. *J Mol Diagn.* Published online 2021.

3.4 Interfaces avec les réseaux de surveillance nationaux ou internationaux

Aucune des infections fongiques invasives n'est à déclaration obligatoire et n'est surveillée par Santé Publique France.

Pour les infections à *Candida auris*, les recommandations du HSSP demandent la déclaration des cas d'infection et de colonisation à *Candida auris* ainsi que l'envoi de la souche au CNRMA. L'état des lieux de ces données sera fait dans le chapitre alerte.

Le CNRMA participe à la surveillance européenne concernant les infections à *Candida auris* mis en place par l'ECDC, *Candida auris* survey collaborative group ²⁴.

3.5 Enquêtes ou études ponctuelles concourant à la surveillance

Pour chacune de ces études, décrivez **en une page maximum** : (i) les objectifs de l'enquête, (ii) les partenaires, (iii) la contribution du CNR, (iv) l'état d'avancement et (v) principaux résultats le cas échéant ou renvoi à une publication.

Exemples : étude de la couverture immunitaire et de son évolution ; enquête cas-témoins pour identifier des facteurs de risque ; étude d'incidence ; étude sur les facteurs associés à l'isolement d'un sous type particulier d'agent pathogène, d'un type de résistance,...

²⁴ Kohlenberg et al. Increasing number of cases and outbreaks caused by *Candida auris* in the EU/EEA, 2020 to 2021. Euro Surveill. 2022 doi: 10.2807/1560-7917.ES.2022.27.46.2200846.

4. Alertes

Au cours de l'année 2022, nous avons été informés de 10 signalements e-sin par Santé Publique France et/ou les correspondants mycologues et/ou hygiénistes de 7 centres hospitaliers. Les signalements concernaient majoritairement des cas d'infections et/ou colonisations à *Candida auris* (n=7), 1 infection à *Magnusiomyces clavatus* (syn. *Geotrichum clavatum*), 2 cas de Pneumopathies à Mucorales + Aspergillus dans un même hôpital et 2 cas d'infection respiratoires à Mucorales dans un même hôpital.

Candida auris

Parmi les 7 cas (2 infections et 5 colonisations) de *C. auris* en 2022, 6 souches nous ont été envoyées et nous avons pu effectuer le séquençage génome entier pour la détermination du clade géographique et le génotypage. Un cas d'infection liée à deux cas secondaires a pu ainsi être mis en évidence. Le CNRMA fait partie du groupe européen de surveillance des infections et colonisations à *C. auris* (Candida auris survey) et a participé à l'analyse des données européennes de l'ECDC²⁵.

Depuis 2007, 24 cas d'infections (n=10) ou colonisations (n=14) à *C. auris* ont été recensés. Les cas ont été rapportés dans 14 centres hospitaliers en France. 21 des 24 cas notifiés sont importés de différents pays d'endémicité connue (Koweït, Inde, Dubai, Egypte...). Seuls 2 épisodes de transmissions avérées entre patients ont été observés (1 épisode avec 1 cas secondaire en 2021 et 1 avec 2 cas secondaires en 2022).

Year	Cases* number	Infection cases	Colonisation cases
2007	1	1	0
2014	1	1	0
2015	2	1	1
2016	1	0	1
2017	1	0	1
2019	3	0	3
2020	3	2	1
2021	5	3	2
2022	7	2	5
All	24	10	14

Le premier évènement de transmission de *Candida auris* dans un hôpital français a été mis en évidence à l'hôpital Saint-Louis en 2021 et investigué. Les résultats sont disponibles dans cette publication²⁶. L'investigation a révélé qu'entre 41 et 61 jours ont séparé la détection du deuxième cas (P1) en culture après le premier cas (P0) importé d'Abu Dhabi. Tous les patients contacts incluant le patient P1 avaient été criblé négatifs en culture et en qPCR trois fois de suite à une semaine d'intervalle. L'enquête environnementale n'avait pas révélé de prélèvement positif en culture bien que des qPCR avaient été positives de façon prolongées dans la chambre des patients. Cette épidémie a permis de préciser des éléments qui ont été intégrés dans les premières recommandations de prise en charge des cas de *C. auris* à l'APHP (cf recommandation APHP en supplément de la publication).

Trichosporon inkin

Un signalement concernant des cas de médiastinites à *Trichosporon inkin* nous avait été signalé en décembre 2021. Des nouveaux cas ont également été reportés au cours de l'année 2022. A la suite du signalement de ces cas groupés, Françoise Dromer avait mis en place une alerte auprès des mycologues de France, afin de recenser les éventuels cas

²⁵ Kohlenberg *et al.* Euro Surv 2022, doi: 10.2807/1560-7917

²⁶ Alanio A, *et al.* 2022. First Patient-to-Patient Intrahospital Transmission of Clade I *Candida auris* in France Revealed after a Two-Month Incubation Period. Microbiol Spectr e01833-22.

supplémentaires de médiastinites à *Trichosporon*. Les souches de 2021 et 2022 nous ont été envoyées au cours de l'année 2022. Les 9 isolats correspondaient majoritairement à des cas chez des patients transplantés cardiaques ou ayant subi des interventions de chirurgie cardio-vasculaires dans un même hôpital sur une période relativement courte. Tous les isolats ont été identifiés comme appartenant à l'espèce *Trichosporon inkin* par technique de spectrométrie de masse MALDI-Tof. Cependant le séquençage de la région IGS (utilisé comme locus de référence pour le genre *Trichosporon*) suggère qu'ils appartiennent à une espèce proche mais différente (*T. cf. inkin* ; 72-73% similarité) déjà retrouvé parmi des isolats cliniques reçus au CNRMA depuis 2005. Les infections à *T. inkin* étant rare et les cas groupés n'étant pas étudiés pour cette espèce, il n'existe pas de technique robuste de génotypage pour confirmer ou infirmer le lien entre les isolats. Nous avons donc réalisé le séquençage génome entier de tous les isolats cliniques reçus au CNRMA depuis 2008 et identifiés comme *T. inkin* ou *T. cf. inkin* (36 isolats). Les données de génome entier ont été obtenus par séquençage sur Illumina, effectué par la plateforme P2M de l'Institut Pasteur. Les analyses ont été effectuées en collaboration avec le Hub Bio-informatique et Bio-statistiques avec les modules minimap2, samtools, IQTREE et le pipeline SAM2MAP. Le mapping, initialement effectué sur un des génomes de la souche type CBS 5585 déposé dans la base NCBI, suggère que les isolats appartiennent bien à une nouvelle espèce (*Trichosporon cf. inkin*). Nous avons donc choisi de faire un séquençage *de novo* en utilisant le premier isolat clinique de l'épidémie comme génome de référence (CNRMA22.72). Nous avons effectué un alignement total des génomes pour construire une matrice de distance nous permettant de visualiser la distance entre les isolats. Cette analyse suggère que les isolats identifiés comme responsables de l'épidémie appartiennent tous à une même nouvelle espèce (taille du génome 20.8Mb environ) qui aurait été responsable depuis 2005 d'infections invasives dans différents hôpitaux français (ANI 98-99%) (Figure 11).

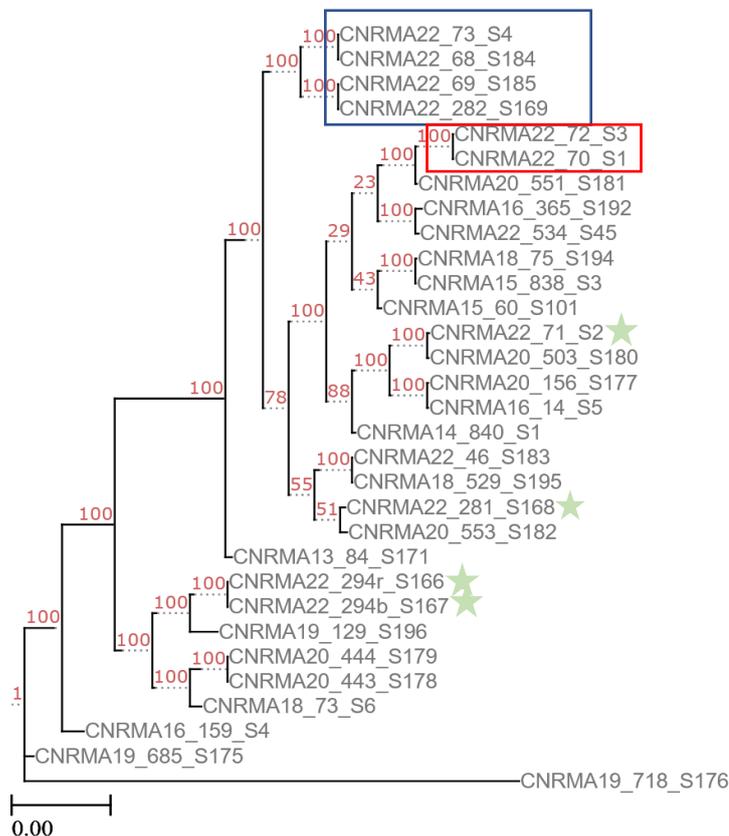


Figure 11. Arbre construit à partir d'une matrice de distance calculée en utilisant l'alignement de 19676699 positions nucléotidiques pour 30 isolats cliniques, arbre non enraciné, les valeurs en rouge correspondent aux valeurs de bootstrap. En rouge et en bleu deux éventuels clades génétiques

La diversité génétique au sein des espèces de *Trichosporon* est inconnue (quelques données pour *T. asahii* basée sur une étude préalable), taux de mutation, niche écologique inconnues ne permettent pas de connaître les pressions environnementales, les éventuels phénomènes d'hybridation comme cela a été montrée pour certains isolats d'espèces proches. Il est donc difficile pour l'instant de déterminer un seuil de SNP permettant de conclure au lien génétique entre isolats, comme cela a été fait par exemple pour *Candida auris* et comme nous avons pu le faire après

une étude détaillée pour *S. clavata*. L'analyse des données de génome entier est nécessairement combinée aux données épidémiologiques pour pouvoir conclure à un lien éventuel entre souches.

Aux vues des premiers résultats de génome entier et des données épidémiologiques nous pouvons identifier, parmi les isolats responsables des cas groupés, (i) 6 isolats liés génétiquement 2 par 2 (ii) 2 groupes sont éventuellement liés entre eux, (iii) les 3 autres isolats recueillis en même temps ne sont pas liés. Ces résultats sont encore partiels pour l'instant car la faible quantité de données présentes dans la littérature et/ou les bases publiques nécessitent beaucoup de recherche et d'analyse. Des analyses complémentaires sont encore nécessaires.

5. Activités de mise à disposition de l'information, de formation et de conseil

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

5.1 Conseil et expertise 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, pneumologues des différents centres hospitaliers français universitaires et généraux. Nous sommes sollicités soit par l'adresse email générique du CNRMA, soit par téléphone au service de maladies infectieuses de l'hôpital Necker. Les réponses sont faites soit directement par téléphone, soit en réponse aux emails soit par une RCP pour les questions plus complexes avec un compte-rendu écrit. Cette activité clinique n'est pas quantifiable mais les deux cliniciens sont sollicités au moins 3/5 fois par jour. Le nombre de réponses via la RCP hebdomadaire est de l'ordre de 5 demandes par semaine.

L'activité de conseil concerne aussi un aspect microbiologique et diagnostic. Généralement, le CNRMA est sollicité via son adresse email générique au moins 1-2 fois par semaine.

5.2 Conseil et expertise aux autorités sanitaires

Nous avons été sollicités par l'ANSM pour échanger au sujet des nouveaux antifongiques ainsi que sur la place de la formulation intraveineuse de 5 Flucytosine dont la production a été définitivement interrompue.

Fanny Lanternier est responsable du Groupe de Travail sur les infections associées à l'Infection VIH dans le cadre des recommandations ANRS/HAS de prise en charge des PPVIH qui sont coordonnées par le Pr Delobel. Alexandre Alanio a été sollicité par ce groupe de travail pour la partie concernant la cryptococcose et la pneumocystose.

Expertise pour le comité leucémie de la Société française de lutte contre les cancers et les leucémies de l'enfant et de l'adolescent (SFCE) sur Infections fongiques invasives chez l'enfant immunodéprimé en hématologie pédiatrique : recommandations de prise en charge au sein des centres de la SFCE.

5.3 Conseil et expertise pour d'autres cibles (médias, grand public ...)

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

Ne mentionnez ici que les nouveaux éléments, ne figurant pas déjà dans le dossier de candidature du CNR ou dans le rapport de l'année précédente.

6.1 Activités de recherche en cours lors de l'année N, concernant uniquement celles ayant un lien direct avec les missions et activités du CNR

Cryptococcose

Du fait des modifications épidémiologiques de la cryptococcose avec notamment le poids grandissant des sujets séronégatifs pour le VIH en France, plusieurs publications concernant ces derniers ont été réalisées. Nous avons ainsi montré et questionné la survenue d'un cas de cryptococcose disséminée après traitement par eculizumab, anticorps monoclonal inhibiteur de C5²⁷ ainsi qu'un cas survenant chez un jeune patient ayant un déficit en CD40 ligand (interaction lymphocytaire T et B)²⁸. Dans le cadre d'une collaboration avec la Guyane française, nous avons suivi plusieurs cas de cryptococcose survenant chez des sujets jeunes²⁹.

Nous avons également co-dirigé une importante étude nationale qui a rassemblé les observations de cryptococcose neuro-méningée survenues chez les patients transplantés rénaux soulignant une baisse de la mortalité dans cette population dans laquelle on décrit des syndromes inflammatoires de reconstitution immunitaires comme chez les sujets infectés par le VIH³⁰.

Sur le plan thérapeutique, chez les sujets VIH+, avec méningite, nous avons montré en Afrique (étude Ambition), la non-infériorité de l'association triple fluconazole forte dose + flucytosine et dose unique d'amphotéricine B liposomale par rapport à la stratégie de référence³¹. Ces résultats sont très rapidement devenus la recommandation thérapeutique définie par l'OMS (<https://www.who.int/news/item/20-04-2022-rapid-advice-new-guidelines-for-simpler-safer-treatment-for-cryptococcal-disease-in-plhiv>). En parallèle de la publication de l'étude Ambition, il nous a été demandé de rédiger un éditorial pour résumer toutes les barrières à la mise à disposition de la flucytosine dans l'ensemble du continent africain³². Une autre demande a été formulée auprès de notre groupe pour réfléchir à l'application de l'étude pour la pratique thérapeutique en Europe, USA³³ et celle-ci a été jugée possible.

Nous avons réalisé une étude sur la cryptococcose chez les sujets séronégatifs pour le VIH en France entre 2005 et 2020. 652 cas de cryptococcose ont été rapportés. La majorité (66%) étaient dues à *Cryptococcus neoformans* sérotype A. La majorité des sujets (63%) avaient une cryptococcose neuroméningée et/ou disséminée. Parmi les 652 patients, 102 étaient transplantés d'organe solide, 209 avaient une néoplasie (32%, dont 80% avaient une hémopathie maligne, et 204 avaient un autre facteur de risque (31%, les plus fréquents étant une maladie auto-immune, une insuffisance hépatique ou rénale, et une sarcoïdose, et parmi lesquels 53% avaient reçu une corticothérapie systémique).

²⁷ Lortholary et al, 2023, OFID

²⁸ Françoise et al, 2022, JCI

²⁹ Goupil de Bouillié et al, 2022, Front Immunol

³⁰ Tardieu et al., 2022, Pathogens

³¹ Jarvis et al., 2022, NEJM

³² Temfack et al., 2022, Lancet ID

³³ Harrison et al., 2023, CID

Candidoses chroniques disséminées (CCD ou candidoses hépato-spléniques)

Depuis plus de dix ans, nous avons émis l'hypothèse que les CCD étaient en fait un syndrome inflammatoire de reconstitution immunitaire (IRIS) et non une pathologie infectieuse classique, en raison du bénéfice de la corticothérapie adjuvante et la mise en évidence d'une réponse IFN- γ spécifique (CID et JID). Dans le cadre du PHRC « Canhpari » portant sur l'étude physiopathologique et sur l'intérêt de la réalisation d'un PET SCAN pour le diagnostic et dans le suivi des CCD, nous avons pu montrer un polymorphisme fonctionnel portant sur le gène de l'IL-1b, là encore autre évidence d'une susceptibilité individuelle à la survenue d'un IRIS fongique³⁴. Par ailleurs, nous avons montré l'absence de bénéfice du PET Scan pour le diagnostic de CCD sur la radiologie conventionnelle mais sa contribution au 3^e mois dans une décision d'arrêt des antifongiques classiquement prescrits pendant 6 mois.

Aspergilloses

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 pays³⁵.

L'espèce le plus souvent impliquée en pathologie humaine dans les aspergilloses invasives est sans conteste *A. fumigatus* sous nos climats, mais *A. flavus* est prédominant sous les tropiques. Il est donc important de comparer ces deux espèces. Ici, le travail a consisté à regarder les différences concernant les réactions immunes vis-à-vis des spores de ces deux espèces et a objectivé de nombreuses différences liées aux structures différentes des paroi des spores. Ces différences ont un intérêt fondamental mais aussi pratique dans l'optique de développer des tests de détection des anticorps produits lors des infections dues à ces deux espèces³⁶.

Travaux sur les mycoses rares et/ou émergentes

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

Mucormycoses cérébrales

Nous avons constitué une cohorte rétrospective de 54 patients atteints de mucormycose du système nerveux central entre 2005 et 2020 à partir de 28 hôpitaux français, afin de préciser les caractéristiques clinico-radio-biologiques de ces infections selon leur mode de dissémination. Cette étude souligne que la mucormycose du SNC est rapidement fatale, notamment en cas de dissémination hématogène et de neutropénie au diagnostic. Les résultats préliminaires de cette étude ont été présentés aux Journées Nationales d'Infectiologie (2021), au congrès de l'ESCMID (2021) et au congrès « 10th Advances Against Aspergillosis and Mucormycosis » (2022).

Scedosporioses

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 période³⁷. Ce travail a permis d'identifier des formes cliniques de scedosporioses jusque-là peu décrites avec la publication des formes ostéoarticulaires d'évolution favorable avec un

³⁴ Rammaert et al, 2022, OFID

³⁵ 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

³⁶ 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.

³⁷ Bronnimann D et al. Scedosporiosis/lomentosporiosis observational study (SOS): Clinical significance of *Scedosporium* species identification. *Med. Mycol.* 2021;59(5):486–97.

traitement chirurgical et un traitement antifongique prolongé³⁸. Un travail sur les scedosporioses vasculaires est en cours permettant de décrire la fréquence des complications vasculaires fréquentes à proximité des atteintes ostéoarticulaires avec des aortites et des artérites périphériques. Ce travail est fait en collaboration avec les infectiologues de CHU de Bordeaux (Dr Vignals, Bronnimann, Puges).

Mycoses invasives émergentes

Nous avons mené une collaboration avec l'hôpital de Fort de France sur les infections liées au complexe *Candida haemulonii*, principalement représentées par les fongémies. Les caractéristiques étaient comparables à celles liées à *Candida parapsilosis*, autre levure colonisant la peau, en dehors de l'origine géographique principalement antillaise des infections liées au complexe haemulonii. Nous avons pu également montrer la multirésistance possible de ce complexe proche phylogénétiquement de *Candida auris* et la colonisation de la peau des sujets martiniquais hors hôpital, mais aussi la colonisation respiratoire par cette levure en réanimation (Françoise, PLoS NTD, in press).

Nous sommes également en cours d'analyse de l'étude nationale portant sur les **infections autochtones à *Cladophialophora bantiana*** (n=23) dont l'incidence a été multipliée par 7 au cours de 2022, par rapport à celle rapportée au cours des vingt années précédentes, 2022 étant l'année la plus chaude enregistrée en France depuis 1900. Les infections se répartissaient en lésions cérébrales d'allure kystique ou post-traumatiques, lors de fractures ouvertes complexes. De manière majeure, nous montrons que les patients traités selon les recommandations émises par le CNRMA sur la base des data *in vitro* et dans les modèles expérimentaux ont une probabilité de survie significativement plus élevée à 6 mois que ceux recevant toute autre stratégie thérapeutique.

Mises au point

Nous avons enfin coordonné trois travaux de synthèse importants, l'un dans le cadre d'une collaboration internationale portant sur les mycoses ostéo-articulaires reprenant toutes les données disponibles sur le sujet (Gamaletsou, Clin Microbiol Rev 2022) ; une deuxième portant sur les données les plus récentes acquises sur les mucormycoses pulmonaires (Danion, J Fungi 2022) en parallèle d'un travail original portant sur le même sujet et actuellement en cours de publication (Coste, Chest in press). Une revue exhaustive de la littérature sur l'aspergillose invasive compliquant la transplantation hépatique a également été publiée (Melenotte, Transplant ID 2023), là aussi en parallèle d'une étude nationale en cours sur le sujet.

6.2 Liste des publications et communications de l'année N, concernant uniquement celles ayant un lien direct avec les missions et activités du CNR

Liste des publications

Publications nationales

1. [Invasive fungal infections in immunocompromised children in paediatric haematology: Recommendations for management in SFCE centres]. Alby-Laurent F, Chahla WA, Brethon B, Dupont D, Gandemer V, Gueguen G, Lanternier F, Pasquet M, Philippe M, Pluchart C, Domenech C. Bull Cancer. 2022 Nov;109(11):1109-1124. doi: 10.1016/j.bulcan.2022.08.004. Epub 2022 Sep 29. PMID: 36184333 Review. French.

Publications internationales

1. MALDI-TOF Mass Spectrometry Online Identification of Trichophyton indotineae Using the MSI-2 Application. Normand AC, Moreno-Sabater A, Jabet A, Hamane S, Cremer G, Foulet F, Blaize M, Dellièvre S, Bonnal C, Imbert S, Brun S, Packeu A, Bretagne S, Piarroux R. J Fungi (Basel). 2022 Oct 19;8(10):1103. doi: 10.3390/jof8101103. PMID: 36294668 Free PMC article.
2. Evaluation of Serum Mucorales Polymerase Chain Reaction (PCR) for the Diagnosis of Mucormycoses: The MODIMUCOR Prospective Trial. Millon L, Caillot D, Berceanu A, Bretagne S, Lanternier F, Morio F, Letscher-Bru V, Dalle F, Denis B, Alanio A, Boutoille D, Bougnoux ME, Botterel F, Chouaki T, Charbonnier A, Ader F,

³⁸ Blez et al.. Invasive bone and joint infections from the French Scedosporiosis/lomentosporiosis Observational Study (SOS) cohort: no mortality with long-term antifungal treatment and surgery. Med Mycol. 2023 doi: 10.1093/mmy/myad023.

- Dupont D, Bellanger AP, Rocchi S, Scherer E, Gbaguidi-Haore H, Herbrecht R. Clin Infect Dis. 2022 Sep 14;75(5):777-785. doi: 10.1093/cid/ciab1066. PMID: 34986227 Free article.
3. Bloodstream Infections Caused by *Magnusiomyces capitatus* and *Magnusiomyces clavatus*: Epidemiological, Clinical, and Microbiological Features of Two Emerging Yeast Species. Noster J, Koeppl MB, Desnos-Ollivier M, Aigner M, Bader O, Dichtl K, Gottig S, Haas A, Kurzai O, Pranada AB, Stelzer Y, Walther G, Hamprecht A. 2022. Antimicrob Agents Chemother 66:e0183421. Feb 15;66(2):e0183421. doi: 10.1128/AAC.01834-21
 4. Active Surveillance Program to Increase Awareness on Invasive Fungal Diseases: the French RESSIF Network (2012 to 2018). Bretagne S, Sitbon K, Desnos-Ollivier M, Garcia-Hermoso D, Letscher-Bru V, Cassaing S, Millon L, Morio F, Gangneux JP, Hasseine 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. mBio. 2022 Jun 28;13(3):e0092022. doi: 10.1128/mbio.00920-22. Epub 2022 May 2. PMID: 35499498 Free PMC article.
 5. Echinocandins Susceptibility Patterns of 2,787 Yeast Isolates: Importance of the Thresholds for the Detection of FKS Mutations. Desnos-Ollivier M, Bretagne S, Lortholary O, Dromer F; French Mycoses Study Group N. Brieu CH Aix, T. Chouaki, C. Damiani, A. Totet CHU Amiens, J. P. Bouchara, D. Chabasse, M. Pihet CHU Angers, S. Bland CH Annecy, V. Blanc CH Antibes, S. Branger CH Avignon, A. P. Bellanger, L. Millon CHU Besançon, C. Plassart CH Beauvais, I. Poilane Hôpital Jean Verdier, Bondy, I. Accoceberry, L. Delhaes, B. Couprie, F. Gabriel CH Bordeaux, J. Dunand, A. L. Roux, V. Sivadon-Tardy Hôpital Ambroise Paré, Boulogne Billancourt, F. Laurent CH, Bourg en Bresse, S. Legal, E. Moalic, G. Nevez, D. Quinio CHU Brest, M. Cariou CH Bretagne Sud, J. Bonhomme, C. Duhamel CHU, Caen, B. Podac CH, Chalon sur Saône, S. Lechatch CH, Charleville-Mézières, C. Soler Hopital d'Instruction des armées, Clamart, M. Cambon, C. Nourrisson, P. Poirier, D. Pons CHU, Clermont Ferrand, O. Augereau, I. Grawey CH, Colmar, N. Fauchet CHIC, Créteil, A. Bonnin, F. Dalle CHU, Dijon, P. Cahen, P. Honderlick CMC, Foch, N. Desbois, C. Miossec CHU, Fort de France, J. L. Hermann Hôpital Raymond Poincaré, Garches, M. Cornet, R. Grillot, B. Lebeau, D. Maubon, H. Pelloux CHU, Grenoble, M. Nicolas CHU, Gua... See abstract for full author list → Antimicrob Agents Chemother. 2022 May 17;66(5):e0172521. doi: 10.1128/aac.01725-21. Epub 2022 Apr 12. PMID: 35412354 Free PMC article.
 6. Hepatosplenic Candidiasis in Patients With Hematological Malignancies: A 13-Year Retrospective Cohort Study. Boussen I, Lisan Q, Raffoux E, Di Blasi R, Boissel N, Oksenhendler E, Adès L, Xhaard A, Bretagne S, Alanio A, Molina JM, Denis B. Open Forum Infect Dis. 2022 Mar 7;9(4):ofac088. doi: 10.1093/ofid/ofac088. eCollection 2022 Apr. PMID: 35355897 Free PMC article.
 7. Osteoarticular Mycoses. Gamaletsou MN, Rammaert B, Brause B, Bueno MA, Dadwal SS, Henry MW, Katragkou A, Kontoyiannis DP, McCarthy MW, Miller AO, Moriyama B, Pana ZD, Petratiene R, Petratis V, Roilides E, Sarkis JP, Simitsopoulou M, Sipsas NV, Taj-Aldeen SJ, Zeller V, Lortholary O, Walsh TJ; International Consortium for Osteoarticular Mycoses. Clin Microbiol Rev. 2022 Dec 21;35(4):e0008619. doi: 10.1128/cmr.00086-19. Epub 2022 Nov 30. PMID: 36448782 Review.
 8. Does 18F-FDG PET/CT add value to conventional imaging in clinical assessment of chronic disseminated candidiasis? Rammaert B, Maunoury C, Rabeony T, Correas JM, Elie C, Alfandari S, Berger P, Rubio MT, Braun T, Bakouboula P, Candon S, Montravers F, Lortholary O. Front Med (Lausanne). 2022 Dec 20;9:1026067. doi: 10.3389/fmed.2022.1026067. eCollection 2022. PMID: 36606049 Free PMC article.
 9. Extensive dermatophytosis caused by terbinafine-resistant *Trichophyton indotineae*, successfully treated with topical voriconazole. Gueneau R, Joannard B, Haddad N, Alby F, Jullien V, Schlatter J, Cotteret C, Bougnoux ME, Lanternier F, Laroche L, Delliere S, Cisternino S, Lortholary O. Int J Antimicrob Agents. 2022 Nov-Dec;60(5-6):106677. doi: 10.1016/j.ijantimicag.2022.106677. Epub 2022 Sep 30. PMID: 36184016.
 10. Disseminated Cryptococcosis in a Patient with CD40 Ligand Deficiency. Françoise U, Lafont E, Suarez F, Lanternier F, Lortholary O. J Clin Immunol. 2022 Nov;42(8):1622-1625. doi: 10.1007/s10875-022-01329-y. Epub 2022 Aug 6. PMID: 35932410
 11. Curative allogeneic hematopoietic stem cell transplantation following reduced toxicity conditioning in adults with primary immunodeficiency. Marçais A, Mahlaoui N, Neven B, Lanternier F, Catherinot É, Salvator H, Cheminant M, Jeljeli M, Asnafi V, van Endert P, Couderc LJ, Lortholary O, Picard C, Moshous D, Hermine O, Fischer A, Suarez F. Bone Marrow Transplant. 2022 Oct;57(10):1520-1530. doi: 10.1038/s41409-022-01739-x. Epub 2022 Jul 6. PMID: 35794259 Free PMC article.
 12. Access to flucytosine for the treatment of HIV-associated cryptococcal meningitis in Africa. Temfack E, Lortholary O. Lancet Infect Dis. 2022 Sep;22(9):1262-1264. doi: 10.1016/S1473-3099(22)00315-2. Epub 2022 Jun 21. PMID: 35750066.

13. Cryptococcal Meningitis in Kidney Transplant Recipients: A Two-Decade Cohort Study in France. Tardieu L, Divard G, [Lortholary O](#), Scemla A, Rondeau É, Accoceberry I, Agbonon R, [Alanio A](#), Angoulvant A, Albano L, Attias P, Bellanger AP, Bertrand D, Bonhomme J, Botterel F, Bouvier N, Buchler M, Chouaki T, Crépin T, Durieux MF, Desoubeaux G, Doppelt G, Favennec L, Fekkar A, Fourdinier O, Frimat M, Gangneux JP, Garandeau C, Hasseine L, Hennequin C, Iriart X, Kamar N, Kaminski H, Kormann R, Lachaud L, Legendre C, Le Quintrec Donnette M, Leroy J, Levi C, Machouart M, Marx D, Menotti J, Moal V, Morio F, Mrozek N, Nicolas M, Poirier P, Peraldi MN, Poussot B, Ranque S, Rerolle JP, Sendid B, Snanoudj R, Tourret J, Vasse M, Vigneau C, Villard O, Mesnard L, [Lanternier F](#), Rafat C. *Pathogens*. 2022 Jun 17;11(6):699. doi: 10.3390/pathogens11060699. PMID: 35745553 Free PMC article.
14. Case Report: Invasive Cryptococcosis in French Guiana: Immune and Genetic Investigation in Six Non-HIV Patients. Goupil de Bouillé J, Epelboin L, Henaff F, Migaud M, Abboud P, Blanchet D, Aznar C, Djossou F, [Lortholary O](#), Elenga N, Puel A, [Lanternier F](#), Demar M. *Front Immunol*. 2022 Apr 26;13:881352. doi: 10.3389/fimmu.2022.881352. eCollection 2022. PMID: 35558066 Free PMC article.
15. Single-Dose Liposomal Amphotericin B Treatment for Cryptococcal Meningitis. 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, van Widenfelt E, Chen T, Wang D, Hope W, Boyer-Chammard T, Loyse A, Molloy SF, Youssouf N, [Lortholary O](#), Lalloo DG, Jaffar S, Harrison TS; Ambition Study Group. *N Engl J Med*. 2022 Mar 24;386(12):1109-1120. doi: 10.1056/NEJMoa2111904. PMID: 35320642 Free PMC article. Clinical Trial.
16. Main human inborn errors of immunity leading to fungal infections. Cifaldi C, Ursu GM, D'Alba I, Paccoud O, Danion F, [Lanternier F](#), Chiriaco M. *Clin Microbiol Infect*. 2022 Nov;28(11):1435-1440. doi: 10.1016/j.cmi.2022.06.031. Epub 2022 Jul 19. PMID: 35863627 Review.
17. Dynamic full-field optical coherence tomography as complementary tool in fungal diagnostics. Maldiney T, Chassot JM, Boccara C, Blot M, Piroth L, Charles PE, [Garcia-Hermoso D](#), [Lanternier F](#), Dalle F, Sautour M. *J Mycol Med*. 2022 Nov;32(4):101303. doi: 10.1016/j.mycmed.2022.101303. Epub 2022 Jun 11. PMID: 35732095
18. Pearls & Oysters: Spinal Cord Candidiasis Linked to CARD9 Deficiency Masquerading as a Longitudinally Extensive Transverse Myelitis. Jeantin L, Plu I, Amador MDM, Maillart E, [Lanternier F](#), Pourcher V, Davy V. *Neurology*. 2022 Sep 13;99(11):475-479. doi: 10.1212/WNL.0000000000200992. Epub 2022 Jul 6. PMID: 35794021
19. Case Report: Immune Checkpoint Blockade Plus Interferon- γ Add-On Antifungal Therapy in the Treatment of Refractory Covid-Associated Pulmonary Aspergillosis and Cerebral Mucormycosis. Serris A, Ouedrani A, Uhel F, Gazzano M, Bedarida V, Rouzaud C, Bougnoux ME, Raphalen JH, Poirée S, Lambotte O, Martin-Blondel G, [Lanternier F](#). *Front Immunol*. 2022 Jun 1;13:900522. doi: 10.3389/fimmu.2022.900522. eCollection 2022. PMID: 35720319 Free PMC article.
20. Intricate isavuconazole therapy of a subcutaneous nodule caused by *Alternaria infectoria* in a heart transplant recipient. Maisons V, Desoubeaux G, Coustillères F, Lemaigen A, Chesnay A, Doman M, [Lanternier F](#), Bernard L, Lacasse M. *J Mycol Med*. 2022 May;32(2):101235. doi: 10.1016/j.mycmed.2021.101235. Epub 2021 Dec 16. PMID: 34954620
21. The role of glycosylphosphatidylinositol (gpi) anchored proteins in *Cryptococcus neoformans*. Snelders E, Moyrand F, Sturny-Leclère A, Vernel-Pauillac F, Volant S, Janbon G, [Alanio A](#). *Microbes Infect*. 2022 Nov-Dec;24(8):105016. doi: 10.1016/j.micinf.2022.105016. Epub 2022 May 28. PMID: 35640861
22. First Patient-to-Patient Intrahospital Transmission of Clade I *Candida auris* in France Revealed after a Two-Month Incubation Period. [Alanio A](#), Snell HM, Cordier C, Desnos-Olivier M, Dellièrre S, Aissaoui N, Sturny-Leclère A, Da Silva E, Eblé C, Rouveau M, Thégat M, Zebiche W, Lafaurie M, Denis B, Touratier S, Benyamina M, Dudoignon E, Hamane S, Cuomo CA, Dépret F. *Microbiol Spectr*. 2022 Oct 26;10(5):e0183322. doi: 10.1128/spectrum.01833-22. Epub 2022 Sep 12. PMID: 36094221 Free PMC article.
23. Engineered Fluorescent Strains of *Cryptococcus neoformans*: a Versatile Toolbox for Studies of Host-Pathogen Interactions and Fungal Biology, Including the Viable but Nonculturable State. de Castro RJA, Rêgo MTAM, Brandão FS, Pérez ALA, De Marco JL, Poças-Fonseca MJ, Nichols C, Alspaugh JA, Felipe MSS, [Alanio A](#), Bocca AL, Fernandes L. *Microbiol Spectr*. 2022 Oct 26;10(5):e0150422. doi: 10.1128/spectrum.01504-22. Epub 2022 Aug 25. PMID: 36005449 Free PMC article
24. Investigation of CryptoPS LFA-positive sera in patients at risk of cryptococcosis. Aissaoui N, Benhadid-Brahmi Y, Sturny-Leclère A, Hamane S, Payet E, Bonnal C, Munier AL, Denis B, [Alanio A](#). *Med Mycol*. 2022 Oct 3;60(10):myac078. doi: 10.1093/mmy/myac078. PMID: 36149324

25. Detection of circulating DNA for the diagnosis of invasive fusariosis: retrospective analysis of 15 proven cases. Dellière S, Guitard J, Sabou M, Angebault C, Moniot M, Cornu M, Hamane S, Bougnoux ME, Imbert S, Pasquier G, Botterel F, [Garcia-Hermoso D](#), [Alanio A](#). *Med Mycol*. 2022 Sep 5;60(9):myac049. doi: 10.1093/mmy/myac049. PMID: 36044994
26. Multiple colony antifungal susceptibility testing detects polyresistance in clinical *Candida* cultures: a European Confederation of Medical Mycology excellence centers study. Knoll MA, Lackner N, Ulmer H, Samardzic E, Steinmann J, Krause R, Verhasselt HL, Rath PM, Fuchs F, Koehler P, Denis B, Hamane S, [Alanio A](#), Lass-Flörl C. *Clin Microbiol Infect*. 2022 Sep;28(9):1288.e1-1288.e7. doi: 10.1016/j.cmi.2022.04.014. Epub 2022 May 9. PMID: 35537592
27. Analytical Performance of the Commercial MucorGenius® Assay as Compared to an In-House qPCR Assay to Detect Mucorales DNA in Serum Specimens. Ghelfenstein-Ferreira T, Verdurme L, [Alanio A](#). *J Fungi (Basel)*. 2022 Jul 27;8(8):786. doi: 10.3390/jof8080786. PMID: 36012775 Free PMC article.
28. The current state of clinical mycology in Africa: a European Confederation of Medical Mycology and International Society for Human and Animal Mycology survey. Driemeyer C, Falci DR, Oladele RO, Bongomin F, Ocansey BK, Govender NP, Hoenigl M, Gangneux JP, Lass-Flörl C, Cornely OA, [Alanio A](#), Guinea J, Morrissey CO, Rautemaa-Richardson R, Chakrabarti A, Meis JF, Bruns C, Stemler J, Pasqualotto AC. *Lancet Microbe*. 2022 Jun;3(6):e464-e470. doi: 10.1016/S2666-5247(21)00190-7. Epub 2022 Jan 18. PMID: 35659908 Free article. Review.
29. Invasive Rhinosinusitis Caused by *Alternaria* infectoria in a Patient with Autosomal Recessive CARD9 Deficiency and a Review of the Literature. Paccoud O, Vignier N, Boui M, Migaud M, Vironneau P, Kania R, Méchaï F, Brun S, [Alanio A](#), Tauziède-Espariat A, Adle-Biassette H, Ouedraogo E, Bustamante J, Bouchaud O, Casanova JL, Puel A, [Lanternier F](#). *J Fungi (Basel)*. 2022 Apr 25;8(5):446. doi: 10.3390/jof8050446. PMID: 35628702 Free PMC article.
30. Hepatosplenic Candidiasis in Patients With Hematological Malignancies: A 13-Year Retrospective Cohort Study. Boussen I, Lisan Q, Raffoux E, Di Blasi R, Boissel N, Oksenhendler E, Adès L, Xhaard A, [Bretagne S](#), [Alanio A](#), Molina JM, Denis B. *Open Forum Infect Dis*. 2022 Mar 7;9(4):ofac088. doi: 10.1093/ofid/ofac088. eCollection 2022 Apr. PMID: 35355897 Free PMC article.
31. Combination of Mycological Criteria: a Better Surrogate to Identify COVID-19-Associated Pulmonary Aspergillosis Patients and Evaluate Prognosis? Dellière S, Dudoignon E, Voicu S, Collet M, Fodil S, Plaud B, Chousterman B, [Bretagne S](#), Azoulay E, Mebazaa A, Dépret F, Mégarbane B, [Alanio A](#). *J Clin Microbiol*. 2022 Mar 16;60(3):e0216921. doi: 10.1128/JCM.02169-21. Epub 2022 Jan 5. PMID: 34985983 Free PMC article.
32. COVID-19-associated mixed mold infection: A case report of aspergillosis and mucormycosis and a literature review. Benhadid-Brahmi Y, Hamane S, Soyer B, Mebazaa A, [Alanio A](#), Chousterman B, [Bretagne S](#), Dellière S. *J Mycol Med*. 2022 Mar;32(1):101231. doi: 10.1016/j.mycmed.2021.101231. Epub 2021 Nov 26. PMID: 34864498 Free PMC article. Review.
33. An overview of using fungal DNA for the diagnosis of invasive mycoses. White PL, [Alanio A](#), Brown L, Cruciani M, Hagen F, Gorton R, Lackner M, Millon L, Morton CO, Rautemaa-Richardson R, Barnes RA, Donnelly JP, Löffler J; Fungal PCR Initiative. *Expert Rev Mol Diagn*. 2022 Feb;22(2):169-184. doi: 10.1080/14737159.2022.2037423. Epub 2022 Feb 16. PMID: 35130460 Review.
34. Fungal infections in mechanically ventilated patients with COVID-19 during the first wave: the French multicentre MYCOVID study. Gangneux JP, Dannaoui E, Fekkar A, Luyt CE, Botterel F, De Prost N, Tadié JM, Reizine F, Houzé S, Timsit JF, Iriart X, Riu-Poulenc B, Sendid B, Nseir S, Persat F, Wallet F, Le Pape P, Canet E, Novara A, Manai M, Cateau E, Thille AW, Brun S, Cohen Y, [Alanio A](#), Mégarbane B, Cornet M, Terzi N, Lamhaut L, Sabourin E, Desoubeaux G, Ehrmann S, Hennequin C, Voiriot G, Nevez G, Aubron C, Letscher-Bru V, Meziani F, Blaize M, Mayaux J, Monsel A, Boquel F, Robert-Gangneux F, Le Tulzo Y, Seguin P, Guegan H, Autier B, Lesouhaitier M, Pelletier R, Belaz S, Bonnal C, Berry A, Leroy J, François N, Richard JC, Paulus S, Argaud L, Dupont D, Menotti J, Morio F, Soulié M, Schwebel C, Garnaud C, Guitard J, Le Gal S, Quinio D, Morcet J, Laviolle B, Zahar JR, Bougnoux ME. *Lancet Respir Med*. 2022 Feb;10(2):180-190. doi: 10.1016/S2213-2600(21)00442-2. Epub 2021 Nov 26. PMID: 34843666 Free PMC article.
35. Emergence of Difficult-to-Treat Tinea Corporis Caused by *Trichophyton mentagrophytes* Complex Isolates, Paris, France. Dellière S, Joannard B, Benderdouche M, Mingui A, Gits-Muselli M, Hamane S, [Alanio A](#), Petit A, Gabison G, Bagot M, [Bretagne S](#). *Emerg Infect Dis*. 2022 Jan;28(1):224-228. doi: 10.3201/eid2801.210810. PMID: 34932462 Free PMC article.
36. First case of subcutaneous cystic phaeohyphomycosis due to *Phialophora chinensis* in a kidney transplant recipient in Martinique. Pruvot C, Messagier AL, [Garcia-Hermoso D](#), Lebailly F, Aglae C, Desbois-Nogard N. *Med Mycol Case Rep*. 2022 Dec 25;39:18-22. doi: 10.1016/j.mmcr.2022.12.003. eCollection 2023 Mar. PMID: 36620427 Free PMC article.

37. Caméléna F, Ponfily GP de, Pailhoriès H, Bonzon L, Alanio A, Poncin T, Lafaurie M, Dépret F, Cambau E, Godreuil S, Chenouard R, Monnier AL, Jacquier H, Berçot B. 2022. Multicenter Evaluation of the FilmArray Blood Culture Identification 2 Panel for Pathogen Detection in Bloodstream Infections. *Microbiol Spectr* e02547-22.
38. Mercier V, Letscher-Bru V, Bougnoux ME, Delhaes L, Botterel F, Maubon D, Dalle F, Alanio A, Houzé S, Dannaoui E, Cassagne C, Cassaing S, Durieux MF, Fekkar A, Bouchara JP, Gangneux JP, Bonhomme J, Dupont D, Costa D, Sendid B, Chouaki T, Bourgeois N, Huguenin A, Brun S, Mahinc C, Hasseine L, Gal SL, Bellanger AP, Bailly E, Morio F, Nourrisson C, Desbois-Nogard N, Perraud-Cateau E, Debourgogne A, Yéra H, Lachaud L, Sasso M. 2022. Gradient concentration strip-specific epidemiological cut-off values of antifungal drugs in various yeast species and five prevalent aspergillus species complexes. *Clin Microbiol Infec* <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2022.11.030>.

Liste des communications orales

1. Communications internationales

- 21st Congress of the International Society for Human and Animal Mycology (ISHAM), sept 2022. New Delhi. (Garcia-Hermoso D.): **In vitro activity of eight antifungals against 3,343 filamentous pathogenic fungi collected during 18 years at the French National Reference Center for invasive Mycosis and Antifungals**

2. Séminaires sur invitation

- 21st Congress of the International Society for Human and Animal Mycology (ISHAM), sept 2022. New Delhi. (Alanio A): **WGS for outbreak investigations**
- 21st Congress of the International Society for Human and Animal Mycology (ISHAM), sept 2022. New Delhi. (Alanio A): **Cryptococcus qPCR Assay: the future for routine and clinical trials dealing with cryptococcosis.**
- Workshop de la Société Française de Mycologie Médicale (SFMM), Lyon. 07 oct 2022. (Alanio A): **Epidémiologie des candidémies à *C. glabrata* : données françaises issues de l'étude ARéST.**
- 21st Congress of the Internatiol Society for Human and Animal Mycology (ISHAM), sept 2022. New Delhi. (Lanternier F): **Antifungals monitoring in pediatrics ICU**
- Sepsis Masterclass Marseille (Lanternier F) : **Sepsis : beyond bacteria.**
- RICAI 2022 (Lanternier F) : **Traitement des otomycoses**
- Réanimation (Lanternier R) : **Infections fongiques en onco-hématologie.**
- JNI 2022 (Lanternier F) : **Best off Infections de l'immunodéprimé**
- Congrès pharmaciens Ile de France (Lanternier F) : **Recommandations antifongiques COMAI APHP**
- Journées Institut Maurice Rapin (Lanternier F) : **Épidémiologie des infections fongiques respiratoires communautaires**
- Journées Claude Bernard (Lanternier F) : **Nouveaux antifongiques**
- Centre Hospitalier Régional de Périgueux (Lortholary O.), juillet 2022 : **Nouvelles modalités thérapeutiques de la méningite à cryptocoque au cours de l'infection par le VIH**

7. Coopération avec les laboratoires de santé animale, de sécurité sanitaire des aliments, environnementaux

Pas d'activité en 2022

8. Programme d'activité pour les années suivantes

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.

Depuis le 1er janvier 2023, l'équipe est composée d'un responsable (Fanny Lanterrier) et de quatre responsables Adjointes (Alexandre Alanio, Dea Garcia-Hermoso, Marie Desnos-Ollivier, Olivier Lortholary), 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 avons également renforcé 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.

Le CNRMA-IFI est en train de se doter 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. Nous souhaitons d'ici la fin de l'année 2023, mettre en place un système d'OpenDesk pour les centres collaborateurs afin de répondre au mieux et dans les meilleurs délais à leurs questions thérapeutiques, microbiologiques. Une RCP nationale coordonnée par le CNRMA-IFI est mise en place. 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.

Nous avons intégré depuis avril 2023, un biostatisticien à 20% ce qui nous permet de mettre en place notre nouveau système de surveillance (SINFONI via le serveur RedCap) sans perdre les données recueillies lors des diverses surveillances depuis 1985 (RESSIF, ODL, Cryptococcoses via le serveur Resomyc). La mise en place du nouveau questionnaire SINFONI, ainsi que la fusion et l'archivage des différentes bases de données sont prévues pour l'année 2023. Nous prévoyons d'organiser annuellement des réunions (en visio ou en présentielle) avec notre réseau de correspondants afin de les tenir informés des données épidémiologiques recueillies et des différentes études envisagées.

Deux laboratoires associés ont aussi été créés afin de répondre à la nouvelle mission concernant le suivi des aspergilloses chroniques et afin de renforcer notre système d'alerte. Le laboratoire associé des Aspergilloses Chroniques (LA-AspC) a été mis en place sur deux sites (CHU Bordeaux et CHU Rennes) et 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. Le laboratoire associé Identification Numérique, Surveillance épidémiologique (LA-INuSuAI) mis en place au CHU de La Pitié-Salpêtrière 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.

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 favorisants émergeant en particulier les âges extrêmes, biothérapies, infections virales et ainsi permettre une meilleure vision de ces infections. Par ailleurs, l'émergence d'espèces résistants aux azolés comme *Candida parapsilosis*, *Candida tropicalis*, *Aspergillus fumigatus* 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. Ces données seront mises en perspectives avec les données environnementales en particulier par le biais du conseil scientifique et sa dimension OneHealth.

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-INuSuAI).

1. Annexe 1 : Missions & organisation du CNR

1.1 Missions du CNR et de ses éventuels laboratoires associés

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

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

En ce qui concerne l'activité de surveillance, la diversité des genres et espèces fongiques en cause et la complexité des pathologies engendrées et des populations à risque compliquent le recueil des données. Nous continuons donc la surveillance passive de toutes les mycoses invasives, ainsi que deux surveillances actives : l'Observatoire des Levures (ODL) depuis 2022, qui concerne les fongémies à levures en Ile de France et depuis 2012 une surveillance active grâce à des centres collaborateurs (CC-CNRMA) qui forment le RESeau de Surveillance des Infections Fongiques invasives (RESSIF) dont l'objectif est l'exhaustivité de déclarations aussi bien des pathogènes fongiques rares que fréquents. Ces surveillances sont microbiologiques et épidémiologiques.

1.2 Organisation du CNR et de ses éventuels laboratoires associés

En 2022, le CNRMA était situé sein de l'unité de Mycologie Moléculaire de l'Institut Pasteur et n'avait pas de laboratoire associé. La diversité des missions du CNRMA et des genres/espèces pathogènes nous a conduit à une organisation dans laquelle les "équipes", composées d'un ingénieur et d'un technicien associés à l'un des responsables ou collaborateurs du CNR, se spécialisent dans certaines thématiques (expertise sur les filamenteux, les levures, la détermination de la sensibilité aux antifongiques, génotypage, mise au point de techniques d'identification ou de typage, surveillance, ...).

La continuité de l'expertise globale est bien sûr assurée en cas d'absence de l'un des membres de l'équipe. La composition de l'équipe et l'organisation fonctionnelle du CNRMA ont été décrites en Figure 1 et Tableau 1. Il faut ici noter que certaines activités se font en dehors de l'unité de mycologie moléculaire dans les services des collaborateurs et adjoints hospitalo-universitaires.

1.3 Locaux et équipements

Des locaux, ont été attribués à l'unité de mycologie moléculaire (recherche) dans le bâtiment Duclaux (rez de chaussée haut, aile Fourneau) au 28 rue du Dr. Roux. Ils comprennent pour l'année 2022:

Des locaux dédiés au CNR : un grand laboratoire P2 et un laboratoire P2+ (total 65m²), 4 bureaux séparés pour les responsables et collaborateurs, 4 espaces bureaux partagés avec d'autres membres de l'unité pour les autres membres du CNRMA et des placards fermés à clés pour les dossiers du CNR, 1 bureau partagé pour le secrétariat avec le CNR Listeria et l'unité de recherche correspondante.

Des locaux partagés avec le CNR Listeria au même étage : pièce PCR, pièce d'incubateurs, pièce de pesée, ou

dans le même bâtiment : chambre froide

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

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

Les équipements principaux propres comprennent :

- PSM2 et incubateurs à CO₂, hottes chimiques
- Thermocycleurs (iCycler et C1000 de Bio-Rad et LCR480 de Roche)
- MagNAlyser
- Extracteur semi-automatique KingFisher
- QUBit (fluoromètre pour quantification d'ADN, ARN et protéines)
- Nanodrop
- Caméras numériques, appareil photo Reflex
- Lecteur de plaques par spectrométrie (Tecan, Multiskan Go)
- Compteur de cellules (Luna)
- Microscopes : optiques, contraste interférentiel, inversé, à épifluorescence
- Loupe binoculaire
- Ordinateurs
- Container d'azote
- Congélateurs à -20°C, à -80°C et réfrigérateurs
- Etuves et incubateurs agités et non agités
- Enceinte illuminée Memmert
- Bioscreen
- Cytométrie en flux (Guava)

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

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

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

1.4 Collections de matériel biologique

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

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

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

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

remboursement des coûts induits pour l'obtention et la conservation du matériel biologique transféré. Ces accords ont notamment pour objet d'assurer le transfert de la détention physique du matériel au partenaire. Il est bien entendu que l'utilisation du matériel biologique par le tiers est strictement limitée au projet initial. En termes de valorisation, l'Institut Pasteur s'assure que le CNRMA soit remercié ou associé dans chacune des publications et communications des résultats du projet. L'Institut Pasteur s'assure également dans certaines circonstances de la copropriété des résultats issus des travaux effectués sur le matériel biologique.

Collection des levures :

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 6800 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 3300 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.

Collection des champignons filamenteux :

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

- ✓ près de 4200 souches d'origine clinique, y compris des souches de champignons dimorphiques stockées en laboratoire P3+ à -80°C
- ✓ auxquelles s'ajoutent des souches de référence ou des souches type provenant de diverses collections (CBS, ATCC, IP, NRRL) non distribuables.

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

1.5 Démarche qualité du laboratoire

Le CNR des Mycoses Invasives et Antifongiques fait partie des Centres Nationaux de Référence placés sous la responsabilité de l'Institut Pasteur qui étaient au nombre de 14 en 2022. Ils sont organisés en multisite et constituent, avec la Cellule d'Intervention Biologique d'Urgence (CIBU), le Laboratoire de Référence et d'Expertise Multisite (LREMS). Le LREMS est sous démarche d'accréditation.

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

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

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

Les services supports de l'Institut Pasteur participent également à la démarche d'accréditation du LREMS en apportant les ressources nécessaires au bon déroulement des activités. Les services supports critiques sont régulièrement audités dans le cadre de leurs activités en interne par les organismes de certification et d'accréditation.

Le LREMS est accrédité selon la norme ISO 15189 version 2012 sous le n° 8-2588, Examens Médicaux. L'annexe d'accréditation est disponible sur le site du COFRAC www.cofrac.fr.

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

mondiaux. Dans le cas où cette organisation est impossible, le CNR organise en interne des exercices à l'aveugle pour maintenir les compétences du personnel et du laboratoire.

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

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

L'année qualité 2022 du CNRMA s'est organisée comme suit :

Etapes clés LRE-MS	Périodes de réalisation
Audit de surveillance COFRAC	Du 27 au 29 juin 2022 et du 6 au 9 juillet 2023
Revue qualité	17 mars 2023
Revue de direction LREMS et ajustement de la demande d'extension	23 juin 2023
Audits internes qualité et technique	Audit technique : 1 février 2023 Audit qualité : 7 décembre 2022
Finalisation des dossiers de validation de méthode pour les extensions et les ajouts	En cours

Perspectives 2023:

Etapes clés	Prévision de réalisation
Revue qualité LRE	mars - juin 2023
Audits internes qualité et technique	Septembre - décembre 2023
Revue de direction LRE-MS	4 juillet 2023
Audi de surveillance COFRAC	Novembre-décembre 2023

La prochaine évaluation par le COFRAC est prévue pour novembre ou décembre 2023.

2. Annexe 2 : Capacités techniques du CNR

2.1 Liste des techniques de référence

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

- Identification phénotypique complète des levures et des champignons filamenteux avec profils protéiques par spectrométrie de masse, fermentation de certains sucres, croissance sur milieux spéciaux, réalisation de cultures "3 points", de cultures sur lames, détermination des vitesses et des températures maximales de croissance ...
- Détermination de la sensibilité aux antifongiques par une technique en milieu liquide standardisée par le comité européen (EUCAST). Les antifongiques testés sont le fluconazole (Triflucan®), l'itraconazole (Sporanox®), la 5-fluorocytosine (Ancotil®), l'amphotéricine B (Fungizone®), le voriconazole (V-fend®), le posaconazole (Noxafil®), l'isavuconazole (Cresemba®), la terbinafine (Lamisil®), la caspofungine (Cancidas®), et la micafungine (Mycamine®). A noter que le protocole standardisé est modifié pour l'amphotéricine B et les échinocandines pour les levures.
- Identification des isolats d'espèces communes de champignons par MALDI-TOF (Biotyper Bruker)
- Extraction d'ADN pour les levures et les champignons filamenteux selon des protocoles optimisés.
- Séquençage nucléotidique des régions ITS et de la région variable de la grande sous-unité 28S de l'ADN ribosomique pour l'identification moléculaire de tous les champignons, et, pour certaines espèces, séquençage d'autres loci (voir plus loin).
- Identification de *Candida dubliniensis* par PCR duplex en utilisant les amorces spécifiques d'une partie du gène de l'actine et les amorces universelles ITS1/ITS4 (technique accréditée COFRAC selon la norme 15189).
- Identification des espèces *S. clavata*, *M. capitatus* et *C. auris* par PCR en temps réel
- Génotypage par marqueurs microsatellites, ou MLST pour les espèces *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. tropicalis*, *C. krusei*, *C. parapsilosis*, *C. auris*, *M. capitatus*, *C. neoformans/C. gattii* et *A. fumigatus* :
 - Pour *C. albicans*, 5 séquences microsatellites (CDC3, HIS3, EF3, STPK, CDR1), et les 7 loci MLST (AAT1a, ACC1, ADP1, MPIb, SYA1, VPS13, ZWF1)
 - Pour *C. glabrata*, 6 loci MLST (FKS1, LEU2, NMT1, TRP1, UGP1, URA3)
 - Pour *C. parapsilosis*, 3 séquences microsatellites (CP1, CP4, CP6)
 - Pour *Aspergillus fumigatus*, 4 séquences microsatellites A, B, C et D
 - Pour *C. auris*, 12 marqueurs microsatellites (M2a, M1b, M2c, M3-1a, M3-1b, M3-1c, M3-1ia, M3-11b, M3-11c, M9a, M9b, M9c)2
 - Pour *C. tropicalis*, 6 loci MLST (MDR1, XYR1, SAPT4, SAPT2, ZWF1a, ICL1)
 - Pour *Cr. neoformans*, sérotypage par PCR spécifiques (Pak1 et Gpa1)) et typage par la technique MLST (7 loci : CAP59, URA5, LAC1, IGS1, GPD1, PLB1 et SOD1)
 - Pour *C. krusei*, 6 loci MLST (ADE2, LYS2, HIS3, LEU2, TRP1 et MPD1)
 - Pour *Cr. gattii*, 7 loci MLST (IGS1, CAP59, URA5, PLB1, GPD1, SOD1, LAC1)
- PCR diagnostique histoplasmosse, coccidioïdomycose, mucormycose, pneumocystose (site hôpital Saint-Louis du CNRMA)
- Détection des mutations dans le gène Cyp51A pour les isolats d'*A. fumigatus* résistants aux antifongiques azolés
- Détection des mutations dans les gènes Fks pour les isolats d'*A. fumigatus* ayant un profil élevé à la caspofungine
- Détection des mutations dans les gènes Fks pour les isolats de *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. tropicalis*, *C. krusei*, *C. lusitanae*, *C. dubliniensis*, *C. kefyr* ayant des profils de sensibilité anormaux pour les échinocandines.
- Détection des mutations dans le gène CYP51B pour les isolats d'*A. fumigatus* résistants aux antifongiques azolés (Mellado et al. 2001)
- Détection par PCR en temps réel du clone épidémique de 2012 pour les souches de *S. clavata*
- Comparaison de souches de champignons responsables d'épidémies/cas groupés par séquençage génome entier et développement de techniques de typage / d'identification du clone épidémique éventuel

2.2 Liste des techniques recommandées par le CNR

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

	Gène	
Complexe d'espèces <i>A. fumigatus</i>	β -tubuline	Bt2a/ Bt2b³⁹
Espèces d'<i>Aspergillus</i> autres que section <i>Fumigati</i>	β -tubuline	Bt2a/ Bt2b
	Calmoduline	CL1/CL2a⁴⁰
Complexe d'espèces <i>Fusarium</i> spp	Factor d'élongation (TEF1- α)	EF1 / EF2⁴¹
	RNA polymérase II (RPB2)	5F2/ 7CR⁴²
<i>Scedosporium</i> spp.	β -tubuline	TUB-F/ TUB-R⁴³
<i>Phaeoacremonium</i> spp	β -tubuline	T1 /Bt2b⁴⁴
<i>Sporothrix</i> spp.	Calmoduline	CL1/CL2a
<i>Trichoderma</i> spp.	Factor d'élongation (TEF1- α)	EF1 / EF2
Coelomycètes	β -tubuline	TUB2-F / TUB4-R⁴⁵
<i>Trichosporon</i> spp.	IGS1 / ADNr	26SF/5SR Erreur ! Signet non défini.
<i>Debaryomyces</i> spp.	actine	CA21/CA15R Erreur ! Signet non défini.
<i>Clavispora lusitaniae</i>	actine	CA16mod/CA5⁴⁶
<i>Arthrographis</i> spp.	actine	Act1/Act4R
Complexe <i>M. guilliermondii</i>	RPBI	

Tableau 12. Principales cibles et amorces utilisées pour l'identification de certains groupes fongiques

Le Tableau 12 récapitule les principales cibles utilisées et les références correspondantes, sachant que certains genres nécessitent une analyse multigénique. Il faut aussi savoir que les changements taxonomiques rendent parfois difficiles les identifications. Il peut être utile pour suivre ces changements de se référer par exemple au site Index Fungorum (<http://www.indexfungorum.org>). La base de données est consultable gratuitement en ligne et fournit la liste des espèces dans chaque genre, avec pour chacune d'elle le taxon correct, la citation d'auteur, la date et le support de publication, voire une image de celui-ci, ainsi qu'un rappel de la position de l'espèce dans la classification traditionnelle.

Diagnostic des mycoses endémiques

La sérologie par électro-synérèse a définitivement été abandonnée par le CNRMA en raison de ses mauvaises

³⁹ 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.

⁴⁰ 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

⁴¹ 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.

⁴² 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.

⁴³ Cruse M, et al (2002) Cryptic species in *Stachybotrys chartarum*. *Mycologia* 94:814-22.

⁴⁴ 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.

⁴⁵ Aveskamp MM, et al (2009) DNA phylogeny reveals polyphyly of *Phoma* section *Peyronellaea* and multiple taxonomic novelties. *Mycologia* 101:363-82.

⁴⁶ 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

performances. Il s'agissait d'une technique "maison" utilisant des réactifs (antigènes et sérums de référence) commercialisés qui sont de qualité inconstante, obligeant à des mises au point répétées lors des changements de lot. Par ailleurs, la reproductibilité des résultats, indépendamment de ces problèmes de réactifs, est très mauvaise. La contribution de la sérologie au diagnostic des mycoses exotiques est très faible. Ainsi, sur les 3500 sérologies enregistrées dans la base de données du CNRMA en 9 ans, moins de 8% étaient positives, mais avec de grandes différences en fonction du contexte clinique (<4% de positivité de la sérologie histoplasmosse chez les patients VIH positif vs. 14% chez les sujets séronégatifs pour le VIH par exemple). C'est donc beaucoup plus le contexte épidémiologique et clinique ainsi que les examens mycologiques (examen direct, histologie, culture et détection du galactomannane) qui ont permis dans le passé d'établir le diagnostic.

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

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

Détermination de la sensibilité aux antifongiques des isolats de champignons pathogènes

La réalisation et l'interprétation des techniques disponibles ne sont pas évidentes. En effet, les techniques standardisées en Europe (EUCAST) ou aux Etats-Unis (CLSI) ne sont pas commercialisées et sont de réalisation difficile en routine. La majorité des techniques commercialisées n'a pas été validée par rapport aux techniques de référence, et le CNRMA ne peut donc qu'encourager les centres à utiliser des techniques standardisées et validées, telles les bandelettes E-test. Cependant, la réalisation pratique demande une certaine habitude (en particulier dans la préparation de l'inoculum, et pour les champignons filamenteux) et la lecture des résultats n'est pas toujours simple, rendant compte des différences de résultats en fonction du lecteur, voire du technicien. De plus, l'interprétation des résultats est difficile car les seuils de sensibilité et de résistance publiés ne s'appliquent qu'à certaines espèces et certains antifongiques et ne sont valables que pour des isolats testés avec l'une ou l'autre des techniques de référence (l'interprétation étant différente pour chacune de ces techniques). En pratique, un laboratoire utilisant les bandelettes E-test ne devrait donc pas rendre un résultat S ou R, mais seulement interpréter le résultat comme conforme ou aberrant (> 2 dilutions en log2) par rapport à la base de données dont il dispose pour les isolats de la même espèce testées dans les mêmes conditions localement.

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

Désinfection des surfaces

La question de l'efficacité du nouvel ANIOS SURFA'SAFE Premium s'est posée pour les champignons que nous recevons et nous avons donc testé les temps de contact efficaces sur quelques espèces fréquemment manipulées au CNR. Les espèces choisies représentent un panel représentatif en termes de classe de risque (1, 2 et 3) et de fréquence de manipulation au CNRMA : pour les principales espèces de levures manipulées au CNRMA, on n'observe aucune croissance résiduelle après un temps de contact inférieur ou égal à 5 minutes.

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

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