



Rapport annuel d'activité

2019

Centre de national de référence Mycoses Invasives et Antifongiques

Responsables

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

Année d'exercice

2018

Collaborateurs

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

RESUME ANALYTIQUE	5
SUMMARY	6
1 MISSIONS ET ORGANISATION DU CNR	7
2 ACTIVITES D'EXPERTISE	7
2.1 ÉVOLUTIONS DES TECHNIQUES	7
2.2 TRAVAUX D'ÉVALUATION DES TECHNIQUES, REACTIFS ET TROUSSES	8
2.3 TECHNIQUES TRANSFEREES VERS D'AUTRES LABORATOIRES	8
2.4 COLLECTIONS DE MATERIEL BIOLOGIQUE.....	8
2.5 ACTIVITES D'EXPERTISE	9
<i>Expertise 2018 sur les levures</i>	<i>10</i>
<i>Expertise 2018 sur les champignons filamenteux.....</i>	<i>13</i>
<i>Expertise 2018 sur la sensibilité aux antifongiques</i>	<i>16</i>
<i>Expertise 2018 sur les mycoses endémiques</i>	<i>18</i>
<i>Expertise 2018 en anatomopathologie.....</i>	<i>18</i>
<i>Expertise 2018 pour les diagnostics moléculaires</i>	<i>19</i>
2.6 ACTIVITES DE SEQUENÇAGE	20
3 ACTIVITES DE SURVEILLANCE	21
3.1 DESCRIPTION DU RESEAU DE PARTENAIRES	21
3.2 SURVEILLANCE DE L'ÉVOLUTION ET DES CARACTERISTIQUES DES INFECTIONS	22
<i>Cryptococcoses</i>	<i>24</i>
<i>Fongémies.....</i>	<i>25</i>
<i>Pneumocystoses</i>	<i>26</i>
<i>Mucormycoses.....</i>	<i>27</i>
<i>Aspergilloses</i>	<i>29</i>
<i>Fusarioses</i>	<i>30</i>
3.3 SURVEILLANCE DE LA RESISTANCE DES AGENTS PATHOGENES AUX ANTI-INFECTIEUX.....	30
<i>Définitions utilisées pour exprimer la résistance</i>	<i>31</i>
<i>Résultats de la surveillance des résistances aux antifongiques pour les levures.....</i>	<i>32</i>
<i>Résultats de la surveillance des résistances aux antifongiques pour les filamenteux.....</i>	<i>34</i>
<i>Analyse des tendances.....</i>	<i>38</i>
3.4 INTERFACES AVEC LES RESEAUX DE SURVEILLANCE NATIONAUX OU INTERNATIONAUX.....	39
3.5 ENQUETES OU ETUDES PONCTUELLES CONCOURANT A LA SURVEILLANCE	39
<i>Cas groupés d'infection à S. clavata</i>	<i>39</i>
<i>Surveillance de Candida auris : enquête sur les pratiques hospitalières en mycologie.....</i>	<i>40</i>
<i>Mise en œuvre d'une PCR en temps réel permettant d'identifier C. auris.....</i>	<i>42</i>
<i>Cas groupés de candidoses à Candida albicans.....</i>	<i>42</i>
4 ALERTE.....	42
5 ACTIVITES DE RETRO-INFORMATION, DE FORMATION ET DE CONSEIL.....	43
5.1 CONSEIL ET EXPERTISE AUX PROFESSIONNELS DE SANTE	43
5.2 CONSEIL ET EXPERTISE AUX AUTORITES SANITAIRES	44
5.3 ACTIVITE DE FORMATION	45
6 TRAVAUX DE RECHERCHE ET PUBLICATIONS EN LIEN DIRECT AVEC L'ACTIVITE DU CNR	45
6.1 ACTIVITES DE RECHERCHE EN 2018 EN LIEN DIRECT AVEC LES MISSIONS ET ACTIVITES DU CNR.....	45
<i>Aspergillose et allogreffe</i>	<i>45</i>
<i>Investigation d'une épidémie d'infections invasives à Mucor circinelloides f. circinelloides.....</i>	<i>45</i>
<i>Etude sur les dermatophytoses sévères des patients transplantés d'organe.....</i>	<i>46</i>
<i>Optimisation de la prise en charge de cryptococcose associée à l'infection VIH en Afrique.....</i>	<i>46</i>
<i>Etude sur les endocardites à Candida spp. sur prothèse valvulaire (ESCAPE, 2001-2015).....</i>	<i>46</i>
6.2 LISTE DES PUBLICATIONS ET COMMUNICATIONS EN LIEN DIRECT AVEC LES MISSIONS ET ACTIVITES DU CNR ...	47
<i>Publications nationales.....</i>	<i>47</i>
<i>Publications internationales</i>	<i>47</i>

<i>Communications nationales</i>	50
<i>Communications internationales</i>	50
<i>Conférences sur invitations</i>	50
7 COOPERATION AVEC LES LABORATOIRES DE SANTE ANIMALE, D’HYGIENE ALIMENTAIRE, ENVIRONNEMENTAUX	51
8 PROGRAMME D’ACTIVITE POUR LES ANNEES SUIVANTES	51
9 LISTE DES COLLABORATEURS DU CNRMA	52
9.1 CC-CNRMA FORMANT RESSIF.....	52
9.2 CENTRES PARTICIPANTS A L’ODL.....	52
9.3 PARTICIPANTS A LA SURVEILLANCE DES MYCOSES INVASIVES EN 2018.....	53
ANNEXE 1 : MISSIONS & ORGANISATION DU CNR	54
1.1. MISSIONS DU CNR ET DE SES EVENTUELS LABORATOIRES ASSOCIES	54
1.2. ORGANISATION DU CNR ET DE SES EVENTUELS LABORATOIRES ASSOCIES.....	54
Composition de l’équipe.....	54
1.3. LOCAUX ET EQUIPEMENTS	55
1.4. COLLECTIONS DE MATERIEL BIOLOGIQUE.....	56
Collections de levures.....	57
Collection de champignons filamenteux	58
Collection d’images numériques	58
Collection d’ADN génomique	58
Base de données de séquences : Institut Pasteur FungiBank.....	58
Collection de sérums	59
1.5. DEMARCHE QUALITE DU LABORATOIRE	59
1.6. ASPECTS REGLEMENTAIRES.....	60
ANNEXE 2 : CAPACITES TECHNIQUES DU CNR	61
2.1. LISTE DES TECHNIQUES DE REFERENCE	61
Techniques pour le diagnostic, l’identification et l’évaluation de la sensibilité aux antifongiques.....	61
Techniques mises en place en 2018	61
2.2. LISTE DES MARQUEURS EPIDEMIOLOGIQUES DISPONIBLES.....	62
2.3. LISTE DES TECHNIQUES RECOMMANDEES PAR LE CNR.....	62
Identification des champignons	62
Diagnostic des mycoses endémiques	63
Détermination de la sensibilité aux antifongiques des isolats de champignons pathogènes.....	64
Désinfection des surfaces.....	64

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Résumé de l'activité d'expertise en 2018.....	9
Tableau 2 : Dénominations taxonomiques pour les levures.....	11
Tableau 3 : Dénominations taxonomiques pour les champignons filamenteux.....	13
Tableau 4 : Mutations dans le gène <i>cyp51A</i> d' <i>Aspergillus fumigatus</i>	18
Tableau 5 : Principales caractéristiques des fongémies.....	26
Tableau 6 : Caractéristiques des pneumocytoses répertoriées dans RESSIF.....	27
Tableau 7 : Caractéristiques des mucormycoses répertoriées dans RESSIF.....	28
Tableau 8 : Profil de sensibilité des 6 principales espèces de Mucorales.....	28
Tableau 9 : Seuils cliniques EUCAST pour <i>Candida</i> spp.	31
Tableau 10 : Seuils cliniques EUCAST pour <i>Aspergillus</i> spp.....	32
Tableau 11 : Profil de sensibilité des levures aux antifongiques.....	33
Tableau 12 : Profil de sensibilité des levures à 4 azolés, dont l'isavuconazole.....	34
Tableau 13 : Profil de sensibilité des champignons filamenteux aux antifongiques.....	35
Tableau 14 : Profil de sensibilité des filamenteux à 4 azolés, dont l'isavuconazole.....	37
Tableau 15 : Proportion d'isolats de levures "résistants" selon les seuils EUCAST.....	38
Tableau 16 : Analyse des isolats de <i>C. albicans</i> (cas groupés en néonatalogie).....	42
Tableau 17 : Composition de l'équipe du CNRMA.....	54
Tableau 18 : Liste des couples d'amorces utilisés en fonction des genres étudiés.....	63

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Organigramme fonctionnel du CNRMA.....	7
Figure 2 : Morphologies caractéristiques (1).....	14
Figure 3 : Morphologies caractéristiques (2).....	14
Figure 4 : Morphologies caractéristiques (3).....	15
Figure 5 : Morphologies caractéristiques (4).....	15
Figure 6 : Morphologies caractéristiques (5).....	16
Figure 7 : Schéma du gène <i>Cyp51A</i> d' <i>A. fumigatus</i> et principales mutations.....	17
Figure 8 : Sélection d'expertise anatomopathologique.....	19
Figure 9 : Déclarations à travers le portail dédié en 2018.....	22
Figure 10 : Répartition des principales IFI répertoriées dans RESSIF.....	23
Figure 11 : Analyse des tendances de déclaration d'aspergilloses invasives.....	23
Figure 12 : Mortalité globale à 3 mois en fonction des IFI diagnostiquées.....	24
Figure 13 : Évolution des cryptococcoses déclarées en France (1985-2018).....	24
Figure 14 : Caractéristiques des patients atteints de cryptococcoses en France.....	25
Figure 15 : Mortalité à 3 mois au cours de la cryptococcoses.....	25
Figure 16 : Répartition des 6 principales <i>Mucorales</i> en fonction du terrain.....	28
Figure 17 : Éléments contribuant au diagnostic de l'aspergillose invasive.....	29
Figure 18 : Pathologies sous-jacentes selon l'espèce d' <i>Aspergillus</i> impliquée.....	30
Figure 19 : Evolution du pourcentage d'isolats "résistants".....	38
Figure 20 : Locaux du CNRMA.....	55
Figure 21 : Portail de la base de données de séquences Institut Pasteur FungiBank.....	59

Résumé analytique

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

En 2018, le CNRMA a fourni son expertise biologique pour l'identification de 809 isolats (levures, filamenteux, champignons dimorphiques) et 516 échantillons biologiques (liquides, tissus), et son expertise clinique pour 3 à 5 avis/jour. Pour les isolats, nous avons effectué l'identification par approche polyphasique et la détermination de la sensibilité à huit antifongiques selon la méthode EUCAST. Les nouvelles identifications et la veille taxonomique permettent au CNRMA d'alimenter et de mettre à jour la base de séquences « Institut Pasteur FungiBank ». Des diagnostics moléculaires (n=463) ou anatomopathologiques (n=53) ont été réalisés sur les liquides biologiques ou tissus.

Le CNRMA a mis en place en 2012 le réseau de centres collaborateurs du CNRMA (les CC-CNRMA) et l'a agrandi en 2017. Les 29 CC-CNRMA forment le RESeau de Surveillance des Infections Fongiques invasives (RESSIF). RESSIF collecte, de façon active et pérenne, toutes les informations sur les infections fongiques invasives probables ou prouvées et les isolats correspondants des espèces non communes et, pour les espèces communes, les isolats de sensibilité diminuée à au moins un antifongique. L'Observatoire des Levures (ODL) mis en place en 2002 en région parisienne surveille de façon plus spécifique les fongémies à levures et collecte tous les isolats pour les caractériser de façon standardisée. Le site de déclaration en ligne a été remodelé et permet maintenant à tout clinicien ou mycologue qui le souhaite de participer à la surveillance indépendamment des réseaux de surveillance active (RESSIF ou ODL). La base RESSIF comprend actuellement 10663 cas d'infections fongiques invasives, et représente une base unique au plan international que nous avons commencé à « nettoyer » pour analyser les 6 premières années.

Le CNRMA continue à investiguer les cas groupés d'infections dues à des espèces rares en utilisant le séquençage de génomes entiers grâce à la plateforme mise en place à l'Institut Pasteur. L'utilisation d'un panel de souches comprenant la souche type de l'espèce et des isolats épidémiologiquement liés ou non, et de souches historiques de sa collection a permis notamment d'affirmer l'origine environnementale dans des cas d'infection invasive à *Saprochaete clavata* dans un même centre hospitalier en 2018. Nous avons également pu déterminer qu'une source unique de contamination n'était pas à l'origine de cas groupés de colonisation ou infection invasive à *Candida albicans* dans un service de réanimation néonatale.

Summary

The missions of the NRCMA combine expertise on pathogenic fungi responsible for invasive fungal infections (IFIs) and the microbiological and epidemiological surveillance of all IFIs including pneumocystoses. Most of the missions are fulfilled at Institut Pasteur in the Molecular Mycology unit (head, Pr. F. Dromer), or in the Experimental Neurophatology unit for the histopathology expertise (head Pr. F. Chrétien), whereas molecular diagnoses are performed at Hopital Saint Louis (parasitology-mycology laboratory, head Pr. S. Bretagne), and therapeutic advice at Hôpital Necker (Infectious Diseases and Tropical Medicine ward, head Pr. O. Lortholary). In 2017, the NRCMA performed expertise on 809 isolates (characterization) and 516 biological specimen or tissues (molecular or histopathological diagnoses), and provided 3 to 5 daily therapeutic advice. The expertise on the isolates included identification by polyphasic approach (morphology, MALDI-TOF and DNA sequencing of multiple loci) and susceptibility to eight antifungal drugs by the EUCAST method. Nucleotide sequences obtained from newly identified isolates are uploaded in the Institut Pasteur FungiBank database that we launched in 2015.

The network of collaborative centers called RESSIF (RESeau de Surveillance des Infections Fongiques) has expanded since 2012. It now includes 29 hospitals from remote regions of metropolitan France and overseas that notify all their cases of proven or probable IFIs to the NRCMA. The notifications are made on a secured website administered at the NRCMA. The centers send also the isolates (all the non-common species or the common species with abnormal susceptibility to one or more antifungal drugs). The YEASTS program (Observatoire Des Levures) launched in 2002 continues with 14 participating centers that notify their cases of yeast fungemia and send all the corresponding isolates. The third source of information in IFIs is the passive notification when isolates are sent for expertise. Any clinician or mycologist/microbiologist willing to participate in the surveillance of IFIs can request parameters allowing notification on line on the “renovated” website. In 2018, we cleaned the first 6 years of the very unique RESSIF database that now includes 10663 IFIs. In 2018, the NRCMA has been involved in the investigation of a few grouped cases. We used whole genome sequencing and the bioinformatics analysis provided at the dedicated P2M platform at Institut Pasteur. Large panels of strains including epidemiologically related and unrelated strains, recently isolated or present in the collection as well as type strain allowed us to uncover for example that a single clone of *Saprochaete clavate* recovered also from the environment was involved in the occurrence of several cases of invasive infections in the same hospital. We also determined that a single source of contamination was not responsible for several unusual grouped cases of colonisations or infections due to *Candida albicans* in a neonate intensive care unit.

1 Missions et organisation du CNR

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

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

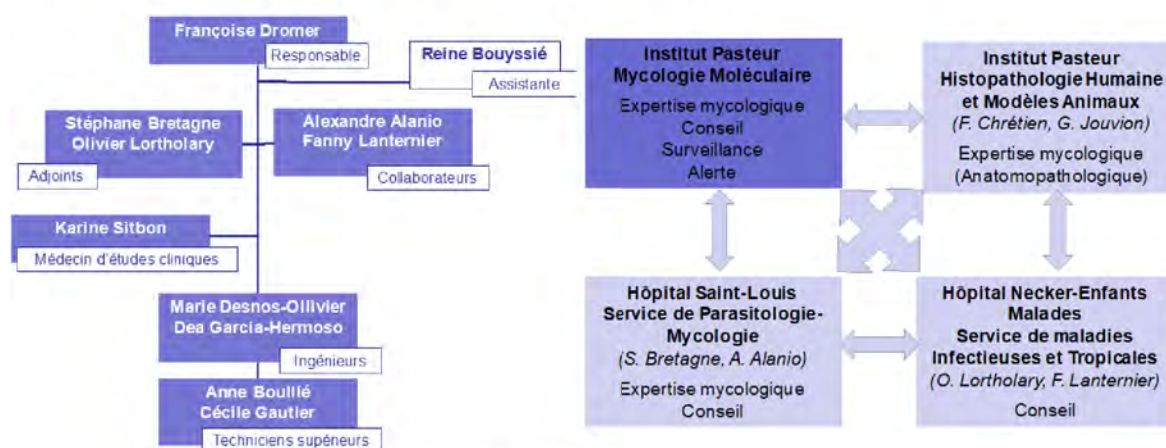


Figure 1 : Organigramme fonctionnel du CNRMA

Le CNR a été accrédité selon la norme NF EN ISO 15189 en mars 2015 (n°8-2588). La portée d'accréditation est visible sur le site du [COFRAC](#). Le CNR poursuit la démarche d'accréditation selon les conditions imposées par la Loi du 30 mai 2013 (2013-442). En 2018, des audits interne (3/10/2018) et externe (4/10/2018) ainsi qu'une revue de direction (9/02/2018) ont été organisés.

Les détails sont disponibles dans l'[annexe 1](#).

2 Activités d'expertise

Le CNRMA a reçu, en 2018, 835 souches dans le cadre de demande d'expertise ou de réseau de surveillance. Aux expertises réalisées au CNRMA se sont ajoutées celles réalisées dans l'unité Neuropathologie Expérimentale dirigée par le Pr. F. Chrétien sur les prélèvements anatomopathologiques et celles réalisées sur le site de Saint-Louis (SLS) dans le laboratoire de Parasitologie-Mycologie dirigé par le Pr. S. Bretagne pour le diagnostic moléculaire sur échantillon biologique.

2.1 Évolutions des techniques

Le CNRMA continue à développer les outils d'identification des champignons d'espèces rares pour lesquelles les caractéristiques morphologiques sont insuffisamment discriminantes et les séquences disponibles dans les bases de données inexistantes ou non fiables. Les identifications d'espèces réalisées

par MALDI-TOF sont systématiquement contrôlées par séquençage nucléotidique d'un ou plusieurs loci, dès lors qu'il s'agit d'une espèce rare ou d'identification difficile ou incertaine.

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

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

2.2 Travaux d'évaluation des techniques, réactifs et trousse

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

2.3 Techniques transférées vers d'autres laboratoires

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

La base contient actuellement 1967 séquences (ITS, 26S, IGS, actine, FKS) pour 1927 souches de levures et 1971 séquences (18S, 28S, ITS, calmoduline, actine, β -tubuline, EF1- α , RPB1, RPB2, CYP51A) pour 941 souches de champignons filamenteux. La base de données est implémentée régulièrement avec les nouvelles données disponibles.

2.4 Collections de matériel biologique

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

- Levures correspondant à 27 genres et 104 espèces différentes (1 à près de 3140 isolats/espèce) comprenant plus de 5200 souches collectées dans le cadre de l'Observatoire des Levures, plus de 2600 souches d'autres sites profonds ou superficiels, et plus de 3000 souches de cryptocoques, auxquelles s'ajoutent des souches de référence achetées dans des collections internationales.
- Champignons filamenteux correspondant à 97 genres et 365 espèces différentes (1 à 358 isolats/espèce) avec plus de 3100 souches d'origine clinique y compris des champignons dimorphiques stockés en P3 et des souches de référence achetées dans des collections internationales.
- Le CNR a distribué une trentaine de souches levures et 3 souches de champignons filamenteux essentiellement dans le cadre d'une étude phylogénétique internationale, ainsi que quelques échantillons d'ADN.

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

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

2.5 Activités d'expertise

Le CNRMA a reçu sur le site IP/CNRMA 835 échantillons dont une faible proportion n'était pas conforme à ses missions [(mycoses superficielles (n=4) et demandes de sérologies (n=9)], et d'autres (n=28) dont l'identification n'a pu aboutir immédiatement car ils contenaient des mélanges de plusieurs espèces nécessitant purification avant analyse (n=7) ou des souches non viables (n=21) dont certaines n'ont pas été retrouvées par les laboratoires expéditeurs. Au total, 810 souches ont été caractérisées. Enfin, d'autres échantillons ont été reçus directement à SLS (n=225) ou sur le site IP/anatomopathologie (n=53).

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

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

Tableau 1 : Résumé de l'activité d'expertise en 2018

TYPE D'EXPERTISE	Levures (n= 504)	Filamenteux (n=292)	Classe 3 (n=13)
Expertise sur les souches			
MALDI-TOF	504		
Détermination de la sensibilité aux antifongiques	502	244	0
Séquençage Sanger (>2 régions/souches)	190	292	13
PCR en temps réel			
qPCR de <i>Saprochaete clavata</i>	28		
qPCR de <i>Candida auris</i>	2		
Typage			
MLST de <i>Candida tropicalis</i>	19		
Ploïdie et typage de <i>Cryptococcus neoformans</i>	84		
Microsatellites <i>C. albicans</i> (5 marqueurs)	15		
Microsatellites <i>C. glabrata</i> (5 marqueurs)	0		
Microsatellites <i>C. parapsilosis</i> (3 marqueurs)	5		
Microsatellites <i>A. fumigatus</i> (4 marqueurs)	17		
Recherche de mutations			
FKS	6		
CYP51		17	
NGS	66		
Expertise anatomopathologique	53		
Diagnostic moléculaire			
Histoplasmose	441		
Coccidioidomycose	22		
Avis thérapeutiques	3 à 5 / jour		

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

L'activité d'expertise est associée à un rapport envoyé au correspondant dans les 10 jours suivant la réception. Ce résultat est final dans la grande majorité des cas (sauf pour le typage ou la recherche de mutation et une partie des filamenteux). Si ce n'est pas le cas, un résultat préliminaire avec le profil de sensibilité aux antifongiques est envoyé dans ce délai de 10 jours. Les résultats finaux sur l'identification de l'espèce ou le typage sont envoyés dès qu'ils sont disponibles. Les expertises urgentes définies au

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

Toute demande d'expertise est systématiquement accompagnée d'une fiche de demande d'expertise (modifiée en 2017 et disponible sur le site web du CNRMA). En l'absence d'information sur une souche provenant d'un prélèvement profond, le correspondant est systématiquement contacté par téléphone pour obtenir les informations manquantes. Les demandes non conformes entraînent l'envoi d'un courrier au laboratoire expéditeur et sont classées au bout d'un mois en l'absence de réponse. En 2017, 4 demandes étaient non conformes car ne correspondant pas aux missions du CNR (mycoses superficielles, expertise relevant d'un LABM), et 9 concernaient une demande de sérologies des mycoses exotiques, technique arrêtée pour manque de service rendu depuis 2015. Dans ce dernier cas, les responsable/adjoint/collaborateurs du CNRMA contactent le laboratoire correspondant pour discuter de l'opportunité de mettre en oeuvre d'autres moyens de diagnostic (qPCR essentiellement, cf. plus loin).

La totalité des échantillons était en provenance de France, de métropole (90%) ou des DOM-TOM (10%). Les souches proviennent des laboratoires hospitaliers, en raison même des missions du CNRMA qui couvrent uniquement les mycoses invasives. Les isolats reçus provenaient du sang (47%), d'échantillons pulmonaires (17,5%), de biopsies cutanées (10,5%), de liquides céphalo-rachidiens (5,6%), d'échantillons oculaires (8%), osseux (2,7%), digestifs (2,7%) ou ORL (2%). Nous avons également reçu des souches de l'environnement (n=12) dans un contexte d'investigation d'épidémies. Des précisions sont données plus loin en fonction de l'expertise microbiologique requise.

Expertise 2018 sur les levures

Les levures provenaient essentiellement d'hémocultures (72%), mais aussi du système nerveux central (7,5%), des poumons (7%), de l'appareil digestif (3%), de la peau (2,9%) de lésions ostéo-articulaires (2,6%), et des urines (0,8%).

Le niveau de caractérisation pour les 504 levures identifiées (correspondant à 35 genres et espèces différents) est celui décrit précédemment. Nous avons donc réalisé :

- ✓ Une analyse phénotypique : pureté sur milieu chromogène et profil protéique par MALDI-TOF systématique, et, en fonction du genre ou espèce suspectés : activité uréase, température de croissance, fermentation de certains sucres, croissance en milieux hyperosmolaires, croissance sur milieu CGB, cultures sur lame pour l'observation de structures particulières.
- ✓ Une identification moléculaire pour tous les isolats d'espèces communes ayant un profil protéique inhabituel par MALDI-TOF, et pour toutes les espèces de levures moins fréquentes voire rares, soit 190 isolats avec amplification d'un ou plusieurs loci :
 - Régions ITS1-5.8S-ITS2 (149 isolats)
 - Région D1D2 de la sous-unité 26S (73 isolats)
 - Amplification de la région IGS1 (7 isolats de *Trichosporon* spp. et *Cryptococcus* spp.)
 - Amplification du gène codant l'actine (20 isolats de *Clavispora lusitaniae*)
 - Amplification d'une partie du gène RPBI (4 isolats de *Meyerozyma guilliermondii* et 1 isolat de *Meyerozyma caribbica*)
- ✓ Un profil de sensibilité des souches aux 8 antifongiques pour 502 isolats (2 souches de *Malassezia* sp. ne poussant pas dans les milieux liquides)
- ✓ Un typage MLST pour rechercher le clone 5FC-R pour 17 isolats de *C. tropicalis* dont 11 résistants à la 5FC ou au fluconazole (14 patients, aucune souche du clone R-5FC³)

³ Desnos-Ollivier M et al (2008) Clonal population of flucytosine-resistant *Candida tropicalis* from blood cultures, Paris, France. *Emerging Infect Dis* 14(4):557–565.

- ✓ Le séquençage des gènes *Fks* pour 6 isolats (4 *C. albicans*, 1 *K. marxianus*, 1 *C. tropicalis*), résistants aux échinocandines ou liés épidémiologiquement à des isolats résistants.
- ✓ L'identification en urgence d'isolats de *Geotrichum* spp. et/ou du clone épidémique de 2012 pour ceux adressés comme *Saprochaete clavata* a été réalisée sur 26 isolats La PCR en temps réel mise au point au CNRMA a permis de donner un résultat dans la journée suivant la réception de la souche pour les isolats suspects avec donc identification de 26 isolats de *S. clavata*, aucune ne correspondant au clone épidémique de 2012 ou au clone B.
- ✓ La détermination de la ploïdie et le sérotypage de 84 souches de *Cryptococcus* sp. aboutissant à la caractérisation de 66 souches de *Cr. neoformans* (64 sérotype A, 7 sérotype D, 11 AD) et 1 souche de *Cr. gattii*.

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

Tableau 2 : Dénominations taxonomiques pour les levures

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

* *C. haemulonii* et *C. duobushaemulonii* sont deux espèces distinctes ***C. neoformans* var. *grubii* correspond au sérotype A et *C. neoformans* var. *neoformans* au sérotype D

Nous avons poursuivi la constitution d'une base de données complète (caractères phénotypiques CMI et séquences) dans BioloMICS, et alimenté la nouvelle base de données **Institut Pasteur FungiBank**. Il faut noter que de constantes révisions taxonomiques entraînent des changements de noms, y compris pour des espèces courantes **Tableau 2**). En tant que Centre de Référence, le CNRMA se doit de donner les noms

taxonomiques en vigueur, mais maintient dans le compte-rendu le nom d'usage de façon à ne pas perturber l'interprétation des résultats par les cliniciens ou mycologues/microbiologistes non experts de ce domaine très spécialisé.

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

Parmi les levures basidiomycètes, outre *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* et var. *grubii*, nous avons identifié *Rhodotorula mucilaginosa*, *Trichosporon asahii*, *Malassezia furfur*, mais aussi *Naganishia diffluens*, *Kwoniella heveanensis*, *Pseudozyma* sp.

Toutes ces espèces sont, rappelons-le, responsables d'infections sévères et il ne s'agit donc pas ici d'une liste purement "botanique". Plusieurs espèces n'ayant jamais ou très rarement été impliquées en pathologies humaines ont d'ailleurs été identifiées dans des cas d'infection invasive en 2017 :

Kwoniella heveanensi

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

Naganishia diffluens

Levure basidiomycète, anciennement dénommé *Cryptococcus diffluens*, appartenant désormais au genre *Naganishia* créé en 2015⁴. Cette espèce a longtemps été considérée comme synonyme ou variété de *Cryptococcus albidus* (nom actuel *Naganishia albida*), les profils physiologiques étant similaires. Le réservoir naturel de cette espèce reste inconnu. Cependant des isolats ont été retrouvés partout dans le monde dans différents environnements (sol, insecte aux Etats-Unis, air au Japon). D'après une étude au Japon, cette espèce semble aussi coloniser la peau surtout chez des patients présentant des dermatites atopiques⁵. De nombreux isolats cliniques ont été identifiés mais uniquement des cas d'infections superficielles ou de colonisations, dans des lésions de la peau, des crachats, des ongles. Depuis 2003, deux isolats cliniques ont été reçus au CNRMA, une souche provenant d'une hémoculture en 2008 (patient transplanté de rein) et une souche issue d'un LCR en 2018 (isolement non pris en compte par les cliniciens et évolution favorable). Comme toutes les espèces de basidiomycètes, *N. diffluens* est résistant *in vitro* aux échinocandines, et les isolats testés ont des sensibilités diminuées au fluconazole, et à la 5-fluorocytosine⁶.

⁴ Liu et al (2015) Towards an integrated phylogenetic classification of the Tremellomycetes. *Studies in Mycology* 81:85-147 <http://dx.doi.org/10.1016/j.simyco.2015.12.001>

⁵ Sugita et al (2003) The basidiomycetous yeasts *Cryptococcus diffluens* and *C. liquefaciens* colonize the skin of patients with atopic dermatitis. *Microbiol Immunol* 47:945.

⁶ Kantarcioglu et al (2009) Susceptibility testing of *Cryptococcus diffluens* against amphotericin B, flucytosine, fluconazole, itraconazole, voriconazole and posaconazole. *Med Mycol* 47:169.

Expertise 2018 sur les champignons filamenteux

Les champignons filamenteux étaient isolés essentiellement des poumons (33,1%), de la peau (24,5%), de l'œil (21%) de la sphère ORL (5,2%), du sang (6,2%), mais aussi des os (3,1%), du tube digestif (2,4%) ou du cerveau (2,4%).

Tableau 3 : Dénominations taxonomiques pour les champignons filamenteux

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

Le niveau de caractérisation pour les 286 champignons filamenteux identifiés cette année (86 genres et espèces différents incluant quelques souches de champignons dimorphiques classe 3) est celui décrit plus haut. Le **tableau 3** décrit les changements récents. De plus, chaque année, en raison de changements taxonomiques ou d'études en cours, des souches sont ressorties de la collection pour complément d'identification.

Nous avons ainsi réalisé :

- ✓ Une identification phénotypique complète et la constitution d'un fichier numérique complet (macroscopie et microscopie) pour toutes les souches étudiées
- ✓ Une caractérisation moléculaire avec séquençage des régions ITS1-5.8S-ITS2 et de la région 28S pour tous les isolats, et de certains gènes (EF-1alpha, RPB1, RPB2, calmoduline, beta-tubuline, actine pour des filamenteux tels que les *Mucorales*, *Aspergillus* section *Fumigati*, *Fusarium* spp., *Phaeoacremonium* spp., le complexe *Pseudallescheria/Scedosporium*, les coelomycètes ...), ce qui a abouti cette année à l'amplification de EF-1alpha (204 isolats), RPB2 (198 isolats), beta-tubuline (205 isolats), calmoduline (44 isolats), actine (27 isolats) et RPB1 (7 isolats)
- ✓ La recherche des mutations CYP51A pour 17 isolats d'*A. fumigatus* résistants aux azolés

- ✓ La détermination du profil de sensibilité à 8 antifongiques pour 244 isolats (sachant que les conditions de réalisation des CMI ne permettent pas une croissance adéquate de certaines espèces et/ou isolats).

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

Dans l'ordre des *Eurotiales*, pour le genre *Aspergillus*, nous avons caractérisé 81 souches principalement isolées de lésions respiratoires (73%). Plusieurs espèces appartenant aux 7 sections d'*Aspergillus* ont été identifiées. Les espèces majoritaires identifiées étaient *A. fumigatus* (53%) et *A. flavus* (20%) appartenant aux sections *Fumigati* et *Flavi* (Figure 2, Figure 4) respectivement. Le reste des espèces rencontrées étaient : *A. felis* (sect. *Fumigati*) ; *A. pseudoglaucus* (syn. *Eurotium repens*) (sect. *Aspergillus*) ; *A. sydowii* (sect. *Versicolores*) ; *A. calidoustus* (sect. *Usti*) ; *A. alliaceus*, *A. parasiticus*, *A. tamaris* (sect. *Flavi*) ; *A. terreus* (sect. *Terrei*) ; *A. tubingensis*, *A. welwitschiae* (sect. *Nigri*).

Deux autres membres des *Eurotiales* ont été identifiés : *Paecilomyces maximus* et *Rasamsonia argillacea*.

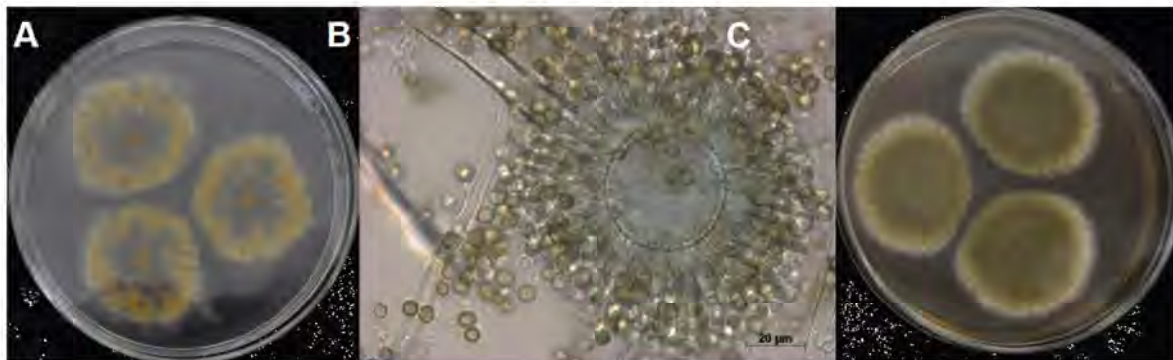


Figure 2 : Morphologies caractéristiques (1)

Aspect macroscopique (A,C) sur milieux malt (A) et CZA (C) et microscopique (B) d'*Aspergillus tamaris* (sect. *Flavi*)

L'ordre *Onygenales* a été représenté majoritairement par 13 souches d'*Histoplasma* spp. (laboratoire de confinement P3), responsables de mycoses endémiques, et par deux isolats du genre *Nannizzopsis* dont l'identification d'espèce est en cours.

Les souches des levures noires et espèces apparentées à l'ordre des *Chaetothyriales*, telles qu'*Exophiala alcalophila*, *E. attenuata*, *E. bergeri*, *E. dermatitidis*, *E. spinifera*, *E. xenobiotica*, *Fonsecaea pedrosoi*, *F. monophora* et *Phialophora chinensis* ont été caractérisées (Figure 3).

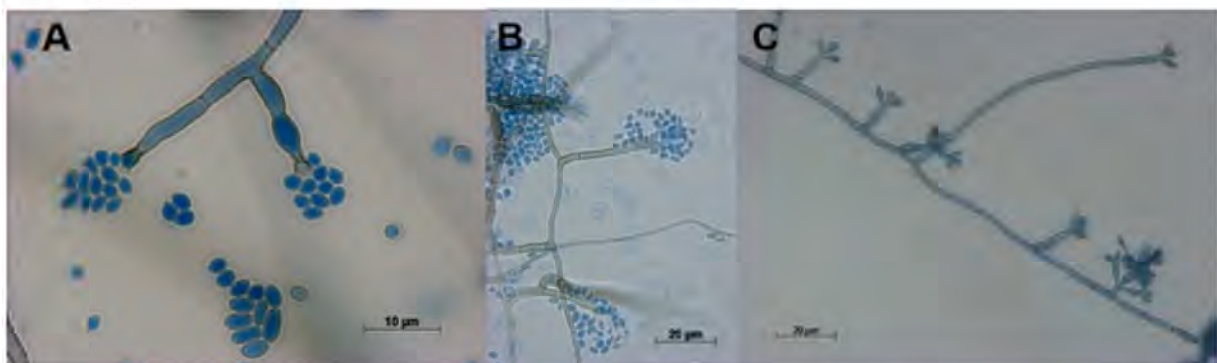


Figure 3 : Morphologies caractéristiques (2)

Aspect microscopique de microcultures sur malt 2% de *Phialophora chinensis* (A), *Exophiala spinifera* (B) et *Fonsecaea monophora* (C)

Dans l'ordre des *Pleosporales*, nous avons identifié plusieurs membres : les phaeohyphomycètes *Kirschsteiniothelia tectonae*, *Curvularia aerea* (Figure 5), *C. hominis* et des membres du groupes *Alternaria infectoria* et *A. alternata*. En outre, des champignons appartenant aux coelomycètes tels que *Medicopsis romeroi* et *Nigrogana mackinnonii* (syn. *Pyrenochaeta mackinnonii*) ont été identifiés.

Les ordres des *Capnodiales* et *Mycosphaerellales* ont été représentés par deux souches identifiées comme *Cladosporium halotolerans* et *Zasmidium musae* respectivement.

Nous avons identifié une souche coelomycète de *Lasiodiplodia theobromae* appartenant à l'ordre *Botryosphaeriales*.

Dans l'ordre des *Hypocreales*, les 66 souches caractérisées du genre *Fusarium* étaient distribuées dans les différents complexes d'espèces : le complexe *Fusarium solani* (FSSC) était représenté par 31 souches, dont les espèces *F. keratoplasticum*, *Neocosmospora falciformis* (syn. *Fusarium falciforme*) et *N. pseudensiformis* (Figure 4) ont été identifiées. Parmi les 12 souches appartenant au complexe *Fusarium oxysporum* (FOSC), l'espèce *Fusarium redolens* a été rencontrée. D'autres espèces appartenant aux complexes *Fusarium fujikuroi* (FFSC) (*F. proliferatum* et *F. verticillioides*), *Fusarium incarnatum-equiseti* (FISC) et *Bisifusarium dimerum* (FDSC) ont été expertisées.

Nous avons également reçu quelques souches de *Purpureocillium lilacinum* et *Trichoderma longibrachiatum* toutes les deux appartenant à l'ordre des *Hypocreales*.



Figure 4 : Morphologies caractéristiques (3)

Culture d'*Aspergillus* sect. *Flavi* sur malt 2% (A), Conidiophore et conidies de *Neocosmospora pseudensiformis* (B), périthèce et ascospores de *Chaetomium globosum*

Deux isolats apparentés à l'ordre *Glomerellales* ont été identifiés comme *Colletotrichum truncatum* et *Colletotrichum* sp.

Les 16 souches appartenant à l'ordre de *Microascales* correspondaient à 7 d'espèces différentes groupées dans les genres *Pseudallescheria/Scedosporium* (*Scedosporium apiospermum*, *S. boydii*, *S. angustum*, *S. aurantiacum*); *Lomentospora* (*L. prolificans*) (Figure 5); *Microascus* (*Microascus cirrosus*, *M senegalensis*).

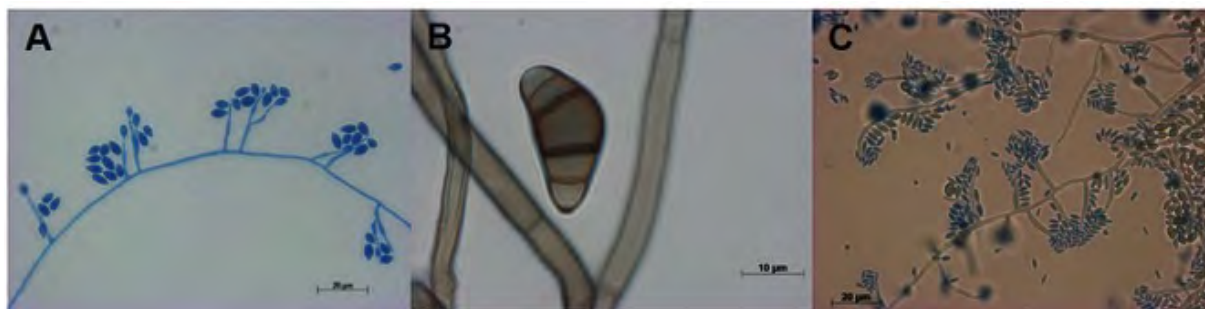


Figure 5 : Morphologies caractéristiques (4)

Conidiophores et conidies à partir d'une culture sur lame (malt 2%) de *Lomentospora prolificans* (A) et *Pleurostomophora ochracea* (C). Dictyospore de *Curvularia aerea* (B)

D'autres hyphomycètes dematiés ont été identifiés : *Pleurostomophora ochracea* (ordre **Calosphaeriales**, Figure 5) ; *Phaeoacremonium venezuelense*, *Ph. parasiticum*, *Ph. scolyti* (ordre **Togniniales**).

Nous avons également identifié les champignons ascomycètes suivants : *Chaetomium globosum* (Figure 4) et *Madurella fahalii* (ordre **Sordariales**) ; *Sporothrix globosa* (ordre **Ophiostomatales**), *Peroneutypa scoparia* (ordre **Xylariales**) et *Mycoleptodiscus indicus* (ordre **Magnaporthales**). *Cephalotheca foveolata*, membre de la **classe des Sordariomycetes** a été caractérisée.

Concernant les **champignons basidiomycètes**, cinq isolats ont été analysés : *Hormographiella aspergillata*, *Hexagonia* sp., *Schizophyllum commune*, *Trametes polyzona* et une souche pour laquelle la morphologie et le séquençage n'ont pas permis l'identification de genre et espèce pour le moment.

Dans l'ordre de Mucorales, nous avons identifié 32 souches appartenant aux genres : *Rhizopus* (*R. arrhizus*, *R. microsporus* ; 29%) ; *Lichtheimia* (*L. corymbifera* (Figure 6), *L. ramosa* ; 28%) ; *Mucor* (*M. circinelloides*, *M. hiemalis* ; 22%) et quelques isolats de *Rhizomucor pusillus*, *Mycotypha microspora*, *Cunninghamella bertholletiae*, *Mortierella ambigua* et *Apophysomyces ossiformis*.



Figure 6 : Morphologies caractéristiques (5)

Culture de *Lichtheimia corymbifera* sur malt 2% (A), sporanges (B) et sporangiophore en disposition sympodiale (C) de *Mucor circinelloides* et jeune sporangiole de *Cunninghamella bertholletiae* (D)

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

Expertise 2018 sur la sensibilité aux antifongiques

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

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

Au total, 793 isolats ont été testés en 2018 pour leur sensibilité aux antifongiques. Le nombre très important d'antifongiques testés, de genres et d'espèces différents rend impossible un compte rendu détaillé, certaines espèces n'étant représentées que par un très petit nombre d'isolats. Nous présentons donc les données de CMI depuis 2003, et en nous limitant : 1) aux espèces pour lesquelles au moins 5 isolats ont été testés et 2) aux antifongiques pertinents pour les espèces concernées. Une analyse des tendances sera faite plus loin sur un nombre limité d'espèces de levures analysées dans le cadre de l'Observatoire des Levures (ODL), pour éviter le biais lié à l'envoi de souches isolées dans un contexte connu d'échec thérapeutique.

En effet, nous recevons des isolats pour confirmation d'une moindre sensibilité décelée en routine, et pour recherche d'une éventuelle mutation dans les gènes cibles. Ainsi, nous avons fait le séquençage des gènes *Fks* pour 6 isolats de levures résistants aux échinocandines :

- 4 *Candida albicans* (3 patients) avec CMI haute et présence de mutation en région HS1 : S645P pour 1 souche, S645S/P pour 1 souche et F641S pour 1 souche provenant d'un patient pour lequel nous disposons également d'une souche sensible aux échinocandines et n'ayant pas de mutation dans le gène *Fks*
- 1 souche de *Candida tropicalis* avec CMI hautes et présence d'une mutation S645S/P en région HS1
- 1 souche de *Kluyveromyces marxianus* analysée rétrospectivement et ayant des CMI hautes aux échinocandines et une mutation F651F/S en région HS1

Nous avons également recherché des mutations dans le gène *CYP51A* (Figure 7) pour 18 isolats d'*A. fumigatus*. Nous avons mis en évidence les mutations suivantes pour les isolats résistants : F219S (4 isolats), TR34/L98H (1 isolat) et des combinaisons F46Y/M172V/E427K (7 isolats), TR46/Y121F/T289A (1 isolat) déjà décrites dans la littérature (Tableau 4). Les isolats sensibles aux azolés pour lesquelles le gène *CYP51A* a été séquencé provenaient de deux patients pour lesquels des isolats résistants avaient également été isolés. Ces isolats ne possèdent pas de mutation dans le gène *CYP51A*.

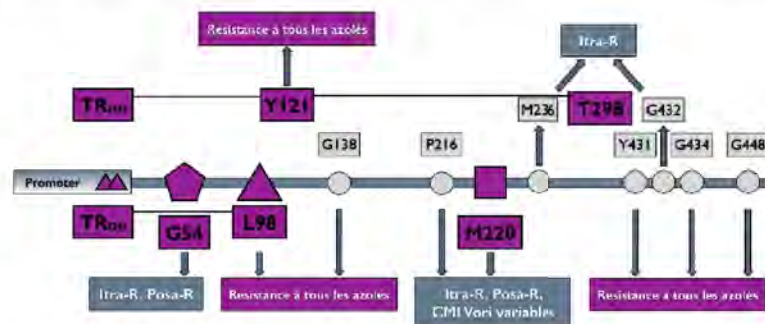


Figure 7 : Schéma du gène *Cyp51A* d'*A. fumigatus* et principales mutations

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

Tableau 4 : Mutations dans le gène cyp51A d'*Aspergillus fumigatus*⁷

Mutations	Mécanisme
G54/W/R/E/V/A M220/T/V/I/K/R/L G448S	Mutation décrite pour des souches résistantes Mécanisme connu
TR ₃₄ /L98H avec ou sans S297T/F497I TR ₄₆ /Y121F/T289A avec ou sans S297T/F497I TR53	Hyper expression par modification dans le promoteur du gène
F46Y/M172V/N248T/D255E/E427K ou autres G138/C/S	Mutation décrite pour des souches résistantes et sensibles Mutation décrite pour des souches résistantes avec mécanisme non connu
P216L F219/S/C/I I242V N248K Y431/S/C G432/S/A G434C	Mutation décrite occasionnellement pour des résistantes et sensibles

Expertise 2018 sur les mycoses endémiques

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

Expertise 2018 en anatomopathologie

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

Cette organisation est active depuis début 2013. En 2018, les demandes provenaient à part à peu près égale d'hôpitaux de l'AP-HP (49%) ou de centres hospitaliers en province et dans les DOM-TOM (51%). Au total 53 échantillons ont été analysés et discutés, aboutissant à un diagnostic de certitude (30 dossiers, 58%) ou de présomption (5 dossiers, 9%) (**Figure 8**). Dans 5 cas, le diagnostic n'a pas pu être établi en l'absence d'éléments fongiques visibles. Les données histopathologiques ont été confrontées aux données éventuellement disponibles au CNRMA et aux diagnostics moléculaires.

⁷ Rivero-Menendez O, Alastruey-Izquierdo A, Mellado E, Cuenca-Estrella M. (2016) Triazole Resistance in *Aspergillus* spp.: A Worldwide Problem? *J. Fungi* (Basel). 2016 Jul 4; 2(3). doi: 10.3390/jof2030021

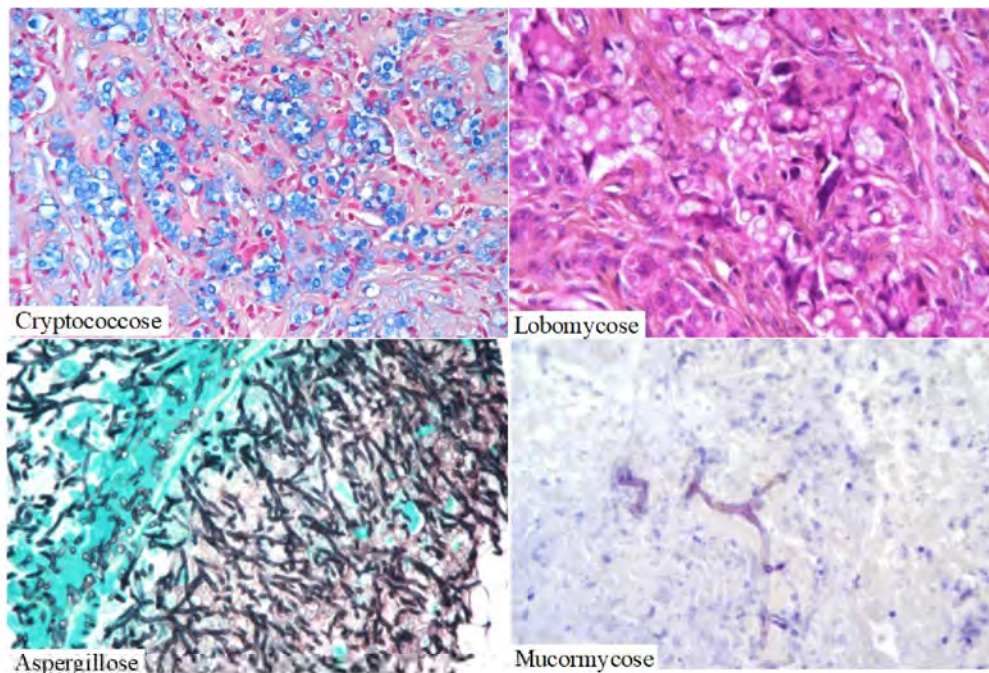


Figure 8 : Sélection d'expertise anatomopathologique

Cryptococcose pulmonaire (bleu alcian) ; lobomycose cutanée (HES) ; aspergillose des cordes vocales (Gomori-Grocott), Mucormycose pulmonaire (immunohistochimie)

Expertise 2018 pour les diagnostics moléculaires

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

La généralisation de la PCR quantitative (qPCR) avec les optimisations et les contrôles adéquats permet de multiplier les tests diagnostiques, de remplacer certaines méthodes, comme la microscopie, et d'en compléter d'autres, comme les recherches d'antigènes. Ces tests qPCR ont été optimisés dans le laboratoire de Mycologie-Parasitologie de l'hôpital St-Louis en insistant sur les étapes pré-analytiques. Ces tests pratiqués en routine concernent l'aspergillose invasive, la pneumocystose, les mucormycoses, et l'histoplasmosse. Pour l'aspergillose invasive et la pneumocystose, l'immense majorité des laboratoires hospitaliers réalisent ces examens. La question est donc l'harmonisation des pratiques.

Peu de laboratoires ont en revanche développé un test de diagnostic d'histoplasmosse⁸. Ce test est réalisé à partir de prélèvement invasifs (tissus pathologiques), superficiel (écouvillon cutané/buccal) et à partir de sang prélevé sur anticoagulant. Sur les 441 prélèvements (309 patients) adressés au laboratoire pour un diagnostic d'histoplasmosse (dont 214 prélèvements sanguins, 52 moëlles osseuses/ganglions, 83 prélèvements respiratoires et 92 autres de diverses origines), 26 étaient positifs correspondant à 14 patients pour lesquels le diagnostic, évoqué sur le contexte clinique, a été confirmé par l'histologie et/ou la culture dans au moins 8 cas portés à notre connaissance immédiate. La PCR spécifique pour le diagnostic de coccidioidomycose a été réalisée pour 17 patients (22 prélèvements dont 11 sanguins, 4 respiratoires et 7 autres), et positive pour l'un d'entre eux.

⁸ Alanio, A. et al (2017). Diagnosis of histoplasmosis: switching from microscopy/culture to RNA/DNA detection. *Mycoses* 60, pp.28–29.

2.6 Activités de séquençage

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

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

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

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

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

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

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

Le CNRMA a utilisé le séquençage génome entier (WGS) pour investiguer des cas groupés d'infections à des pathogènes fongiques rares. Le CNRMA a ainsi réalisé en 2018 le séquençage de 66 génomes de champignons, sachant que certains séquençages ont été refaits en raison de résultats non interprétables ou pour vérification. Dans la mesure où les génomes de ces espèces ne sont pas disponibles, le CNR est obligé d'abord de définir l'échantillonnage approprié (souche type, souches historiques, souches épidémiologiquement liées et non liées) pour permettre une interprétation des données de WGS. La description de ces analyses est faite plus loin (§3.5 et 4). Les séquences ne sont pas encore déposées mais le seront prochainement comme nous l'avons fait dans le passé dans la base de données EMBL.

3 Activités de surveillance

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

Au cours de l'année 2018 :

- Dans le cadre de la surveillance active par le biais de ses réseaux de partenaires (ODL et RESSIF), 2076 dossiers ont été enregistrés sur le site dédié. Ces déclarations correspondaient à 1063 fongémies (dont 264 dans l'ODL) et 1014 infections fongiques invasives hors fongémies.
- Dans le cadre de la surveillance passive, 81 cryptococcoses et 85 autres infections fongiques invasives (mycoses exotiques et mycoses rares) ont été déclarées sur le site.
- Le génotypage de souches a été fait par les techniques disponibles (microsatellites pour des cas groupés d'infections à *C. parapsilosis* ou des infections récurrentes dues à *C. albicans*; MLST pour des infections récurrentes à *C. tropicalis* chez un même patient ou pour détecter le clone résistant à la 5FC, PCR multiplex pour les souches de *C. neoformans* ; PCR temps réel pour les isolats de *S. clavata*), et par séquençage du génome entier (n=66 au total) pour des cas groupés d'infection à *Saprochaete clavata*.

3.1 Description du réseau de partenaires

La surveillance utilise trois types de réseaux de partenaires :

- L'Observatoire des Levures (ODL), mis en place en 2002, fait appel à un réseau de mycologues/microbiologistes de tous les hôpitaux de court séjour de l'AP-HP et quelques hôpitaux de la périphérie en Ile-de-France. Pendant 8 ans, le réseau a fonctionné avec 27 centres participants. Les restructurations et quelques défections font que l'ODL fonctionne actuellement (année 17) avec 15 centres actifs⁹. Ces centres déclarent de façon exhaustive toutes leurs fongémies à levures et envoient les isolats correspondants quelle que soit l'espèce isolée.
- Le RESeau de Surveillance des Infections Fongiques (RESSIF) a été mis en place en 2012 à l'occasion du renouvellement du mandat du CNRMA et de l'extension de ses missions. Il comprenait, en 2012, 13 centres collaborateurs du CNRMA (CC-CNRMA). Après un appel à volontaires parmi tous les correspondants hospitaliers du CNRMA en 2013, puis à l'occasion de la préparation du nouveau mandat en 2016, RESSIF compte maintenant 29 CC-CNRMA¹⁰. La particularité de RESSIF est de s'appuyer sur une charte de fonctionnement, signée par tous les partenaires et définissant le rôle de chacun et ses engagements. RESSIF permettra de déterminer avec plus de précision l'incidence de certaines mycoses invasives et d'obtenir des données sur la pneumocystose qu'il serait difficile de chiffrer par le biais d'une surveillance passive. Les CC-CNRMA envoient tous les isolats correspondants aux espèces non fréquentes (donc toutes, sauf *A. fumigatus*, *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. krusei*, *C. kefyr*) à moins que l'isolat n'ait un profil anormal de

⁹ Liste des Centres participants à l'ODL par ordre alphabétique des villes, les référents mycologues étant indiqués entre parenthèses : Bobigny - **hôpital Avicenne** (Sophie Brun), Bondy – **hôpital Jean Verdier** (Isabelle Poilane), Boulogne – **hôpital Ambroise Paré** (Anne-Laure Roux), Créteil - **hôpital Henri Mondor** (Françoise Botterel), Garches – **hôpital Raymond Poincaré** (Anne-Laure Roux), Kremlin-Bicêtre – **hôpital du Kremlin Bicêtre** (Adela Angouvant), Paris – **hôpital Cochin** (André Paugam), **hôpital Necker-Enfants Malades** (Marie-Elisabeth Bougnoux), **hôpital Bichat** (Sandrine Houzé), **hôpital Saint-Louis** (Stéphane Bretagne), **hôpital Robert Debré** (Patricia Marianni), **hôpital Lariboisière** (Stéphane Bretagne), LeChesnay-CH de Versailles (Odile Eloy), Villejuif - **hôpital Paul Brousse** (Adela Angouvant) et **Institut Gustave Roussy** (Elisabeth Chachaty).

¹⁰ Liste des CC-CNRMA ayant déclaré en 2018, par ordre alphabétique des villes, les référents mycologues étant indiqués entre parenthèses : Amiens (Taieb Chouaki, Anne Totet), Angers (Jean-Philippe Bouchara), Besançon (Laurence Millon), Caen (Julie Bonhomme), Cayenne (Magalie Demar), Clermont-Ferrand (Philippe Poirier), Dijon (Frédéric Dalle), Fort-de-France (Nicole Desbois), Limoges (Bernard Bouteille), Montpellier (Laurence Lachaux), Nice (Martine Gari-Toussaint, Lilia Hasseine), Nîmes (Mylène Sasso), Paris – **hôpital Cochin** (André Paugam), Paris – **hôpital Saint-Louis** (Stéphane Bretagne), Paris – **hôpital des Quinze-Vingt** (Lilia Merabet), Paris – **hôpital Necker-Enfants Malades** (Marie-Elisabeth Bougnoux), Paris – **hôpital Robert Debré** (Patricia Marianni), Poitiers (Estelle Perraud-Cateau), Pointe-à-Pitre (Muriel Nicolas), Reims (Dominique Toubas), Rennes (Jean-Pierre Gangneux), Rouen (Loïc Favennec), Saint-Etienne (Hélène Raberin), Strasbourg (Valérie Bru), Toulouse (Sophie Cassaing), Tours (Jacques Chandener, Guillaume Desoubeaux), Versailles (Odile Eloy), Villejuif **Institut Gustave Roussy** (Elisabeth Chachaty).

sensibilité aux antifongiques. Le CNRMA reçoit donc l'isolat correspondant dans environ 25% des cas, mais souvent de façon décalée par rapport à l'isolement dans le centre.

- Enfin, les collègues mycologues, microbiologistes et cliniciens qui ne font pas partie des deux réseaux précédents, contribuent, par des déclarations occasionnelles, à la surveillance de certaines infections fongiques invasives rares, en particulier la cryptococcose, mais aussi les mucormycoses, fusarioses ou mycoses endémiques. Les correspondants envoient alors les souches pour expertise. Ces déclarations sont utiles pour augmenter la couverture de la surveillance et caractériser des souches d'espèces rares. Le nombre de centres ayant déclaré au moins une cryptococcose depuis 1985 s'élevait à 204 en mars 2019 (1-218 cas/centres dans 80 départements métropolitains et 5 départements ultramarins).



Figure 9 : Déclarations à travers le portail dédié en 2018

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

déclaration en ligne est resté séparé (<https://epidemio.pasteur.fr/cryptococcoses>) car cette base de données est unique car alimentée par les notifications de cas de toute la France depuis 1985.

Tout professionnel de santé (microbiologiste ou clinicien) souhaitant participer à la surveillance des mycoses invasives peut adresser un mail à cnrma@pasteur.fr en demandant l'ouverture d'un compte. Au 21 mars 2019, 583 déclarations avaient été faites sur la fiche simplifiée (dont 290 au titre de l'ODL) et 11164 sur la fiche complète dont 376 concernant des cas hors surveillance de RESSIF (par exemple les péritonites post-opératoires ou les sinusites non invasives). À ce jour, 73 centres hospitaliers répartis dans 45 départements ont utilisé le portail de déclaration en ligne.

3.2 Surveillance de l'évolution et des caractéristiques des infections

En 2018, 1594 épisodes d'IFI ont été déclarés dans le cadre de RESSIF, ce qui porte à 10663 le nombre d'IFI répertoriées (**Figure 10**). En comparant à l'ensemble de la base de données (2012-2018), l'on peut noter que la proportion des aspergilloses invasives diminue. L'analyse des tendances sur 7 ans confirme cette impression ($p < 0,0001$) (**Figure 11**).

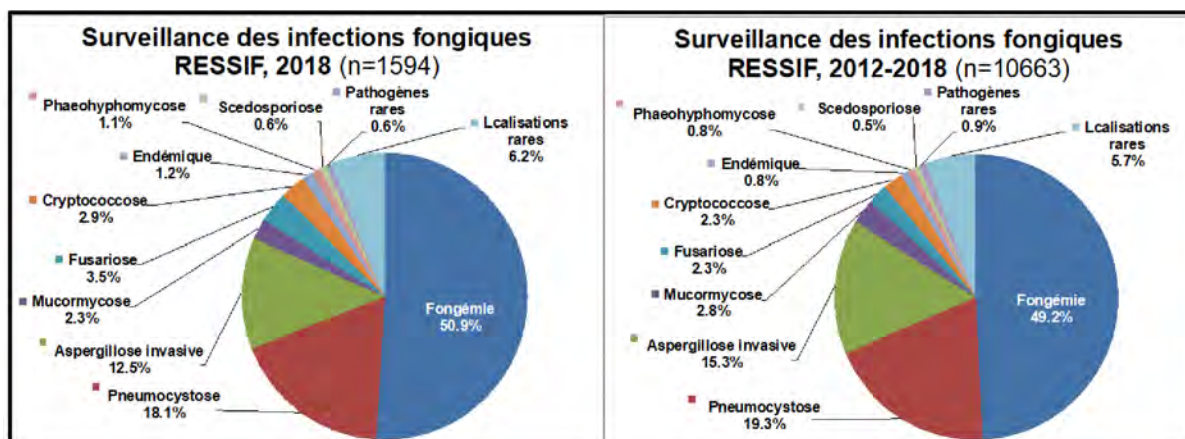


Figure 10 : Répartition des principales IFI répertoriées dans RESSIF

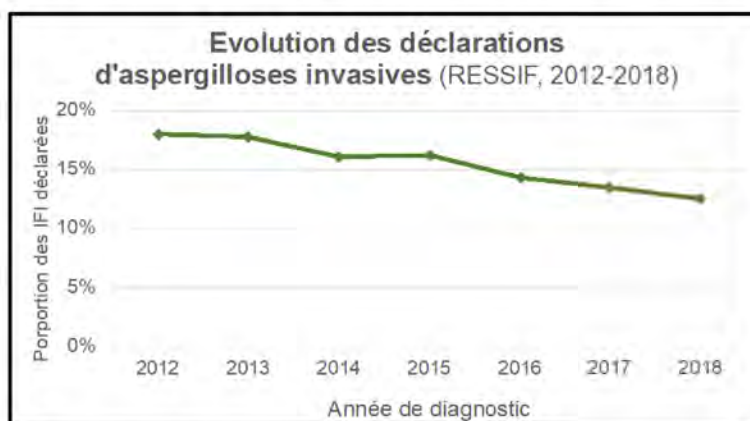


Figure 11 : Analyse des tendances de déclaration d'aspergilloses invasives
AI prouvées ou probables (RESSIF 2012-2018)

Nous analyserons succinctement les données globales sur les 7 premières années de RESSIF. Près d'un tiers des patients était hospitalisé en réanimation au moment du diagnostic d'IFI (30%) et plus d'un sur 10 était en chirurgie (11%). Globalement, la proportion d'hommes était toujours plus élevée que celle des femmes avec un sexe ratio de 1,6/1. Les principaux facteurs de risque pour les 9951 patients concernés par ces 10663 IFIs se répartissaient en pathologies malignes (43,3%), transplantation d'organes solides (7,9%), infection par le VIH (4,4%), chirurgie récente (18,4%), autres facteurs favorisants (24,8% maladies systémiques, diabète, traitement corticoïdes, traumatisme, ...). Rarement, aucune cause n'est retrouvée (1,2%). L'âge médian était de 61 ans (extrêmes 0-99 ans).

Dans 5,5% des cas, les infections sont dues à plusieurs espèces dans un même site anatomique, qu'il s'agisse d'une fongémie avec deux espèces de levures, ou de l'association d'une aspergillrose pulmonaire et d'une pneumocystose. L'épisode déclaré peut aussi être, soit la récurrence d'une infection antérieure (2,2%), soit un nouvel épisode (3,7%) dû soit à un nouveau pathogène dans le même site ou dans un site différent (aspergillrose pulmonaire et fongémie), soit au même pathogène dans un nouveau site (fongémie suivie d'une arthrite par exemple).

L'évolution à 3 mois était très variable selon les IFI (Figure 12), le pronostic le plus péjoratif étant associé aux mucormycoses avec une mortalité globale > 60%.

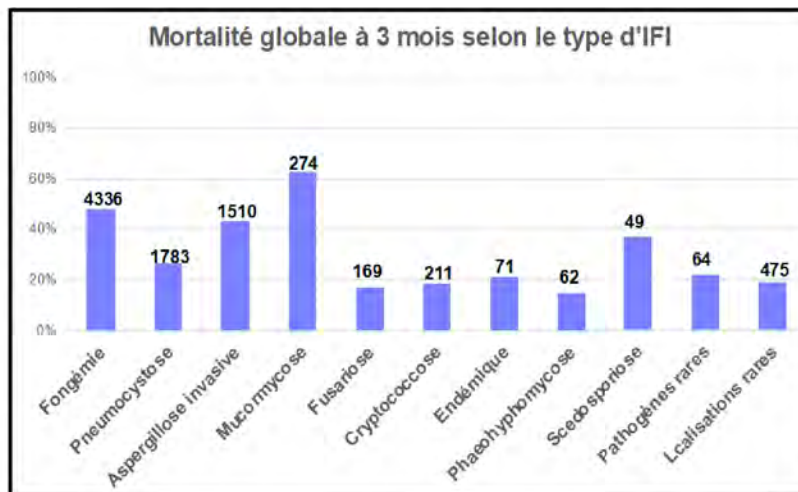


Figure 12 : Mortalité globale à 3 mois en fonction des IFI diagnostiquées
Les chiffres correspondent au nombre de cas pour lesquels l'information était disponible à la date du bilan

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

Cryptococcoses

Au moment du bilan (22 mars 2019), 3462 cas de cryptococcose ont été enregistrés dans RESOMYC, avec pour l'année 2018, 79 cas enregistrés contre 60 à la même époque l'an dernier. C'est la deuxième année consécutive de baisse importante chez les patients séropositifs (**Figure 13**).

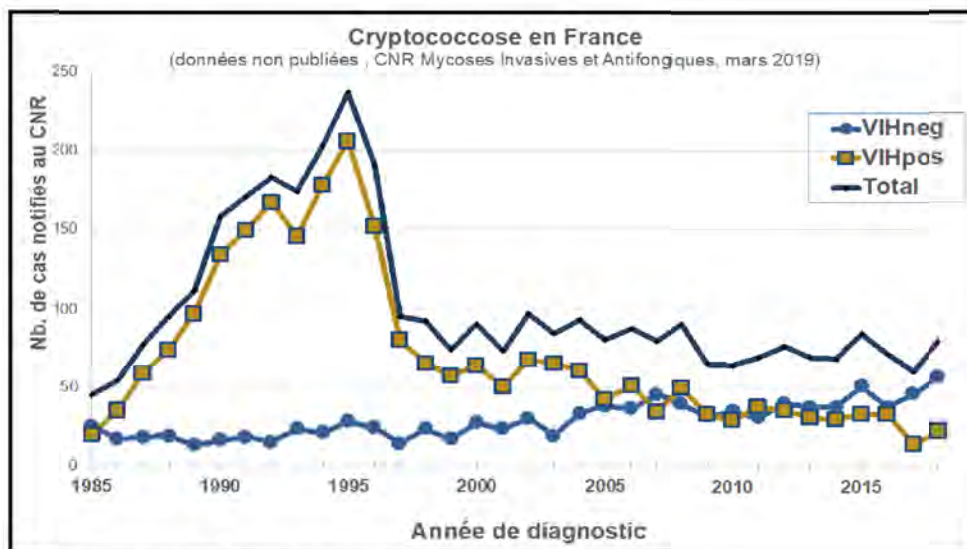


Figure 13 : Évolution des cryptococcoses déclarées en France (1985-2018)

Nous avons analysé les facteurs de risque en fonction de 5 grandes catégories (infection VIH, pathologie malignes, transplantation d'organe solide, autre facteur de risque, et aucun facteur de risque identifié) et sur trois périodes « 1985-1995 », « 1996-2006 » et « 2007-2018 ». L'épidémiologie de la cryptococcose en France évolue significativement au cours de ces trois périodes avec, à chaque fois, un doublement des cas diagnostiqués dans chacune des catégories chez les patients séronégatifs pour le VIH et à l'inverse une diminution d'un facteur 2 chez les patients séropositifs pour le VIH (**Figure 14**, $p < 0,0001$). La proportion de femmes a augmenté en parallèle ($p < 0,0001$). Une analyse plus détaillée de ces évolutions est prévue prochainement.

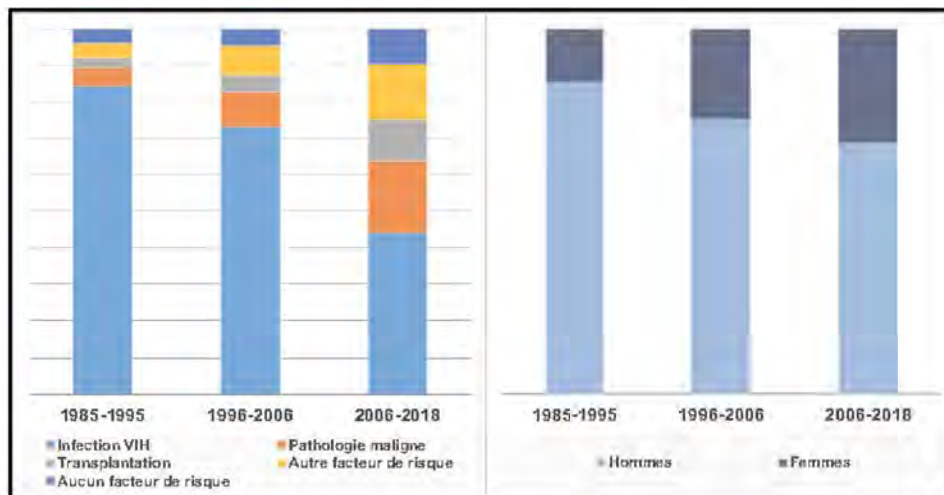


Figure 14 : Caractéristiques des patients atteints de cryptococcose en France

Principaux facteurs de risque et répartition hommes/femmes selon la période de diagnostic chez les patients ayant une cryptococcose en France (1985 -2018)

Si l'on compare la première et la troisième période, le pourcentage de patients ayant une méningoencéphalite n'a pas beaucoup évolué dans les différentes catégories. Si l'on considère seulement les patients avec méningoencéphalite, la mortalité globale à 3 mois a chuté chez les patients séropositifs et les patients d'hématologie, mais pas dans les autres catégories suggérant une prise en charge différente et/ou un retard de diagnostic (**Figure 15**). Globalement, pendant la période récente (2007-2018), la mortalité à 3 mois reste significativement plus élevée chez les patients séronégatifs en comparaison des patients séropositifs (27,3% vs. 14,3%, $p < 0,0001$).

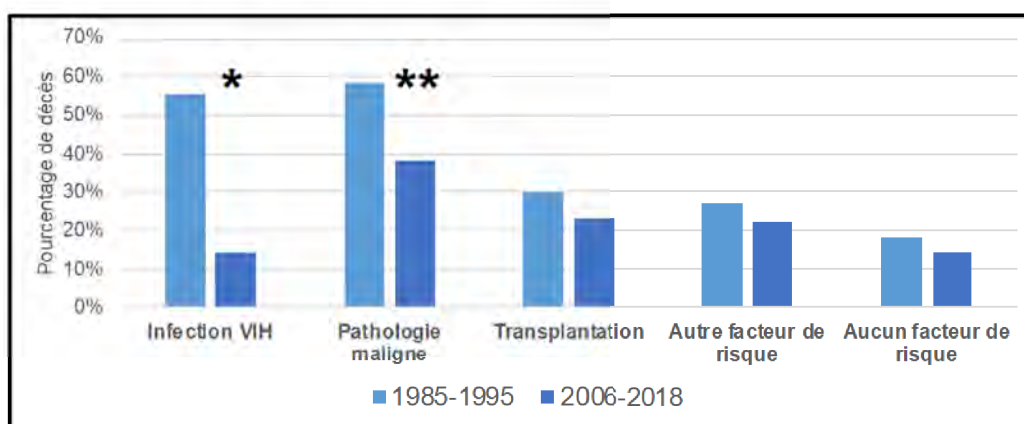


Figure 15 : Mortalité à 3 mois au cours de la cryptococcose

Comparaison selon le facteur de risque et la période de diagnostic

Fongémies

Nous ne ferons pas de bilan spécifique de l'ODL car nous venons d'analyser les fongémies en hématologie¹¹ et les levures rares¹².

Contrairement à l'ODL où seules les fongémies à levures sont colligées, dans RESSIF, tout champignon isolé du sang est répertorié. On compte ainsi au moment du bilan, 5336 épisodes avec hémocultures positives comprenant 5255 levures, 21 champignons dimorphiques et 60 filamenteux.

¹¹ Lortholary O, et al (2017) The risk and clinical outcome of candidemia depending on underlying malignancy. *Intensive Care Med* 38(Suppl 7):311–662.

¹² Bretagne S, et al (2017) Predisposing factors and outcome of uncommon yeast species-related fungaemia based on an exhaustive surveillance programme (2002-14). *J Antimicrob Chemother*. doi:10.1093/jac/dkx045.

La grande majorité des patients (92,1%) n'a fait qu'un épisode de fongémie (rapelons que 40% en moyenne meurent), mais 173 patients (3,1%) en ont fait deux et 24 plus de deux (3 épisodes pour 19 patients, 4 épisodes pour 3 patients, 5 pour un, et 8 pour le dernier).

Parmi les levures, 2,9% (n=156) étaient des basidiomycètes (90 *Cr. neoformans*, 26 *Rhodotorula mucilaginosa*, 22 *Trichosporon* spp. et 13 *Malassezia* spp.). Parmi les 5196 levures ascomycètes, les principales étaient, comme dans l'observatoire des levures *C. albicans* (50,6%), *C. glabrata* (17,1%), *C. parapsilosis* (12,6%), *C. tropicalis* (7,4%), *C. krusei* (3,1%), *C. kefyr* (1,7%) et *Cl. lusitaniae* (1,8%). Des espèces très rarement isolées en pathologie humaine ont été identifiées (*Candida catenulata*, *Candida homilientoma*, *Candida sorbosivorans*, *Candida theae*, *Candida rugosa*, *Debaryomyces fabryi*). A noter qu'aucune fongémie à *C. auris* n'a été déclarée.

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

Enfin, 62 infections dues à des champignons filamenteux ont été associées à des hémocultures positives et en particulier 29 infections à *Fusarium* spp. 5 *Mucorales*, et 24 espèces variées.

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

Tableau 5 : Principales caractéristiques des fongémies

	Levures		Dimorphiques	Filamenteux
	Ascomycètes (n= 4974)	Basidiomycètes (n = 153)	(n=20)	(n=58)
Sex ratio	1,6 / 1	2,3 / 1	4 / 1	1,5 / 1
Age médian [extrêmes]	63 [0 – 98]	51 [0 – 86]	46 [2 – 69]	57 [0 - 80]
Facteurs de risque				
Pathologie maligne	37,9%	35,3%	10,0%	72,4%
Chirurgie récente	32,0%	8,5%	-	5,2%
Transplantation d'organe	3,3%	9,8%	-	5,2%
Infection VIH	0,2%	22,9%	85,0%	-
Autres	26,4%	21,6%	-	17,2%
Aucun	0,3%	2,0%	5,0	-
Tt corticoïde prolongé	11,2%	16,7%	4,8%	24,2%
Mortalité globale à 3 mois (évolution connue pour 85% des patients)	48,0%	33,9%	35,3%	51,8%

Aucune tendance n'est décelable au cours du temps ou en fonction des régions. Nous sommes d'ailleurs en train d'étudier les tendances pour les fongémies à levures en collaboration avec Didier Che (SPF) en utilisant la base ODL qui nous permet d'analyser une période beaucoup plus longue.

Pneumocystoses

Depuis 2012, 2061 cas de pneumocystose ont été répertoriés dans RESSIF. Il s'agissait majoritairement d'hommes (64,8%) adultes (62±17 ans) avec seulement 1,9% d'enfants (**Tableau 6**). Les patients étaient infectés par le VIH dans 19,5% des cas seulement. Les conditions prédisposantes pour les patients séronégatifs se répartissaient entre pathologies malignes (58,0%), transplantation d'organe (18,7%) et autres pathologies (22,5%). A noter que dans un certain nombre de cas, la pneumocystose était diagnostiquée en même temps qu'une autre IFI [aspergillose pulmonaire (n=46), cryptococcose (n=9) et scedosporiose (n=1)]. Les co-infections aspergilloso-pneumocystoses sont en cours d'analyse par l'un des CC-CNRMA (Rennes, F. Robert-Gangneux) en collaboration avec le CNRMA.

L'examen direct était positif dans 45,3% et la PCR dans 85,0 % des cas en moyenne avec des variations significatives selon le terrain ($p < 0,0001$). Le diagnostic était établi par la seule PCR dans 64% des cas (examen direct négatif) et par le seul examen direct dans 15% des cas.

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

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

Tableau 6 : Caractéristiques des pneumocystoses répertoriées dans RESSIF

	VIH	Transplantation d'organe	Pathologie maligne	Autre
Sex ratio	2,9 / 1	1,7 / 1	1,8 / 1	1,4 / 1
Age médian [extrêmes]	47 [1,5 – 78]	62 [9 – 88]	65 [0,2 – 93]	65 [0,3 – 91]
Moyens diagnostiques				
Ex. direct positif	77,4%	54,8%	35,7%	35,8%
PCR positive	71,8%	80,3%	87,9%	92,4%
Type d'infection				
Prouvée	72,8%	61,0%	50,4%	48,8%
Probable	16,6%	26,2%	34,6%	32,6%
Mortalité globale à 3 mois	6,2%	16,1%	35,7%	28,5%

Mucormycoses

Pour les 301 cas de mucormycoses rapportés dans RESSIF (65,5% d'hommes, âge moyen de 58 ans, 12 enfants), les principaux facteurs de risque se répartissaient en pathologie maligne (63,5%), diabète (9,2%), transplantation (7,7%), et traumatisme/brûlures étendues (13,1%). L'infection invasive était prouvée dans 56,9% des cas. Une infection simultanée par un autre pathogène dans le même site était diagnostiquée pour 62 patients (*Aspergillus* spp. dans 68% des cas). Dans 47,9% des cas en moyenne, l'épisode de mucormycose survenait alors que le patient était sous antifongiques, plus fréquemment chez les patients d'hématologie (61,7%) que les autres (23,3%, $p < 0,001$). Les localisations différaient selon le facteur de risque sous-jacent ($p < 0,001$), avec dans la majorité des cas (52%) une atteinte pulmonaire, mais aussi ORL (18%) et cutanée (15%) (**Tableau 7**).

Le diagnostic avait été fait par culture (66%), histologie/examen direct (63,5%) et/ou PCR (51,5%). L'identification polyphasique systématique des isolats permet de mettre en évidence une diversité impressionnante en termes de genres et espèces avec 6 espèces représentant 84,3% du total. On constate des différences de répartition des espèces selon le terrain sous-jacent (**Figure 16**), rendant importante l'identification précise des espèces en cause, et ceci d'autant plus que la mortalité associée semble différer selon les espèces, potentiellement en rapport avec la pathologie en cause et la localisation de l'infection.

Tableau 7 : Caractéristiques des mucormycoses répertoriées dans RESSIF

	Hémopathies malignes (n =191)	Transplantation d'organe (n = 22)	Diabète (n = 26)	Brulures étendues – traumatisme (n = 37)
Sex ratio	1,8 / 1	2,7 / 1	4,2 / 1	2,1 / 1
Age médian [extrêmes]	59 [3 – 83]	57,5 [8 – 77]	62 [15 – 85]	50 [17 – 81]
Localisation				
Pulmonaire	71,3%	68,4%	33,3%	14,3%
ORL	18,6%	21,1%	58,3%	2,9%
Ostéoarticulaire	-	-	8,3%	17,1%
Cutanées	10,2%	10,5%	-	65,7%
IFI prouvée	48,2%	59,1%	76,90%	78,4%
Moyens diagnostiques				
Isolement en culture	56,8%	77,3%	16,9%	97,3%
Histologie	57,0%	63,6%	96,2%	73,0%
PCR diagnostique	58,6%	27,3%	46,2%	32,4%
Mortalité globale à 3 mois	70,4%	57,1%	40,9%	36,7%

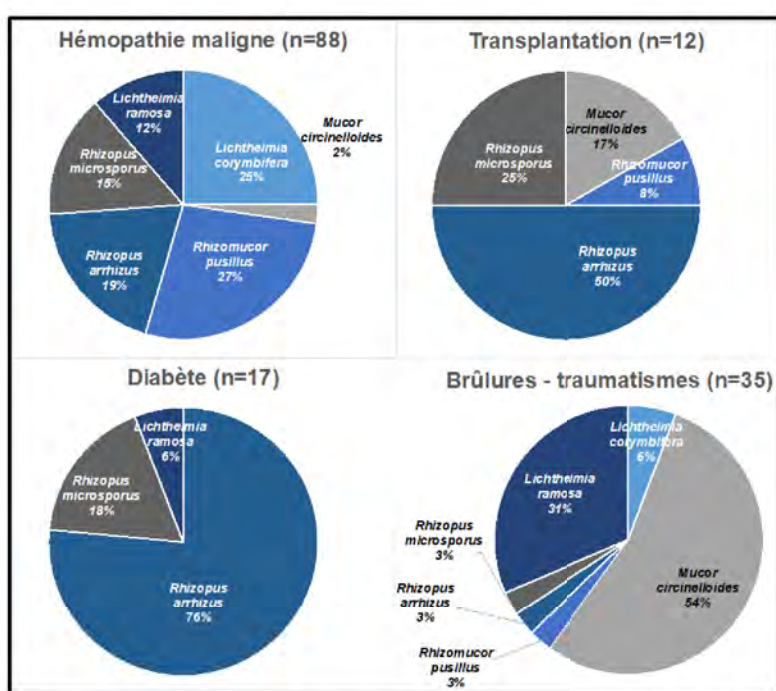


Figure 16 : Répartition des 6 principales Mucorales en fonction du terrain

En revanche, il ne semble pas y avoir de différence majeure de sensibilité aux antifongiques (**Tableau 8**), sauf peut-être les CMI de certains antifongiques, un peu plus basses sur *Rhizomucor pusillus* (le tableau complet des CMI ainsi que les données sur l'isavuconazole figurent plus loin).

Tableau 8 : Profil de sensibilité des 6 principales espèces de Mucorales

Espèce (nombre d'isolats testés)	Valeurs des CMI50 / CMI90 (mg/L) pour les antifongiques						
	AMB	Itra	Vori	Pcsa	Caspo	Mica	Terbi
<i>Lichtheimia corymbifera</i> (n=68)	0.5/0.5	1/4	≥8/≥8	0.5/0.5	≥8/≥8	≥8/≥8	0.5/1
<i>Lichtheimia ramosa</i> (n=66)	0.12/0.25	2/≥8	≥8/≥8	0.5/1	≥8/≥8	≥8/≥8	1/2
<i>Mucor circinelloides</i> (n=68)	0.03/0.12	≥8/≥8	≥8/≥8	1/≥8	≥8/≥8	≥8/≥8	≥8/≥8
<i>Rhizomucor pusillus</i> (n=55)	0.06/0.12	0.5/1	≥8/≥8	0.25/0.5	≥8/≥8	≥8/≥8	0.25/0.5
<i>Rhizopus arrhizus</i> (n=91)	0.12/0.25	1/≥8	8/≥8	0.25/1	≥8/≥8	≥8/≥8	≥8/≥8
<i>Rhizopus microsporus</i> (n=53)	0.06/0.12	1/≥8	8/≥8	0.5/1	≥8/≥8	≥8/≥8	0.5/1

Aspergilloses

De 2012 à 2018, 1630 cas d'AI ont été répertoriés dans RESSIF, dont 84% d'infections probables et 16% d'infections prouvées. L'âge médian des 1607 patients était de 59 ans [0-91 ans] avec 3,0% d'enfant et une majorité d'hommes (63,6%). Dans 32 des cas (2%), il s'agissait d'une récurrence.

Dans près de 10% des cas, le site anatomique était infecté par 2 pathogènes, le plus souvent par deux espèces d'*Aspergillus* (n=40), mais pouvaient être associés à l'*Aspergillus* une *Mucorale* (n=46), *Pneumocystis jirovecii* (n=45), un *Fusarium* spp. (n=9) ou d'autres filamenteux (n=11). Dans 17 cas supplémentaires, une fongémie concomitante à l'aspergillose était diagnostiquée.

Nous avons analysé les facteurs de risque en utilisant les catégories que nous avons utilisées pour l'analyse de SAIF¹³ : lymphomes (25,1%), allogreffes quel qu'en soit le motif (17,1%), leucémies aiguës ± autogreffe (12,1%), autres hémopathies et déficits immunitaires congénitaux (11,8%), transplantations d'organes (11,1%), cancers (6,8%), pathologies respiratoires chroniques (2,4%), maladies de système (3,3%) et diverses pathologies autres (10,2%). Près d'un tiers des patients globalement (31,9%), 40% des patients ayant un lymphome, et plus de la moitié des patients ayant eu une allogreffe (53,4%) avaient un traitement antifongique au moment du diagnostic de l'aspergillose.

Il faut garder en mémoire que les critères de diagnostic de l'AI imposent des critères d'hôte que ne remplissent pas nécessairement les patients ayant des pathologies respiratoires chroniques par exemple. Les modalités du diagnostic variaient considérablement selon le terrain sous-jacent (**Figure 17**).

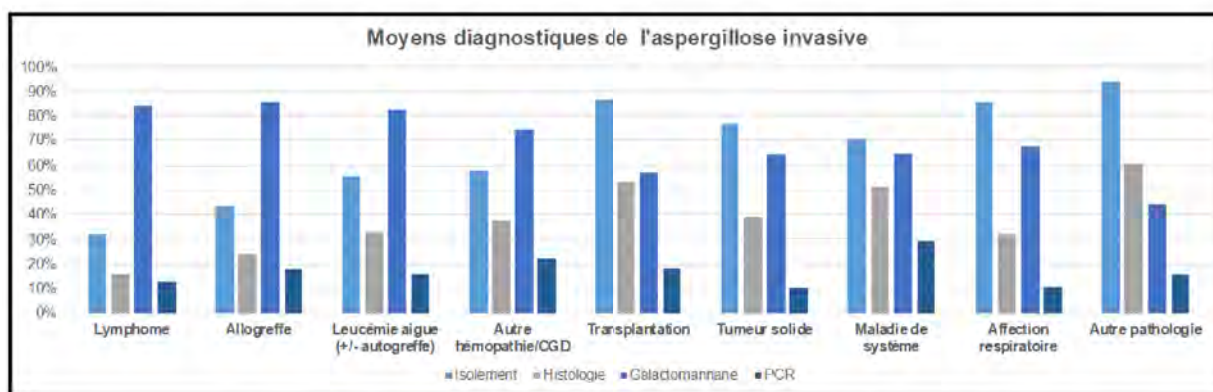


Figure 17 : Éléments contribuant au diagnostic de l'aspergillose invasive

Lorsqu'un *Aspergillus* est isolé, l'espèce en cause était *Aspergillus fumigatus* dans plus de deux tiers des cas (78,8%), et globalement, l'isolat appartenait dans 79,3% des cas à la section *Fumigati*, et plus rarement aux sections *Flavi* (9,1%), *Nigri* (3,7%), *Nidulantes* (3,4%), ou *Terrei* (2,4%). Cette distribution changeait ($p=0,010$) si le patient avait reçu des antifongiques antérieurement, avec un peu moins d'isolats de la section *Fumigati* (73,9% vs. 81,4%) et davantage de section *Nidulantes* (4,5% vs. 3,1%), ou *Nigri* (6,1% vs. 2,8%). Il y avait dans ce contexte davantage d'*A. calidoustus* (3,2% vs. 0,6%, $p=0,002$). La distribution changeait aussi en fonction du terrain sous-jacent (**Figure 18**). Des données complémentaires sont nécessaires pour savoir s'il s'agit d'une réelle différence ou d'un simple biais d'interprétation des résultats de la culture.

En analysant l'évolution globale pour les 1510 patients pour lesquels elle était rapportée, la mortalité globale était de 43% à 3 mois. Elle était significativement plus élevée pour les 626 patients infectés par un isolat appartenant à la section *Fumigati* (47,1% vs. 36,2%, $p=0,024$), plus faible en cas d'infection par une espèce de la section *Nigri* (n=21, 19,2%) et intermédiaire en cas d'infection par les autres espèces (n=727, 46,2%, $p=0,007$). L'évolution, connue pour 7 des 12 patients infectés par *A. calidoustus*, était fatale dans

¹³ Lortholary O, et al (2011) Epidemiological trends in invasive aspergillosis in France: the SAIF network (2005-2007). *Clin Microbiol Infect* 17:1882-1889.

100% des cas dans un délai médian de 5 jours [0-68 j]. L'évolution variait aussi significativement en fonction du facteur de risque ($p < 0,0001$) avec une mortalité globale allant de 64,7% en cas de pathologie respiratoire chronique ($n=34$) à 31,7% chez les patients transplantés d'organes solides ($n=145$).

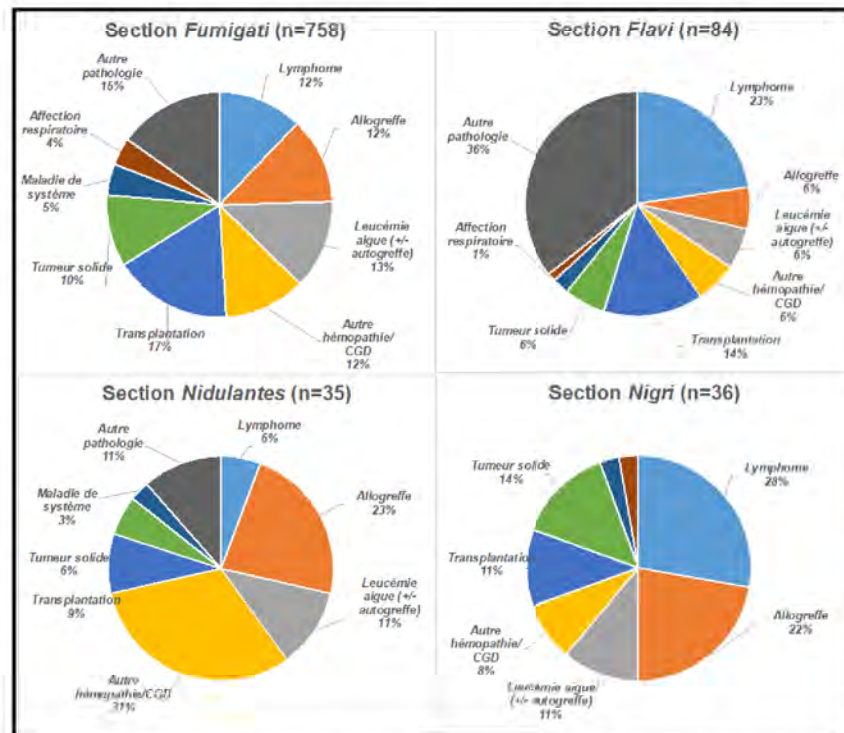


Figure 18 : Pathologies sous-jacentes selon l'espèce d'*Aspergillus* impliquée

Fusarioses

Nous avons actuellement répertorié 248 cas d'infection à *Fusarium* spp. dont 55% sont des infections prouvées, et 64,18% des infections oculaires. Cette dernière localisation est associée à des traumatismes par corps étrangers et en particulier des lentilles de contact, ce qui explique la prédominance féminine (seulement 34,6% d'hommes) et l'âge médian plus jeune (37 ans [17-79]). Les autres localisations étaient des localisations ostéo-articulaires et/ou cutanées (16,5%), majoritairement liées à des traumatismes locaux et/ou brûlures étendues (70,7%) mais survenant aussi dans un contexte d'immunosuppression (24,4%), qui accompagnait les autres tableaux cliniques dans 85,4% des cas (fongémies (58,7%), localisation pulmonaires (30,4%) et ORL (6,5%)). Il faut noter qu'une prescription antifongique antérieure était notée pour 16,6% des patients, plus fréquemment dans un contexte hématologique (61,2% des patients) que dans les autres situations ($p < 0,0001$). La mortalité était de 50% en cas de fongémies, de 38,0% en hématologie et de 23,1% dans les cas de traumatisme loco-régional (incluant les brûlures étendues).

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

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

Dans la mesure où les seuils de résistance n'ont été définis pour cette technique que pour quelques antifongiques et sur les espèces communes, nous présenterons les résultats en termes de CMI50 et de

CMI90, c'est-à-dire, les concentrations correspondant aux concentrations minimales de l'antifongique inhibant respectivement 50% et 90% des isolats de l'espèce concernée. Soulignons cependant que depuis notre étude publiée en 2008¹⁴, nous recherchons systématiquement une mutation dans le gène *Fks* lorsque la CMI de la caspofungine est $\geq 0,5$ mg/L en AM3 (sauf pour les isolats de *C. parapsilosis* et les espèces basidiomycètes intrinsèquement résistantes aux échinocandines). En pratique, nous interprétons donc les résultats des CMI en fonction du profil de sensibilité obtenu pour les isolats de la même espèce testés dans les mêmes conditions au CNRMA, en sachant que cette interprétation est d'autant plus fiable que le nombre d'isolats déjà testés est grand. Pour améliorer la lisibilité de ce rapport, nous avons choisi de présenter les données cumulées des profils de CMI obtenus depuis 2003 pour les levures et les champignons filamenteux séparément.

Définitions utilisées pour exprimer la résistance

Nous retranscrivons ici les seuils établis par le comité EUCAST pour *Candida* sp. (Tableau 9) et *Aspergillus* spp. (Tableau 10), sachant que, pour la caspofungine et la micafungine, nous avons modifié la technique en utilisant le milieu AM3 au lieu du milieu RPMI, et établi qu'une CMI de la caspofungine au-dessus de 0,25 mg/L pour une espèce de *Candida* autre que celles du complexe *C. parapsilosis/orthopsilosis/metapsilosis*, était habituellement associée à une mutation dans le hot spot d'un ou plusieurs gènes *Fks*.

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

Candida spp.

EUCAST Antifungal Clinical Breakpoint Table v. 9.0 valid from 2018-02-12

Antifungal agent	MIC breakpoint (mg/L)																	
	<i>C. albicans</i>		<i>C. dubliniensis</i>		<i>C. glabrata</i>		<i>C. krusei</i>		<i>C. parapsilosis</i>		<i>C. tropicalis</i>		<i>C. guilliermondii</i>		Non-species related breakpoints ¹			
	S ≤	R >	S ≤	R >	S ≤	R >	S ≤	R >	S ≤	R >	S ≤	R >	S ≤	R >	S ≤	R >		
Amphotericin B	1	1	IE	IE	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	IE	IE	IE	IE
Anidulafungin	0.032	0.032	IE	IE	0.064	0.064	0.064	0.064	0.002	4	0.064	0.064	IE ²	IE ²	IE	IE	IE	IE
Caspofungin	Note ³	Note ³	IE	IE	Note ³	Note ³	Note ³	Note ³	Note ³	Note ³	Note ³	Note ³	IE ²	IE ²	IE	IE	IE	IE
Fluconazole	2	4	IE	IE	0.002	32	-	-	2	4	2	4	IE ²	IE ²	2	4	IE	IE
Isavuconazole	IE	IE	IE	IE	IE	IE	IE	IE	IE	IE	IE	IE	IE	IE	IE	IE	IE	IE
Itraconazole	0.064	0.064	0.064	0.064	IE ²	IE ²	IE ²	IE ²	0.125	0.125	0.125	0.125	IE ²	IE ²	IE	IE	IE	IE
Micafungin	0.016	0.016	IE	IE	0.032	0.032	IE ²	IE ²	0.002	2	IE ²	IE ²	IE ²	IE ²	IE	IE	IE	IE
Posaconazole	0.064	0.064	0.064	0.064	IE ²	IE ²	IE ²	IE ²	0.064	0.064	0.064	0.064	IE ²	IE ²	IE	IE	IE	IE
Voriconazole ⁶	0.064 ⁵	0.25 ⁵	0.064	0.25	IE	IE	IE	IE	0.125 ⁵	0.25 ⁵	0.125 ⁵	0.25 ⁵	IE ²	IE ²	IE	IE	IE	IE

Notes

1. Non-species related breakpoints have been determined mainly on the basis of PK/PD data and are independent of MIC distributions of specific 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. Similarly, *C. parapsilosis* isolates intermediate to anidulafungin and micafungin can be regarded intermediate to caspofungin. EUCAST breakpoints have not yet been established for caspofungin, due to significant inter-laboratory variation in MIC ranges for caspofungin. 4. MICs for *C. tropicalis* are 1-2 two-fold dilution steps higher than for *C. albicans* and *C. glabrata*. In the clinical study successful outcome was numerically slightly lower for *C. tropicalis* than for *C. albicans* at both dosages (100 and 150 mg daily). However, the difference was not significant and whether it translates into a relevant clinical difference is unknown. MICs for *C. krusei* are approximately three two-fold dilution steps higher than those for *C. albicans* and, similarly, those for *C. guilliermondii* are approximately eight two-fold dilutions higher. In addition, only a small number of cases involved these species in the clinical trials. This means there is insufficient evidence to indicate whether the wild-type population of these pathogens can be considered susceptible to micafungin. 5. Strains with MIC values above the S/I breakpoint are rare or not yet reported. The identification and 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. 6. For *Candida* the intermediate 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

¹⁴ Desnos-Ollivier M, et al (2008) Mutations in the *fks1* gene in *Candida albicans*, *C. tropicalis*, and *C. krusei* correlate with elevated caspofungin MICs uncovered in AM3 medium using the method of the European Committee on Antibiotic Susceptibility Testing. *Antimicrob Agents Chemother* 52:3092-3098.

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

Aspergillus spp.

EUCAST Antifungal Clinical Breakpoint Table v. 9.0 valid from 2018-02-12

MIC method (EUCAST standardized broth microdilution method)
 Medium: RPMI1640-2% glucose, MOPS as buffer
 Inoculum: Final 1x10⁵ – 2.5x10⁵ cfu/mL
 Incubation: 48h
 Reading: Visual, complete inhibition for amphotericin B and azoles (MIC), aberrant growth endpoint for echinocandins (MEC).
 Quality control: *A. fumigatus* ATCC 204305, *A. flavus* ATCC 204304, *A. fumigatus* F 6919, *A. flavus* CM 1813, *C. parapsilosis* ATCC 22019 (read after 16-24 h) or *C. krusei* ATCC 6258 (read after 16-24 h).

Antifungal agent	MIC breakpoint (mg/L)											
	<i>A. flavus</i>		<i>A. fumigatus</i>		<i>A. nidulans</i>		<i>A. niger</i>		<i>A. terreus</i>		Non-species related breakpoints ¹	
	S ≤	R >	S ≤	R >	S ≤	R >	S ≤	R >	S ≤	R >	S ≤	R >
Amphotericin B	IE ²	IE ²	1	2	Note ³	Note ³	1	2	-	-	IE	IE
Anidulafungin	IE	IE	IE	IE	IE	IE	IE	IE	IE	IE	IE	IE
Caspofungin	IE	IE	IE	IE	IE	IE	IE	IE	IE	IE	IE	IE
Fluconazole	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Isavuconazole	IE ²	IE ²	1	1	0.25	0.25	IE ²	IE ²	1	1	IE	IE
Itraconazole ⁴	1	2	1	2	1	2	IE ^{2,5}	IE ^{2,5}	1	2	IE ⁵	IE ⁵
Micafungin	IE	IE	IE	IE	IE	IE	IE	IE	IE	IE	IE	IE
Posaconazole ⁴	IE ²	IE ²	0.125 ⁶	0.25 ⁶	IE ²	IE ²	IE ²	IE ²	0.125 ⁶	0.25 ⁶	IE	IE
Voriconazole ⁴	IE ²	IE ²	1	2	IE	IE	IE ²	IE ²	IE ²	IE ²	IE	IE

Notes

1. Non-species related breakpoints have been determined mainly on the basis of PK/PD data and are independent of MIC distributions of specific species. They are for use only for organisms that do not have specific breakpoints. 2. The ECOFFs for these species are in general one step higher than for *A. fumigatus*. 3. There are too few MIC data to establish ECOFFs and hence to suggest any breakpoints. 4. Monitoring of azole trough concentrations in patients treated for fungal infection is recommended. 5. The MIC values for isolates of *A. niger* and *A. versicolor* are in general higher than those for *A. fumigatus*. Whether this translates into a poorer clinical response is unknown. 6. Provided adequate drug exposure has been confirmed using therapeutic drug monitoring (TDM). There remains some uncertainty regarding cut-off values for posaconazole concentrations that separate patients with a high probability of clinical success from those with a low probability of clinical success. In some circumstances (e.g. patients with persistent and profound neutropenia, large lesions, or those with other features associated with a poor clinical outcome) a relatively high trough concentration should be sought. Preclinical and clinical data suggest this value should be >1 mg/L at steady state. For other patient groups a lower trough concentration may be acceptable. For prophylaxis a target concentration of >0.7 mg/L has been suggested.

Résultats de la surveillance des résistances aux antifongiques pour les levures

Les données du CNRMA concernent actuellement plus de 8900 isolats de levures dont la sensibilité a été testée à 8 antifongiques systémiques. Nous présentons ci-dessous les résultats concernant les espèces pour lesquelles plus de 10 isolats ont été testés depuis 2003, et les antifongiques pertinents correspondants (Tableau 11). Il faut remarquer que les CMI50 et les CMI90 du voriconazole et du posaconazole sont nettement plus hautes pour *C. glabrata* et *C. krusei* que pour *C. albicans* confirmant l'existence fréquente de "résistances" croisées. A quelques exceptions près, les CMI hautes observées font partie du profil naturel des espèces (comme *C. krusei* et le fluconazole, *C. haemulonii* et l'amphotéricine B et les azolés, *C. parapsilosis* et les échinocandines). La distribution des valeurs de CMI de la micafungine est comparable à celle de la caspofungine sur les espèces de levures « fréquentes ». Comme la caspofungine, la micafungine n'a pas d'activité sur les levures des genres *Cryptococcus*, *Geotrichum*, *Rhodotorula* et *Trichosporon*. Il n'y a donc pas d'argument microbiologique pour privilégier l'une ou l'autre des échinocandines disponibles en France.

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

Tableau 11 : Profil de sensibilité des levures aux antifongiques
(mise à jour 4/02/2019)

Espèces étudiées		Valeurs des CMI50 / CMI90 mg/L pour les antifongiques*						
Nom d'usage en clinique (nbre d'isolats testés)	Nom actuel	AMB	5-FC	Fluco	Vori	Posa	Caspo**	Mica**
<i>C. albicans</i> (n=3139)		0.06/0.12	≤0.12/0.5	0.25/0.5	≤0.01/≤0.01	0.03/0.06	0.03/0.06	0.03/0.03
<i>C. dubliniensis</i> (n=129)		≤0.014/0.06	≤0.12/≤0.12	≤0.12/0.25	≤0.01/≤0.01	0.03/0.06	0.03/0.03	0.015/0.03
<i>C. glabrata</i> (n=1217)		0.12/0.25	≤0.12/≤0.12	16/64	0.25/1	0.5/2	0.06/0.12	0.03/0.03
<i>C. nivariensis</i> (n=12)		0.12/0.25	0.5/1	4/4	0.06/0.12	0.12/0.25	0.06/0.12	0.015/0.03
<i>C. parapsilosis</i> (n=770)		0.06/0.12	≤0.12/0.25	0.5/2	≤0.01/0.06	0.06/0.12	0.25/1	0.25/0.5
<i>C. orthopsilosis</i> (n=43)		0.03/0.06	≤0.12/≤0.12	0.5/16	0.03/1	0.06/0.12	0.12/0.25	0.12/0.25
<i>C. metapsilosis</i> (n=42)		0.06/0.12	≤0.12/≤0.12	1/2	0.03/0.06	0.03/0.12	0.06/0.25	0.12/0.25
<i>C. tropicalis</i> (n=615)		0.06/0.12	≤0.12/32	0.5/4	0.03/0.25	0.06/0.25	0.03/0.06	0.03/0.03
<i>C. krusei</i> (n=328)	<i>Pichia kudriavzevii</i>	0.12/0.25	2/4	32/64	0.25/0.5	0.12/0.25	0.12/0.25	0.06/0.12
<i>C. inconspicua</i> (n=41)		0.12/0.25	2/4	16/32	0.12/0.5	0.12/0.12	0.03/0.06	0.03/0.03
<i>C. kefyr</i> (n=165)	<i>Kluyveromyces marxianus</i>	0.06/0.12	0.5/8	0.25/1	≤0.01/≤0.01	0.06/0.12	0.015/0.03	0.03/0.06
<i>C. guilliermondii</i> (n=107)	<i>Meyerozyma guilliermondii</i>	0.03/0.06	≤0.12/≤0.12	8/64	0.06/0.5	0.25/0.5	0.06/0.25	0.12/0.25
<i>C. fermentati</i> (n=33)	<i>Meyerozyma caribbica</i>	0.12/0.25	≤0.12/≤0.12	8/64	0.12/2	0.25/0.5	0.12/0.5	0.25/2
<i>C. lusitanae</i> (n=197)	<i>Clavispora lusitanae</i>	0.06/0.25	≤0.12/0.5	0.25/0.5	≤0.01/0.03	0.03/0.06	0.03/0.06	0.03/0.06
<i>C. haemulonii</i> (n=42)		0.5/2	≤0.12/0.25	32/≥64	≥8/≥8	2/≥8	0.03/0.06	0.06/0.06
<i>C. haemulonii</i> type II (n=41)	<i>Candida duobushaemulonii</i>	2/8	≤0.12/≥64	32/≥64	≥8/≥8	4/≥8	0.015/0.03	0.03/0.06
<i>C. palmiophila</i> (n=20)		0.12/0.5	≤0.12/0.5	8/32	0.12/0.25	0.12/0.25	0.06/0.25	0.03/0.25
<i>Pichia jadinii</i> (n=23)	<i>Cyberlindnera jadinii</i>	0.06/0.12	≤0.12/1	1/4	0.06/0.12	0.12/0.25	0.015/1	0.015/2
<i>C. pelliculosa</i> (n=33)	<i>Wickerhamomyces anomalus</i>	0.06/0.12	≤0.12/16	2/4	0.12/0.25	0.25/0.5	0.03/0.06	0.03/0.03
<i>Pichia ohmeri</i> (n=30)	<i>Kodamaea ohmeri</i>	0.06/0.06	≤0.12/1	4/16	0.03/0.12	0.06/0.12	0.12/≥8	0.06/0.12
<i>Pichia norvegensis</i> (n=18)		0.06/0.12	4/8	32/64	0.25/0.5	0.12/0.25	0.06/0.06	0.03/0.06
<i>S. cerevisiae</i> (n=58)		0.06/0.12	≤0.12/≤0.12	8/16	0.12/0.25	0.5/1	0.12/0.25	0.12/0.25
<i>C. lipolytica</i> (n=24)	<i>Yarrowia lipolytica</i>	0.5/2	16/≥64	4/8	0.06/0.12	0.25/1	0.12/0.5	0.25/0.25
<i>Geotrichum candidum</i> (n=34)	<i>Galactomyces candidus</i>	0.25/0.5	0.25/1	16/64	0.25/1	0.25/1	1/≥8	0.5/≥8
<i>G. capitatum</i> (n=54)	<i>Magnusiomyces capitatus</i>	0.25/0.5	≤0.12/0.25	8/16	0.06/0.5	0.12/1	≥8/≥8	≥8/≥8
<i>G. clavatum</i> (n=167)	<i>Saprochaete clavata</i>	0.25/0.5	0.25/1	32/64	0.5/2	0.5/1	≥8/≥8	≥8/≥8
<i>Cr. neoformans</i> var. <i>grubii</i> (n=903)		0.12/0.5	4/16	4/8	0.06/0.12	0.06/0.25	≥8/≥8	4/≥8
<i>Cr. neoformans</i> var. <i>neoformans</i> (n=195)		0.12/0.25	4/16	1/4	≤0.015/0.06	0.03/0.12	≥8/≥8	1/4
<i>Cr. neoformans</i> hybrides AD (n=173)		0.12/0.25	4/8	4/8	0.03/0.12	0.06/0.25	≥8/≥8	4/≥8
<i>Cr. gattii</i> (n = 28)		0.12/0.25	2/8	8/16	0.12/0.5	0.25/0.5	≥8/≥8	≥8/≥8
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i> (n=50)		0.25/0.5	0.25/0.5	≥64/≥64	2/4	1/2	≥8/≥8	≥8/≥8
<i>Trichosporon asahii</i> (n=55)		2/≥8	32/≥64	4/16	0.06/0.25	0.25/0.5	≥8/≥8	4/≥8

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

L'isavuconazole est le dernier azolé commercialisé et n'est testé au CNRMA que depuis janvier 2015. Nous présentons donc ici la comparaison des CMI sur des espèces pour lesquelles plus de 10 isolats ont été testés en parallèle avec les différents azolés (**Tableau 12**). Sur ces espèces, les CMI de l'isavuconazole sont équivalentes à celles du voriconazole sauf sur les isolats de *S. cerevisiae* pour lesquels elles sont un peu plus basses, ceux de *C. neoformans* pour lesquels elles sont un peu plus élevées, mais surtout ceux de *M. capitatus* ou *S. clavata* pour lesquels elles sont très nettement plus élevées¹⁵.

Tableau 12 : Profil de sensibilité des levures à 4 azolés, dont l'isavuconazole

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

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

Résultats de la surveillance des résistances aux antifongiques pour les filamenteux

Depuis 2003, le CNRMA a déterminé la sensibilité à 8 antifongiques systémiques de plus de 2700 isolats de champignons filamenteux (**Tableau 13**). Les données sur l'isavuconazole sont présentées plus loin dans un tableau séparé car le nombre de souches est plus limité.

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.

¹⁵ Desnos-Ollivier M, Bretagne S, Boullié A, Gautier C, Dromer F, Lortholary O, French Mycoses Study Group (2019) Isavuconazole MICs distribution of 29 yeast species responsible for invasive infections (2015-2017). *Clin Microbiol Infect* (sous presse)

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

Tableau 13 : Profil de sensibilité des champignons filamenteux aux antifongiques
(MAJ 04/02/2019)

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=14)	0.5/1	1/≥8	≥8/≥8	0.5/1	≥8/≥8	≥8/≥8	0.12/0.25
<i>Lichtheimia corymbifera</i> (n=68)	0.5/0.5	1/4	≥8/≥8	0.5/0.5	≥8/≥8	≥8/≥8	0.5/1
<i>Lichtheimia ornata</i> (n=7)	0.25/-	0.5/-	≥8/-	0.5/-	≥8/-	≥8/-	0.5/-
<i>Lichtheimia ramosa</i> (n=66)	0.12/0.25	2/≥8	≥8/≥8	0.5/1	≥8/≥8	≥8/≥8	1/2
<i>Mucor circinelloides</i> (n=68)	0.03/0.12	≥8/≥8	≥8/≥8	1/≥8	≥8/≥8	≥8/≥8	≥8/≥8
<i>Mucor indicus</i> (n=15)	0.06/0.12	≥8/≥8	≥8/≥8	1/2	≥8/≥8	≥8/≥8	≥8/≥8
<i>Mucor</i> spp. (n=10)	0.12/0.25	≥8/≥8	≥8/≥8	2/≥8	≥8/≥8	≥8/≥8	≥8/≥8
<i>Rhizomucor pusillus</i> (n=55)	0.06/0.12	0.5/1	≥8/≥8	0.25/0.5	≥8/≥8	≥8/≥8	0.25/0.5
<i>Rhizomucor miehei</i> (n=8)	0.03/-	0.03/-	2/-	0.06/-	≥8/-	2/-	0.25/-
<i>Rhizopus arrhizus</i> (n=91)	0.12/0.25	1/≥8	8/≥8	0.25/1	≥8/≥8	≥8/≥8	≥8/≥8
<i>Rhizopus microsporus</i> (n=53)	0.06/0.12	1/≥8	8/≥8	0.5/1	≥8/≥8	≥8/≥8	0.5/1
<i>Saksenaia vasiformis</i> complex (n=5)	8/-	0.25/-	8/-	0.12/-	≥8/-	≥8/-	0.25/-
<i>Syncephalastrum racemosum</i> (n=5)	0.03/-	≥8/-	≥8/-	0.5/-	≥8/-	≥8/-	0.5/-
<i>Acremonium</i> sp. (n=9)	4/-	≥8/-	2/-	≥8/-	≥8/-	≥8/-	4/-
<i>Alternaria infectoria</i> complex (n=26)	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=31)	0.5/1	0.5/2	2/4	0.25/0.5	0.5/≥8	0.25/≥8	4/≥8
<i>Aspergillus flavus</i> (n=140)	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 fischeri</i> (n=5)	1/-	0.5/-	0.5/-	0.25/-	0.5/-	0.03/-	0.12/-
<i>Aspergillus fumigatus</i> itraR (CMI>2mg/L) (n=82)	0.25/0.5	≥8/≥8	4/8	1/2	0.5/0.5	≤0.007/0.03	1/4
<i>Aspergillus fumigatus</i> (n=265)	0.25/0.5	0.25/0.5	0.25/1	0.06/0.25	0.5/0.5	0.015/0.03	2/4
<i>Aspergillus nidulans</i> (n=32)	2/4	0.12/0.5	0.12/0.25	0.12/0.5	0.5/4	0.015/0.06	0.12/0.5
<i>Aspergillus quadrilineatus</i> (n=16)	0.5/1	0.12/0.5	0.12/0.25	0.12/0.25	2/2	≤0.007/0.03	0.12/0.25
<i>Aspergillus calidoustus</i> (n=19)	1/2	≥8/≥8	4/8	≥8/≥8	1/≥8	0.015/0.12	0.25/0.5
<i>Aspergillus</i> section <i>Usti</i> (n=28)	0.5/1	2/≥8	4/8	≥8/≥8	2/≥8	0.25/≥8	0.25/0.5
<i>Aspergillus</i> section <i>Nidulantes</i> (n=6)	1/-	0.25/-	0.12/-	0.12/-	1/-	≤0.007/-	0.06/-
<i>Aspergillus</i> section <i>Nigri</i> (n=29)	0.25/0.5	0.5/4	0.5/1	0.25/0.5	0.25/0.5	0.015/0.5	0.12/0.5
<i>Aspergillus tamarii</i> (n=6)	0.5/-	0.03/-	0.25/-	0.03/-	0.25/-	≤0.007/-	≤0.01/-
<i>Aspergillus tubingensis</i> (n=19)	0.25/0.25	1/4	1/2	0.25/0.25	0.25/0.25	≤0.007/≤0.007	0.25/0.25
<i>Aspergillus terreus</i> (n=43)	4/8	0.06/0.25	0.5/1	0.06/0.12	0.5/1	≤0.007/0.03	0.06/0.12
<i>Aspergillus sydowii</i> (n=6)	2/-	0.5/-	0.5/-	0.25/-	0.12/-	≤0.007/-	0.06/-
<i>Aspergillus versicolor</i> (n=9)	1/-	0.25/-	0.25/-	0.12/-	0.5/-	0.03/-	0.25/-
<i>Aureobasidium pullulans</i> (n=7)	0.25/-	0.03/-	0.12/-	0.06/-	1/-	1/-	1/-
<i>Chaetomium</i> spp. (n=113)	2/8	0.12/0.5	0.25/1	0.12/0.5	1/2	0.12/0.5	2/16
<i>Curvularia</i> spp. (n=23)	0.06/0.25	0.25/≥8	0.5/2	0.12/0.5	0.5/2	0.06/1	0.5/2
<i>Doratomyces</i> spp. (n=5)	2/-	≥8/-	4/-	1/-	1/-	0.12/-	2/-
<i>Exophiala dermatitidis</i> (n=32)	0.12/0.25	0.5/1	0.06/0.5	0.12/0.5	4/≥8	1/≥8	0.06/0.25
<i>Exophiala jeanselmei</i> (n=8)	1/-	0.5/-	0.25/-	0.25/-	2/-	2/-	0.06/-
<i>Exophiala oligosperma</i> (n=5)	0.25/-	0.25/-	0.25/-	0.25/-	≥8/-	2/-	0.03/-
<i>Exophiala spinifera</i> (n=11)	0.12/0.25	0.03/-	0.12/0.25	0.25/-	2/2	0.25/2	0.06/-
<i>Fonseca monophora</i> (n=8)	0.25/-	≤0.01/-	0.06/-	0.06/-	0.5/-	0.5/-	0.03/-
<i>Fonsecaea pedrosoi</i> (n=7)	0.25/-	0.12/-	0.06/-	0.06/-	1/-	1/-	0.03/-
<i>Fonsecaea nubica</i> (n=11)	0.5/1	≤0.01/0.5	0.06/0.12	0.12/-	1/2	0.5/4	0.03/0.25

(suite)	AMB	Itra	Vori	Posa	Caspo	Mica	Terbi
<i>Fusarium fujikuroi</i> complex (n=144)	4/8	≥8/≥8	4/8	4/≥8	≥8/≥8	≥8/≥8	1/2
<i>Fusarium dimerum</i> complex (n=27)	0.5/0.5	≥8/≥8	2/8	≥8/≥8	≥8/≥8	≥8/≥8	0.5/1
<i>Fusarium incarnatum-equiseti</i> complex (n=5)	1/-	≥8/-	2/-	1/-	≥8/-	≥8/-	4/-
<i>Fusarium oxysporum</i> complex (n=163)	2/4	≥8/≥8	2/8	2/≥8	≥8/≥8	≥8/≥8	2/4
<i>Fusarium solani</i> complex (n=227)	4/8	≥8/≥8	8/≥8	≥8/≥8	≥8/≥8	≥8/≥8	≥8/≥8
<i>Lecytophora hoffmannii</i> (n=5)	0.25/-	0.25/-	1/-	0.25/-	2/-	2/-	0.5/-
<i>Lomentospora prolificans</i> (n=34)	8/≥8	≥8/≥8	8/≥8	≥8/≥8	4/≥8	4/≥8	≥8/≥8
<i>Medicopsis romeroi</i> (n=6)	0.5/-	4/-	0.5/-	1/-	4/-	2/-	0.12/-
<i>Microascus cirrosus</i> (n=7)	8/-	≥8/-	≥8/-	≥8/-	4/-	≥8/-	2/-
<i>Neoscytalidium</i> sp. (n=7)	0.12/-	≥8/-	0.12/-	0.5/-	0.5/-	0.12/-	0.5/-
<i>Purpureocillium lilacinum</i> (n=47)	8/≥8	2/≥8	0.25/0.5	0.25/0.5	≥8/≥8	2/≥8	0.25/0.5
<i>Paecilomyces variotii</i> (n=15)	0.06/0.5	0.12/0.5	8/≥8	0.12/0.5	2/4	0.03/0.25	1/8
<i>Penicillium</i> spp. (n=28)	0.5/8	1/≥8	8/≥8	1/≥8	2/≥8	0.12/2	0.25/1
<i>Penicillium chrysogenum</i> (n=7)	0.5/-	0.25/-	1/-	0.25/-	0.5/-	0.03/-	0.25/-
<i>Phaeoacremonium parasiticum</i> (n=15)	0.5/2	≥8/≥8	0.25/0.25	0.25/1	≥8/≥8	≥8/≥8	0.25/0.5
<i>Pleurostomophora richardsiae</i> (n=7)	0.25/-	0.25/-	0.5/-	0.25/-	4/-	1/-	1/-
<i>Pseudallescheria ellipsoidea</i> (n=8)	≥8/-	1/-	0.5/-	1/-	0.5/-	0.25/-	≥8/-
<i>Sarocladium kiliense</i> (n=10)	8/≥8	≥8/≥8	0.5/1	1/≥8	4/≥8	4/≥8	0.5/0.5
<i>Scedosporium boydii</i> (n=41)	8/≥8	0.5/4	0.25/0.5	0.5/1	1/2	0.25/1	≥8/≥8
<i>Scedosporium apiospermum</i> (n=101)	8/≥8	1/≥8	0.5/1	1/2	1/2	0.25/1	≥8/≥8
<i>Scedosporium aurantiacum</i> (n=6)	8/-	4/-	0.5/-	1/-	8/-	4/-	≥8/-
<i>Scedosporium dehoogii</i> (n=10)	8/≥8	0.5/1	0.25/0.5	0.5/1	2/2	0.25/0.5	≥8/≥8
<i>Scedosporium minutisporum</i> (n=5)	8/-	0.5/-	0.25/-	0.5/-	2/-	0.25/-	≥8/-
<i>Scopulariopsis brevicaulis</i> (n=18)	8/≥8	≥8/≥8	8/≥8	≥8/≥8	1/4	0.25/0.5	2/8
<i>Sporothrix schenckii</i> (n=19)	1/2	0.5/2	8/≥8	1/4	≥8/≥8	≥8/≥8	0.06/2
<i>Thermothelomyces thermophilus</i> (n=8)	1/-	0.12/-	0.12/-	0.06/-	4/-	0.5/-	2/-
<i>Trichoderma longibrachiatum</i> (n=21)	1/2	≥8/≥8	0.5/1	1/2	0.5/1	0.06/0.25	1/2
<i>Trichoderma</i> spp. (n=8)	1/-	≥8/-	1/-	8/-	0.5/-	0.06/-	2/-
<i>Hormographiella aspergillata</i> (n=5)	0.06/-	≥8	1/-	2/-	4/-	4/-	8/-
<i>Phaneroantia chrysosporium</i> (n=6)	0.03/-	0.12/-	0.06/-	0.25/-	≥8/-	≥8/-	4/-

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

Plusieurs isolats d'*A. fumigatus* ont des CMI élevées à l'itraconazole avec parfois une résistance croisée pour le voriconazole et le posaconazole. Nous avons séparé, dans le tableau, les souches pour lesquelles les CMI de l'itraconazole étaient élevées (>2 mg/L) de façon à mieux mettre en évidence le profil des souches sauvages puisque plus d'un tiers des souches d'*A. fumigatus* nous sont souvent envoyées dans un contexte d'échec thérapeutique ou de suspicion de résistance. **Dans ce tableau résumant les données sur les souches testées au CNR, la proportion élevée des souches d'*A. fumigatus* résistantes est donc totalement artificielle et ne reflète en rien la réalité épidémiologique en France.**

Certaines espèces émergentes, comme les *Aspergillus* de la section *Usti*, ont des profils de sensibilité particuliers avec des CMI élevées pour tous les azolés et les échinocandines. Les *Fusarium* spp. et *Lomentospora prolificans* sont caractérisés par une résistance à la plupart des antifongiques systémiques, y compris les nouveaux azolés et les échinocandines. Les dématiés ont globalement une bonne sensibilité à l'amphotéricine B et aux azolés. On peut remarquer que l'activité des différents azolés n'est pas superposable, même pour une espèce donnée. Certaines espèces ont des CMI basses pour l'itraconazole et le posaconazole et des CMI hautes pour le voriconazole (Mucorales, *Exophiala dermatitidis*, ou la forme mycélienne de *Sporothrix schenckii*). A l'inverse, des CMI basses pour le voriconazole et hautes pour l'itraconazole et le posaconazole sont observées pour d'autres espèces (*Trichoderma* spp.).

Dans la mesure où l'isavuconazole n'a été testé que depuis janvier 2015, nous présentons la comparaison des CMI sur des espèces pour lesquelles plus de 5 isolats ont été testés en parallèle avec les différents azolés (Tableau 14). Sur ces espèces, les CMI de l'isavuconazole sont très élevées et comparables à celles du voriconazole et de l'itraconazole sur les *Mucorales* et sur les *Fusarium* spp. Pour les autres espèces testées, les CMI de l'isavuconazole sont la plupart du temps plus hautes que pour tout ou partie des autres azolés, ce qui, rappelons-le, ne préjuge pas de l'activité *in vivo* de cet antifongique étant données les différences de pharmacocinétique.

Tableau 14 : Profil de sensibilité des filamenteux à 4 azolés, dont l'isavuconazole
pour les espèces pour lesquelles au moins 5 isolats ont été testés depuis janvier 2015 (MAJ 04/02/2019)

Espèce (nbre d'isolats)	Valeurs des CMI ₅₀ /CMI ₉₀ (mg/L) pour les azolés			
	Posaconazole	Itraconazole	Voriconazole	Isavuconazole
<i>Cunninghamella bertholletiae</i> (n=8)	0.5/-	8/-	≥8/-	≥8/-
<i>Lichtheimia corymbifera</i> (n=24)	0.5/0.5	0.5/2	≥8/≥8	4/≥8
<i>Lichtheimia ramosa</i> (n=16)	0.5/0.5	1/≥8	≥8/≥8	4/≥8
<i>Mucor circinelloides</i> (n=35)	2/≥8	≥8/≥8	≥8/≥8	≥8/≥8
<i>Mucor indicus</i> (n=12)	1/2	≥8/≥8	≥8/≥8	≥8/≥8
<i>Rhizopus arrhizus</i> (n=32)	0.25/1	2/≥8	≥8/≥8	2/≥8
<i>Rhizopus microsporus</i> (n=18)	0.5/≥8	1/≥8	8/≥8	2/≥8
<i>Rhizomucor pusillus</i> (n=11)	0.25/0.25	0.5/0.5	≥8/≥8	4/≥8
<i>Alternaria alternata</i> complex (n=5)	0.25/-	0.5/-	2/-	4/-
<i>Aspergillus calidoustus</i> (n=15)	≥8/≥8	≥8/≥8	4/8	2/4
<i>Aspergillus flavus</i> (n=63)	0.125/0.125	0.125/0.25	0.5/1	0.5/1
<i>Aspergillus fumigatus</i> non Ritra (n=73)	0.06/0.12	0.25/0.5	0.25/1	0.5/1
<i>Aspergillus fumigatus</i> Ritra (n=37)	0.5/2	≥8/≥8	4/8	8/8
<i>Aspergillus nidulans</i> (n=7)	0.06/-	0.125/-	0.125/-	0.125/-
<i>Aspergillus</i> section <i>Nigri</i> (n=8)	0.125/-	0.5/-	0.5/-	1/-
<i>Aspergillus quadrilineatus</i> (n=6)	0.06/-	0.06/-	0.06/-	0.125/-
<i>Aspergillus terreus</i> (n=12)	0.06/0.12	0.06/0.25	0.5/1	0.5/1
<i>Aspergillus tubingensis</i> (n=12)	0.25/0.5	0.5/4	1/2	2/≥8
<i>Chaetomium</i> sp. (n=5)	0.06/-	0.06/-	0.25/-	0.25/-
<i>Curvularia</i> sp. (n=8)	0.03/-	0.06/-	0.5/-	1/-
<i>Exophiala dermatitidis</i> (n=7)	0.06/-	0.12/-	0.25/-	1/-
<i>Fonsecaea monophora</i> (n=6)	≤0.01/-	0.015/-	0.06/-	0.03/-
<i>Fonsecaea nubica</i> (n=7)	0.03/-	0.015/-	0.06/-	0.03/-
<i>Fusarium dimerum</i> complex (n=11)	≥8/-	≥8/≥8	2/4	≥8/≥8
<i>Fusarium fujikuroi</i> complex (n=43)	2/≥8	≥8/≥8	4/8	≥8/≥8
<i>Fusarium oxysporum</i> complex (n=55)	2/≥8	≥8/≥8	2/4	≥8/≥8
<i>Fusarium solani</i> complex (n=84)	≥8/≥8	≥8/≥8	8/≥8	≥8/≥8
<i>Lomentospora prolificans</i> (n=10)	≥8/-	≥8/-	8/≥8	≥8/≥8
<i>Scedosporium apiospermum</i> (n=39)	0.5/1	0.5/≥8	0.5/0.5	2/4
<i>Scedosporium boydii</i> (n=9)	0.25/-	0.25/-	0.12/-	1/-
<i>Scopulariopsis brevicaulis</i> (n=6)	2/-	≥8/-	4/-	4/-
<i>Phaeoacremonium parasiticum</i> (n=7)	0.5/-	≥8/-	0.25/-	2/-
<i>Purpureocillium lilacinum</i> (n=21)	0.25/0.5	8/≥8	0.25/0.5	0.5/2
<i>Trichoderma longibrachiatum</i> (n=5)	1/-	≥8/-	0.5/-	≥8/-

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

Analyse des tendances

L'analyse de 16 années de surveillance de la sensibilité aux antifongiques de quatre des principales espèces de *Candida* responsables de fongémies en Ile-de-France (ODL) ne met pas en évidence d'évènements inhabituels (**Tableau 15, Figure 19**). Pour *Candida albicans*, il existe une proportion très faible (0,5%) d'isolats résistants aux antifongiques azolés prescrits en thérapeutique (fluconazole et voriconazole). Il n'existe donc pas d'argument microbiologique contre l'utilisation des azolés pour les infections profondes à *C. albicans*. De même, la résistance aux candines (casposfungine et micafungine) de *C. albicans* reste exceptionnelle. Il n'existe pas de souche sauvage de *C. albicans* ayant une sensibilité diminuée à la casposfungine sans pression antifongique antérieure.

La résistance de *C. glabrata* au fluconazole diminue (actuellement <4% des isolats avec une CMI>32mg/L) à l'opposé de ce qui est apporté dans d'autres pays, en particulier aux USA. La prévalence de la résistance de *C. glabrata* aux échinocandines reste globalement faible (2,2%).

La résistance au fluconazole et au voriconazole concerne un petit pourcentage des isolats de *Candida parapsilosis* (en moyenne 6,9% et 6,1% respectivement), avec des variations selon les années, mais aucune tendance significative à la hausse contrairement à ce qui est rapporté dans d'autres pays. Il importe donc de surveiller ce phénomène car le fluconazole représente actuellement la proposition thérapeutique de première ligne selon les recommandations internationales. On rappelle que le complexe *parapsilosis* est intrinsèquement de moindre sensibilité ou résistant aux échinocandines.

Pour *Candida tropicalis*, on note une prévalence variable de résistance aux deux azolés testés selon les années mais une tendance globale à la baisse de ce phénomène. Les isolats résistants à la casposfungine sont extrêmement rares.

Tableau 15 : Proportion d'isolats de levures "résistants" selon les seuils EUCAST
Analyse des CMI du fluconazole, voriconazole et casposfungine des isolats collectés dans l'ODL

Espèces	Fluconazole		Voriconazole		Caspofungine	
	Seuil mg/L	% R [extrêmes]	Seuil mg/L	% R [extrêmes]	Seuil mg/L	% R [extrêmes]
<i>C. albicans</i>	> 4	0,4 % [0 - 1,2]	> 0,25	0,5 % [0 - 2,4]	> 0,25	0,3 % [0 - 1,8]*
<i>C. glabrata</i>	> 32	16,5 % [2 - 28,3] *#	-	-	> 0,25	2,2 % [0 - 7,3]
<i>C. parapsilosis</i>	> 4	6,9 % [0 - 18,9] *	> 0,25	2,5 % [0 - 6,8]	-	-
<i>C. tropicalis</i>	> 4	6,1 % [0 - 15,6] *#	> 0,25	8,9 % [0 - 27,8] *#	> 0,25	0,6 % [0 - 3,4]

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

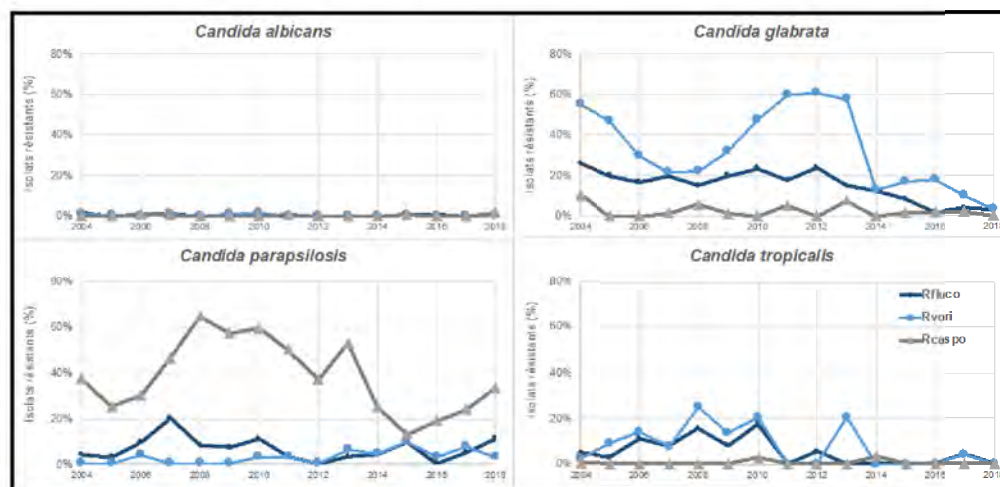


Figure 19 : Evolution du pourcentage d'isolats "résistants"
Analyses des données de l'ODL (2004-2018)

Pour *A. fumigatus*, le CNRMA n'a pas mis en place d'observatoire, mais les quelques études régionales de monitoring systématique prouvent que le phénomène de résistance ne concerne qu'une très petite proportion des isolats cliniques des patients immunodéprimés. Sur les 1409 aspergilloses invasives recensées depuis 2012 dans RESSIF, 633 ont eu une culture positive à *A. fumigatus*, et seuls 14 patients étaient infectés par une souche Azole-R (soit 2.2%). On peut donc dire que l'incidence de la résistance aux azoles reste très contenue en France en ce qui concerne les isolats responsables d'infections invasives. Une généralisation des prophylaxies antifongiques chez les patients d'hématologie peut faire craindre une plus grande fréquence d'infection à *A. fumigatus* résistant justifiant la poursuite de la surveillance. La principale source de résistance décrite dans plusieurs pays est l'usage d'antifongiques azolés dans l'agriculture et la floriculture. Les patients s'infectent alors d'emblée avec des isolats résistants ayant des mutations assez monomorphes dans le gène *cyp51A*.

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

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. Les surveillances faites au CNRMA ne font donc pas l'objet d'une confrontation de données en cours d'année, sauf en cas de phénomènes anormaux ce qui survient régulièrement.

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

3.5 Enquêtes ou études ponctuelles concourant à la surveillance

Cas groupés d'infection à S. clavata

En janvier 2018, un centre hospitalier a signalé au CNRMA des cas groupés d'infections invasives dues à *S. clavata*. Les souches issues d'hémoculture de 3 patients prélevées en décembre 2017 dans un même service, ainsi qu'une souche isolée chez un autre patient en avril 2017, ont été envoyées au CNRMA pour vérifier si ces souches appartenaient au clone responsable de l'épidémie nationale décrite en 2012. Le CNRMA a rapidement confirmé par RT-PCR que les 4 souches n'appartenaient pas au clone responsable de l'épidémie décrite en 2012 et rapportée avec SPF¹.

Les prélèvements effectués dans l'environnement hospitalier sur les conseils du CNRMA ont mis en évidence la présence de *S. clavata* dans les lave-vaisselles de l'hôpital ainsi que dans des thermos et brocs de lait et de café utilisés dans le service où étaient hospitalisés les patients. Au total, 10 souches de l'environnement hospitalier (lave-vaisselle, broc de lait, thermos de café) ont été isolées entre le 26 décembre 2017 et le 4 janvier 2018. Des isolats cliniques supplémentaires des mêmes patients ainsi que

d'autres patients prélevés entre janvier et juin 2018 ont ensuite été envoyés au CNRMA pour une étude génétique des souches. Au total, le génome entier a été séquencé pour les isolats cliniques de *S. clavata* provenant de 8 patients (1 – 3 isolats/patient), principalement des hémocultures isolées entre janvier 2017 et janvier 2018, ainsi que les souches cliniques de deux autres patients provenant du même hôpital mais isolées en janvier 2015 et février 2016 et 10 souches environnementales isolées entre décembre 2017 et janvier 2018 dans l'hôpital. D'autres souches épidémiologiquement non liées ont été ajoutées de façon à compléter le panel.

Le séquençage des génomes entiers par technique Illumina a été réalisé par la plateforme P2M de l'Institut Pasteur (responsable Vincent Enouf). L'analyse des données a été faite en collaboration avec Alexis Crisucuolo (bioinformaticien). Le génome de la souche type (CBS425.71) ainsi que celui de souches appartenant aux deux clades décrits en 2012 (souche CNRMA12.647 appartenant au clade épidémique de 2012, clade A ; souche CNRMA12.304 appartenant au clade B) ont été utilisés comme génome de référence.

L'analyse phylogénétique montre que les souches cliniques et environnementales isolées à l'hôpital de Marseille entre janvier 2017 et juin 2018 appartiennent toutes à un même clade différent des clades A et B précédemment décrits, suggérant une source commune sans doute d'origine environnementale. De plus, l'analyse a permis d'établir que les deux souches cliniques isolées dans le même hôpital en 2015 et 2016 ne sont pas liées aux souches de 2017 et 2018 suggérant dans ce cas des infections sporadiques. Ces résultats ont été transmis aux responsables du service pour une remise à plat des circuits de nettoyage de la vaiselle utilisé, et aucun cas n'a été détecté depuis.

Surveillance de Candida auris : enquête sur les pratiques hospitalières en mycologie

Candida auris est une levure ascomycète appartenant à l'ordre des Saccharomycétales dans le clade Metschnikowiaceae, proche des espèces du « complexe » *Candida haemulonii*, décrite en 2009 par Sathoh et al. isolée de l'oreille externe d'un patient.

Depuis 2011, des épidémies dues à *C. auris* ont été décrites en Inde, Corée du Sud, Venezuela, Afrique du Sud, Angleterre. Les résultats des études génomiques montrent que les souches sont séparées en différents clades (différents de plusieurs milliers de SNPs) selon l'origine géographique mais qu'au sein d'un clade les souches sont clonales. Les souches de *C. auris* sont très persistantes dans l'environnement autour des lits des patients pouvant entraîner des réinfections des patients, mais également la transmission entre patients. De plus, cette espèce présente une moindre sensibilité *in vitro* à plusieurs classes d'antifongiques d'où l'importance d'une identification rapide de l'espèce.

Le CNRMA a été sollicité pour savoir si de tels phénomènes pouvaient survenir en France. Il a donc réalisé une enquête avec l'outil WEPI (EpiConcept) auprès de 119 correspondants habituels ou occasionnels du CNRMA dont les mails étaient connus. Ces correspondants travaillaient dans 70 laboratoires situés en France métropolitaine et dans les territoires ultramarins. Les 59 laboratoires hospitaliers qui ont répondu (39 CHU, 20 CHG) incluaient 35 laboratoires/secteurs de mycologie, et 24 laboratoires de microbiologie polyvalents. L'objet principal de cette enquête était de savoir si les laboratoires de microbiologie pouvaient ou non passer à côté de l'isolement et de l'identification de cette levure.

Prélèvements-analyse des pratiques

Dans les cas où les prélèvements (superficiels ou profonds) sont réalisés en bactériologie, la transmission au service de mycologie pour identification, s'il s'agit d'une structure distincte, dépend des pratiques locales et du contexte : souvent systématique s'il s'agit d'un prélèvement profond ou d'un patient connu, mais parfois seulement à la demande du clinicien ou si le nombre de colonies de levures est jugé important en bactériologie (seuil arbitraire pour les levures souvent fixé à $>10^3$).

Les cartographies à visée mycologique sont pratiquées par 80% des centres (47/59), mais les rythmes dépendent du centre, du type de patient, du prescripteur et du service. Les services les pratiquant le plus communément sont les services de réanimation (près de 70%) et les services d'hématologie (42%), ainsi

que les services de grands brûlés, les services de réanimation néonatale ou dans des situations particulières (bilan pré-greffe, neutropénie, onco-hématologie pédiatrique). Le site prélevé le plus constamment ($\geq 75\%$ des cas) est l'anus (remplacé par les selles pour les patients d'hématologie), suivi de la bouche et des urines, les plis n'étant prélevés avec constance que chez les patients de réanimation. Si ces prélèvements parviennent au laboratoire de mycologie, toutes les levures sont identifiées au niveau de l'espèce.

Les recherches conjointes de levures sont en revanche rarement faites (<20%) chez un patient porteur de bactéries carbapénemase/BMR/BHR ou venant d'un pays à risque pour les BMR/BHR, un contexte rapporté comme à risque de colonisation à *C. auris*. L'utilisation de milieu spécifique mycologique est exceptionnelle rendant improbable la détection de *C. auris*.

Identification-analyse des pratiques

Tous les laboratoires identifient les isolats de levures jusqu'à l'espèce dans le cadre d'infections profondes. La grande majorité des laboratoires identifient aussi les levures isolées de sites superficiels dans le cadre de la surveillance quel que soit le nombre de colonies isolées, même si certains ne le font que si le contexte le justifie ou s'il y a plus de 10 colonies sur la boîte. La démarche d'identification se poursuit par l'analyse des profils MALDI-TOF si la couleur sur milieu chromogène suggère une espèce non-*albicans* (un tiers des centres (32%) pour un prélèvement superficiel et 10% pour un prélèvement profond) alors que l'analyse au MALDI-TOF est systématique pour les autres centres. Les centres sont équipés majoritairement de biotyper Brucker (n=42) dont la base de données contient quelques spectres de *C. auris*, mais aussi du VITEK MS de bioMérieux (n=14) et de l'appareil Andromas (n=2). L'appareil Andromas n'est plus commercialisé et les bases de données sont donc par définition obsolètes, et la base de données du VITEK MS vient seulement (avril 2019) d'être mise à jour avec un ou des spectres de *C. auris*. Il y a donc un réel danger de passer à côté du diagnostic si les contrats de maintenance ne prévoient pas de mises à jour régulières. Il faut donc rappeler ici qu'il est important d'obtenir les dernières mises à jour des bases de données, et de contacter le CNRMA en cas de doute.

Les centres ne font d'analyse des séquences nucléotidiques que si l'espèce est rare et/ou que le score au MALDI-TOF est mauvais. Les trois contextes évocateurs de *C. auris* sont l'identification d'une espèce souvent confondue avec *C. auris* (88%), une résistance aux antifongiques (84%), ou un mauvais score MALDI-TOF (76%) mais rarement le fait qu'il s'agisse d'une levure ne filamentant pas (14%) ou isolée d'un patient porteur de BMR/BHR (10%).

La grande majorité des centres (85%) enverrait une levure suspecte d'être un *C. auris* pour confirmation d'identification dans un centre expert ou au CNRMA, et tous sont conscients que cela justifierait un signalement aux équipes d'hygiène hospitalière et/ou au CNRMA.

Conclusion

Candida auris apparaissant comme un risque associé à des patients provenant de pays connus comme endémiques pour cette levure et aux pratiques d'hygiène dans les services les hébergeant, les pratiques actuelles n'apparaissent pas comme optimales pour la détection de colonisation par *C. auris* en France. L'absence de description d'épidémies hexagonales est peut-être liée aux mesures prises pour les BMR/BHR qui, de fait, sont efficaces pour éradiquer *C. auris*. En revanche, il est peu probable que *Candida auris* ait pu être responsable d'infections profondes ignorées en raison de la démarche d'identification suivie en mycologie, même si des améliorations techniques sont possibles.

La connaissance des questions posées par *C. auris* apparaît satisfaisante par les correspondants habituels ou occasionnels du CNRMA. Il semble peu probable que des cas connus n'aient pas été signalés.

Mise en œuvre d'une PCR en temps réel permettant d'identifier *C. auris*

En 2017, Kordalewska et al.¹⁶ ont décrit une PCR en temps réel utilisant deux couples d'amorces dessinées dans le gène codant l'ARN ribosomique et amplifiant une partie de la région 5.8S, la totalité de la région ITS2 et une partie de la région 26S : le premier couple d'amorces est spécifique de *C. auris* tandis que l'autre couple d'amorces permet l'amplification des espèces proches en phylogénie ou en phénotypie (*C. haemulonii*, *C. duobushaemulonii*, *C. pseudohaemulonii*, *C. lusitanae*).

Au CNRMA, nous utilisons cette PCR en temps réel sur un thermocycleur LC480 (Roche) à partir d'ADN extrait de culture pure (1ng d'ADN). Cette technique nous permet à partir d'une culture de levures de confirmer ou d'infirmer la présence éventuelle de *C. auris* en moins de 3 heures. Cependant cette PCR n'est pas utilisable à partir d'un échantillon primaire.

Nous l'avons mise en œuvre 2 fois en 2018.

Cas groupés de candidoses à *Candida albicans*

En novembre 2018, le CNRMA a été sollicité pour des cas groupés d'infections à *C. albicans* chez des nouveaux-nés. Au total, 7 enfants étaient concernés dont 2 couples de jumeaux et 3 autres enfants. Les cliniciens souhaitaient savoir s'il existait une source commune d'infection pour renforcer les mesures d'hygiène éventuellement nécessaires et les orienter. Le génotypage par 5 marqueurs microsatellites a permis d'écarter l'hypothèse d'une source commune pour les 7 patients (Tableau 16). En effet, 4 profils moléculaires distincts ont été identifiés avec des souches identiques pour les deux paires de jumeaux, suggérant une contamination materno-fœtale dans le cas des jumeaux. Cependant chez 2 patients ayant des infections cutanées, les souches isolées à seulement 4 jours d'intervalle étaient identiques laissant supposer une éventuelle source commune comme par exemple une transmission par manu portage du personnel soignant. Aucune nouvelle infection n'a été signalée après renforcement des mesures d'hygiène.

Tableau 16 : Analyse des isolats de *C. albicans* (cas groupés en néonatalogie)

Contexte	Numéro patient	site	Date d'isolement	Commentaires
Jumeaux	Pat1	poumon	30/10/2018	souches identiques / jumeaux
	Pat2	peau	18/09/2018	
Jumeaux	Pat3	peau	29/10/2018	souches identiques / jumeaux
		liq gastrique	30/10/2018	
		placenta	24/10/2018	
	Pat4	liq gastrique	30/10/2018	
		placenta	20/10/2018	
	Pat5	peau	10/10/2018	souches identiques pour Pat5 et Pat6
		pus gorge	12/10/2018	
	Pat6	peau	14/10/2018	
	Pat7	organe génital externe	09/11/2018	souche unique et différente de toutes les autres

4 Alerte

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

¹⁶ Kordalewska M, Zhao Y, Lockhart SR, Chowdhary A, Berrio I, Perlin DS (2017) Rapid and accurate molecular identification of the emerging multidrug-resistant pathogen *Candida auris*. *J Clin Microbiol* 55:2445–2452.

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

- Une suspicion de colonisation à *C. auris* a été rapidement levée grâce à la RT-PCR mise en place au CRMA (souche envoyée comme *C. haemulonii* et confirmée comme telle)
- Les cas groupés d'infections à *S. clavata* ont été notifiés à SPF et au CNRMA. L'identification a rapidement confirmé qu'il ne s'agissait pas du clone épidémique de 2012 (cf. description plus haut).
- Des cas sporadiques d'infections invasives à *S. clavata* ont justifié l'implication du CNRMA en urgence. Dans chaque cas, le CNRMA a rendu le résultat (souche n'appartenant pas au clone épidémique de 2012) au centre concerné et à SPF s'il y avait eu un signalement.
- Le CNRMA a été sollicité en raison d'au moins un cas d'histoplasmosse aiguë (prouvée par isolement du champignon), et de plusieurs cas suspects au retour du Mexique. Les voyageurs faisaient partie d'un voyage organisé et avaient visité des grottes au Mexique. Cet incident a fait l'objet d'un signalement du CNRMA auprès de SPF. Le département de maladies infectieuses tropicales de SPF a pris en charge le contact avec l'ONG concernée et les patients. La Direction Générale de la Santé s'est impliquée en envoyant en particulier un courrier rédigé par les experts du CNRMA recommandant aux patients, symptomatiques ou asymptomatiques, de contacter un médecin et d'être conscients du contexte épidémiologique et du fait que qu'il leur faudra notifier ce contact aux médecins qui les prendraient en charge pour une pathologie sévère, y compris dans un futur lointain.

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

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

5.1 Conseil et expertise aux professionnels de santé

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

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

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

Une réunion annuelle est organisée pour les partenaires des réseaux de surveillance active RESSIF et ODL. Elle permet de faire le point sur le fonctionnement des réseaux et de discuter des points d'amélioration, des études à prévoir. Elle fait l'objet d'un compte-rendu envoyé à tous les partenaires.

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

5.2 Conseil et expertise aux autorités sanitaires

Au plan national

- A la demande de l'agence danoise de l'environnement, l'ANSES formé un groupe de travail étudiant le lien potentiel entre l'usage des fongicides azolés en agriculture et l'augmentation éventuelle de l'incidence des aspergilloses multi-résistantes aux azolés (MARAF) chez les patients immunodéprimés. Fanny Lanternier et Stéphane Bretagne ont donc rejoint ce groupe d'experts.
- A la demande du Haut Commissariat de Santé Publique, Françoise Dromer fait partie des experts sollicités pour le groupe de travail sur *Candida auris*.

Au plan international

- **EUCAST** : Nous participons activement en tant que représentants pour la France à l'AFST (AntiFungal Susceptibility Testing) sous-comité de l'EUCAST (European Committee for Antibiotic Susceptibility Testing). Ce comité regroupe 1 à 2 membres par pays (environ 15 pays sont représentés et Olivier Lortholary est notre représentant).
- **ECMM**
 - Fanny Lanternier, Alexandre Alanio et Stéphane Bretagne ont participé à la rédaction de recommandations ECMM sur le diagnostic et la prise en charge thérapeutique des mucormycoses (Global guideline for the diagnosis and management of mucormycosis: An initiative of the European Confederation of Medical Mycology in cooperation with the Mycoses Study Group Education and Research Consortium, révision en cours).
 - Olivier Lortholary, membre expert des recommandations européennes (ESCMID-ECMM-ERS guideline) sur le diagnostic et la prise en charge des aspergilloses¹⁷.
- **eCDC** :
 - Françoise Dromer a été sollicitée par SPF et l'eCDC pour contribuer au bilan sur la situation épidémiologique et les recommandations européennes concernant *C. auris*¹⁸
 - Stéphane Bretagne a fait partie du groupe d'experts sollicités par l'eCDC sur [l'évaluation des risques concernant les aspergilloses invasives compliquant des gripes graves](#)¹⁹
- **EORTC** : le CNRMA est actif au sein du groupe d'étude des antifongiques de l'Organisation Européenne de Recherche et de Lutte contre le Cancer (EORTC) à Bruxelles. Olivier Lortholary a notamment participé à l'établissement du consensus des définitions des infections fongiques invasives (2008, 2013). Olivier Lortholary et Stéphane Bretagne sont co-auteurs d'une mise à jour des définitions (soumission en cours).
- **ECIL**: Fanny Lanternier a participé à l'ECIL-8 : update of fungal infections in pediatric haematology patients
- **ISHAM** :
 - Dea Garcia-Hermoso représente le CNRMA dans le groupe de travail « Joined ECMM/ISHAM Working Group » sur les infections à *Pseudallescheria/Scedosporium*

¹⁷ Diagnosis and management of Aspergillus diseases: executive summary of the 2017 ESCMID-ECMM-ERS guideline (2018) *Clin Microbiol Infect* 24 Suppl 1:e1-e38.

¹⁸ Kohlenberg A et al (2018) *Candida auris*: epidemiological situation, laboratory capacity and preparedness in European Union and European Economic Area countries, 2013 to 2017. *Euro Surveill* 23(13):41.

¹⁹ Rapid risk assessment: Influenza-associated invasive pulmonary aspergillosis, Europe: <https://ecdc.europa.eu/en/publications-data/rapid-risk-assessment-influenza-associated-invasive-pulmonary-aspergillosis>

- Dea Garcia-Hermoso est membre du groupe de travail sur « Barcoding and identification of fungi »
- Françoise Dromer et Marie Desnos-Ollivier sont membres du groupe de travail sur le génotypage des souches cliniques et environnementales de *C. neoformans* et *C. gattii*.

5.3 Activité de formation

Les responsables et collaborateurs du CNRMA contribuent au travers de conférences, colloques, séminaires et cours nationaux et internationaux à la formation de cliniciens et microbiologistes à la mycologie médicale. Ainsi, les collaborateurs hospitalo-universitaires participent à différents DU (en particulier le DU de mycologie médicale de Paris V), DURPI, DESC et même au summer school de l'ESCMID.

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

6.1 Activités de recherche en 2018 en lien direct avec les missions et activités du CNR

Aspergillose et allogreffe

L'aspergillose invasive (AI) est particulièrement représentée dans les suites de l'allogreffe de moelle (allogeneic stem cell transplantation : allo-HSCT) en raison de l'immunodépression qu'elle induit. Pour élucider les facteurs potentiellement associés avant ou après l'allo-HSCT, une étude conjointe entre le CNRMA et la Société Française de Greffe de Moelle (SFGM) a été menée. Les aspergilloses ont été identifiées à travers le réseau SAIF (Surveillance des Aspergilloses Invasives en France) avec les documentations mycologiques nécessaires pour les classer selon les critères internationaux. D'un autre côté, la SFGM tient à jour l'ensemble des greffes pratiquées avec de nombreuses données sur la maladie sous-jacente, les conditionnements et l'évolution. Cela a permis une étude cas-contrôle multicentrique, avec 185 AI prouvées ou probables appariées à quatre contrôles sans AI (n=651) selon le centre, l'âge et l'année de transplantation. Les AI ont été classées selon la date de survenue en fonction de la greffe [35 (19%) avant J40 ; 33 (18%) entre J40 et J100 ; et 117 (63%) après J100. L'analyse multivariée a montré une association entre les AI précoces et l'absence de prise de greffe, une association entre les AI tardives et très tardives avec une maladie du greffon contre l'hôte (GvHD) de grade >2, et une association entre les AI très tardives avec une rechute de la maladie et une neutropénie secondaire. Il n'a pas été montré d'association significative avec des critères pré-greffe, avec pour conséquence la nécessité de régulièrement suspecter l'aspergillose après la greffe. Cette étude a confirmé que l'AI est désormais une complication tardive de l'allo-HSCT et non plus une complication précoce pendant la phase neutropénique initiale comme observé précédemment. Les stratégies prophylactiques doivent donc inclure les phases tardives, en particulier lorsque sont présents GvHD, rechute de la maladie, et neutropénie secondaire.

Ce travail a été présenté à l'EBMT Annual Meeting (mars 2018, Lisbonne, poster no. B121) et a été publié dans *Biol Blood Marrow Transplant*.²⁰

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

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

²⁰ Robin Cet al (2018) Mainly Post-Transplant Factors Are Associated with Invasive Aspergillosis after Allogeneic Stem Cell Transplantation: A Study from the Surveillance des Aspergilloses Invasives en France and Societe Francophone de Greffe de Moelle et de Therapie Cellulaire. *Biol Blood Marrow Transplant* 25(2):354-361.

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

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

L'analyse des génomes a révélé qu'une seule souche commune n'existait que pour deux patients, et que les autres patients étaient infectés par des souches différentes, et pour certains avec un mélange de souches. Cette épidémie locale a donc été attribuée à une source environnementale, non identifiée malgré les investigations multiples réalisées dans l'environnement du service et sur les consommables utilisés. Cette source environnementale probablement non univoque explique l'infection des patients avec des génotypes multiples et des génotypes différents par patients. L'épidémie s'est éteinte en parallèle avec le renforcement des mesures d'hygiène mises en place à cette occasion dans le service. L'étude a fait l'objet d'une publication dans *mBio*²¹.

Etude sur les dermatophytoses sévères des patients transplantés d'organe

Nous avons repris sur la période 2010 à 2016, les patients qui avaient développé une dermatophytose sévère au décours d'une transplantation d'organe en France. Nous avons ainsi inclus 12 patients dont 10 transplantés rénaux. La plupart avaient présenté des signes de dermatophytose superficielle avant la survenue d'une atteinte sévère. Neuf patients avaient une atteinte invasive et trois une atteinte extensive, huit présentaient des nodules des membres inférieurs. Aucun ne présentait d'atteinte extra cutanée. *Trichophyton rubrum* était isolé dans 11 cas. La plupart des patients ont reçu de la terbinafine (n=7) et trois du posaconazole. Une réponse complète était obtenue après 2.5 mois dans les formes extensives et 7.5 mois dans les formes invasives²².

Optimisation de la prise en charge de cryptococcose associée à l'infection VIH en Afrique

Nous avons utilisé les bases MEDLINE, EMBASE, et Web of Science et réalisé une méta-analyse avec effet random pour préciser la prévalence de la détection de l'antigène cryptococcique chez les patients infectés par le VIH et avec une lymphopénie CD4 < 100/mm³ (31 études ; 35,644 participants). La prévalence de la positivité était de 6% et celle d'une méningite latente était de 33% parmi les patients ayant un antigène détecté. L'incidence de la méningite cryptococcique était de 21.4% (95% IC, 11.6%-34.4%) sans fluconazole et de 5.7% (95% CI, 3.0%-9.7%) avec le fluconazole préemptif à la posologie de 800 mg/j. Le taux de mortalité globale était plus élevé chez les CrAg-positifs que chez les CrAg-négatifs (risk ratio, 2.2; 95% CI, 1.7-2.9; P < .001)²³.

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

Les endocardites à *Candida* spp. (PVE-C) sur prothèse valvulaire sont rares et de pronostic redoutable. Les recommandations internationales s'appuient sur des avis d'expert et prônent l'association d'une chirurgie suivie d'un traitement prolongé par triazolé. Quarante-six patients ont été suivis pendant une durée médiane

²¹ Garcia-Hermoso D et al (2018) Outbreak of Invasive Wound Mucormycosis in a Burn Unit Due to Multiple Strains of *Mucor circinelloides* f. *circinelloides* Resolved by Whole-Genome Sequencing. *MBio* 9(2):e00573–18–12.

²² Rouzaud C et al (2018) Severe dermatophytosis in solid organ transplant recipients: A French retrospective series and literature review. *Transpl Infect Dis* 20(1):e12799.

²³ Temfack E et al (2018) Impact of routine cryptococcal antigen screening and targeted pre-emptive fluconazole therapy in antiretroviral naive HIV-infected adults with less than 100 CD4 cells/μL: a systematic review and meta-analysis. *CID* 50:1101

de 9 mois. Quarante-huit pour cent présentaient un antécédent d'endocardite ; 65% étaient nosocomiales ou liées aux soins ; 20% des patients étaient toxicomanes. Quarante et un pour cent ont été opérés. Les patients <66 ans et sans co-morbidité étaient plus souvent confiés au chirurgien (adjusted odds ratios [aORs], 6.80 [95% confidence interval [CI], 1.59-29.13] et 10.92 [1.15-104.06], respectivement). La chirurgie n'était pas associée à une survie meilleure à 6 mois. Les patients qui étaient traités par amphotéricine B liposomale avaient une survie à 6 mois meilleure que ceux traités par échinocandine (aOR, 13.52; 95% CI, 1.03-838.10). Un traitement d'entretien par fluconazole a été prescrit chez 21 patients pour une durée médiane de 13 mois (range, 2-84 mois). Nos données devraient permettre d'actualiser les recommandations actuelles²⁴.

6.2 Liste des publications et communications en lien direct avec les missions et activités du CNR

Publications nationales

1. Hoarau G, Albrieux M, Martin-Phipps T, Zitte-Zehler K, Borry L, Peytral J, Garcia-Hermoso D, Picot S. [Fungal keratitis: A 5-year monocentric retrospective study on Reunion Island]. *J Fr Ophtalmol*. 2018; 41:321-325.
2. Larsabal M, Gabriel F, Pajaniapadeatchy E, Rougeron A, Accoceberry I, Garcia-Hermoso D, Saunier A. [Sporotrichosis in France]. *Med Mal Infect*. 2018; 48:298-300.
3. Quaesaet L, Stindel E, Lanternier F, Williams T, Jaffuel S, Moalic E, Garcia Hermoso D, Lortholary O, Ansart S. Miltefosine-based regimen as salvage therapy in *Lomentospora prolificans* bone and joint infection. *Med Mal Infect*. 2018; 48:63-65.

Publications internationales

2018

1. Boyer-Chammard T, Temfack E, Lortholary O, Alanio A. Diagnostic and therapeutic strategies in cryptococcosis: impact on outcome. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2018; 113:e180050.
2. Brunet K, Alanio A, Lortholary O, Rammaert B. Reactivation of dormant/latent fungal infection. *J Infect*. 2018; 77:463-468.
3. Casadevall A, Coelho C, Alanio A. Mechanisms of *Cryptococcus neoformans*-Mediated Host Damage. *Front Immunol*. 2018; 9:1-8.
4. Chammard TB, Temfack E, Lortholary O, Alanio A. Diagnostic and therapeutic strategies in cryptococcosis: impact on outcome. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2018; 113:e180050.
5. Colley T, Sehra G, Chowdhary A, Alanio A, Kelly SL, Kizawa Y, Armstrong-James D, Fisher MC, Warrilow AGS, Parker JE, Kelly DE, Kimura G, Nishimoto Y, Sunose M, Onions S, Crepin D, Lagasse F, Crittall M, Shannon J, McConville M, King-Underwood J, Naylor A, Bretagne S, Murray J, Ito K, Strong P, Rapeport G. In Vitro and In Vivo Efficacy of a Novel and Long-Acting Fungicidal Azole, PC1244, on *Aspergillus fumigatus* Infection. *Antimicrob Agents Chemother*. 2018; 62(5) pii: e01941-17
6. Cornu M, Sendid B, Mery A, Francois N, Malgorzata M, Letscher-Bru V, De Carolis E, Damonti L, Titecat M, Bochud PY, Alanio A, Sanguinetti M, Viscoli C, Herbrecht R, Guerardel Y, Poulain D. Evaluation of mass spectrometry detection of pan-fungal serum disaccharide (MS-DS) for the diagnosis of invasive fungal infections: results from a collaborative study involving six European clinical centres. *J Clin Microbiol*. 2019; pii: JCM.01867-18
7. Danion F, Jullien V, Rouzaud C, Abdel Fattah M, Lapusan S, Guery R, Bige N, Morgand M, Pallet N, Lanternier F, Lortholary O. Is It Time for Systematic Voriconazole Pharmacogenomic Investigation for Central Nervous System Aspergillosis? *Antimicrob Agents Chemother*. 2018; 62(9). pii: e00705-18

²⁴ Rivoisy C et al (2018) Prosthetic Valve Candida spp. Endocarditis: New Insights Into Long-term Prognosis-The ESCAPE Study. *CID* 66(6):825–832.

8. Danion F, Rouzaud C, Dureault A, Poiree S, Bougnoux ME, Alanio A, Lanternier F, Lortholary O. Why are so many cases of invasive aspergillosis missed? *Med Mycol.* 2019; 57:S94-S103.
9. Delliere S, Guery R, Candon S, Rammaert B, Aguilar C, Lanternier F, Chatenoud L, Lortholary O. Understanding Pathogenesis and Care Challenges of Immune Reconstitution Inflammatory Syndrome in Fungal Infections. *J Fungi (Basel).* 2018; 4(4). pii: E139. doi
10. Desnos-Ollivier M, Bormida V, Poirier P, Nourrisson C, Pan D, Bretagne S, Puime A, Dromer F, French Mycoses Study G, Uruguayan Invasive Fungal Infection N. Population Structure of *Candida parapsilosis*: No Genetic Difference Between French and Uruguayan Isolates Using Microsatellite Length Polymorphism. *Mycopathologia.* 2018; 183:381-390.
11. Desnos-Ollivier M, Bretagne S, Boullie A, Gautier C, Dromer F, Lortholary O, French Mycoses Study G. Isavuconazole MICs distribution of 29 yeast species responsible for invasive infections (2015-2017). *Clin Microbiol Infect.* 2019; pii: S1198-743X(19)30053-9.
12. Dudoignon E, Alanio A, Anstey J, Depret F, Coutrot M, Fratani A, Jully M, Cupaciu A, Chaussard M, Oueslati H, Ferry A, Benyamina M, de Tymowski C, Boccara D, Serror K, Chaouat M, Mimoun M, Lafaurie M, Denis B, Gits-Muselli M, Bretagne S, Mebazaa A, Legrand M, Soussi S, group P. Outcome and potentially modifiable risk factors for candidemia in critically ill burns patients: A matched cohort study. *Mycoses.* 2019; 62:237-246.
13. Garcia-Hermoso D, Criscuolo A, Lee SC, Legrand M, Chaouat M, Denis B, Lafaurie M, Rouveau M, Soler C, Schaal JV, Mimoun M, Mebazaa A, Heitman J, Dromer F, Brisse S, Bretagne S, Alanio A. Outbreak of Invasive Wound Mucormycosis in a Burn Unit Due to Multiple Strains of *Mucor circinelloides* f. *circinelloides* Resolved by Whole-Genome Sequencing. *MBio.* 2018; 9(2). pii: e00573-18.
14. Hoenigl M, Gangneux JP, Segal E, Alanio A, Chakrabarti A, Chen SC, Govender N, Hagen F, Klimko N, Meis JF, Pasqualotto AC, Seidel D, Walsh TJ, Lagrou K, Lass-Flörl C, Cornely OA, European Confederation of Medical M. Global guidelines and initiatives from the European Confederation of Medical Mycology to improve patient care and research worldwide: New leadership is about working together. *Mycoses.* 2018; 61:885-894.
15. Hommel B, Mukaremera L, Cordero RJB, Coelho C, Desjardins CA, Sturny-Leclere A, Janbon G, Perfect JR, Fraser JA, Casadevall A, Cuomo CA, Dromer F, Nielsen K, Alanio A. Titan cells formation in *Cryptococcus neoformans* is finely tuned by environmental conditions and modulated by positive and negative genetic regulators. *PLoS Pathog.* 2018; 14:e1006982.
16. Kohlenberg A, Struelens MJ, Monnet DL, Plachouras D, The *Candida auris* Survey Collaborative Group (F. Dromer member of the group). *Candida auris*: epidemiological situation, laboratory capacity and preparedness in European Union and European Economic Area countries, 2013 to 2017. *Euro Surveill.* 2018; 23(13).
17. Lawrence DS, Boyer-Chammard T, Jarvis JN. Emerging concepts in HIV-associated cryptococcal meningitis. *Curr Opin Infect Dis.* 2019; 32:16-23.
18. Lawrence DS, Youssouf N, Molloy SF, Alanio A, Alufandika M, Boulware DR, Boyer-Chammard T, Chen T, Dromer F, Hlupeni A, Hope W, Hosseinipour MC, Kanyama C, Lortholary O, Loyse A, Meya DB, Mosepele M, Muzoora C, Mwandumba HC, Ndhlovu CE, Niessen L, Schutz C, Stott KE, Wang D, Lalloo DG, Meintjes G, Jaffar S, Harrison TS, Jarvis JN. AMBIsome Therapy Induction Optimisation (AMBITION): High Dose AmBisome for Cryptococcal Meningitis Induction Therapy in sub-Saharan Africa: Study Protocol for a Phase 3 Randomised Controlled Non-Inferiority Trial. *Trials.* 2018; 19(1):649.

19. Loyse A, Burry J, Cohn J, Ford N, Chiller T, Ribeiro I, Koulla-Shiro S, Mghamba J, Ramadhani A, Nyirenda R, Aliyu SH, Wilson D, Le T, Oladele R, Lesikari S, Muzoora C, Kalata N, Temfack E, Mapoure Y, Sini V, Chanda D, Shimwela M, Lakhi S, Ngoma J, Gondwe-Chunda L, Perfect C, Shroufi A, Andrieux-Meyer I, Chan A, Schutz C, Hosseinipour M, Van der Horst C, Klausner JD, Boulware DR, Heyderman R, Lalloo D, Day J, Jarvis JN, Rodrigues M, Jaffar S, Denning D, Migone C, Doherty M, Lortholary O, Dromer F, Stack M, Molloy SF, Bicanic T, van Oosterhout J, Mwaba P, Kanyama C, Kouanfack C, Mfinanga S, Govender N, Harrison TS. Leave no one behind: response to new evidence and guidelines for the management of cryptococcal meningitis in low-income and middle-income countries. *Lancet Infect Dis.* 2018; pii: S1473-3099(18)30493-6
20. Meyer W, Irinyi L, Hoang MTV, Robert V, Garcia-Hermoso D, Desnos-Ollivier M, Yurayart C, Tsang CC, Lee CY, Woo PCY, Pchelin IM, Uhrlas S, Nenoff P, Chindamporn A, Chen S, Hebert PDN, Sorrell TC. Database establishment for the secondary fungal DNA barcode -Translational Elongation Factor 1alpha (TEF1alpha). *Genome.* 2018; 1-10
21. Molloy SF, Kanyama C, Heyderman RS, Loyse A, Kouanfack C, Chanda D, Mfinanga S, Temfack E, Lakhi S, Lesikari S, Chan AK, Stone N, Kalata N, Karunaharan N, Gaskell K, Peirse M, Ellis J, Chawinga C, Lontsi S, Ndong JG, Bright P, Lupiya D, Chen T, Bradley J, Adams J, van der Horst C, van Oosterhout JJ, Sini V, Mapoure YN, Mwaba P, Bicanic T, Lalloo DG, Wang D, Hosseinipour MC, Lortholary O, Jaffar S, Harrison TS, Team ATS. Antifungal Combinations for Treatment of Cryptococcal Meningitis in Africa. *N Engl J Med.* 2018; 378:1004-1017.
22. Parize P, Mamez AC, Garcia-Hermoso D, Dumaine V, Poiree S, Kauffmann-Lacroix C, Jullien V, Lortholary O, Lanternier F. Successful treatment of *Saksena* sp. osteomyelitis by conservative surgery and intra-diaphysal incorporation of amphotericin B cement beads. *Antimicrob Agents Chemother.* 2018;
23. Pasquier E, Kunda J, De Beudrap P, Loyse A, Temfack E, Molloy SF, Harrison TS, Lortholary O. Long-term Mortality and Disability in Cryptococcal Meningitis: A Systematic Literature Review. *Clin Infect Dis.* 2018; 66:1122-1132.
24. Pilimis B, Alanio A, Lortholary O, Lanternier F. Recent advances in the understanding and management of mucormycosis. *F1000Res.* 2018; 7
25. Pilimis B, Garcia-Hermoso D, Alanio A, Catherinot E, Scemla A, Jullien V, Bretagne S, Lortholary O. Failure of voriconazole therapy due to acquired azole resistance in *Aspergillus fumigatus* in a kidney transplant recipient with chronic necrotizing aspergillosis. *Am J Transplant.* 2018; 18:2352-2355.
26. Rivoisy C, Vena A, Schaeffer L, Charlier C, Fontanet A, Delahaye F, Bouza E, Lortholary O, Munoz P, Lefort A, French Mycoses Study G, Grupo de Apoyo al Manejo de las Endocarditis en E. Prosthetic Valve *Candida* spp. Endocarditis: New Insights Into Long-term Prognosis-The ESCAPE Study. *Clin Infect Dis.* 2018; 66:825-832.
27. Robin C, Cordonnier C, Sitbon K, Raus N, Lortholary O, Maury S, Peffault de la Tour R, Bretagne S, Bastuji-Garin S, Saif, the S-TCAG. Mainly Post-Transplant Factors Are Associated with Invasive Aspergillosis after Allogeneic Stem Cell Transplantation: A Study from the Surveillance des Aspergilloses Invasives en France and Societe Francophone de Greffe de Moelle et de Therapie Cellulaire. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2018;25(2):354-361.
28. Rouzaud C, Chosidow O, Brocard A, Fraïtag S, Scemla A, Anglicheau D, Bouaziz JD, Dupin N, Bougnoux ME, Hay R, Lortholary O, Lanternier F, French Mycoses Study G. Severe dermatophytosis in solid organ transplant recipients: A French retrospective series and literature review. *Transpl Infect Dis.* 2018; 20:e12799.
29. Salzer HJF, Schafer G, Hoenigl M, Gunther G, Hoffmann C, Kalsdorf B, Alanio A, Lange C. Clinical, Diagnostic, and Treatment Disparities between HIV-Infected and Non-HIV-Infected Immunocompromised Patients with *Pneumocystis jirovecii* Pneumonia. *Respiration.* 2018; 96:52-65.

30. Temfack E, Bigna JJ, Luma HN, Spijker R, Meintjes G, Jarvis JN, Dromer F, Harrison T, Cohen JF, Lortholary O. Impact of routine cryptococcal antigen screening and targeted pre-emptive fluconazole therapy in antiretroviral naive HIV-infected adults with less than 100 CD4 cells/ μ L: a systematic review and meta-analysis. *Clin Infect Dis.* 2018;68(4):688-698.
31. Temfack E, Kouanfack C, Mossiang L, Loyse A, Fonkoua MC, Molloy SF, Koulla-Shiro S, Delaporte E, Dromer F, Harrison T, Lortholary O. Cryptococcal Antigen Screening in Asymptomatic HIV-Infected Antiretroviral Naive Patients in Cameroon and Evaluation of the New Semi-Quantitative Biosynex CryptoPS Test. *Front Microbiol.* 2018; 9:409.
32. Thomas E, Bertolotti A, Barreau A, Klisnick J, Tournebize P, Borgherini G, Zemali N, Jaubert J, Jouvion G, Bretagne S, Picot S. From phaeohyphomycosis to disseminated chromoblastomycosis: A retrospective study of infections caused by dematiaceous fungi. *Med Mal Infect.* 2018; 48:278-285.
33. Xhaard A, Porcher R, Bergeron A, Alanio A, Touratier S, Bretagne S, de Margerie-Mellon C, Sicre de Fontbrune F, Itzykson R, Coman T, Robin M, Cabannes-Hamy A, Socie G, Peffault de Latour R. Primary antifungal prophylaxis with micafungin after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation: a monocentric prospective study. *Ann Hematol.* 2018; 98(4):1033-1035.

Communications nationales

- La bataille du diagnostic : Galactomanane vs PCR. Raoul Herbrecht & Stéphane Bretagne, Journée Multidisciplinaire en Hématologie, Fongilead, Paris, 8 novembre 2018

Communications internationales

21st Congress of International Society for Human & Animal Mycology (ISHAM), Amsterdam, the Netherlands, 2018

- Marie Desnos-Ollivier, Corinne Maufrais, Marc Pihet, Christine Aznar, Françoise Dromer and the French Mycoses Study Group. Epidemiological investigation for grouped cases of *Trichosporon asahii* using whole genome sequencing.
- Alexandre Alanio. From parasitic life to nosocomial outbreak: the life of *Pneumocystis jirovecii*
- Dea Garcia Hermoso. Diversity among coelomycetous isolates from cutaneous and subcutaneous infections and Analysis of clinically relevant *Exophiala* species in France: 2004-2018

ECCMID 2017 : *Scedosporium* observational study. D. Bronniman, F. Dromer, D. Garcia-Hermoso, F. Lanternier and the French Mycoses Study Group

Conférences sur invitations

- Organisation de la surveillance des infections fongiques invasives (S. Bretagne) congrès franco-marocain de parasitologie et mycologie, Faculté de Médecine et de Pharmacie de Rabat, 1-3 février 2018.
- Taxonomie et sensibilité antifongique des complexes d'espèces : que faut-il retenir ? (D. Garcia-Hermoso et M. Desnos-Ollivier), Société Française de Mycologie Médicale (SFMM), Toulouse, Mars 2017
- Les moisissures et leurs impacts sanitaires, colloque « moisissures, habitat et santé » (S. Bretagne & D. Caillaud), Ministère de la santé, Paris, octobre 2017
- Epidemiology of mucormycoses (O. Lortholary) ECCMID, avril 2017
- Cryptococcosis in HIV-negative patients (O. Lortholary) 8th TIMM, Belgrade 2017
- Pro/con debate: Amphotericin B (not isavuconazole) as primary treatment for mucormycosis. (F. Lanternier) ECCMID 2018 Madrid
- Immunogenetics of fungal infections (F. Lanternier) ECCMID 2018 Madrid

7 Coopération avec les laboratoires de santé animale, d'hygiène alimentaire, environnementaux

Pas de liens

8 Programme d'activité pour les années suivantes

Le programme d'activité du CNRMA est en continuité avec celui de l'année qui vient de s'écouler. Les techniques d'identification et de typage seront développées en fonction des isolats envoyés et des questions qui se poseront (épidémie, cas groupés, nouveau pathogène). Notre objectif est de développer les techniques de typage à partir des données de NGS en commençant par les espèces à l'origine de cas groupés ou apparemment groupés.

Nous allons finir l'analyse des données correspondant aux cas groupés d'infection à *M. capitatus*, *S. clavata*, *T. inkin* et *Y. lipolytica*. L'article reposant sur l'analyse de SOS (infection à *Scedosporium* et *Lomentospora*) est en cours de finition, de même que celui concernant les cas d'infections à *Fusarium* spp.

L'année 2019 doit aussi permettre d'analyser les 6 premières années de la base RESSIF. Ce travail prévu en 2018 a été retardé du fait des reports de déclarations dans certains CC-CNRMA, ce qui aurait biaisé les résultats.

De nombreuses collaborations sont en cours avec les CC-CNRMA et les cliniciens et mycologues français, certaines portées par nos collègues, pour exploiter les données générées par la surveillance active, décortiquer une question particulière en recueillant éventuellement des données complémentaires. Ainsi des projets concernant les histoplasmoses d'importation, les aspergilloses cérébrales, la comparaison des infections à *A. fumigatus* et *A. non fumigatus*, les co-infections pneumocystose/aspergillose pulmonaire, ...) ont été approuvées par le comité de coordination RESSIF et devraient se concrétiser, voire se finaliser (analyse de l'évolution des candidémies sur les 10 dernières années, en collaboration avec Didier Che de Santé Publique France).

9 Liste des collaborateurs du CNRMA

9.1 CC-CNRMA formant RESSIF

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

9.2 Centres participants à l'ODL

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

9.3 Participants à la surveillance des mycoses invasives en 2018

Annecy, Laboratoire de Biologie Médicale, Centre Hospitalier Général
Antibes, Laboratoire de Biologie Médicale, Centre Hospitalier Général
Bordeaux, Laboratoire de Parasitologie-Mycologie, CHR Hôpital Saint-André
Brest, Laboratoire de Microbiologie, Centre Hospitalier Général
Châlon en Champagne, Laboratoire de Biologie Médicale, Centre Hospitalier
Clamart, Laboratoire de Biologie Médicale, Hôpital des Armées Percy
Clamart, Service de Bactériologie-Virologie, Hôpital Antoine Béchère
Colmar, Laboratoire de Microbiologie, CHG Louis Pasteur
Centre Médico Chirurgical Foch, Laboratoire Central
Eaubonne, Laboratoire d'Immuno-Bactério-Hématologie, Centre Hospitalier Emile Roux
Institut Mutualiste Montsouris
La Roche-sur-Yon, Laboratoire de Biologie Médicale, CHD Roche-sur-Yon Luçon Montaigu
Laval, Laboratoire de Bactério-Parasito-Virologie, Centre Hospitalier
Le Mans, Service de Microbiologie Médicale et Hygiène Hospitalière, Centre Hospitalier
Le Plessis Robinson, Marie-Lannelongue, Centre Chirurgical
Lille, Laboratoire de Parasitologie-Mycologie, C.H.R. Hôpital Calmette
Lyon, Laboratoire de Mycologie, Hôpital de la Croix-Rousse
Marseille, Laboratoire de Biologie Médicale, Hôpital Fondation Saint-Joseph
Marseille, Laboratoire de Parasitologie-Mycologie, CHU – La Timone
Mayotte, Laboratoire de Biologie Médicale, Centre Hospitalier
Mulhouse, Laboratoire de Biologie Médicale, Hôpital Emile Muller
Neuilly, Laboratoire de Bactériologie, Hôpital Américain
Nevers, Laboratoire de Bactériologie-Immunologie, Centre Hospitalier
Orléans, Laboratoire de Biologie Médicale, Centre Hospitalier Régional
Saint-Denis, La Réunion, Laboratoire de Biologie, CHD Felix Guyon
Saint-Pierre, La Réunion, Laboratoire de Bactério-Parasito-Virologie et Hygiène, Groupe Hospitalier
Réunion Sud
Toulon Armées, Laboratoire de Bactériologie, HIA Sainte-Anne
Tourcoing, Laboratoire de Biologie Médicale, CH Gustave Dron

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, mais avons en plus développé une surveillance active grâce à des centres collaborateurs (CC-CNRMA) qui forment le RESeau de Surveillance des Infections Fongiques invasives (RESSIF) dont l'objectif est l'exhaustivité de déclarations aussi bien des pathogènes fongiques rares que fréquents. Cette surveillance active est microbiologique et épidémiologique.

1.2.Organisation du CNR et de ses éventuels laboratoires associés

Composition de l'équipe

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

La continuité de l'expertise globale est bien sûr assurée en cas d'absence de l'un des membres de l'équipe. La composition de l'équipe et l'organisation fonctionnelle du CNRMA sont décrites ci-dessous (**Tableau 17**). Il faut ici noter que certaines activités se font en dehors de l'unité de mycologie moléculaire, soit sur le campus de l'Institut Pasteur (expertise anatomopathologique), soit dans les services des collaborateurs et adjoints hospitalo-universitaires.

Tableau 17 : Composition de l'équipe du CNRMA

Nom	Fonction	ETP	Qualification/statut	Organisme payeur
Alexandre Alanio	Collaborateur scientifique	10%	Docteur en médecine, Thèse d'université, MCU-PH Hôpital Saint Louis	AP-HP / Université Paris Diderot P7
Reine Bouyssié	Secrétaire	40%	Secrétaire de Direction	Institut Pasteur
Stéphane Bretagne	Directeur Adjoint	20%	Docteur en Médecine, Thèse d'université / PUPH Hôpital Saint Louis	AP-HP / Paris Diderot P7
Marie Desnos-Ollivier	Collaborateur technique/scientifique	80%	Thèse d'université / Ingénieur	Institut Pasteur
Françoise Dromer	Directeur du CNRMA	40%	Docteur en Médecine, Thèse d'université / Professeur Institut Pasteur	Institut Pasteur

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

1.3.Locaux et équipements

Des locaux, entièrement rénovés en 2014, ont été attribués à l'unité de mycologie moléculaire (recherche) dans le bâtiment Duclaux (rez de chaussée haut, l'aile Fourneau) au 28 rue du Dr. Roux (Figure 20). Ils comprennent :



Figure 20 : Locaux du CNRMA

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, chambre froide, pièce de congélateurs à -80°C

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

Des locaux partagés avec d'autres structures impliquées dans le diagnostic (CIBU, les CNR Bordetella et Corynebactéries) 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 (MultiSkan Labsystem, Multiskan Go)
- 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

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 microsattellites. Les bases de données sont gérées par les logiciels Lagon et VOOZANOO (EpiConcept).

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

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

Collections de levures

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

- ✓ vérification de la pureté de la souche (pour les levures sur milieu BBL™ CHROMagar™ *Candida*, BD ou milieu aux graines de Niger pour les souches des *Cryptococcus sp.*)
- ✓ identification phénotypique par profil MALDI-TOF. Pour les levures rares, détermination de la fermentation du glucose, de la croissance à différentes températures et sur des milieux spéciaux (nitrate, NaCl 10% NaCl 15%, glucose 50%, acide acétique).
- ✓ extraction de l'ADN
- ✓ en cas d'identification de *C. albicans*, recherche systématique de l'espèce *C. dubliniensis* par PCR duplex
- ✓ en cas d'identification de *C. parapsilosis*, recherche systématique de *C. orthopsilosis* et *C. metapsilosis* par séquençage des régions ITS²⁵
- ✓ en cas d'identification de *Trichosporon sp.* séquençage systématique de la région IGS1 de l'ADN ribosomique²⁶
- ✓ en cas d'identification de *Debaryomyces sp.* ou de *C. lusitaniae*, séquençage systématique d'une partie du gène codant l'actine²⁷
- ✓ en cas d'identification de *M. guilliermondii* ou *M. caribbica*, séquençage systématique d'une partie du gène *RPB1*
- ✓ en cas d'identification de *C. neoformans* détermination du sérotype par amplification de régions des gènes *Gpa1* et *Pak1* avec des amorces spécifiques du sérotype A ou D et/ou séquençage de la région IGS du gène codant l'ARN ribosomique
- ✓ détermination de la sensibilité à 8 antifongiques systémiques (amphotéricine B, 5-fluorocytosine, fluconazole, voriconazole, posaconazole, isavuconazole, caspofungine, micafungine)
- ✓ en cas de moindre sensibilité à la caspofungine (CMI \geq 0,5 mg/L), séquençage systématique partiel des gènes codant la 1,3 beta-glucane synthase pour les isolats de *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. tropicalis*, *C. krusei*, *C. dubliniensis*, *C. kefyr* et *C. lusitaniae*
- ✓ en cas d'espèce non « fréquente » ou de profil MALDI-TOF non valide, séquençage systématique des régions ITS1 – 5.8S – ITS2 par les couples d'amorces V9D/LS266 et depuis 2006 de la région D1/D2 de la sous-unité 26S (couple d'amorces NL1/NL4) du gène codant pour l'ARN ribosomique
- ✓ recherche d'ascospores si c'est pertinent, culture sur lames pour les espèces de *Trichosporon*
- ✓ récupération de données cliniques et épidémiologiques
- ✓ Stockage des données physiologiques, des profils de sensibilités aux antifongiques, des résultats de typage et des séquences nucléotidiques dans la base de données « Institut Pasteur FungiBank »

La collection du CNRMA comprend ainsi des souches bien caractérisées appartenant à 27 genres et 104 espèces différents (1 à 3140 isolats/espèce) et se répartissant en :

- plus de 5200 souches de nombreuses espèces de levures isolées d'hémocultures en région parisienne depuis octobre 2002 dans le cadre de l'Observatoire des Levures (cf. plus bas), stockées congelées en glycérol 40% à -80°C, et depuis 2009 en glycérol 20% dans l'azote liquide.

²⁵ Tavanti A, et al. *Candida orthopsilosis* and *Candida metapsilosis* spp. nov. to replace *Candida parapsilosis* groups II and III. J Clin Microbiol. 2005; 43:284

²⁶ Sugita T, et al. Sequence Analysis of the Ribosomal DNA Intergenic Spacer 1 Regions of *Trichosporon* Species. J Clin Microbiol. 2002, 40;1826

²⁷ Martorell P, et al. Sequence-based identification of species belonging to the genus *Debaryomyces* FEMS Yeast research. 2005; 5:1157

- plus de 2600 souches de levures provenant d'autres sites profonds ou superficiels, stockées congelées à -20°C entre 2002 et 2006, à -80°C depuis 2007, et en double depuis 2009 dans l'azote liquide.
- plus de 3200 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 de champignons filamenteux

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

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

La collection comprend des souches appartenant à 97 genres et 365 espèces différents, (1 à 358 isolats/espèce) :

- ✓ plus de 3100 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.

Collection d'images numériques

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

Collection d'ADN génomique

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

Base de données de séquences : Institut Pasteur FungiBank

La base de données compilant les données d'identification polyphasique réalisée au CNRMA « Institut Pasteur FungiBank » (<http://fungibank.pasteur.fr/>) a été créée en collaboration avec Vincent Robert ([société BioAware](#)) avec le logiciel BioloMICS (**Figure 21**). Elle est constituée des séquences ADN de pathogènes fongiques (levures et champignons filamenteux) associés aux données de CMI. Cette base de données est

publique, accessible sans mot de passe pour l'utilisateur. Les centres collaborateurs du CNRMA peuvent obtenir des paramètres de connexion qui leur donnent accès à davantage d'information et de séquences.



Figure 21 : Portail de la base de données de séquences Institut Pasteur FungiBank

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

Les informations disponibles pour chaque isolat comprennent le site et l'année de prélèvement, le nom de la ville/hôpital, les valeurs de CMI (EUCAST), l'espèce identifiée au CNRMA, la(es) séquence(s) utilisées pour l'identification, et éventuellement, les données de génotypage et/ou présence/absence de mutations (résistance aux antifongiques). La base contient actuellement 1860 séquences (ITS, 26S, IGS, actine, FKS) pour 1698 souches de levures et 1952 séquences (18S, 28S, ITS, calmoduline, actine, β -tubuline, EF1- α , RPB1, RPB2, CYP51A) pour 934 souches de champignons filamenteux. La base de données est implémentée régulièrement avec les nouvelles données disponibles.

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

Collection de sérums

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

1.5.Démarche qualité du laboratoire

Le CNRMA fait partie des Centres Nationaux de Référence placés sous la responsabilité de l'Institut Pasteur qui sont au nombre de 14. Ils sont organisés en multisite et constituent, avec la Cellule d'Intervention Biologique d'Urgence (CIBU), le Laboratoire de Référence et d'Expertise Multisite (LREMS). Le LREMS est sous démarche d'accréditation. Le CNRMA a été accrédité selon la **norme NF EN ISO 15189** en mars 2015. La portée d'accréditation est visible [sur le site du COFRAC](https://www.cofrac.fr/annexes/sect8/8-2588.pdf) (<https://www.cofrac.fr/annexes/sect8/8-2588.pdf>).

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

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

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

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

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

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

Etapes clés de l'année 2018	Périodes de réalisation
Audit de surveillance S5	23 au 26 janvier 2018
Revue qualité	20 février 2018
Revue de direction LREMS et ajustement de la demande d'extension	16 mai 2018
Audit interne qualité	4 octobre 2018
Audit interne technique	3 octobre 2018

Perspectives pour l'année 2019	Prévision de réalisation
Revue qualité LRE	Janvier-avril 2019
Audit COFRAC S6	15 au 19 Avril 2019
Audits internes qualité et technique	Septembre - novembre 2019
Revue de direction LRE-MS	Mai 2019
Portée d'accréditation complète	Octobre 2020

1.6.Aspects réglementaires

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

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

- désigné un délégué à la protection des données (DPO) depuis juillet 2018 ;
- établi un registre des opérations de traitement pour lesquelles il agit d'une part en qualité de responsable du traitement et d'autre part en qualité de sous-traitant ;

- souscrit auprès de la CNIL un engagement de conformité aux méthodologies de référence MR-01 – MR-02 et MR-03 ;
- pris des initiatives de sensibilisation de ses personnels à la protection des données.

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)^{28,29}. Les antifongiques testés sont le fluconazole (Triflucan®), l'itraconazole (Sporanox®), la 5-fluorocytosine (Ancotil®), l'amphotéricine B (Fungizone®), le voriconazole (V-fend®), le posaconazole (Noxafil®), l'isavuconazole (Cresemba®), la terbinafine (Lamisil®), la caspofungine (Cancidas®), et la micafungine (Mycamine®).
- ✓ Identification des isolats d'espèces communes de champignons par MALDI-TOF (Biotyper Bruker)
- ✓ Extraction d'ADN pour les levures et les champignons filamenteux selon des protocoles optimisés.
- ✓ Séquençage nucléotidique des régions ITS et de la région variable de la grande sous-unité 28S de l'ADN ribosomique pour l'identification moléculaire de tous les champignons, et, pour certaines espèces, séquençage d'autres loci (voir plus loin).
- ✓ Identification de *Candida dubliniensis* par PCR duplex en utilisant les amorces spécifiques d'une partie du gène de l'actine³⁰ et les amorces universelles ITS1/ITS4 (**technique accréditée COFRAC selon la norme 15189**).
- ✓ PCR en temps réel permettant l'identification en urgence de *Candida auris*
- ✓ Diagnostic anatomopathologique / immuno-histochimie
- ✓ Diagnostic moléculaire sur tissus/échantillons frais, congelés ou fixés
- ✓ PCR diagnostique histoplasmosse, coccidioïdomycose, mucormycose (site hôpital Saint-Louis du CNRMA)
- ✓ Détection des mutations dans le gène *Cyp51A* pour les isolats d'*Aspergillus fumigatus* résistants aux antifongiques azolés³¹
- ✓ Détection des mutations dans les gènes *Fks* pour les isolats de *Candida albicans*, *C. glabrata*, *C. tropicalis*, *C. krusei*, *C. lusitaniae*, *C. dubliniensis*, *C. kefyr* ayant des profils de sensibilité anormaux pour les échinocandines.

Techniques mises en place en 2018

- Ajout de nouvelles cibles pour l'identification de diverses espèces de levures et de champignons filamenteux

²⁸ EUCAST Definitive Document EDef 7.1 (2008) method for the determination of broth dilution MICs of antifungal agents for fermentative yeasts. *Clin Microbiol Infect* 14:398-405.

²⁹ EUCAST Technical Note on the method for the determination of broth dilution minimum inhibitory concentrations of antifungal agents for conidia-forming moulds (2008) *Clin Microbiol Infect* 14:982

³⁰ Donnelly SM, et al (1999). Phylogenetic analysis and rapid identification of *Candida dubliniensis* based on analysis of ACT1 intron and exon sequences. *Microbiology* 45:1871-1882.

³¹ Mellado E, et al. Identification of two different 14-alpha sterol demethylase-related genes (*cyp51A* and *cyp51B*) in *Aspergillus fumigatus* and other *Aspergillus* species (2001) *J Clin Microbiol* 39:2431 (erratum p4225).

2.2. Liste des marqueurs épidémiologiques disponibles

- Pour *C. albicans*, 5 séquences microsatellites (CDC3, HIS3, EF3, STPK, CDR1)^{32,33}, et les 7 loci MLST (AAT1a, ACC1, ADP1, MPIb, SYA1, VPS13, ZWF1)³⁴
- Pour *C. glabrata*, 5 séquences microsatellites (RPM2, MTI, ERG, Cg4, Cg6)³⁵
- Pour *C. parapsilosis*, 3 séquences microsatellites (CP1, CP4, CP6)³⁶
- Pour *Aspergillus fumigatus*, 4 séquences microsatellites A, B, C et D³⁷
- Pour *C. tropicalis*, 6 loci MLST (MDR1, XYR1, SAPT4, SAPT2, ZWF1a, ICL1)³⁸, et 2 séquences microsatellites (URA3 et CT14)³⁹
- Pour *Cr. neoformans*, sérotypage (cytométrie en flux à l'aide d'un anticorps monoclonal anti-polyoside capsulaire⁴⁰ et PCR spécifiques (*Pak1* et *Gpa1*)), détermination de la ploïdie (cytométrie en flux), et typage par la technique MLST (7 loci : CAP59, URA5, LAC1, IGS1, GPD1, PLB1 et SOD1⁴¹)
- Pour *Candida krusei*, 6 loci MLST (ADE2, LYS2, HIS3, LEU2, TRP1 et MPD1)⁴²
- Pour *Cryptococcus gattii*, 7 loci MLST (IGS1, CAP59, URA5, PLB1, GPD1, SOD1, LAC1)⁴³
- 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

2.3. Liste des techniques recommandées par le CNR

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

Identification des champignons

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

³² Foulet F, et al (2005) Microsatellite markers as a typing system for *Candida glabrata*. *J Clin Microbiol* 43:4574-9.

³³ Stephan F, et al (2002) Molecular diversity and routes of colonization of *Candida albicans* in a surgical intensive care unit, as studied using microsatellite markers. *Clin Infect Dis* 35:1477-83.

³⁴ Bougnoux ME, et al (2003) Collaborative consensus for optimized multilocus sequence typing of *Candida albicans*. *J Clin Microbiol* 41:5265

³⁵ Foulet F, et al (2005) Microsatellite marker analysis as a typing system for *Candida glabrata*. *J Clin Microbiol* 43:4574

³⁶ Irinyi L, et al (2015) ISHAM-ITS reference DNA barcoding database - the quality controlled standard tool for routine identification of human and animal pathogenic fungi. *Med Mycol* 53(4):313-37.

³⁷ Bart-Delabesse E, et al (1998) Microsatellite markers for typing *Aspergillus fumigatus* isolates. *J Clin Microbiol* 36:2413

³⁸ Tavanti A, et al (2005) Multilocus sequence typing for differentiation of strains of *Candida tropicalis*. *J Clin Microbiol* 43: 5593-600.

³⁹ Desnos-Ollivier M, et al (2008) Clonal population of flucytosine-resistant *Candida tropicalis* from blood cultures, Paris, France. *Emerg Infect Dis* 14:557

⁴⁰ Dromer F, et al (1993) Serotyping of *Cryptococcus neoformans* by using a monoclonal antibody specific for capsular polysaccharide. *J Clin Microbiol* 31:359.

⁴¹ Meyer W, et al (2009) Consensus multi-locus sequence typing scheme for *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii*. *Med Mycol* 47:561

⁴² Jacobsen MD, et al (2007) Strain Typing and Determination of Population Structure of *Candida krusei* by Multilocus Sequence Typing. *J Clin Microbiol* 45:317

⁴³ Hagen F, et al (2012) Autochthonous and dormant *Cryptococcus gattii* infections in Europe. *Emerging Infect Dis* 10:1618

taxonomie, nous avons multiplié, selon les genres étudiés, les gènes cibles et les amorces pour une identification moléculaire polygénique.

Le **Tableau 18** récapitule les principales cibles utilisées et les références correspondantes, sachant que certains genres nécessitent une analyse multigénique. Il faut aussi savoir que les changements taxonomiques rendent parfois difficiles les identifications. Il peut être utile pour suivre ces changements de se référer par exemple au site Index Fungorum (<http://www.indexfungorum.org>). La base de données est consultable gratuitement en ligne et fournit la liste des espèces dans chaque genre, avec pour chacune d'elle le taxon correct, la citation d'auteur, la date et le support de publication, voire une image de celui-ci, ainsi qu'un rappel de la position de l'espèce dans la classification traditionnelle.

Tableau 18 : Liste des couples d'amorces utilisés en fonction des genres étudiés
(en plus des régions ITS)

Espèce	Gène	Amorces
Complexe d'espèces <i>A. fumigatus</i>	β -tubuline	Btub1F/ Btub2R ⁴⁴
Complexe d'espèces <i>Fusarium spp</i>	Factor d'élongation (TEF1- α)	EF1 / EF2 ⁴⁵
	RNA polymérase II (RPB2)	5F2/ 7CR ⁴⁶
Complexe d'espèces <i>Pseudallescheria / Scedosporium</i>	β -tubuline	TUB-F/ TUB-R ⁴⁷
<i>Phaeoacremonium spp</i>	β -tubuline	T1 /Bt2b ⁴⁸
Coelomycètes	β -tubuline	TUB2-F / TUB4-R ⁴⁹
<i>Trichosporon spp.</i>	IGS1 / ADNr	26SF/5SR ²⁶
<i>Debaryomyces spp.</i>	actine	CA21/CA15R ²⁷
<i>Clavispora lusitaniae</i>	actine	CA16mod/CA5 ⁵⁰

Diagnostic des mycoses endémiques

La sérologie par électro-synérèse a définitivement été abandonnée par le CNRMA en raison de ses mauvaises performances. Il s'agissait d'une technique "maison" utilisant des réactifs (antigènes et sérums de référence) commercialisés qui sont de qualité inconstante, obligeant à des mises au point répétées lors des changements de lot. Par ailleurs, la reproductibilité des résultats, indépendamment de ces problèmes de réactifs, est très mauvaise. La contribution de la sérologie au diagnostic des mycoses exotiques est très faible. Ainsi, sur les 3500 sérologies enregistrées dans la base de données du CNRMA en 9 ans, moins de 8% étaient positives, mais avec de grandes différences en fonction du contexte clinique (<4% de positivité de la sérologie 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

⁴⁴ Balajee S, et al (2005) *Aspergillus lentulus* sp. nov., a new sibling species of *A. fumigatus*. *Eukaryot Cell* 4:625-32.

⁴⁵ 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.

⁴⁶ 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.

⁴⁷ Cruse M, et al (2002) Cryptic species in *Stachybotrys chartarum*. *Mycologia* 94:814-22.

⁴⁸ 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.

⁴⁹ Aveskamp MM, et al (2009) DNA phylogeny reveals polyphyly of *Phoma* section *Peyronellaea* and multiple taxonomic novelties. *Mycologia* 101:363-82.

⁵⁰ 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

moelle et des biopsies. Des lésions cutanées ou des ulcérations buccales peuvent être prélevées par écouvillonnage, les écouvillons secs ou dans un milieu de préservation peuvent être alors envoyés. Tout échantillon doit être envoyé à 4°C **accompagné** d'un mail à cnrma@pasteur.fr ou d'une **fiche de demande d'expertise** au site SLS du CNRMA :

Dr. A. Alanio/Pr. B. Bretagne/Dr. M. Gits-Muselli
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 (**Tableau 11, Tableau 12, Tableau 13, Tableau 14**). Il faut donc considérer qu'en l'absence de pression antifongique, les isolats d'une même espèce ont un profil sauvage et qu'il est donc, par exemple, inutile de tester une souche de *Candida albicans*, même isolée d'une hémoculture, s'il n'y pas eu de pré-exposition à un antifongique. **L'alternative en cas d'espèce rare ou de pression antifongique antérieure, est d'envoyer l'isolat responsable de mycose invasive au CNRMA accompagné d'une justification de la demande** (fiche de demande d'expertise).

Désinfection des surfaces

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

- Pour les principales espèces de levures manipulées au CNRMA, on n'observe aucune croissance résiduelle après un temps de contact inférieur ou égal à 5 minutes.
- Pour les principales espèces de filamenteux manipulées au CNRMA, on observe une croissance résiduelle inférieure à 1% après un temps de contact inférieur ou égal à 15 minutes.
- Pour les champignons de classe 3, un temps de contact de 30 minutes, le produit pulvérisé directement sur la culture de l'agent pathogène fongique de classe 3 (*Histoplasma capsulatum*, *Coccidioides immitis*, *Talaromyces marneffeï*) de façon à recouvrir entièrement la culture est préconisé pour une décontamination totale. A noter pour l'espèce *Cladophialophora bantiana* un temps de contact de 24h est préconisé pour une décontamination totale.

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