

Rapport annuel d'activité

2017

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

Responsables

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

Collaborateurs

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

**Année
d'exercice**

2016

Table des matières

RESUME ANALYTIQUE	1
1 MISSIONS ET ORGANISATION DU CNR.....	2
2 ACTIVITES D'EXPERTISE	2
2.1 ÉVOLUTIONS DES TECHNIQUES AU COURS DE L'ANNEE 2014	2
2.2 ACTIVITES D'EXPERTISE DE L'ANNEE 2016.....	2
2.2.1 Expertise 2016 sur les levures.....	3
2.2.2 Expertise 2016 sur les champignons filamenteux.....	6
2.2.3 Expertise 2016 sur la sensibilité aux antifongiques	8
2.2.4 Expertise 2016 sur les mycoses endémiques.....	9
2.2.5 Expertise 2016 en anatomopathologie.....	10
2.2.6 Expertise 2016 pour les diagnostics moléculaires.....	10
Diagnostic sur tissu fixé	11
Diagnostic sur prélèvements sanguins, urinaires ou respiratoires.....	11
3 ACTIVITES DE SURVEILLANCE.....	11
3.1 SURVEILLANCE DE L'ÉVOLUTION ET DES CARACTERISTIQUES DES INFECTIONS.....	11
3.1.1 Surveillance de la cryptococcose :.....	13
3.1.2 Observatoire des Levures.....	15
3.1.3 RESeau de Surveillance des Infections Fongiques invasives en France (ReSSIF)	16
Les aspergilloses invasives.....	19
Les pneumocystoses.....	20
Les mucormycoses	21
Les fusarioses	21
3.2 SURVEILLANCE DE LA RESISTANCE DES AGENTS PATHOGENES AUX ANTI-INFECTIEUX	21
3.2.1 Définition de l'échantillon de souches testées	21
3.2.2 Définitions utilisées pour exprimer la résistance	22
3.2.3 Résultats de la surveillance des résistances aux antifongiques pour les levures	23
3.2.4 Résultats de la surveillance des résistances aux antifongiques pour les filamenteux	25
3.2.5 Analyse des tendances.....	28
3.3 PARTICIPATION AUX RESEAUX DE SURVEILLANCE INTERNATIONAUX, EN PARTICULIER EUROPEENS	29
4 ALERTE.....	29
4.1 ALERTE CONCERNANT <i>CANDIDA AURIS</i>	29
4.2 INFECTIONS A <i>SAPROCHAETE CLAVATA</i>	30
4.3 COLONISATION OU INFECTION A <i>MUCOR INDICUS</i>	30
Contexte	30
Investigation épidémiologique.....	31
Investigations mycologiques	31
5 ACTIVITES D'INFORMATION, DE FORMATION ET DE CONSEIL.....	32
5.1 ENSEIGNEMENTS ET FORMATION.....	32
5.2 MODALITES DE DIFFUSION DES DONNEES DE SURVEILLANCE ET PRODUCTION DU CNRMA.....	33
5.3 ACTIVITE DE CONSEIL AUX PROFESSIONNELS	33
5.4 ACTIVITE D'EXPERTISE.....	33
6 TRAVAUX DE RECHERCHE ET PUBLICATIONS EN LIEN DIRECT AVEC L'ACTIVITE DU CNR	35
Description de nouvelles espèces	35
Développement de méthodes de typage	35
Typage de <i>C. parapsilosis</i>	35
Détection du clone épidémique de <i>Saprochaete clavata</i>	36
Typage de <i>Pneumocystis jirovecii</i>	36
Cryptococcose	36
Evaluation d'un test rapide de diagnostic de la cryptococcose	36
Cryptococcose et <i>Cryptococcus</i> spp. en Europe	36

Essai thérapeutique randomisé en Afrique.....	37
Optimisation diagnostique des infections fongiques	37
Pneumocystoses	37
Variation du nombre de copies de l'ARN 18S d'Aspergillus fumigatus analysé par droplet PCR.....	38
Etudes concernant les fongémies à levures	38
Fongémies en onco-hématologie.....	38
Fongémies dues aux levures rares	38
Infections à coelomycètes.....	39
6.1 LES PUBLICATIONS ET COMMUNICATIONS EN LIEN AVEC LES ACTIVITES DU CNR	40
Invitations dans des congrès internationaux.....	40
Congrès nationaux.....	40
Publications nationales	41
Publications internationales.....	41
Chapitre de livre – publications didactiques	45
7 COOPERATION AVEC LES LABORATOIRES DE SANTE ANIMALE, D'HYGIENE ALIMENTAIRE, ENVIRONNEMENTAUX	45
8 PROGRAMME D'ACTIVITE POUR LES ANNEES SUIVANTES.....	45
9 ANNEXE 1 : MISSIONS & ORGANISATION DU CNR	46
9.1 RAPPEL DES MISSIONS ET OBJECTIFS MAJEURS DU CNR ET DES LABORATOIRES ASSOCIES	46
9.2 DESCRIPTION DETAILLEE DE L'EQUIPE :	46
9.3 DESCRIPTION DETAILLEE DES LOCAUX ET DE L'EQUIPEMENT	48
9.4 DESCRIPTION DE LA DEMARCHE QUALITE DU LABORATOIRE :	49
Historique de la démarche qualité à l'Institut Pasteur.....	49
Projet ISO 15189 du Laboratoire de Référence et d'Expertise Multisite (LREMS) de l'Institut Pasteur.....	49
Actions d'importance 2016 conduites auprès des CNR de l'Institut Pasteur à Paris et Lyon.....	49
Perspectives 2017.....	50
10 ANNEXE 2 : CAPACITES TECHNIQUES DU CNR	50
10.1 LISTE DES TECHNIQUES DE REFERENCE: DIAGNOSTIC/IDENTIFICATION, TYPAGE, EVALUATION DE LA SENSIBILITE AUX ANTI-INFECTIEUX :.....	50
Techniques pour le diagnostic, l'identification et l'évaluation de la sensibilité aux antifongiques	50
Techniques mises en place en 2016	51
10.2 LISTE DES MARQUEURS EPIDEMIOLOGIQUES DISPONIBLES	51
10.3 COLLECTIONS DE SOUCHES, ANTIGENES OU IMMUN-SERUMS DE REFERENCE :.....	52
Collections de levures.....	52
Collection de champignons filamenteux	53
Collection d'images numériques	54
Collection d'ADN génomique	54
Base de données de séquences : Institut Pasteur FungiBank	54
Collection de sérums.....	55
10.4 LISTE DES TECHNIQUES (DIAGNOSTIC/IDENTIFICATION, TYPAGE, SENSIBILITE AUX ANTI-INFECTIEUX...) RECOMMANDEES PAR LE CNR.....	55
Identification des champignons	55
Diagnostic des mycoses endémiques	56
Détermination de la sensibilité aux antifongiques des isolats de champignons pathogènes	56
Désinfection des surfaces.....	57
10.5 TECHNIQUES TRANSFEREES PAR LE CNRMA.....	57
11 ANNEXE 3 : LISTE DES COLLABORATEURS DU CNRMA.....	58
LISTE DES CC-CNRMA FORMANT RESSIF	58
MEMBRES DU RESEAU METROPOLITAIN	58
MEMBRES DU RESEAU DANS LES DOM-TOM	61

Liste des Figures et des Tableaux

Figure 1 : Evolution du volume d'activité d'expertise du CNRMA	3
Figure 2 : Levures d'espèces rares (microscopie)	6
Figure 3 : Aspects morphologiques de quelques champignons (1)	7
Figure 4 : Aspects morphologiques de quelques champignons (2)	8
Figure 5 : Schéma du gène Cyp51A d' <i>A. fumigatus</i> et principales mutations.....	9
Figure 6 : Sélection de quelques diagnostics anatomopathologiques faits en 2016	10
Figure 7 : Répartition géographique des 26 CC-CNRMA composant RESSIF en 2016	12
Figure 8: Evolution des caractéristiques des patients atteints de cryptococcose	13
Figure 9 : Evolution du nombre de cas de cryptococcose et des moyens de diagnostic.....	14
Figure 10 : Evolution des tests de diagnostic de la cryptococcose	14
Figure 11 : Devenir à 3 mois des patients atteints de cryptococcose (2008-2016).....	15
Figure 12 : Distribution des espèces responsables de fongémies, ODL 2002-2016.....	16
Figure 13 : Evolution des techniques d'identification des champignons depuis 2012.....	17
Figure 14 : Evolution des enregistrements sur RESSIF.....	18
Figure 15 : Répartition des principales infections fongiques invasives (RESSIF, 2012-2016)18	
Figure 16 : Principaux outils utilisés dans le diagnostic de l'aspergillose invasive.....	19
Figure 17 : Devenir à 8 jours et à 3 mois après le diagnostic d'aspergillose invasive	19
Figure 18 : Classification des PCP répertoriées En fonction de la pathologie sous-jacente.....	20
Figure 19 : Courbes de survie après diagnostic de PCP	20
Figure 20 : Répartition des espèces de Mucorales.....	21
Figure 21 : Evolution de la résistance aux antifongiques pour les levures communes.....	29
Figure 22 : Détection de <i>Saprochaete clavata</i> et du clone épidémique depuis 2012	30
Figure 23 : Distribution des isoléments de <i>Mucor indicus</i> en France.....	31
Figure 24 : Analyse phylogénétique des isolats <i>Mucor indicus</i>	32
Figure 25 : Arbre décrivant la population des isolats de <i>C. parapsilosis</i> étudiés.....	35
Figure 26 : Organigramme fonctionnel du CNRMA en 2016	47
Figure 27 : Locaux du CNRMA	48
Figure 28 : Portail de la base de données de séquences Institut Pasteur FungiBank.....	54
Figure 29 : Protocole d'amplification des régions ITS utilisé au CNRMA	57
Tableau 1: Tableau des dénominations taxonomiques pour les levures	5
Tableau 2 : Tableau des dénominations taxonomiques pour les champignons filamenteux	6
Tableau 3 : Bases de données du CNRMA (bilan au 24/03/2017)	13
Tableau 4 : <i>Candida</i> sp. EUCAST Antifungal Clinical Breakpoint fungi	22
Tableau 5 : <i>Aspergillus</i> sp. EUCAST Antifungal Clinical Breakpoints –Fungi	23
Tableau 6 : Profil de sensibilité des levures aux antifongiques	24
Tableau 7 : Profil de sensibilité des champignons filamenteux aux antifongiques	26
Tableau 8: Profil de sensibilité des levures à 4 azolés, dont l'isavuconazole.....	27
Tableau 9 : Profil de sensibilité des filamenteux à 4 azolés, dont l'isavuconazole	28
Tableau 10 : Composition de l'équipe du CNRMA en 2016	47
Tableau 11 : Liste des couples d'amorces utilisés en fonction des genres étudiés.....	55

Résumé analytique

Les missions du CNRMA sont l'expertise et la surveillance épidémiologique et microbiologique des mycoses invasives incluant les pneumocystoses.

Le CNRMA a poursuivi les missions d'expertise et de surveillance qui lui étaient assignées auparavant, avec une augmentation sensible de son activité, et développé de nouveaux outils techniques et de surveillance. La surveillance des profils de sensibilité aux antifongiques n'a mis en évidence aucune anomalie en 2016, à l'exception de quelques isolats ayant une résistance acquise, non groupés.

Le CNRMA a mis en place le réseau de centres collaborateurs du CNRMA (les CC-CNRMA) au nombre de 26 en 2016, qui 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. L'objectif est de pouvoir analyser les tendances en termes d'espèces impliquées, d'émergence de résistance à un ou plusieurs antifongiques, ou de nouvelles populations à risque, et aussi de calculer les incidences et de suivre les modifications au cours du temps. RESSIF a déjà permis de collecter les informations sur 7115 cas d'infections fongiques invasives, et représente une base unique au plan international.

Le CNRMA a mis en place depuis 2013, une collaboration avec l'unité d'histopathologie humaine et modèles animaux (Pr. Fabrice Chrétien, Dr. Gregory Jouvion) de l'Institut Pasteur pour développer une expertise spécifique anatomopathologique, et a développé au cours de ces dernières années, particulièrement en 2016 des outils de diagnostic moléculaire des infections fongiques invasives. Il a aussi contribué à l'investigation de cas inhabituels de colonisation ou infection invasive par un champignon rare, *Mucor indicus*, en s'appuyant sur des données de séquençage du génome entier. Le CNRMA continue à alimenter et à mettre à jour la base de séquences Institut Pasteur FungiBank.

1 Missions et organisation du CNR

Les missions et l'organisation du CNRMA sont détaillées en annexe. Les réseaux de surveillance mis en place comprennent l'Observatoire des Levures en région parisienne (ODL), et le RESeau de Surveillance des Infections Fongiques invasives (**RESSIF**) couvrant le territoire national. RESSIF comprend 26 laboratoires (CC-CNRMA) qui ont souhaité participer de façon active et pérenne à cette surveillance. Les isolats des espèces les plus communes (*Candida albicans*, *C. glabrata*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, et *Aspergillus fumigatus*) ne nous sont pas adressés sauf en cas de profil anormal de sensibilité aux antifongiques.

L'**activité de conseil** concerne la prise en charge diagnostique et/ou thérapeutique de patients suspects ou atteints de mycoses invasives. Tout clinicien ou microbiologiste/mycologue peut solliciter l'expertise du CNRMA.

2 Activités d'expertise

2.1 Évolutions des techniques au cours de l'année 2014

Le CNRMA continue à développer les outils d'identifications 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.

Le CNRMA utilise désormais le MALDI-TOF (matrix-assisted laser desorption/ionisation-time of flight) avec le Microflex de Bruker pour l'identification des levures. Les identifications d'espèces sont systématiquement contrôlées par séquençage nucléotidiques d'une ou plusieurs régions, dès lors qu'il s'agit d'une espèce rare ou d'identification difficile ou incertaine.

Le CNRMA a transféré vers les CC-CNRMA les paramètres d'amplification et les amorces utilisées pour l'identification moléculaire des champignons filamenteux et des levures, pour homogénéiser et permettre le transfert des chromatogrammes d'un centre vers le CNRMA. La base de données de séquences du CNRMA intitulée Institut Pasteur FungiBank a été lancée en octobre 2014 et est accessible à tous depuis la fin 2015.

2.2 Activités d'expertise de l'année 2016

Le CNRMA a reçu, en 2016, 871 échantillons dont 5% étaient non conformes car ne correspondant pas aux missions du CNR (mycoses superficielles, expertise relevant d'un LABM). 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.

Aux expertises réalisées au CNRMA se sont ajoutées celles réalisées dans l'unité d'histopathologie et modèles animaux dirigée par le Pr. F. Chrétien sur les prélèvements anatomopathologiques et celles réalisées sur le site de Saint-Louis dans le laboratoire de Parasitologie-Mycologie dirigé par le Pr. S. Bretagne pour le diagnostic moléculaire sur échantillon biologique.

La quasi-totalité des échantillons était en provenance de France Métropolitaine (92%) ou des DOM-TOM (7%). Une seule demande nous est parvenue de l'étranger cette année (Belgique) dans le cadre de l'alerte concernant *Mucor indicus* (et l'expertise a permis d'éliminer ce diagnostic). Toute demande d'expertise est systématiquement accompagnée d'une fiche de renseignements. 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 souches proviennent majoritairement des laboratoires hospitaliers, en raison même des missions du CNRMA qui couvrent uniquement les mycoses invasives. Les isolats reçus avaient été en majorité cultivés à partir du sang (47%), d'échantillons pulmonaires (16%), cutanés (8.5%), liquides céphalo-rachidiens (6%), échantillons oculaires (7%), ORL (3%), osseux (3%) ou digestifs (3%). Des précisions sont données plus loin en fonction de l'expertise microbiologique requise.

En volume, l'activité de laboratoire du CNRMA est stable sur les levures mais augmentée sur les champignons filamenteux et les séquences (Figure 1). Le pôle d'identification des pathogènes au sein de la CIBU (cellule d'intervention biologique d'urgence) nous fournit dans la demi-journée les chromatogrammes pour les urgences définies au CNRMA, ce qui nous permet de donner une réponse au correspondant moins de 36h après réception de l'isolat. Plus de 90% des isolats identifiés sont testés pour leur sensibilité aux antifongiques dans le cadre de nos missions. L'absence de détermination des CMI est uniquement liée à des problèmes techniques (absence de fructification, classe 3).

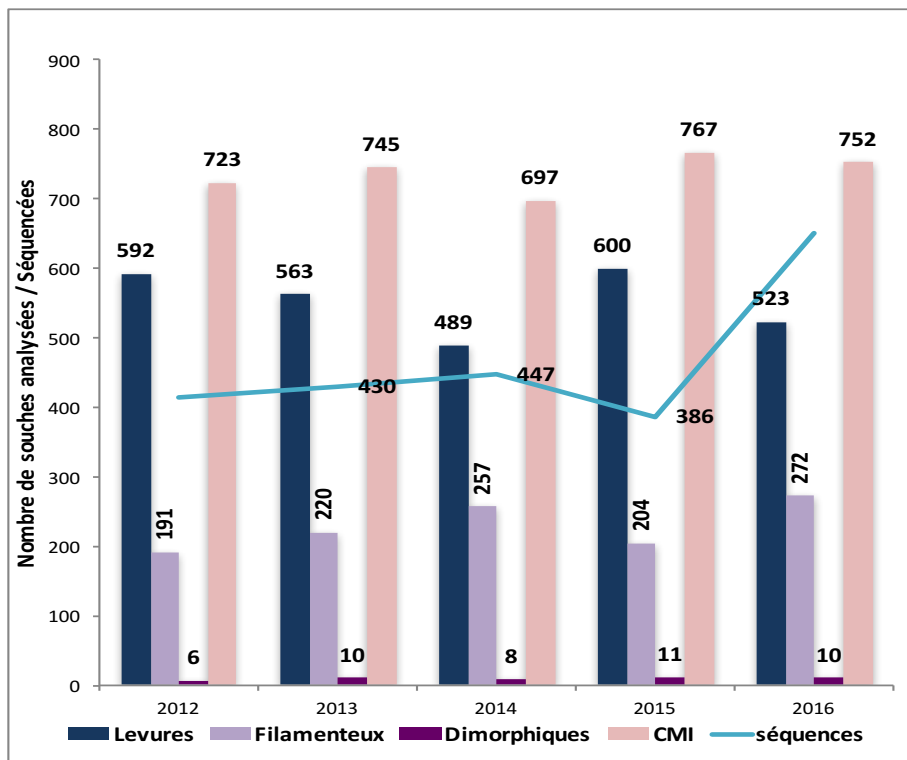


Figure 1 : Evolution du volume d'activité d'expertise du CNRMA

2.2.1 Expertise 2016 sur les levures

Les levures provenaient essentiellement d'hémocultures (76%), mais aussi du système nerveux central (7%), des poumons (6%), de l'appareil digestif (2%), de la peau (2,5%), des urines (2%), de lésions ostéo-articulaires (1,5%).

Le niveau de caractérisation pour les 523 levures identifiées (correspondant à 41 genres et espèces différents) est celui décrit précédemment. Nous avons donc réalisé :

- ✓ Une analyse phénotypique : pureté sur milieu chromogène, profil protéique par MALDI-TOF, et en fonction du genre ou espèce suspectés, activité uréase, température de croissance, profil d'assimilation des sucres (galeries ID32C ou CH50), fermentation de certains sucres, croissance en milieux hyperosmolaires, croissance sur milieu CGB, cultures sur lame pour l'observation de structures particulières (Figure 2).

- ✓ Une identification moléculaire pour tous les isolats d'espèces communes ayant un profil d'assimilation des sucres ou un profil protéique inhabituel, et pour toutes les espèces de levures moins fréquentes voire rares, soit 177 isolats avec amplification d'un ou plusieurs loci :
 - Régions ITS1-5.8S-ITS2 (132 isolats)
 - Région D1D2 de la sous-unité 26S (64 isolats)
 - Amplification de la région IGS1 (11 isolats de *Trichosporon* spp.)
 - Amplification du gène codant l'actine (21 isolats de *Clavispora lusitaniae*)
- ✓ Un profil de sensibilité des souches aux 8 antifongiques pour 518 isolats (certaines souches ne se développant pas dans les milieux tests, les CMI ne peuvent être analysées, et par ailleurs, hors contexte particulier, les CMI ne sont déterminées que pour l'un des isolats en cas de cryptococcose disséminée)
- ✓ Un typage MLST pour rechercher le clone 5FC-R pour 10 isolats de *C. tropicalis* résistants à la 5FC (8 patients, 10 souches différentes du clone R-5FC)
- ✓ Le séquençage des gènes *Fks* pour 6 isolats, 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 réalisé sur 44 isolats et a abouti à l'identification finale de *Saprochaete clavata* (n=24), *Magnusiomyces capitatus* (n=12) ou *Galactomyces candidus* (n=7). La PCR quantitative 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 24 isolats de *S. clavata*, correspondant au clone épidémique de 2012 (clone A, 11 souches), au clone B (5 souches) ou « ni A-ni B » (8 souches).
- ✓ La détermination de la ploïdie et le sérotypage de 71 souches de *Cryptococcus* sp. aboutissant à la caractérisation de 66 souches de *Cr. neoformans* (57 sérotype A, 12 sérotype D, 10 AD) et 2 souche de *Cr. gattii* (2 serotype B).

La détermination de certains caractères phénotypiques peut paraître obsolète alors que les techniques moléculaires et le MALDI-TOF sont accessibles à tous. Elle est fondamentale pour constituer une base de données fiable et une collection de souches bien caractérisées. *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 termes, déterminer si ces espèces sont associées à des pathologies de présentations ou de pronostics différents justifiant leur identification en routine.*

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 1). En tant que Centre de Référence, le CNRMA se doit de donner les noms taxonomiques en cours 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.

Tableau 1: Tableau des dénominations taxonomiques pour les levures

Espèce actuelle	Synonyme usité en clinique	Autre synonyme
<i>Candida albicans</i>	<i>Candida africana</i>	<i>Candida albicans</i>
<i>Candida duobushaemulonii</i>	<i>Candida haemulonii*</i>	<i>Candida haemulonii 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>gattii</i>
<i>Debaryomyces hansenii</i>	<i>Candida famata</i>	
<i>Galactomyces candidus</i>	<i>Geotrichum candidum</i>	
<i>Kazachstania pintolopesii</i>		<i>Candida pintolopesii</i>
<i>Kluyveromyces marxianus</i>	<i>Candida kefyf</i>	
<i>Kodamaea ohmeri</i>	<i>Candida ohmeri</i>	<i>Pichia ohmeri</i>
<i>Kuyveromyces lactis</i>	<i>Candida sphaerica</i>	
<i>Magnusiomyces capitatus</i>	<i>Geotrichum capitatum</i>	
<i>Meyerozyma caribbica</i>	<i>Candida fermentati</i>	
<i>Meyerozyma guilliermondii</i>	<i>Candida guilliermondii</i>	<i>Pichia guilliermondii</i>
<i>Pichia kudriavzevii</i>	<i>Candida krusei</i>	<i>Issatchenkia orientalis</i>
<i>Saprochaete clavata</i>	<i>Geotrichum clavatum</i>	
<i>Torulaspora delbrueckii</i>	<i>Candida colliculosa</i>	
<i>Wickerhamomyces anomalus</i>	<i>Candida pelliculosa</i>	<i>Pichia anomala</i>
<i>Yarrowia lipolytica</i>	<i>Candida lipolytica</i>	

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

Outre les espèces fréquentes (*Candida albicans*, *Candida glabrata*, *Candida parapsilosis*, *Candida tropicalis*, *Pichia kudriavzevii*, *Kluyveromyces marxianus* var. *marxianus*), nous avons identifié ou confirmé l'identification de *Candida dubliniensis*, *Candida haemulonii*, *Candida inconspicua*, *Candida orthopsilosis*, *Candida metapsilosis*, *Candida palmiophila*, *Candida theae*, *Clavispora lusitaniae*, *Cyberlindnera fabianii*, *Cyberlindnera rhodanensis*, *Debaryomyces fabryi*, *Galactomyces candidum*, *Hanseniaspora uvarum*, *Kazachstania bovina*, *Kodamaea ohmeri*, *Magnusiomyces capitatus*, *Meyerozyma guilliermondii*, *Pichia kluyveri*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces fibuligera*, *Saprochaete clavata*, *Wickerhamomyces anomalus* (Figure 2)

Et parmi les levures basidiomycètes, outre *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* et var. *grubii*, *Cryptococcus gattii*, *Rhodotorula mucilaginosa*, *Trichosporon asahii*, *Trichosporon debeurmannianum*, *Trichosporon japonicum*.

Toutes ces espèces sont, rappelons-le, responsables d'infections sévères et il ne s'agit donc pas ici d'une liste purement "botanique". Ainsi l'identification de *Cyberlindnera rhodanensis* contaminant de la feuille de thé et responsable d'une arthrite chez une patiente chinoise a permis de documenter le recours à la médecine naturelle à base de thé à l'origine de l'infection.

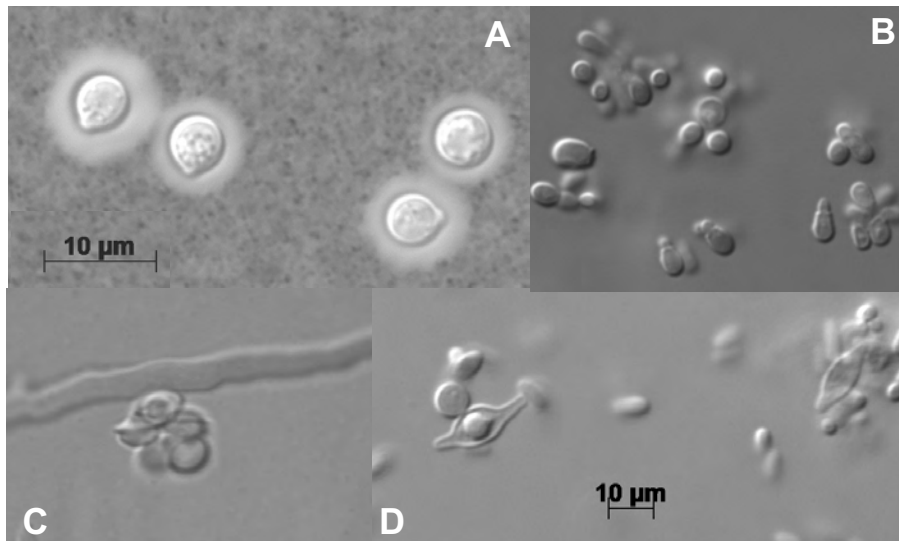


Figure 2 : Levures d'espèces rares (microscopie)

A - *Cryptococcus gattii* (encre de Chine) ; B - *Malassezia furfur* ; C - *Saccharomycopsis fibuligera* (ascospores) ; D - *Hanseniaspora uvarum* (ascospores)

2.2.2 Expertise 2016 sur les champignons filamenteux

Les champignons filamenteux étaient isolés essentiellement des poumons (32,7%), de la peau (18,2%), de l'œil (18,2%) de la sphère ORL (7,1%), du sang (3,9%), mais aussi des os (4,5%), du tube digestif (6,4%) ou du cerveau (2,9%).

Le niveau de caractérisation pour les 281 champignons filamenteux identifiés cette année (87 genres et espèces différents incluant quelques souches de champignons dimorphiques classe 3) est celui décrit plus haut. Le tableau suivant décrit les changements récents (Tableau 2). 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.

Tableau 2 : Tableau des dénominations taxonomiques pour les champignons filamenteux

Dénomination précédente	Espèce actuelle
<i>Emericella nidulans</i>	<i>Aspergillus nidulans</i>
<i>Emericella quadrilineata</i>	<i>Aspergillus quadrilineatus</i>
<i>Neosartorya hiratsukae</i>	<i>Aspergillus hiratsukae</i>
<i>Penicillium marneffeii</i>	<i>Talaromyces marneffeii</i>
<i>Penicillium purpureogenum</i>	<i>Talaromyces purpureogenus</i>
<i>Paecilomyces lilacinus</i>	<i>Purpureocillium lilacinum</i>
<i>Geosmithia argillacea</i>	<i>Rasamsonia argillacea</i>
<i>Bipolaris spicifera</i>	<i>Curvularia spicifera</i>
<i>Acremonium kiliense</i>	<i>Sarocladium kiliense</i>
<i>Acremonium strictum</i>	<i>Sarocladium strictum</i>
<i>Fusarium dimerum</i> species group	<i>Bisifusarium dimerum</i>
<i>Fusarium delphinoides</i>	<i>Bisifusarium delphinoides</i>
<i>Myceliophthora thermophila</i>	<i>Thermothelomyces thermophila</i>
<i>Scedosporium prolificans</i>	<i>Lomentospora prolificans</i>
<i>Pseudallescheria minutispora</i>	<i>Scedosporium minutisporum</i>
<i>Pyrenochaeta romeroi</i>	<i>Medicopsis romeroi</i>
<i>Pleurophoma cava</i>	<i>Pyrenochaeta cava</i>
<i>Ochroconis gallopava</i>	<i>Verruconis gallopava</i>

Nous avons ainsi réalisé :

- ✓ une identification phénotypique complète et la constitution d'un fichier numérique complet (macroscopie et microscopie) pour toutes les souches étudiées (Figure 3, Figure 4)
- ✓ une caractérisation moléculaire avec séquençage des régions ITS1-5.8S-ITS2 et de la région 28S pour tous les isolats, et de certains gènes (EF1alpha, 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 EF1alpha (93 isolats) RPB2 (71 isolats) betatubuline 117 isolats), calmoduline (43 isolats), actine (3 isolats) et RPB1 (43 isolats)
- ✓ La recherche des mutations CYP51A pour 8 isolats d'*A. fumigatus* dont l'un avait la mutation TR34/L98H.
- ✓ la détermination du profil de sensibilité à 8 antifongiques pour 281 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 termes, déterminer si ces espèces sont associées à des pathologies de présentations ou de pronostics différents justifiant leur identification en routine.

Nous avons ainsi identifié ou confirmé l'identification :

- ✓ de plusieurs espèces d'*Aspergillus* : *A. fumigatus*, *A. terreus*, *A. flavus*, *A. calidoustus*, *A. niger*, *A. tubingensis*, *A. welwitschiae*, *A. nidulans*, *A. sublatus*, *A. quadrilineatus*, *A. unguis*
- ✓ de plusieurs espèces de *Fusarium* appartenant aux complexes *solani*, *oxysporum*, *fujikuroi*, *falciforme*, *sporotrichoides*, ainsi que *Bifusarium dimerum* et *delphinoides*
- ✓ d'autres hyphomycètes : *Beauveria bassiana*, *Botrytis cinera*, *Cylindrocarpon lichenicola*, *Scedosporium boydii*, *Lomentospora prolificans*, *Scedosporium dehoogii*, *Pseudallescheria ellipsoidea*, *Microascus cirrosus*, *Thermotheomyces thermophila*, *Purpureocillium lilacinum*, *Paecilomyces variotii*, *Penicillium brevicompactum*, *Penicillium solitum*, *Penicillium frei*, *Penicillium lanosocoeruleum*, *Sarocladium strictum*, *Scopulariopsis brevicaulis*, *Trichoderma longibrachiatum*, *Rasamsonia piperina*



Figure 3 : Aspects morphologiques de quelques champignons(1)

Pseudallescheria ellipsoidea : jeune cleistothèce (A); *Scopulariopsis brevicaulis* : conidiophore et conidies rugueuses (B); *Aspergillus fumigatus* : vésicule et chaînes des conidies (C)

- ✓ de dématiés : *Alternaria alternata*, *Alternaria infectoria*, *Alternaria abundans*, *Curvularia spicifera*, *Chaetomium globosum*, *Cladophialophora bantiana* (classe 3), *Cladophialophora carrionii*, *Cladosporium tenuissimum*, *Cladosporium halotolerans*, *Curvularia hawaiiensis*, *Exophiala bergeri*, *Exophiala dermatitidis*, *Exophiala oligosperma*, *Exophiala spinifera*, *Exophiala nubica*, *Fonsecaea nubica*, *Humicola phialophoroides*, *Phialophora americana*, *Sporothrix globosa*
- ✓ d'agents de mycoses endémiques : *Histoplasma capsulatum* var. *capsulatum* et var. *duboisii* (histoplasmose), *Coccidioides* (coccidioidomycose), *Paracoccidioides*



Figure 4 : Aspects morphologiques de quelques champignons(2)

Purpureocillium lilacinum phialides et conidies (A) ; *Mucor indicus* sporangiophore, columelle et collerette (B) ; *Fusarium fujikuroi* conidiophore et conidies

(paracoccidioidomycose),

- ✓ De *Mucorales* : *Actinomicor elegans*, *Cunninghamella* sp, *Cunninghamella bertholletiae*, *Lichtheimia corymbifera*, *Lichtheimia ramosa*, *Mucor circinelloides*, *Mucor indicus*, *Rhizomicor pusillus*, *Rhizomicor miehei*, *Rhizomicor pusillus*, *Rhizopus arrhizus*, *Rhizopus microsporus*, *Rhizopus stolonifer* var. *stolonifer*, *Saksenaia erythrospora*
- ✓ de coelomycètes : *Colletotrichum gigasporum*, *Phoma saxea*, *Pyrenochaeta unguis-hominis*, *Roussoella percutanea*, *Subramaniula asteroides*
- ✓ Quelques isolats de champignons filamenteux ascomycètes et basidiomycètes d'espèces non identifiables sur la morphologie et pour lesquels les séquences disponibles ne permettent pas encore d'identification.
- ✓ et un dermatophyte responsable d'une infection invasive : *Trichophyton rubrum*

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

2.2.3 Expertise 2016 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 (breakpoint) définie pour toutes les espèces et tous les antifongiques et étant donnée l'absence de corrélation *in vivo/in vitro* dans de nombreuses situations cliniques, les résultats de CMI (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 une attention particulière

- ✓ à déterminer les profils de sensibilité des souches "sauvages" aux nouveaux antifongiques en cours de commercialisation
- ✓ à déterminer, dans des cas particuliers, si un échec thérapeutique est lié à l'émergence d'un isolat de moindre sensibilité à l'antifongique prescrit.

Au total, 752 isolats ont été testés en 2016 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 à un antifongique 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 :

- 1 *Candida albicans* avec CMI haute et présence de mutation en région HS1 : S645P
- 1 *Candida glabrata* avec CMI haute et mutation inconnue en région HS2 du gène *FKS3* : N1301Y
- 4 souches de *Candida tropicalis* : 2 souches avec CMI hautes (une souche avec mutation connue en HS1 S645P, pour l'autre souche 3 mutations hétérozygotes dont 2 inconnues (S645P+V1342I+V1396I). Pour les 2 autres souches testées en raison d'une pousse paradoxale aux fortes concentrations (eagle effect), pas de mutation détectée dans les régions cibles.

Nous avons également recherché une mutation dans le gène *Cyp51A* (Figure 5) pour 8 isolats d'*A. fumigatus* résistants aux antifongiques azolés dont l'un avait la mutation TR34/L98H.

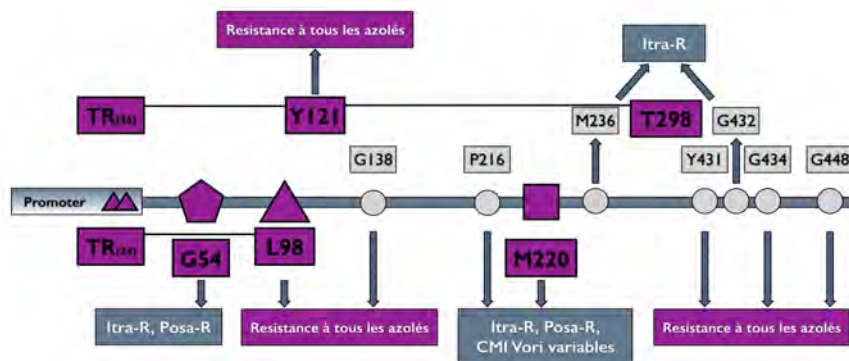


Figure 5 : Schéma du gène Cyp51A d'*A. fumigatus* et principales mutations

Ce schéma reprend les substitutions, responsables d'un phénotype de résistance aux antifongiques azolés, les plus fréquemment rencontrées chez les isolats cliniques (modifié de Alanio A. et al.¹) Itra: itraconazole ; Vori : voriconazole ; Posa : posaconazole, R : résistant

2.2.4 Expertise 2016 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 (cf. §2.2.6).

2.2.5 Expertise 2016 en anatomopathologie

Les demandes d'expertise mycologique en histopathologie arrivent maintenant directement dans l'unité d'histopathologie humaine et modèles animaux (HHMA) de l'Institut Pasteur 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 (HHMA). Une réunion hebdomadaire est ensuite organisée pour une confrontation des expertises anatomopathologiques, cliniques et mycologiques (HHMA-CNRMA) sur ces dossiers, découlant parfois sur la mise en route d'un diagnostic moléculaire après extraction d'ADN.

Cette organisation a été mise en place progressivement en 2012 et est active depuis début 2013. Le nombre d'expertise augmente régulièrement chaque année

En 2016, les demandes provenaient à part à peu près égale d'hôpitaux de l'AP-HP ou de centres hospitaliers en province. Au total 54 échantillons ont été analysés et discutés, aboutissant à un diagnostic de certitude (34 dossiers, 63%) ou de présomption (12 dossiers, 22%) (Figure 6). Dans 8 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.

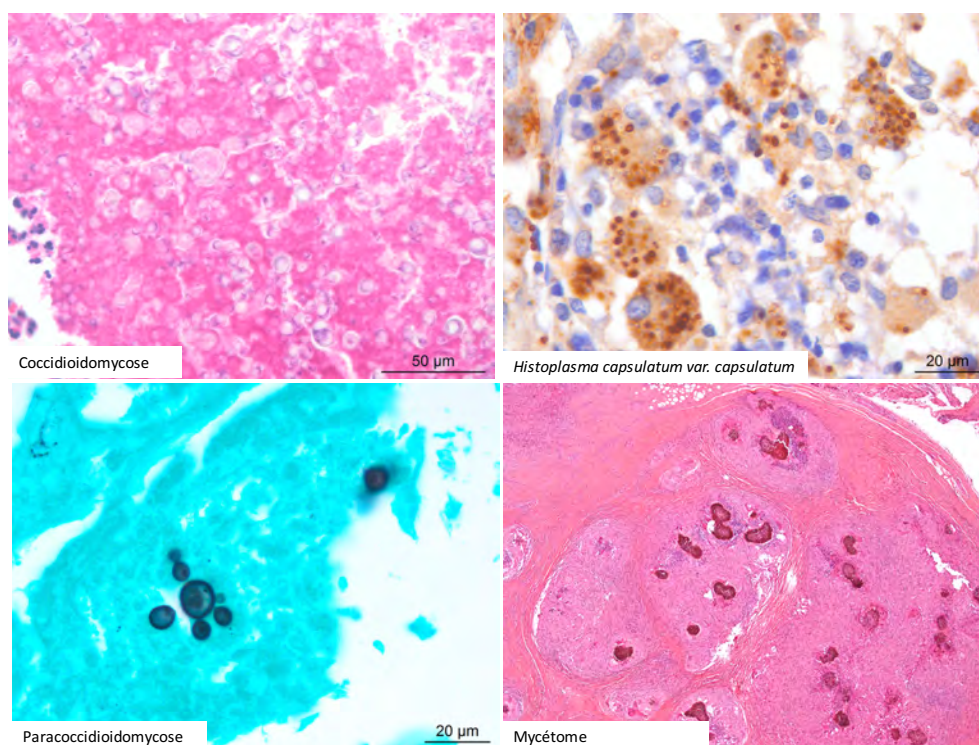


Figure 6 : Sélection de quelques diagnostics anatomopathologiques faits en 2016

2.2.6 Expertise 2016 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.

Diagnostic sur tissu fixé

Les expertises anatomopathologiques pour lesquelles aucune souche fongique n'a été isolée sont ensuite prises en charge dans le cadre du CNRMA mais dans le laboratoire de Parasitologie-Mycologie de l'hôpital Saint-Louis (A. Alanio, S. Bretagne) en attendant la mise en place d'une logistique satisfaisante dans les locaux à l'Institut Pasteur.

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

Cinq échantillons ont ainsi été analysés en 2016 permettant une identification dans 2 des cas, dont celui d'une paracoccidioidomycose pour laquelle la relecture des lames anatomopathologiques a rétrospectivement permis de voir les éléments fongiques typiques (Figure 6).

Diagnostic sur prélèvements sanguins, urinaires ou respiratoires

La généralisation de la PCR quantitative (qPCR) avec les optimisations et les contrôles adéquats permet de multiplier les tests diagnostiques, de remplacer certaines méthodes, comme la microscopie, et d'en compléter d'autres, comme les recherches d'antigènes. Ces tests qPCR ont été optimisés dans le laboratoire de Mycologie-Parasitologie de l'hôpital Saint-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.

Ainsi, le diagnostic d'histoplasmosse a été fait à partir de prélèvement invasifs (tissu pathologiques), superficiel (écouvillon cutané/buccal) et à partir de sang prélevé sur anticoagulant : 25 prélèvements de 10 patients ont été détectés positifs sur 222 tests réalisés chez 122 patients.

3 Activités de surveillance

3.1 Surveillance de l'évolution et des caractéristiques des infections

Les missions de surveillance du CNRMA couvrent le vaste champ des mycoses invasives, auquel s'est ajoutée, dans le nouveau mandat, la surveillance des pneumocystoses.

Le réseau des partenaires est constitué de trois façons :

- L'un ancien, RESOMYC (surveillance semi-passive) comprend des microbiologistes / mycologues et cliniciens qui, soit connaissent les missions du CNRMA et souhaitent y contribuer, soit sont sollicités pour déclarer l'infection invasive pour laquelle ils ont cherché l'expertise mycologique ou clinique présente au CNRMA. La surveillance de la cryptococcose (depuis 1985), et celle des mycoses exotiques ou rares (depuis 2002) sont effectuées ainsi. Le CNRMA n'a aucun moyen de connaître l'exhaustivité des données à moins d'utiliser d'autres sources de données. Deux études des performances de notre système de surveillance, l'une en 1996 sur les cryptococcoses¹, l'autre plus récemment en 2010 sur les mucormycoses², les deux en collaboration avec l'InVS, ont établi à 50% environ l'exhaustivité de cette surveillance semi-passive. RESOMYC comprend plus de 200 centres qui ont déclaré au moins un épisode de mycose invasive au CNRMA, et ce sur tout le territoire métropolitain et les DOM-TOM (Antilles, Guyane, La Réunion, Nouvelle Calédonie, Mayotte, Tahiti) depuis 10 ans.

¹ Dromer F, *et al.* Epidemiology of cryptococcosis in France: a 9-year survey (1985-1993). Clin. Infect. Dis. 1996; 23:82-90.

² Bitar D, *et al.* Estimating the burden of mucormycosis infections in France (2005-2007) through a capture-recapture method on laboratory and administrative data. Rev Epidemiol Santé Publique. 2012; 60:383-7.

- Le deuxième réseau, mis en place en 2002, est l'Observatoire des Levures (ODL) qui 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 récentes font que l'ODL fonctionne actuellement (année 15) avec 16 centres actifs³.
- Le troisième réseau est récent. Il a été mis en place en 2012 à l'occasion du renouvellement du mandat du CNRMA et de l'extension de ses missions. C'est le RESeau de Surveillance des Infections Fongiques invasives (RESSIF). Il comprenait, en 2012, 13 centres collaborateurs du CNRMA (CC-CNRMA). Depuis le 1^{er} janvier 2013, après un appel à volontaires parmi tous les correspondants hospitaliers du CNRMA pour le renforcer et améliorer la couverture nationale, RESSIF compte actuellement 26 CC-CNRMA⁴ (Figure 7). 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.

Ces trois réseaux s'appuient en première ligne sur les mycologues/microbiologistes avec des correspondants cliniciens dans chaque service concerné. Les questionnaires standardisés ont été édités grâce au logiciel Voozoo et sont accessibles au travers d'un site sécurisé hébergé par l'Institut Pasteur (<https://epidemie.pasteur.fr/ressif>). Les correspondants ont un code d'accès personnel qui leur permet de voir, éditer, analyser et récupérer leurs données. Le site de déclaration en ligne a obtenu l'autorisation de la Commission Nationale de l'Informatique et des Libertés (CNIL).

Aucune des infections fongiques invasives n'est surveillée par l'InVS/SpFrance. 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.



Figure 7 : Répartition géographique des 26 CC-CNRMA composant RESSIF en 2016

³ 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), Clichy - **hôpital Beaujon** (E. Forget), 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 Trousseau** (Didier Moissenet), **hôpital Lariboisière** (Stéphane Bretagne), Versailles- **CH de Versailles** (Odile Eloy), Villejuif - **Hôpital Paul Brousse** (Adela Angouvant) et **Institut Gustave Roussy** (Elisabeth Chachaty).

⁴ Liste des 26 CC-CNRMA par ordre alphabétique des villes, les référents mycologues étant indiqués entre parenthèses : **Amiens** (Taieb Chouaki), **Angers** (Jean-Philippe Bouchara), **Besançon** (Laurence Millon), **Caen** (Julie Bonhomme), **Cayenne** (Christine Aznar -> Magalie Demar), **Clermont-Ferrand** (Philippe Poirier), **Fort-de-France** (Nicole Desbois), **Gustave Roussy** (Elisabeth Chachaty), **Limoges** (Bernard Bouteille), **Nantes** (Florent Morio), **Nice** (Martine Gari-Toussaint), **Orléans** (Didier Poisson), **Paris - Hôpital Cochin** (André Paugam), **Paris - Hôpital Saint-Louis** (Stéphane Bretagne), **Paris - Hôpital des Quinze-Vingt** (Christine Chaumeil->Lilia Merabet), **Paris - Hôpital Necker Enfants Malades** (Marie-Elisabeth Bougnoux), **Poitiers** (Catherine Kauffmann-Lacroix), **Pointe-à-Pitre** (Muriel Nicolas), **Reims** (Dominique Toubas), **Rennes** (Jean-Pierre Gangneux), **Rouen** (Loïc Favennec), **Saint-Etienne** (Hélène Raberin), **Strasbourg** (Valérie Bru), **Toulouse** (Sophie Cassaing), **Tours** (Jacques Chandenier), **Versailles** (Odile Eloy)

Le CNRMA comprend donc des bases de données de surveillance épidémiologique, diverses en termes de nombre de cas enregistrés, ancienneté de la surveillance et couverture géographique (Tableau 3).

Tableau 3 : Bases de données du CNRMA (bilan au 24/03/2017)

Questionnaires	Surveillance Nationale/régionale centres	Ancienneté de la surveillance (serveur)	Nombre de cas enregistrés*
Cryptococcose	196 centres	1985 (RESOMYC)	3312
Mycoses endémiques	118 centres	2005 (RESOMYC)	364
Mycoses rares	87 centres	2005 (RESOMYC)	1318
Fongémies à levures	Observatoire des Levures en IdF 27 -> 15 centres	2002 (RESOMYC)	4850
Toutes les IFI + pneumocystoses	14 -> 26 centres	2012 (RESSIF)	7736

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

Le rapport des 5 ans d'activités ayant été fait très récemment, nous ferons ici un bilan plus succinct.

3.1.1 Surveillance de la cryptococcose :

La surveillance de la cryptococcose a débuté en 1985. A ce jour (24/03/2017), 3351 cas de cryptococcoses ont été enregistrés dans la base RESOMYC. Le réseau des correspondants comprend 196 centres qui ont déclaré entre 1 et 215 cas depuis 1985. Le nombre de cas diagnostiqués et notifiés au CNRMA est stable depuis plusieurs années, aux alentours de 70/an avec davantage de patients séronégatifs que de patients séropositifs (Figure 8). En 2016, 71 cas de cryptococcose ont été notifiés au CNRMA à ce jour dont 38 chez des patients séronégatifs pour le VIH (18.4% de femmes) et 33 chez des patients séropositifs (27.3% de femmes).

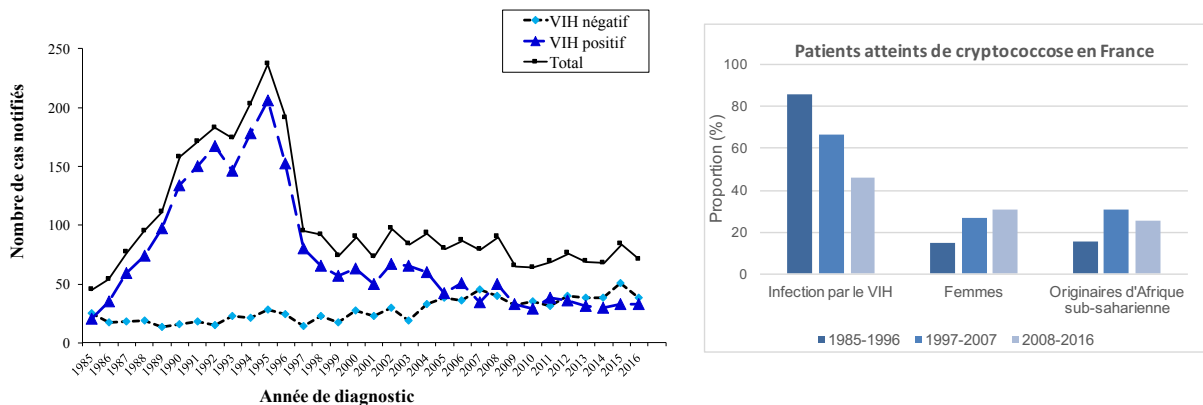


Figure 8: Evolution des caractéristiques des patients atteints de cryptococcose (Bilan au 24/03/2017)

Si l'on s'intéresse à l'ensemble des patients diagnostiqués en France depuis 1985, on peut faire les observations suivantes :

Le nombre de cryptococcoses diagnostiquées chez les sujets séronégatifs pour le VIH a tendance à augmenter depuis 2005 sans qu'on n'ait encore trouvé une explication, avec une augmentation concomitante de la proportion de femmes (Figure 8, $p < 0,001$).

Chez les patients séronégatifs, on identifiait des **transplantés d'organes** [n=154 (17,7%)], des patients atteints de **pathologies malignes** [n=310 (35,7%)], des **pathologies diverses autres** [n=233 (26,8%)], et, enfin, des **patients sans facteur de risque** [n=172, soit 19,8%]. De petites variations annuelles sont visibles sans tendance évidente (Figure 9). Dans le petit nombre de cas sans facteur de risque identifié, une étude de la susceptibilité génétique à la cryptococcose est menée par Anne Puel (INSERM U1163, Institut Imagine, Paris, projet ANR-14-CE15-0006) en collaboration avec le CNRMA, le Service des Maladies Infectieuses et Tropicales de l'hôpital Necker Enfants malades et les mycologues et cliniciens français prenant en charge ces patients.

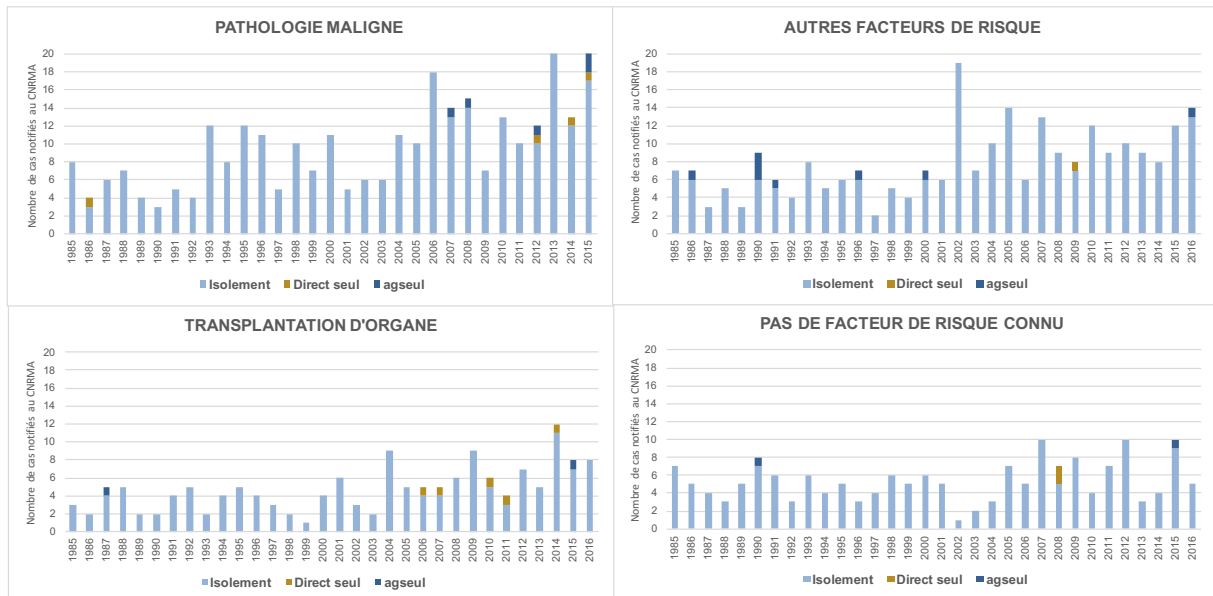


Figure 9 : Evolution du nombre de cas de cryptococcose et des moyens de diagnostic

Analyse selon le facteur de risque chez les patients séronégatifs pour le VIH (données mises à jour le 23/03/2017)

Il faut ici noter que les moyens de diagnostic de cryptococcose ont changé, avec en particulier l'augmentation de l'utilisation du test de diagnostic par bandelettes commercialisé par IMMY (**Figure 10**), mais, dans la quasi-totalité des cas, le diagnostic de cryptococcose repose sur l'isolement d'une souche.

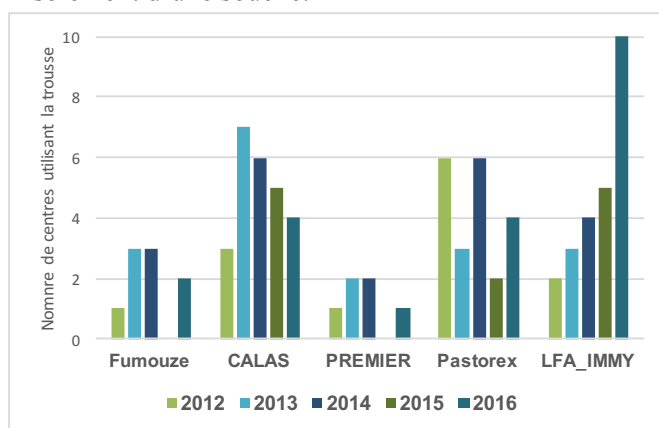


Figure 10 : Evolution des tests de diagnostic de la cryptococcose
(enquête RESSIF, 2012-2016)

Sur le plan clinique, une méningo-encéphalite était plus fréquente chez les sujets séropositifs que chez les sujets séronégatifs (87,6% vs. 73,0%, $p < 0.001$). Des recommandations internationales ont été publiées en 2010, auxquelles nous avons participé grâce aux données cliniques du Groupe d'Etude de la Cryptococcose en France et aux données expérimentales générées dans l'unité de Mycologie Moléculaire. Malgré ces recommandations sur la prise en charge des cryptococcoses, les principes du bilan d'extension systématique pour évaluer la sévérité de l'infection ne sont pas suffisamment

respectés. Il est préoccupant de noter, par exemple, que les PL ne sont pas faites (alors que l'atteinte méningée est un élément pronostique capital pour la prise en charge thérapeutique) chez 14.5% des patients séropositifs pour le VIH et chez lesquels on a découvert une fongémie, et 41% des patients séronégatifs. A noter que sur les 203 patients sans facteur de risque retrouvé et pour lesquels une PL avait été réalisée, près de 80% avaient une méningo-encéphalite. L'on peut cependant noter que la prescription de l'association amphotéricine B + 5-fluorocytosine (selon les recommandations) est devenue le traitement de première intention (84% des cas) en cas de méningo-encéphalite chez tous les patients (séronégatifs et séropositifs), alors qu'on atteignait que 52% des cas dans la période précédente ($p < 0,001$).

Globalement, la cryptococcose reste une infection sévère, y compris, et même, surtout chez les patients séronégatifs. D'après les données enregistrées sur RESOMYC, dans la période 2008-2015, la mortalité globale (information disponible pour 82% des patients, sans différence selon le statut VIH) était de 28.8% chez les patients séronégatifs pour le VIH et de 15.4% chez les patients infectés par le VIH ($p = 0,001$), alors qu'elle était de 25.8% sans différence selon le statut VIH dans la période précédente ($p > 0,05$). Chez les patients séronégatifs pour le VIH, il existait des différences significatives de pronostic global en fonction du terrain ($p = 0,013$). Même si les différences ne sont pas significatives, on peut noter qu'en cas de méningo-encéphalite, la mortalité dépassait 30% chez les transplantés d'organe (32%) et les patients sans facteur de risque connu (37,5%) et que l'absence de prescription de l'association amphotéricine B+flucytosine aggravait le pronostic vital chez tous les patients mais de façon impressionnante chez ceux atteints de pathologie maligne ou sans facteur de risque connu (même si le nombre de patients concernés est faible) (Figure 11).

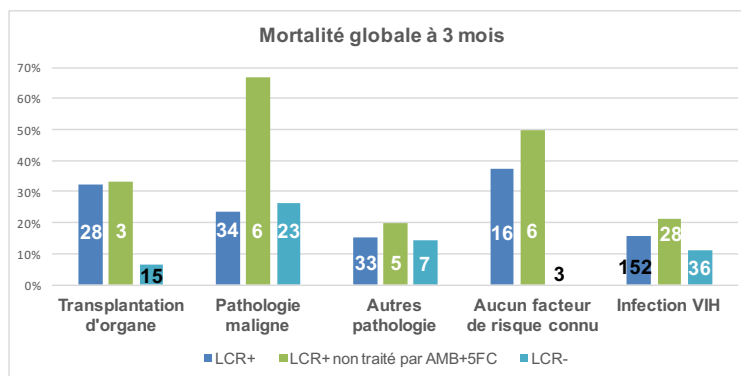


Figure 11 : Devenir à 3 mois des patients atteints de cryptococcose (2008-2016)

Le taux de mortalité est calculé pour les patients pour lesquels l'information est disponible, selon le terrain, l'existence d'une méningo-encéphalite et l'administration initiale de l'association amphotéricine B (AmB)+5-fluorocytosine (5FC). Les chiffres sur les histogrammes représentent le nombre total de patients concernés

3.1.2 Observatoire des Levures

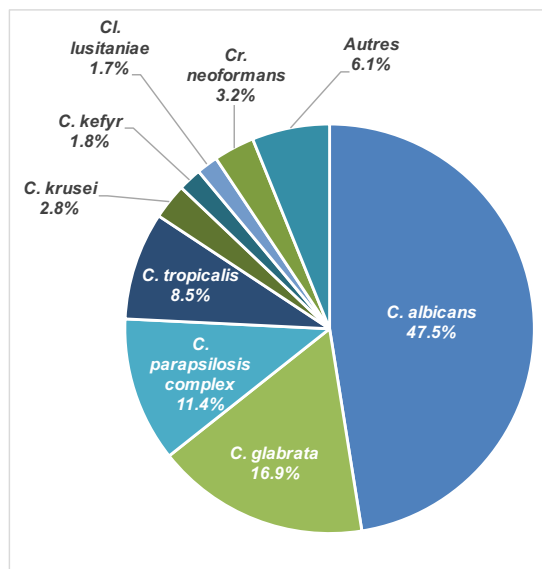


L'observatoire des levures (ODL) est un système de surveillance exhaustif et pérenne, basé sur un réseau de mycologues hospitaliers volontaires en Ile-de-France. Les objectifs de l'ODL sont de suivre l'épidémiologie des fongémies à levures (incidence, caractéristiques des infections, espèces impliquées et résistance éventuelle aux antifongiques) et de constituer une collection de souches.

L'ODL a été mis en place en 2002. La surveillance concerne tous les patients avec fongémie à levure (définie par au moins une hémoculture positive), sans sélection liée à l'âge, la pathologie sous-jacente, le type de service de prise en charge ou la levure impliquée. Les informations cliniques et épidémiologiques sur les cas sont recueillies sur un questionnaire standardisé papier ou sur un site internet sécurisé (<http://resomyc.pasteur.fr>) géré par le CNRMA, en conformité avec la réglementation. Le CNRMA assure également la confirmation de l'espèce (analyse des profils d'assimilation des sucres, spectre protéique par MALDI-TOF, séquençage des régions ITS de l'ADN ribosomique), la détermination des CMI, le typage de certaines espèces et la mise en collection de tous les isolats. Les centres concernés étaient initialement au nombre de 27, regroupant tous les hôpitaux de

court séjour de l'AP-HP et quelques hôpitaux de la périphérie en Ile-de-France, ce nombre est actuellement de 15 du fait des restructurations et des abandons.

Au 31/12/2016, la collection de l'ODL comportait 4959 isolats de levures (dont 250 reçus au cours de l'année 2014) provenant de 4064 patients ayant présenté 4261 épisodes de fongémie à levure, dont 197 épisodes récurrents (isolement de la même espèce à plus de 10 jours d'intervalle ou d'une autre espèce quel que soit le délai).



Au total, 95% des isolats étaient des levures du genre *Candida*, mais on dénombrait aussi d'autres genres, dont *Cryptococcus* (*C. neoformans* représentant 64% des espèces non *Candida* et 3,3% de l'ensemble), mais aussi *Trichosporon* spp. (*asahii*, *inkin*, *mucoïdes*, *loubieri*, *coremiiforme*, *dermatis*, *mondevidense*), *Rhodotorula mucilaginosa*, *Geotrichum* spp. (*Magnusiomyces capitatum* et *Saprochaete clavata*), *Malassezia furfur* et *M. pachydermatis* et *Saccharomyces cerevisiae*. Enfin, 3% des infections étaient mixtes (dus à 2 ou 3 espèces différentes). Les 7 espèces les plus fréquentes représentaient 4511 isolats et leur répartition est indiquée dans la figure suivante (Figure 12).

Figure 12 : Distribution des principales espèces responsables de fongémies, ODL 2002-2016

Nous venons de publier les particularités des fongémies à levures, et en particulier l'augmentation de l'incidence des candidémies et de la mortalité globale des candidémies en USI entre 2002 et 2010⁵ ainsi que les particularités des fongémies liées aux espèces rares⁶ et celles liées aux espèces communes selon le terrain sur lequel elles surviennent (cancer solide, hémopathie maligne ou absence de pathologie maligne)⁷.

3.1.3 RESeau de Surveillance des Infections Fongiques invasives en France (ReSSIF)



RESSIF s'appuie sur un réseau de laboratoires, au nombre de 26 en 2016⁸, les CC-CNRMA qui ont souhaité participer de façon active et pérenne à la surveillance des infections fongiques invasives en France. Nous considérons que RESSIF permettra de déterminer l'incidence des mycoses invasives en France et, pour la première fois, d'obtenir des données prospectives sur la pneumocystose (VIH+ et VIH-) qu'il serait difficile de chiffrer par le biais d'une surveillance passive.

⁵ Lortholary O, *et al.* Worrying trends in incidence and mortality of candidemia in intensive care units (Paris area, 2002-2010). *Intensive Care Med.* 2014; 40:1303-1312.

⁶ Bretagne S, Renaudat C, Desnos-Ollivier M, Sitbon K, Lortholary O, Dromer F. 2017. Predisposing factors and outcome of uncommon yeast species-related fungaemia based on an exhaustive surveillance programme (2002-14). *J Antimicrob Chemother* 1-10.

⁷ Lortholary O, Renaudat C, Sitbon K, Desnos-Ollivier M, Bretagne S, Dromer F. The risk and clinical outcome of candidemia depending on underlying malignancy. *Intensive Care Med* 2017 ; 1-11.

⁸ Liste des CC-CNRMA de 2012 par ordre alphabétique des villes, les référents mycologues étant indiqués entre parenthèses: **Amiens** (Taieb Chouaki), **Angers** (Jean-Philippe Bouchara), **Besançon** (Laurence Millon), **Caen** (Julie Bonhomme), **Cayenne** (Christine Aznar), **Clermont-Ferrand** (Philippe Poirier), **Fort-de-France** (Nicole Desbois), **Gustave Roussy** (Elisabeth Chachaty), **Limoges** (Bernard Bouteille), **Nantes** (Florent Morio), **Nice** (Martine Gari-Toussaint), **Orléans** (Didier Poisson), **Paris – Hôpital Cochin** (André Paugam), **Paris – Hôpital Saint Louis** (Stéphane Bretagne), **Paris – Hôpital des Quinze-Vingt** (Christine Chaumeil), **Poitiers** (Catherine Kauffmann-Lacroix), **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 Chandénier), **Versailles** (Odile Eloy).

Les CC-CNRMA se sont engagés à déclarer de façon exhaustive tous les cas de mycoses invasives prouvées et probables diagnostiqués dans leurs centres grâce au serveur sécurisé dédié (<https://epidemiopasteur.fr/ressif>) et d'adresser au CNRMA tous les isolats correspondants (à l'exception de ceux des espèces les plus fréquentes *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis* et *A. fumigatus*, à moins que l'isolat n'ait un profil anormal de sensibilité aux antifongiques). La contribution des collaborateurs dans les CC-CNRMA est majeure car sans eux cette surveillance des mycoses invasives en France n'aurait aucune valeur. Nous leur en sommes extrêmement reconnaissants.

Le questionnaire en ligne a été construit avec le logiciel ©voozadoo /epiconcept. Il comprend 4 pages et plus de 300 variables, dont certaines, optionnelles, n'apparaissent que si l'information est pertinente dans le contexte. Nous sommes conscients du travail que représente l'enregistrement des données dans les CC-CNRMA. Cependant, le serveur permet aussi d'enregistrer les cas qui ne rentrent pas dans le périmètre de RESSIF (infections "possibles", infections urinaires, péritonéales) pour un usage personnel au niveau de chaque centre. Le médecin d'études cliniques du CNRMA assure le monitoring de la base en continu et réclame les données manquantes ou l'envoi des souches.

La mise en place de RESSIF a permis également de confirmer l'évolution des techniques utilisées en mycologie médicale, puisque les CC-CNRMA complètent chaque année un questionnaire succinct sur ce thème. La tendance la plus impressionnante concerne les moyens d'identification des champignons. En effet, peu de centres utilisaient le MALDI-TOF pour l'identification des levures en 2012, tous l'utilisent maintenant (Figure 13). Cette tendance est décalée dans le temps pour les champignons filamenteux (15% d'utilisation en 2012 et 65% en 2016), ce qui s'explique parfaitement par le fait que les bases de données sont beaucoup moins riches pour les champignons filamenteux.

Il faut ici rappeler qu'une identification fiable repose sur la combinaison de plusieurs critères (MALDI-TOF et/ou séquences nucléotidiques à associer aux critères phénotypiques).

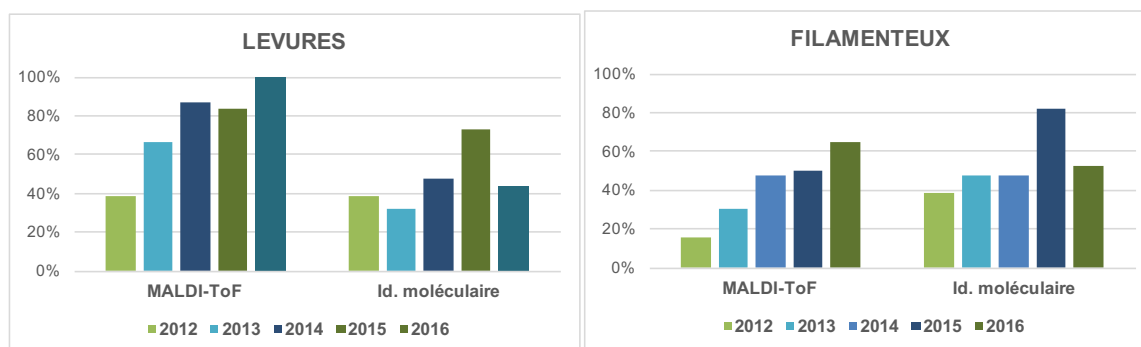


Figure 13 : Evolution des techniques d'identification des champignons depuis 2012
(enquête RESSIF)

Au terme de ces cinq années de fonctionnement, et en sachant que le bilan n'est pas définitif en raison des retards de déclaration, et d'un recul insuffisant pour les évolutions cliniques, il existe 7865 dossiers enregistrés dans RESSIF (bilan au 23/3/2017, Figure 14), ce qui correspond, pour la période 2012-2016 après nettoyage de la base de données, à 7115 épisodes d'IFI et 6653 patients puisque certains patients font plusieurs infections simultanées ou consécutives.

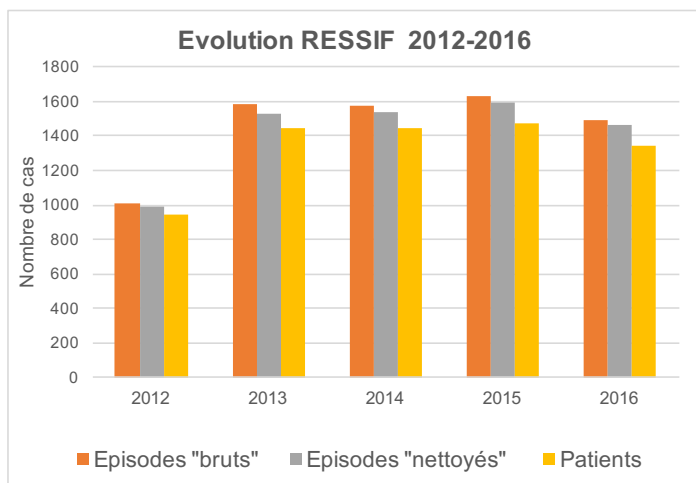


Figure 14 : Evolution des enregistrements sur RESSIF

L'augmentation entre 2012 et 2013 correspondant au doublement des CC-CNRMA impliqués, et l'apparente diminution en 2016 au retard des déclarations.

Le nombre de déclarations est très variable évidemment, en fonction de la taille du centre hospitalier et des services de prise en charge (hématologie, cancérologie, unité de soins intensifs, transplantation, maladies infectieuses, ...). La diversité des infections fongiques est impressionnante (Figure 15) avec 3 mycoses (fongémies à levures, pneumocystoses (PCP) et aspergilloses invasives (AI)) constituant 85% du total, cette hiérarchie correspondant à celle qui avait été trouvée lors de l'analyse des données du PMSI (i.e. données hospitalières nationales) réalisée en 2014 et portant sur une dizaine d'années⁹.

On note 5,3% d'infections mixtes (dues à deux espèces différentes) ou de co-infections (deux types d'IFI par exemple aspergillose et fongémie simultanée), 2% de récurrence et près de 3% des patients ayant plus de 2 IFI successives. Rappelons ici les difficultés diagnostiques de pneumocystose, car la PCR est maintenant très utilisée sur les échantillons respiratoires, sans que les critères de validation et d'interprétation n'aient été clairement définis. RESSIF devrait fournir une base de données utile pour répondre à cette question.

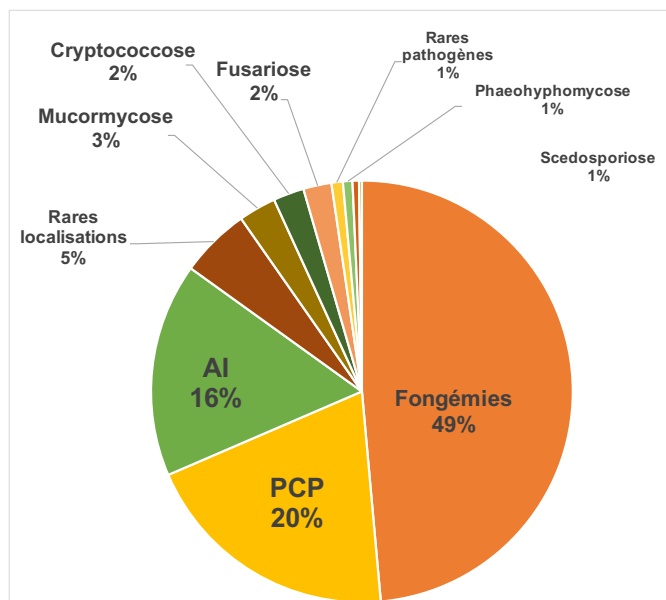


Figure 15 : Répartition des principales infections fongiques invasives (RESSIF, 2012-2016)

Les patients étaient majoritairement (62,5%) des hommes âgés de 57 ± 19 ans, mais avec des différences significatives en fonction des mycoses (cf. plus loin). Le principal facteur de risque correspondait aux pathologies malignes (tumeurs solides, hémopathies malignes, 43,6%), suivi par la chirurgie récente (18,0%), les transplantations d'organe solide (7,7%). Il faut noter que près de 32% des patients étaient pris en charge en unité de soins intensifs. La mortalité globale était de 39,7% avec de grandes variations en fonction du type de mycose évidemment, le pronostic le plus sévère étant associé aux mucormycoses.

Une analyse préliminaire portant sur quelques mycoses démontre l'importance de cette collaboration entre les CC-CNRMA et le CNRMA. L'analyse précise de la base de données RESSIF se fera prochainement, nous ne ferons ici qu'un bref descriptif.

⁹ Bitar D, *et al.* Population-Based Analysis of Invasive Fungal Infections, France, 2001–2010. *Emerging Infect Dis.* 2014; 20:1163–1169.

Les aspergilloses invasives

En 5 ans, 1155 cas d'AI ont été répertoriés dans RESSIF, dont 84% d'infections probables et 16% d'infections prouvées. L'âge moyen des 1138 patients était de 55±17 ans avec 2,5% d'enfant et une majorité d'hommes (64%). Nous avons analysé les facteurs de risque en utilisant les catégories que nous avons utilisées pour l'analyse de SAIF¹⁰ : lymphomes (25,3%), allogreffes quel qu'en soit le motif (18,4%), leucémies aiguës ± autogreffe (11,9%), autres hémopathies et déficits immunitaires congénitaux (11,7%), transplantations d'organes (10,9%), cancers (6,4%), pathologies respiratoires chroniques (2,2%), maladies de système (3,0%) et diverses pathologies autres (10,3%). Il faut cependant 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 16).

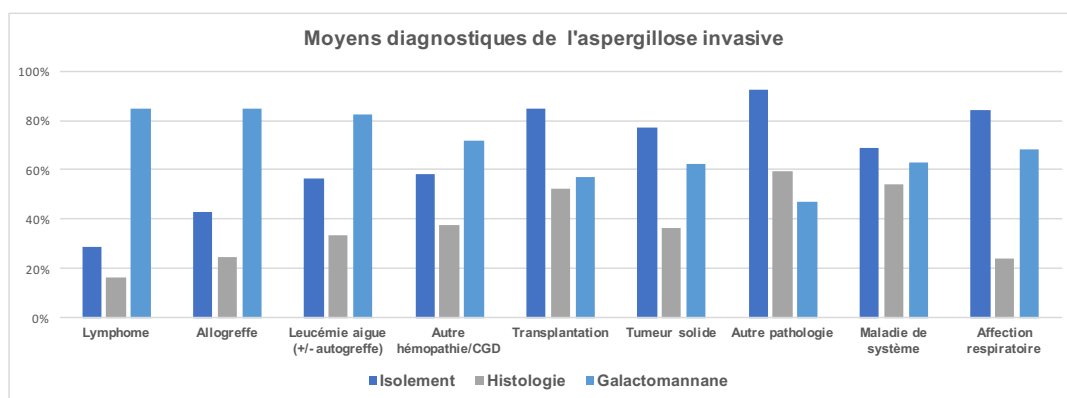


Figure 16 : Principaux outils utilisés dans le diagnostic de l'aspergillose invasive
Analyse selon le terrain

La mortalité globale était de 17% à 8 jours et de 42% à 3 mois sans différence selon que l'infection était probable ou prouvée, mais avec de grandes différences selon le terrain sous-jacent, le pronostic le moins bon étant constaté chez les patients ayant une pathologie respiratoire chronique (Figure 17).

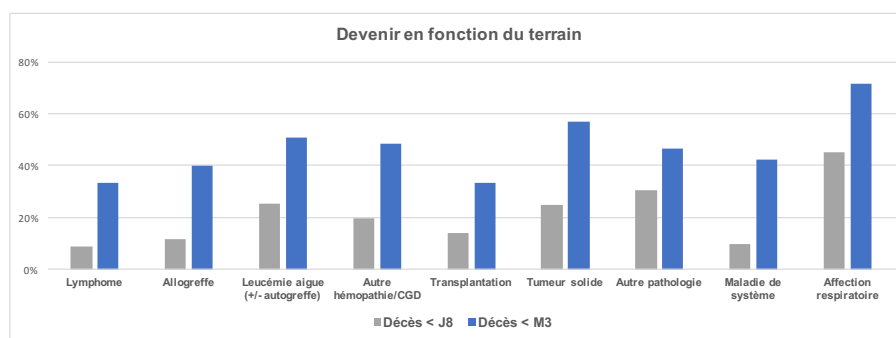


Figure 17 : Devenir à 8 jours et à 3 mois après le diagnostic d'aspergillose invasive

¹⁰ Lortholary O, *et al.* Epidemiological trends in invasive aspergillosis in France: the SAIF network (2005-2007). Clin Microbiol Infect. 2011; 17:1882–1889.

Les pneumocystoses

En 5 ans, 1385 cas de pneumocystose ont été répertoriés dans RESSIF. Il s'agissait majoritairement d'hommes adultes (58±16 ans) avec seulement 2,2% d'enfants. Les patients étaient infectés par le VIH dans 20% des cas seulement. Les conditions prédisposantes pour les patients séronégatifs se répartissaient entre pathologies malignes (47%), transplantation d'organe (14,5%) et autres pathologies (17,5%). L'examen direct était positif dans 54% et la PCR dans 81 % des cas en moyenne avec des variations significatives selon le terrain ($p < 0,0001$). Le diagnostic était établi par la seule PCR dans 52% des cas (examen direct négatif) et par le seul examen direct dans 19% des cas.

Le diagnostic des pneumocystoses continue à poser des problèmes en l'absence de consensus sur les critères. Un travail d'harmonisation des résultats des PCR diagnostiques au niveau des laboratoires européens a été initié¹⁹. Il s'agit d'une première étape sur les outils diagnostiques, sachant que cela ne résoudra pas les questions d'interprétation qui ne pourront être abordées qu'en collaboration avec les cliniciens. Dans le cadre de RESSIF, un certain nombre de centres ne prennent en compte que les résultats de la PCR quantitative, seuls 34% les interpréteraient en fonction des résultats de l'immunofluorescence. Les épisodes de PCP étaient classés en infections prouvées (microscopie positive), infections probables (microscopie négative et PCR positive avec un Cq ≤ 30) et infections possibles pour les autres cas (Figure 18), 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 d'hémopathie maligne ($p < 0,001$, logrank test) (Figure 19).

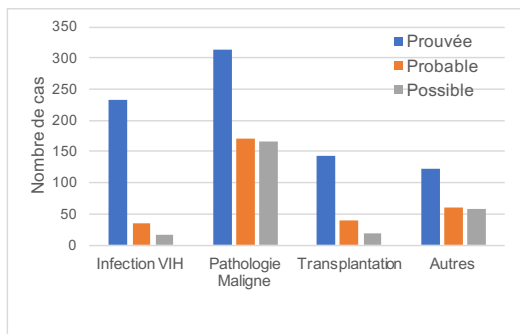


Figure 18 : Classification des PCP répertoriées En fonction de la pathologie sous-jacente

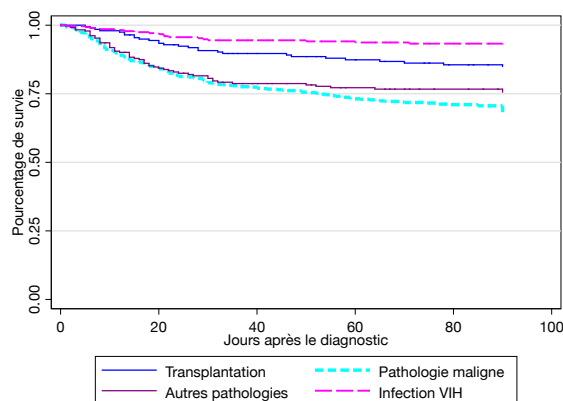


Figure 19 : Courbes de survie après diagnostic de PCP Analyse selon la pathologie sous-jacente (RESSIF, 2012-2016)

Les mucormycoses

Pour les 199 cas de mucormycose rapportés dans RESSIF (65% d'hommes, âge moyen de 53±18 ans), les principaux facteurs de risque se répartissaient en pathologie maligne (61%), diabète (9%), transplantation (9%), et traumatisme/brûlures étendues (13%). L'infection invasive était prouvée dans

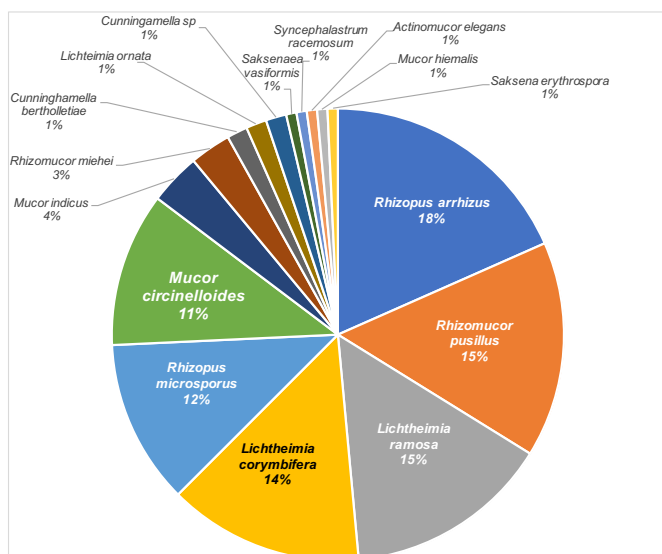


Figure 20 : Répartition des espèces de Mucorales
136 isolats analysés au CNRMA (RESSIF, 2012-2016)

64% des cas. Le diagnostic avait été fait par culture (86,4%), histologie/examen direct (75%) et/ou PCR (37%). L'identification polyphasique systématique des isolats permet de mettre en évidence une diversité impressionnante en termes de genre et espèce (Figure 20) avec 6 espèces représentant 85% du total. On constate des différences de répartition des espèces selon le terrain sous-jacent, 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.

Les fusarioses

Nous avons actuellement répertorié 150 cas d'infection à *Fusarium* spp. Dans le cadre de RESSIF, 51% sont des infections prouvées, et 68% sont 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 41% d'hommes) et l'âge moyen plus jeune (40 ±15 ans). Les autres localisations étaient des infections disséminées avec fongémie (10%), des localisations pulmonaires (7%), cutanées ou articulaires (15%) et autres (4%), avec pour ces localisations non oculaires un terrain favorisant le plus souvent (58%) lié à une hémopathie maligne. On pouvait constater, sans avoir pour l'instant d'explication à ces résultats, que les espèces identifiées variaient en fonction de la localisation. La mortalité globale à 3 mois était de 28% dans les localisations non oculaires.

Cette analyse succincte de la base RESSIF fournit des résultats concordants avec les données obtenues par l'analyse sur 10 ans du PMSI². Elle 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.

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

3.2.1 Définition de l'échantillon de souches testées

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

Tableau 5 : Aspergillus sp. EUCAST Antifungal Clinical Breakpoints –Fungi
(Table v.8.1, March 2017)

Aspergillus spp.

EUCAST Antifungal Clinical Breakpoint Table v. 8.1 valid from 2017-03-01

Antifungal agent	MIC breakpoint (mg/L)												Notes
	<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	<p>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.</p> <p>2. The ECOFFs for these species are in general one step higher than for <i>A. fumigatus</i>.</p> <p>3. There are too few MIC data to establish ECOFFs and hence to suggest any breakpoints.</p> <p>4. Monitoring of azole trough concentrations in patients treated for fungal infection is recommended.</p> <p>5. The MIC values for isolates of <i>A. niger</i> and <i>A. versicolor</i> are in general higher than those for <i>A. fumigatus</i>. Whether this translates into a poorer clinical response is unknown.</p> <p>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.</p>
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 ⁵	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 ⁵	0.25 ⁵	IE ²	IE ²	IE ²	IE ²	0.125 ⁵	0.25 ⁵	IE	IE	
Voriconazole ⁴	IE ²	IE ²	1	2	IE	IE	IE ²	IE ²	IE ²	IE ²	IE	IE	

3.2.3 Résultats de la surveillance des résistances aux antifongiques pour les levures

Les données du CNRMA concernent actuellement plus de 8000 isolats de levures dont la sensibilité a été testée à 8 ou 9 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 6).

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 est donc pour l'instant secondaire dans la prise en charge thérapeutique en dehors de circonstances particulières (échecs, prescriptions antérieures d'antifongiques). Par contre, les données de CMI sont un élément très important de la surveillance épidémiologique lorsque les données sont générées avec la même technique et centralisées comme ici au CNRMA.

Tableau 6 : Profil de sensibilité des levures aux antifongiques
(mise à jour 06/03/2017)

Espèces étudiées	Nom actuel	Valeurs des CMI50 / CMI90 mg/L pour les antifongiques*						
		AMB	5-FC	Fluco	Vori	Posa	Caspo**	Mica**
<i>C. albicans</i> (n=2854)		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=103)		0.03/0.06	≤0.12/≤0.12	≤0.12/0.25	≤0.01/≤0.01	0.03/0.06	0.03/0.03	0.03/0.03
<i>C. glabrata</i> (n=1103)		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. parapsilosis</i> (n=680)		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=35)		0.03/0.06	≤0.12/≤0.12	0.5/16	0.03/1	0.12/0.12	0.12/0.25	0.12/0.25
<i>C. metapsilosis</i> (n=28)		0.06/0.12	≤0.12/≤0.12	1/2	0.03/0.06	0.06/0.12	0.06/0.25	0.12/0.25
<i>C. tropicalis</i> (n=558)		0.06/0.12	≤0.12/64	0.5/4	0.03/0.25	0.06/0.25	0.03/0.06	0.03/0.03
<i>C. krusei</i> (n=290)	<i>Pichia kudriavzevii</i>	0.12/0.25	2/4	32/64	0.25/0.5	0.25/0.25	0.12/0.25	0.06/0.12
<i>C. inconspicua</i> (n=31)		0.12/0.25	2/4	16/32	0.12/0.5	0.12/0.25	0.03/0.12	0.03/0.03
<i>C. kefyr</i> (n=154)	<i>Kluyveromyces marxianus</i>	0.06/0.25	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=93)	<i>Meyerozyma guilliermondii</i>	0.03/0.06	≤0.12/≤0.12	8/32	0.06/0.5	0.25/0.5	0.06/0.25	0.25/0.25
<i>C. fermentati</i> (n=32)	<i>Meyerozyma caribbica</i>	0.12/0.25	≤0.12/≤0.12	8/64	0.12/2	0.25/0.5	0.12/0.5	0.25/2
<i>C. lusitaniae</i> (n=160)	<i>Clavispora lusitaniae</i>	0.06/0.25	≤0.12/1	0.25/0.5	≤0.01/≤0.01	0.03/0.06	0.03/0.06	0.06/0.06
<i>C. haemulonii</i> (n=38)		0.5/4	≤0.12/0.25	32/≥64	≥8/≥8	2/≥8	0.03/0.06	0.06/0.12
<i>C. haemulonii</i> type II (n=36)	<i>Candida duobushaemulonii</i>	2/8	≤0.12/≥64	32/≥64	≥8/≥8	8/≥8	0.03/0.03	0.03/-
<i>C. palmiophila</i> (n=20)		0.12/0.5	≤0.12/0.5	8/64	0.12/0.25	0.12/0.25	0.06/0.25	0.03/0.25
<i>Pichia jadinii</i> (n=20)	<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=30)	<i>Wickerhamomyces anomalus</i>	0.06/0.12	≤0.12/16	2/4	0.12/0.25	0.25/0.5	0.06/0.06	0.03/0.03
<i>Pichia ohmeri</i> (n=27)	<i>Kodamaea ohmeri</i>	0.03/0.06	≤0.12/2	4/16	0.03/0.12	0.06/0.12	0.06/8	0.06/0.25
<i>Pichia norvegensis</i> (n=15)		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=47)		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=23)	<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=33)	<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=51)	<i>Magnusiomyces capitatus</i>	0.25/0.5	≤0.12/0.25	8/16	0.12/0.5	0.25/1	≥8/≥8	≥8/≥8
<i>G. clavatum</i> (n=136)	<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=860)		0.25/0.5	4/16	4/8	0.06/0.12	0.12/0.25	≥8/≥8	4/≥8
<i>Cr. neoformans</i> var. <i>neoformans</i> (n=197)		0.12/0.25	4/16	1/4	≤0.015/0.06	0.03/0.25	≥8/≥8	1/4
<i>Cr. neoformans</i> hybrides AD (n=72)		0.12/0.25	4/8	2/8	0.03/0.12	0.03/0.12	≥8/≥8	4/≥8
<i>Cr. gattii</i> (n=27)		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=36)		0.25/0.5	0.25/0.5	≥64/≥64	2/8	1/2	≥8/≥8	≥8/≥8
<i>Trichosporon asahii</i> (n=45)		2/≥8	32/≥64	4/16	0.12/0.25	0.25/0.5	≥8/≥8	4/≥8

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

3.2.4 Résultats de la surveillance des résistances aux antifongiques pour les filamenteux

Depuis 2003, le CNRMA a déterminé la sensibilité à 8 ou 9 antifongiques systémiques de près de 2300 isolats de champignons filamenteux (Tableau 7). Dans la mesure où l'isavuconazole n'a été testé qu'à partir de 2015, les données 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.

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. Plusieurs isolats d'*A. fumigatus* ont des CMI élevées à l'itraconazole avec parfois une résistance croisée pour le voriconazole et le posaconazole. 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.).

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

Tableau 7 : Profil de sensibilité des champignons filamenteux aux antifongiques (MAJ 06/03/2017)

Espèce (nombre d'isolats testés)	Valeurs des CMI50 / CMI90 (µg/ml) pour les antifongiques*						
	AMB	Itra	Vori	Posa	Caspo	Mica	Terbi
Mucorales							
<i>Lichtheimia corymbifera</i> (n=57)	0.5/0.5	1/≥8	≥8/≥8	0.5/1	≥8/≥8	≥8/≥8	0.5/1
<i>Lichtheimia ramosa</i> (n=61)	0.12/0.25	2/≥8	≥8/≥8	0.5/1	≥8/≥8	≥8/≥8	1/2
<i>Lichtheimia ornata</i> (n=7)	0.25/-	0.5/-	≥8/-	0.5/-	≥8/-	≥8/-	0.5/-
<i>Rhizopus arrhizus</i> (n=75)	0.12/0.25	0.5/4	8/≥8	0.25/1	≥8/≥8	≥8/≥8	≥8/≥8
<i>Rhizopus microsporus</i> (n=47)	0.06/0.12	1/≥8	8/≥8	0.5/1	≥8/≥8	≥8/≥8	0.5/1
<i>Rhizomucor pusillus</i> (n=51)	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>Mucor circinelloides</i> (n=55)	0.03/0.12	≥8/≥8	≥8/≥8	1/≥8	≥8/≥8	≥8/≥8	≥8/≥8
<i>Mucor indicus</i> (n=14)	0.06/0.12	≥8/≥8	≥8/≥8	1/2	≥8/≥8	≥8/≥8	≥8/≥8
<i>Mucor</i> spp. (n=8)	0.03/-	≥8/-	≥8/-	2/-	≥8/-	≥8/-	≥8/-
<i>Cunninghamella bertholletiae</i> (n=10)	0.25/1	1/≥8	≥8/≥8	0.5/1	≥8/-	≥8/≥8	0.12/0.25
<i>Saksenaia vasiformis</i> complex (n=5)	8/-	0.25/-	8/-	0.12/-	≥8/-	≥8/-	0.25/-
Hyphomycètes							
<i>Sarocladium kiliense</i> (n=9)	8/-	≥8/-	0.5/-	1/-	4/-	4/-	0.5/-
<i>Acremonium</i> sp. (n=9)	4/-	≥8/-	2/-	≥8/-	≥8/-	≥8/-	4/-
<i>Aspergillus fumigatus</i> (n=282)	0.25/0.5	0.25/≥8	0.25/4	0.12/0.5	0.5/0.5	0.01/0.03	2/4
<i>Aspergillus flavus</i> (n=116)	1/2	0.12/0.25	0.5/0.5	0.12/0.25	0.25/0.5	≤0.01/0.06	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 nidulans</i> (n=32)	2/4	0.12/0.5	0.12/0.25	0.12/0.5	0.5/4	≤0.01/0.06	0.12/0.5
<i>Aspergillus quadrilineatus</i> (n=15)	0.5/1	0.12/0.5	0.12/0.25	0.12/0.25	2/2	≤0.01/0.03	0.12/0.12
<i>Aspergillus sublatus</i> (n=5)	1/-	0.25/-	0.12/-	0.12/-	1/-	≤0.01/-	0.06/-
<i>Aspergillus</i> section <i>Usti</i> (n=37)	0.5/1	4/≥8	4/8	≥8/≥8	2/≥8	0.25/1	0.25/0.5
<i>Aspergillus</i> section <i>Nigri</i> (n=26)	0.25/0.5	0.5/4	0.5/1	0.25/0.5	0.25/0.5	≤0.01/0.5	0.12/0.5
<i>Aspergillus tubingensis</i> (n=11)	0.25/0.25	0.5/2	1/2	0.25/0.25	0.12/0.25	≤0.01/≤0.01	0.12/0.25
<i>Aspergillus terreus</i> (n=37)	4/8	0.06/0.25	0.5/0.5	0.06/0.25	0.5/2	≤0.01/0.03	0.06/0.12
<i>Aspergillus versicolor</i> (n=9)	1/-	0.25/-	0.25/-	0.12/-	0.5/-	0.03/-	0.25/-
<i>Aspergillus sydowii</i> (n=5)	2/-	0.5/-	0.5/-	0.25/-	0.12/-	≤0.01/-	0.06/-
<i>Fusarium oxysporum</i> complex (n=139)	2/4	≥8/≥8	4/8	2/≥8	≥8/≥8	≥8/≥8	2/8
<i>Fusarium fujikuroi</i> complex (n=122)	4/8	≥8/≥8	4/8	4/≥8	≥8/≥8	≥8/≥8	1/2
<i>Fusarium solani</i> complex (n=175)	2/8	≥8/≥8	8/≥8	≥8/≥8	8/≥8	≥8/≥8	≥8/≥8
<i>Fusarium dimerum</i> complex (n=22)	0.5/0.5	≥8/≥8	2/8	≥8/≥8	8/≥8	≥8/≥8	0.5/1
<i>Scedosporium boydii</i> (n=38)	8/≥8	0.5/≥8	0.25/0.5	0.5/1	1/2	0.25/1	≥8/≥8
<i>Scedosporium apiospermum</i> (n=80)	8/≥8	1/≥8	0.5/1	1/2	1/2	0.25/0.5	≥8/≥8
<i>Scedosporium minutisporum</i> (n=5)	8/-	0.5/-	0.25/-	0.5/-	2/-	0.25/-	≥8/-
<i>Pseudallescheria ellipsoidea</i> (n=7)	≥8/-	1/-	0.5/-	1/-	0.5/-	0.25/-	≥8/-
<i>Lomentospora prolificans</i> (n=29)	8/≥8	≥8/≥8	8/≥8	≥8/≥8	4/≥8	4/≥8	≥8/≥8
<i>Scedosporium dehoogii</i> (n=8)	≥8/-	0.5/-	0.25/-	0.5/-	2/-	0.25/-	≥8/-
<i>Scopulariopsis brevicaulis</i> (n=17)	8/≥8	≥8/≥8	8/≥8	≥8/≥8	1/4	0.25/0.5	2/8
<i>Purpureocillium lilacinum</i> (n=35)	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=25)	0.5/2	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>Trichoderma longibrachiatum</i> (n=18)	1/2	≥8/≥8	0.5/1	1/4	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>Lecytophora hoffmannii</i> (n=5)	0.25/-	0.25/-	1/-	0.25/-	2/-	2/-	0.5/-
<i>Thermothelomyces thermophila</i> (n=7)	1/-	0.12/-	0.12/-	0.12/-	4/-	1/-	2/-
Coelomycètes							
<i>Medicopsis romeroi</i> (n=6)	0.5/-	4/-	0.5/-	1/-	4/-	2/-	0.12/-

(suite)	AMB	Itra	Vori	Posa	Caspo	Mica	Terbi
Dématiés							
<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=28)	0.25/1	1/4	2/8	0.25/1	0.5/≥8	0.25/≥8	4/≥8
<i>Exophiala dermatitidis</i> (n=27)	0.12/0.25	0.5/1	0.06/0.25	0.12/0.5	4/≥8	1/≥8	0.06/0.12
<i>Exophiala jeanselmei</i> (n=8)	1/-	0.5/-	0.25/-	0.25/-	2/-	2/-	0.06/-
<i>Exophiala spinifera</i> (n=8)	0.12/-	0.25/-	0.12/-	0.25/-	2/-	0.25/-	0.12/-
<i>Curvularia</i> spp. (n=18)	0.06/0.25	0.25/≥8	0.5/2	0.12/0.5	0.5/2	0.06/0.5	0.5/2
<i>Chaetomium</i> spp. (n=10)	1/4	0.25/0.5	0.25/1	0.25/0.5	1/2	0.25/1	1/16
<i>Doratomyces</i> spp. (n=5)	2/-	≥8/-	4/-	1/-	1/-	0.12/-	2/-
<i>Fonsecaea pedrosoi</i> (n=5)	0.5/-	0.25/-	0.03/-	0.06/-	2/-	1/-	0.03/-
<i>Fonsecaea nubica</i> (n=9)	0.5/-	0.25/-	0.06/-	0.12/-	1/-	1/-	0.03/-
<i>Phaeoacremonium parasiticum</i> (n=10)	0.5/2	≥8/≥8	0.25/0.25	0.25/0.5	≥8/≥8	≥8/≥8	0.12/0.5
<i>Pleurostomophora richardsiae</i> (n=5)	0.25/-	0.25/-	0.5/-	0.25/-	4/-	1/-	1/-
<i>Neoscytalidium</i> sp. (n=6)	0.12/-	≥8/-	0.12/-	0.5/-	0.5/-	0.06/-	0.5/-
<i>Aureobasidium pullulans</i> (n=6)	0.25/-	0.03/-	0.12/-	0.06/-	1/-	1/-	1/-
Dimorphiques							
<i>Sporothrix schenckii</i> (n=19)	1/2	0.5/2	8/≥8	1/4	≥8/≥8	≥8/≥8	0.06/2

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

Dans la mesure où l'isavuconazole n'a été testé que depuis janvier 2015, nous présentons ici la comparaison des CMI sur des espèces pour lesquelles plus de 10 isolats ont été testés en parallèle avec les différents azolés (Tableau 8, Tableau 9).

Sur les levures, les CMI de l'isavuconazole sont équivalentes à celles du voriconazole sauf sur *S. cerevisiae* pour lequel elles sont un peu plus basses, *C. neoformans* pour lequel elles sont un peu plus élevées, mais surtout *M. capitatus* et *S. clavata* pour lesquels elles sont très nettement plus élevées.

Tableau 8: 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 06/03/2017)

Espèce (nbre isolats testés)	CMI50/CMI90 pour les azolés			
	Fluconazole	Posaconazole	Voriconazole	Isavuconazole
<i>Candida albicans</i> (n=309)	0.124/0.25	≤0.015/0.03	≤0.015/≤0.015	≤0.007/≤0.007
<i>Candida dubliniensis</i> (n=27)	0.25/0.25	0.03/0.06	≤0.015/≤0.015	≤0.007/≤0.007
<i>Candida glabrata</i> (n=148)	8/16	0.5/1	0.125/0.5	0.25/0.5
<i>Candida parapsilosis</i> (n=102)	0.5/2	0.06/0.125	≤0.015/0.06	0.015/0.015
<i>Candida tropicalis</i> (n=73)	0.5/1	0.03/0.06	0.03/0.06	≤0.007/0.03
<i>Pichia kudriavzevii</i> (n=63)	32/64	0.125/0.25	0.25/0.5	0.125/0.25
<i>Kluyveromyces marxianus</i> (n=37)	0.25/0.5	0.06/0.125	≤0.015/≤0.015	≤0.007/≤0.007
<i>Clavispora lusitaniae</i> (n=44)	0.25/0.5	0.03/0.06	≤0.015/≤0.015	≤0.007/0.015
<i>Meyerozyma guilliermondii</i> (n=16)	4/16	0.25/0.5	0.125/0.5	0.25/2
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> (n=12)	4/16	0.5/1	0.25/0.5	0.03/0.5
<i>Kodamaea ohmeri</i> (n=10)	4/4	0.03/0.06	≤0.015/0.03	0.015/0.03
<i>Magnusiomyces capitatus</i> (n=22)	4/16	0.12/0.5	0.03/0.125	4/≥4
<i>Saprochaete clavata</i> (n=55)	16/32	0.25/1	0.25/0.5	2/≥4
<i>C. neoformans</i> var. <i>grubii</i> (n=123)	2/8	0.03/0.125	≤0.015/0.03	0.06/0.25
<i>C. neoformans</i> var. <i>neoformans</i> (n=18)	1/2	≤0.015/0.06	≤0.015/0.03	0.03/0.06
<i>C. neoformans</i> AD hybrid (n=25)	2/8	0.03/0.125	≤0.015/0.06	0.03/0.125

Pour les champignons filamenteux, 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 9 : 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 (technique EUCAST, mise à jour 06/03/2017)

Espèce (nbre d'isolats)	CMI50/CMI90 pour les azolés			
	Posaconazole	Itraconazole	Voriconazole	Isavuconazole
<i>Lichtheimia corymbifera</i> (n=13)	0.5/0.5	1/≥8	≥8/≥8	4/≥8
<i>Lichtheimia ramosa</i> (n=11)	0.5/0.5	2/≥8	≥8/≥8	≥8/≥8
<i>Mucor circinelloides</i> (n=22)	1/≥8	≥8/≥8	≥8/≥8	≥8/≥8
<i>Mucor indicus</i> (n=11)	1/2	≥8/≥8	≥8/≥8	≥8/≥8
<i>Rhizopus arrhizus</i> (n=16)	0.25/1	2/≥8	≥8/≥8	2/≥8
<i>Rhizopus microsporus</i> (n=12)	0.5/1	2/≥8	≥8/≥8	2/4
<i>Rhizomucor pusillus</i> (n=7)	0.25/-	0.5/-	≥8/-	4/-
<i>Aspergillus flavus</i> (n=39)	0.125/0.125	0.125/0.25	0.5/0.5	0.5/1
<i>Aspergillus fumigatus</i> (n=51)	0.06/1	0.25/≥8	0.25/4	0.5/≥8
<i>Aspergillus nidulans</i> (n=7)	0.06/-	0.125/-	0.125/-	0.125/-
<i>Aspergillus quadrilineatus</i> (n=5)	0.06/-	0.06/-	0.06/-	0.125/-
<i>Aspergillus</i> section <i>Usti</i> (n=5)	≥8/-	4/-	4/-	4/-
<i>Aspergillus</i> section <i>Nigri</i> (n=5)	0.125/-	0.5/-	0.5/-	1/-
<i>Aspergillus terreus</i> (n=6)	0.06/-	0.125/-	0.5/-	0.5/-
<i>Fusarium oxysporum</i> complex (n=31)	2/≥8	≥8/≥8	2/4	≥8/≥8
<i>Fusarium fujikuroi</i> complex (n=19)	4/≥8	≥8/≥8	4/4	≥8/≥8
<i>Fusarium solani</i> complex (n=32)	≥8/≥8	≥8/≥8	≥8/≥8	≥8/≥8
<i>Fusarium dimerum</i> complex (n=6)	≥8/-	≥8/-	2/-	≥8/-
<i>Scedosporium boydii</i> (n=6)	0.25/-	1/-	0.25/-	1/-
<i>Scedosporium apiospermum</i> (n=18)	0.5/1	0.51/≥8	0.5/0.5	2/≥8
<i>Lomentospora prolificans</i> (n=5)	≥8/-	≥8/-	≥8/-	≥8/-
<i>Scopulariopsis brevicaulis</i> (n=5)	2/-	≥8/-	≥8/-	4/-
<i>Purpureocillium lilacinum</i> (n=8)	0.25/-	≥8/-	0.5/-	1/-

3.2.5 Analyse des tendances

En prenant des seuils définis partiellement par l'EUCAST, l'on peut étudier les tendances sur les levures collectées dans le cadre de l'observatoire qu'est l'ODL (Figure 21). La surveillance de l'évolution sur 11 ans de la sensibilité *in vitro* des principales levures responsables de fongémie permet de constater la persistance de la très bonne activité du fluconazole et du voriconazole sur les isolats de *C. albicans* ($\leq 1\%$ d'isolats avec une sensibilité diminuée). On peut remarquer l'apparition certaines années d'isolats de *C. parapsilosis* ou de *C. tropicalis* ayant des CMI élevées au fluconazole sans que l'on puisse parler de cas groupés authentifiés. Par ailleurs, on note une stabilité de la sensibilité des isolats de *Cr. neoformans* au fluconazole et l'absence d'isolat « résistant » au voriconazole. En laissant de côté *C. parapsilosis*, on peut également noter que très peu d'isolats ont des CMI de la caspofungine anormalement élevées.

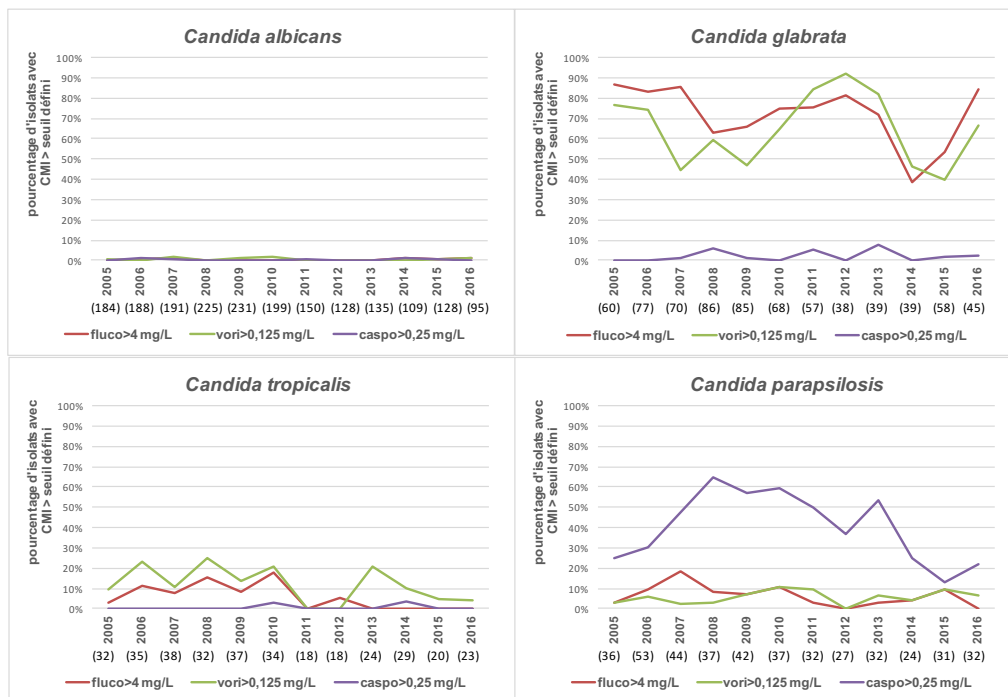


Figure 21 : Evolution de la résistance aux antifongiques pour les levures communes
Isolats ayant une CMI supérieur au seuil indiqué (ODL, 2005-2016)

3.3 Participation aux réseaux de surveillance internationaux, en particulier européens

Il n'existe pas de réseaux internationaux de surveillance, mais les responsables du CNRMA sont en contact avec les microbiologistes et les infectiologues européens et internationaux lors des congrès en particulier ou de colloques ou dans des groupes de travail, tel que l'EUCAST qui indirectement surveille la sensibilité aux anti-infectieux en collectant les données permettant de définir les "epidemiological cutoff" (ECOFFs ou ECVs).

4 Alerte

Les relations avec l'InVS/SpFrance se font très simplement par mail ou par appel téléphonique à l'unité des infections associées aux soins et Résistance aux antibiotiques, Département des maladies infectieuses (Dr. V. Ponties). Les signalements se font dans les deux sens. Les échanges de 2016 ont concerné des cas d'infections à *Geotrichum* sp. et à *Mucor indicus*, ainsi que l'alerte internationale sur *Candida auris*.

4.1 Alerte concernant *Candida auris*

Candida auris est une espèce décrite depuis 2009 et souvent confondue avec les autres espèces du complexe *Candida haemulonii* qui inclut *Candida haemulonii*, *C. haemulonii* var. *vulnera*, *Candida duobushaemulonii*, *Candida pseudohaemulonii* et *Candida auris*¹². Ces espèces se caractérisent par une sensibilité *in vitro* très diminuée à l'amphotéricine B et aux azolés. Elles font certainement partie des espèces émergentes à surveiller en particulier en région tropicale. Plusieurs épidémies ont été rapportées en Inde, aux USA et en Europe. Nous avons relayé les alertes du CDC et de l'eCDC, auprès des mycologues français par le biais de la Société Française de Mycologie Médicale en leur demandant de nous envoyer d'éventuels isolats identifiés comme *C. auris* ou suspects.

¹² Kathuria S et al. Multidrug-Resistant *Candida auris* misidentified as *Candida haemulonii*: Characterization by Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry and DNA Sequencing and Its Antifungal Susceptibility Profile Variability by Vitek 2, CLSI Broth Microdilution, and Etest Method. J Clin Microbiol. 2015;53:1823-30

Aucun isolement récent ne nous a été signalé par les collègues. Nous avons, en collection, deux isolats (reçus en 2007 et 2014) pour lesquels les CMI de la flucytosine et du fluconazole étaient hautes, mais les CMI des autres azolés et de l'amphotéricine B n'étaient que modérément élevées.

4.2 Infections à *Saprochaete clavata*

Depuis 2012, le clone épidémique (clone A) a été identifié plusieurs fois, par petits cas groupés sur un ou deux centres ou de façon sporadique, justifiant des alertes auprès des mycologues français à la recherche de cas non encore déclarés au CNRMA. A ce jour, l'origine de l'épidémie n'est toujours pas élucidée, et des cas liés au clone épidémique (clone A) surviennent régulièrement (Figure 22).

Une PCR en temps réel a été développée, ce qui nous permet d'identifier le clone épidémique en moins de 4 heures dans les meilleurs cas, et toujours en moins de 24 heures.

Les mycologues français sont très attentifs et réactifs quelle que soit leur participation effective aux réseaux de surveillance. Qu'ils en soient ici chaleureusement remerciés.

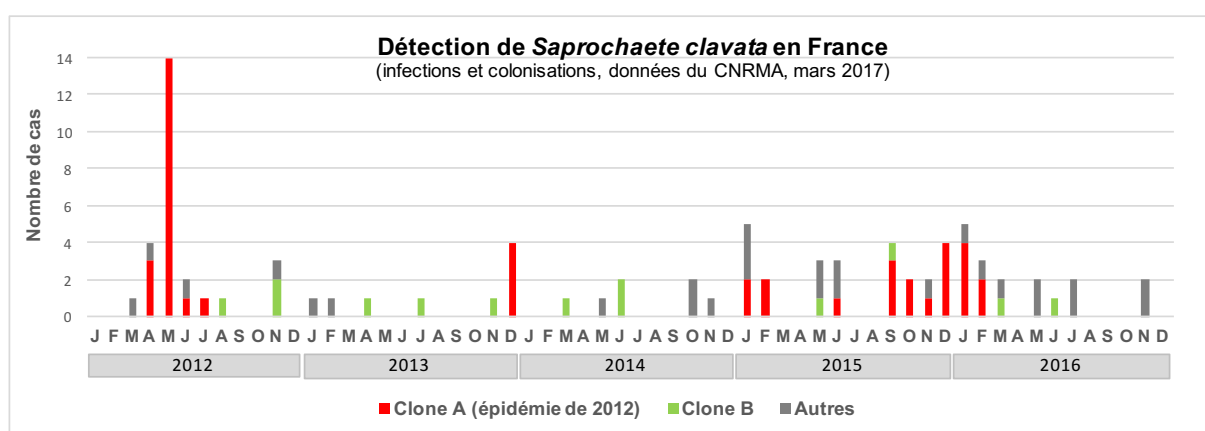


Figure 22 : Détection de *Saprochaete clavata* et du clone épidémique depuis 2012 en France

4.3 Colonisation ou infection à *Mucor indicus*

Contexte

En mars 2016, le CNRMA a été contacté par l'un des mycologues partenaire de RESSIF en raison de l'isolement d'une moisissure inhabituelle, *Mucor indicus*, chez deux enfants immunodéprimés dans son centre (dans un contexte d'infection prouvée pour l'un des enfants), coïncidant avec l'isolement de ce même champignon dans deux autres centres RESSIF de la même région. Ce contexte et la coïncidence temporelle et géographique nous a fait craindre une épidémie avec une source commune potentiellement d'origine alimentaire, et nous a fait contacter nos correspondants de l'InVS/SpFrance. *Mucor indicus* est une *Mucorale* présente dans l'environnement, considérée comme non pathogène, et utilisée dans l'industrie agroalimentaire¹³. Cette espèce est rarement incriminée en clinique (2 souches dans la collection du CNRMA depuis 2002, dont une datant de 2007 (P0), et l'autre de 2014 (P1) correspondant à une mucormycose digestive chez un adolescent atteint de leucémie aiguë).

En avril 2016, le CNRMA (prévenu par l'une des mycologues de RESSIF) et l'ARS ont informé SpFrance qu'un complément alimentaire (dextrine maltose) utilisé pour des préparations diététiques était contaminé à *Mucor* sp. Ce complément alimentaire est utilisé pour l'enrichissement de nutriments infantiles chez des enfants ayant des apports caloriques spontanés insuffisants (tels que les patients immunodéprimés). Aucun cas d'infection ou colonisation n'avait été recensé chez les patients. Le fabricant a conduit des analyses montrant que les taux de moisissures étaient conformes à la

¹³ Karimi K. Zamani A. *Mucor indicus*: biology and industrial application perspectives: a review. Biotechnol Adv, 2013. 31(4): 466-81

législation, mais suggérant que la source de contamination était la matière première (maïs). Un signalement a été fait à l'Anses (en charge de la nutrivigilance) et la DGCCRF (en charge des défauts qualité de ces produits en l'absence d'effets indésirables chez l'homme).

Investigation épidémiologique

Un questionnaire d'investigation, rédigé par SpFrance et le réseau CClin – Arlin, a été envoyé à chaque ES ayant identifié un cas. Un cas était défini comme tout patient, adulte ou enfant, hospitalisé en France et ayant eu un prélèvement positif à *M. indicus* en 2016. Le questionnaire permettait aux équipes opérationnelles d'hygiène (EOH) de renseigner des informations sur les expositions alimentaires des cas au produit dextrine maltose (DM) et/ou d'autres compléments alimentaires, et sur l'utilisation ou non de ce produit dans les services concernés par un cas. Si un établissement de santé déclarait utiliser habituellement de la dextrine maltose, il était alors demandé d'en conserver une boîte non entamée à des fins d'analyses ultérieures.

La recherche active de cas faite par le CNRMA auprès des mycologues français a abouti à l'identification de deux cas supplémentaires, l'un correspondant à une mucormycose digestive d'évolution défavorable chez une enfant, et l'autre, antérieure, liée à une simple colonisation digestive.

Au total, 6 enfants (âge médian 4 ans, 2-8 ans) et 3 adolescents (âge médian 15 ans, 13-18 ans) étaient concernés dans 6 établissements de santé en France. Les patients étaient atteints d'hémopathie maligne (LA) ou de tumeur cérébrale (1 cas). Il s'agissait de colonisation digestive (patients asymptomatiques) dans 5 cas et d'infection invasive prouvée dans 4 cas, associée au décès du patient dans 2 des 4 cas. Un 10^{ème} cas (P10) nous a ensuite été signalé par un 7^{ème} établissement de santé, Figure 23). Il s'agissait d'un adulte bronchopathe chronique, non neutropénique, décédé en quelques jours d'une mucormycose disséminée. Les investigations sur les expositions alimentaires ont permis d'écarter l'ingestion de DM pure au cours de l'hospitalisation pour les 9 patients.

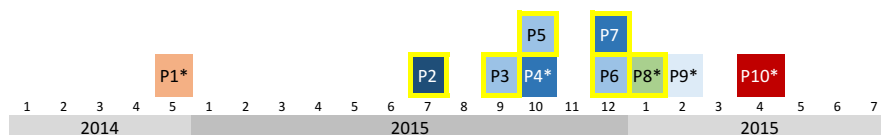


Figure 23 : Distribution des isoléments de *Mucor indicus* en France
 Les cas provenant d'un même centre sont représentés par des pavés de même couleur, tous les cas d'une même région sont en dégradés de bleu. Les cas invasifs sont notés avec un astérisque, et ceux des enfants sont encadrés en jaune

Investigations mycologiques

Les souches retrouvées dans la DM ont été analysées au CNRMA. Il s'agissait de souches de *Mucor circinelloides* (donc une espèce autre qu'*indicus*), et les lots de DM conservés par les ES concernés par au moins un cas, contenaient des moisissures qui se sont révélées être *Aspergillus* et *Mucor* (non *indicus*).

Un séquençage génome entier des souches cliniques a été réalisé à la demande du CNRMA par la plateforme P2M de l'Institut Pasteur. Au total, 22 souches récemment isolées au CNRMA (souches isolées chez les enfants/adolescents + 13 souches provenant de prélèvements séquentiels dans différents sites anatomiques du patient adulte) ont été séquencées. Afin d'apprécier la diversité des souches, un panel de souches épidémiologiquement non liées venant soit de la collection du CNRMA soit de la collection internationale d'Utrecht (CBS, essentiellement de sources environnementales en Asie) a été ajouté à l'analyse.

L'analyse a été réalisée avec les bioinformaticiens de la plateforme P2M et a permis de conclure que les souches des enfants/adolescents immunodéprimés (P1 à P9) étaient plus proches les unes des autres

(Groupe 1) que des souches du patient adulte (P10) ou de la souche ancienne de 2007 (P0) (Groupe 2) (Figure 24). Les souches de la CBS se retrouvaient dans les deux groupes mais distinctes des souches des cas patients. De petites différences entre les souches du patient adulte ont été observées et pourraient être liées soit à des micro-évolutions au cours de l'infection, soit à des artefacts techniques.

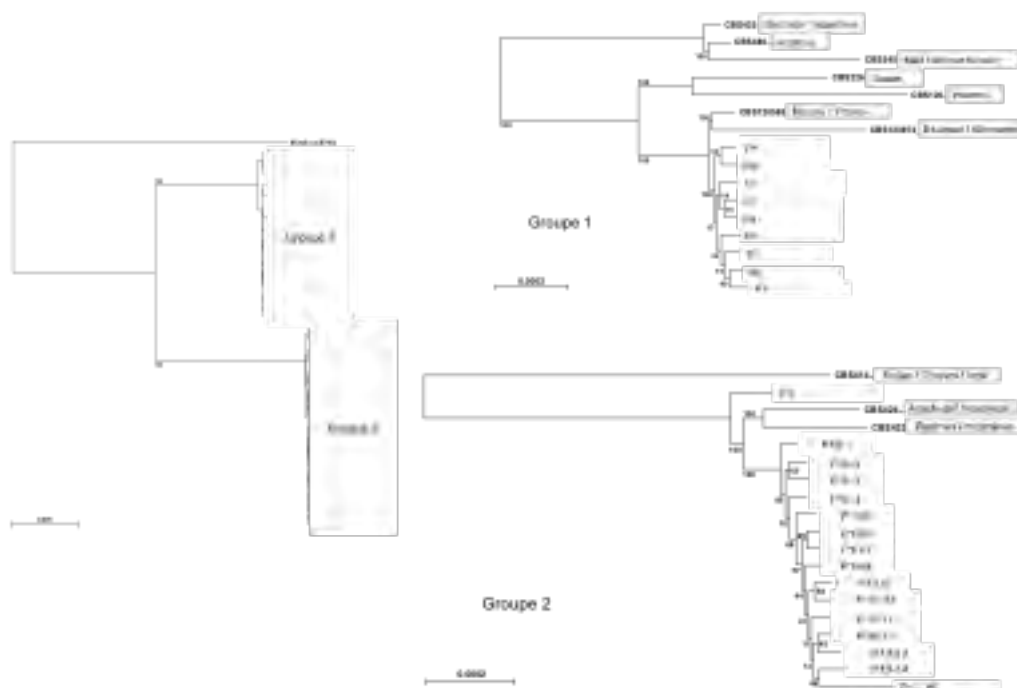


Figure 24 : Analyse phylogénétique des isolats *Mucor indicus*

Arbres construits avec les séquences génome entier pour les souches cliniques des 10 patients et des souches de collection

Ces premières analyses suggèrent donc une clonalité entre les souches des 8 enfants identifiées en 2015/2016 et celle isolée en 2014. La souche du patient adulte s'est quant à elle révélée différente des autres. La clonalité des souches suggère habituellement une source commune, mais ceci reste à confirmer car les connaissances sur la diversité des souches de *Mucor indicus* sont encore limitées. L'hypothèse initiale de la contamination du produit DM n'a pas pu être confirmée, et aucune source commune n'a pu être identifiée.

Aucun nouvel isolement de *M. indicus* n'a, à ce jour, été signalé au CNRMA.

5 Activités d'information, de formation et de conseil

5.1 Enseignements et formation

Les responsables et collaborateurs du CNRMA sont impliqués dans de nombreuses formations.

Le cours de Mycologie Médicale de l'Institut Pasteur est sous la responsabilité, depuis 2005, de F. Dromer et O. Lortholary (co-directeurs) et de D. Garcia-Hermoso (chef de travaux). L'ensemble des collaborateurs (scientifiques, techniciens et secrétaire) participe à cet enseignement, ainsi que des collègues français et européens. Les étudiants français suivant ce cours sont pour la plupart des médecins ou pharmaciens, se préparant aux concours hospitalo-universitaires en parasitologie-mycologie, le cours de l'Institut Pasteur étant un prérequis à cette carrière. Ce public nous permet donc de sensibiliser chaque année de nouveaux collègues à l'importance de la mycologie médicale et aux missions du CNRMA. Le cours est, depuis 2012, dispensé en anglais (<https://www.pasteur.fr/en/education/medical-mycology>).

Nous participons aux **séminaires de formation du groupe EFISG de l'ESCMID** depuis 2006.

Responsables et collaborateurs du CNRMA donnent régulièrement des séminaires dans des centres hospitalo-universitaires ou non en région parisienne et en Province à la demande de collègues. C'est aussi l'occasion de faire connaître le CNRMA et ses missions.

Responsables et collaborateurs du CNRMA co-coordonnent et/ou interviennent aussi dans des DU ou DIU Mycologie Médicale de Paris V, Infection et Transplantation de Paris V, VII, Lyon, Toulouse, DIU de rhinologie (PV-PXII), DIU GISCOH (Gestion des infections et soins courants en hématologie, PXII-PXI), DU ou DIU de thérapeutique anti-infectieux Paris V, VI, VII, Toulouse, Grenoble, Lille, Angers, , DURPI (Réanimation en pathologie infectieuse), DU RéaMID (Réanimation des malades immunodéprimés), DU infection et foie, DU dermatologie tropicale, DU médecine des voyages et migrants, DESC de maladies infectieuses, réanimation médicale, et Masters 2 Paris VI et Paris VII.

DPC dans le cadre du congrès de la Société Française de Mycologie Médicale, Toulouse, mars 2017 : "Taxonomie et Sensibilité antifongique des complexes d'espèces : Que faut-il retenir ?" Dea Garcia-Hermoso – Marie Desnos-Ollivier

5.2 Modalités de diffusion des données de surveillance et production du CNRMA

Les centres collaborateurs à l'ODL et à RESSIF sont réunis une fois par an pour une discussion autour des données de surveillance spécifiques (fongémies à levures pour les premiers, mycoses invasives sans restriction pour les seconds).

Les serveurs RESOMYC et RESSIF sont par ailleurs le véhicule des informations concernant les données de surveillance. En effet, chaque utilisateur peut récupérer en temps réel les données concernant l'ensemble de la surveillance en utilisant les outils d'analyse disponibles sur le site. Enfin, les études liées à l'activité du CNRMA sont publiées dans des journaux d'accès facile (soit libre d'emblée, soit très rapidement après 6 mois). Le CNRMA ne distribue pas de réactifs.

Par ailleurs, le CNRMA met en ligne son rapport d'activité chaque année sur le site dédié de l'Institut Pasteur. Le dernier rapport en ligne est accessible à l'adresse suivante : <http://www.pasteur.fr/cnr/mycologie>

5.3 Activité de conseil aux professionnels

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).

5.4 Activité d'expertise

- ISHAM :

- Dea Garcia-Hermoso représente le CNRMA dans le groupe de travail sur les infections à *Pseudallescheria boydii* au sein de la Confédération Européenne de Mycologie Médicale (ECMM) et de l'International Society for Human and Animal Mycology (ISHAM) et dans le 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* de l'ISHAM.
- La non-incorporation de la PCR dans les critères diagnostiques de l'aspergillose invasive a motivé la création en 2006 d'un groupe de travail (EAPCRI pour European *Aspergillus* PCR Initiative sous l'égide de l'ISHAM ; <http://www.eapcri.eu/>) constitué de paires clinicien-microbiologiste. Stéphane Bretagne a été un membre fondateur de ce groupe. Les nouvelles recommandations internationales devraient inclure la PCR *Aspergillus* dans les critères diagnostiques. En 2016, il a été décidé d'élargir le champ du groupe à d'autres espèces fongiques, *Pneumocystis* et Mucorales, le groupe devenant FPCRI pour Fungal PCR Initiative. Alexandre Alanio a pris la direction du groupe *Pneumocystis* avec comme objectif premier l'harmonisation des procédures entre les différents centres européens à l'aide de contrôles de qualité.
- **EUCAST** : Nous participons activement en tant que représentants pour la France à l'AFST (AntiFungal Susceptibility Testing) subcommittee de l'EUCAST (European Committee for Antibiotic Susceptibility Testing). Ce comité regroupe 1 à 2 membres par pays (environ 15 pays sont représentés et Olivier Lortholary est notre représentant).
- **ECIL** : Olivier Lortholary est membre du groupe de travail sur les recommandations pour les mucormycoses (2010-2012) et Stéphane Bretagne de celui concernant le diagnostic de l'aspergillose (ECIL3). Stéphane Bretagne a participé avec Alexandre Alanio (AHU, Hôpital Saint Louis) à la 5^{ème} European Conference on Infections in Leukaemia (ECIL5, 19-20 septembre 2013) sur *Pneumocystis jirovecii* [*Pneumocystis jirovecii* infections in (non HIV-infected) hematology patients : biological aspects].
- **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'actualisation du consensus des définitions des infections fongiques invasives (2008, 2013).
- **EFISG** : au sein de la Société Européenne de Microbiologie (ECSMID), s'est créé un groupe d'étude des infections fongiques (EFISG) dont le secrétariat a été assuré par O. Lortholary jusqu'en 2007. L'objectif de ce groupe est de pouvoir mener en Europe des études épidémiologiques, physiopathologiques et cliniques dans le domaine des infections fongiques systémiques en dehors du domaine de l'hématologie couvert dans l'EORTC. Ce groupe rassemble cliniciens et mycologues de nombreux pays européens concernés par ces thématiques.
- **Les industriels** : de nombreux contacts se développent avec les industriels développant des antifongiques systémiques en raison des vastes missions d'expertise et de surveillance du CNRMA. Ce dernier aspect nous permet d'apprécier l'évolution de la résistance aux antifongiques et de tester un grand nombre de souches sauvages vis-à-vis des nouveaux antifongiques. Les données générées représentent une des meilleures sources d'informations au niveau européen avec la technique EUCAST. Nous avons participé aux différentes étapes d'évaluation de prototypes pour le développement d'un test de diagnostic de la cryptococcose. Le test BioSynex®CryptoPS permet de détecter l'antigène capsulaire dans les liquides biologiques et de déterminer en une seule analyse si le titre antigénique est très élevé faisant suspecter une infection sévère (méningo-encéphalite, infection disséminée ...). Ce test contribue désormais au diagnostic des cryptococcoses latentes dans les pays où l'incidence de la co-infection VIH/cryptococcose est très élevée, ceci afin d'instituer un traitement préemptif le plus rapidement possible.

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

Description de nouvelles espèces

Les mycétomes sont des infections chroniques sous-cutanées débilantes causées notamment par de nombreuses espèces de champignons telluriques dans les régions tropicales. Cette infection caractérisée par la production de grains, est reconnue, depuis mai 2016, par l'OMS comme une maladie tropicale négligée. De nombreuses souches responsables de mycétomes à grains noirs non sporulantes étaient regroupées sous le nom d'espèce *Madurella grisea* mais les études moléculaires récentes permettent la description et/ou la reclassification des espèces. En collaboration avec le centre de référence de Bristol (UK), nous avons notamment décrit un nouveau genre, *Emarella*, comportant deux espèces *Emarella grisea* regroupant des souches provenant exclusivement d'Inde et *Emarella paragrisea*. La description de ces nouvelles espèces est basée sur une identification polygénique. L'identification correcte des espèces est importante pour la prise en charge des patients et l'étude épidémiologique de ces maladies tropicales¹⁴.

Développement de méthodes de typage

Typage de C. parapsilosis

En collaboration avec Andres Puime (Uruguay), et Philippe Poirier (Clermont-Ferrand), nous avons analysé en utilisant 3 des 4 microsatellites décrits¹⁵, la structure des populations de souches de *C. parapsilosis* sélectionnées sur la base d'une dispersion géographique (43 hôpitaux français et 10 hôpitaux uruguayens) et temporelle (2004-2013). Le panel comportait 161 souches (128 patients différents) isolées au cours d'infections superficielles ou invasives, certains isolats étant résistants aux azolés. L'étude a permis de déterminer : 1) la diversité génétique des souches ; 2) l'absence de spécificité géographique ; 3) l'existence d'infection mixte par deux isolats génétiquement éloignés (incluant un cas avec un isolat sensible et l'autre résistant au posaconazole ; 4) l'existence de microévolutions au cours de l'infection avec perte d'hétérozygotie d'un des marqueurs ; 5) la clonalité des isolats lors de cas groupés dans un même centre (Figure 25).

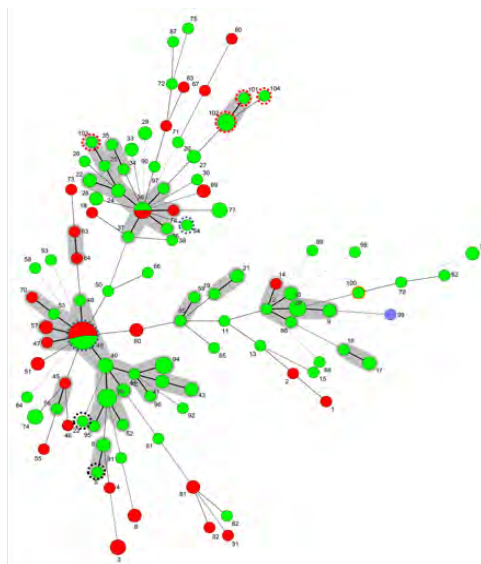


Figure 25 : Arbre décrivant la population des isolats de *C. parapsilosis* étudiés

Des isolats de France (n=116, vert) et d'Uruguay (n=44, rouge) et la souche type ATCC22019 (bleu) ont été analysés. La taille des cercles est déterminée par le nombre d'isolats partageant le même génotype (ST). Les cercles entourés de pointillés correspondent à des infections mixtes (pointillés bleu et noir) et/ou à des cas groupés (pointillés rouge) (Bionumerics v.6.6)

¹⁴ Borman AM et al. Novel taxa associated with human fungal black-grain mycetomas -*Emarella grisea* gen nov. et sp. nov. and *Emarella paragrisea* sp. nov. J Clin Microbiol. 2016; 54(7):1738-45

¹⁵ Sabino R. et al. New polymorphic microsatellite markers able to distinguish among *Candida parapsilosis* sensu stricto isolates. J Clin Microbiol. 2010;48:1677-82

Détection du clone épidémique de *Saprochaete clavata*

Lors de l'épidémie de 2012 par l'espèce *Saprochaete clavata*, en collaboration avec la Plateforme de séquençage de l'Institut Pasteur et l'InVS/SpFrance, nous avons mis en évidence, grâce au séquençage génome entier de souches cliniques reçues au CNRMA entre 2005 et 2012 et la souche type, le caractère clonal des souches responsables de l'épidémie nationale. Afin d'identifier rapidement les éventuels nouveaux cas d'infection dus au clone épidémique, nous avons mis au point une PCR quantitative (qPCR) en temps réel de type ASO (Allele specific oligo), permettant de calculer, à partir d'ADN concentré à 1 ng/μL, la différence de valeur de Cq (Quantitative Cycle) obtenue pour la PCR comportant l'amorce spécifique du clone et la qPCR comportant l'amorce de séquence « sauvage ». Cette qPCR nous permet, à partir d'un isolat pur, de déterminer en quelques heures l'appartenance éventuelle de l'isolat au clone épidémique.

Typage de *Pneumocystis jirovecii*

Pour aller plus loin dans les limites de détection des mélanges de *P. jirovecii* dans les prélèvements humains, en plus de la méthode de typage par microsatellites, nous avons utilisé une méthode de pyroséquençage à partir d'amplicon généré sur 3 gènes cibles (1 gène mitochondrial et 2 gènes nucléaires) sur 33 prélèvements humains. Cette méthode a révélé que 92% des prélèvements contenaient des mélanges, ce qui renforce l'idée que les humains sont constamment exposés à *P. jirovecii* tout au long de leur vie. Elle a également révélé que la diversité génétique était plus importante dans le gène mitochondrial que dans les gènes nucléaires. Nous avons également montré en parallèle la possibilité d'hétéroplasmie mitochondriale à partir de quelques prélèvements. Cette étude nous amène à proposer de ne pas utiliser le séquençage de cibles mitochondriales pour le typage *P. jirovecii*, ceci risquant de d'augmenter artificiellement la diversité observée liée à des phénomènes génétiques propres à l'ADN mitochondrial de *P. jirovecii*¹⁶.

Cryptococcose

Evaluation d'un test rapide de diagnostic de la cryptococcose

Notre expertise sur la cryptococcose a été sollicitée par la société BioSynex qui a développé un test de détection semi-quantitatif rapide (type bandelettes). Le test BioSynex®CryptoPS permet de détecter l'antigène capsulaire dans les liquides biologiques et de déterminer en une seule analyse si le titre antigénique est très élevé faisant suspecter une infection sévère (méningo-encéphalite, infection disséminée ...). Ce test contribue désormais au diagnostic des cryptococcoses latentes dans les pays où l'incidence de la co-infection VIH/cryptococcose est très élevée, ceci afin d'instituer un traitement préemptif le plus rapidement possible. Ainsi l'étude PreCasa promue par l'ANRS (coordinateurs O Lortholary, E Temfack) démontre une très bonne concordance entre les tests IMMY et BioSynex sur sérum et plasma (manuscrit en préparation).

Cryptococcose et *Cryptococcus spp.* en Europe

Cryptococcus neoformans serotype D représente environ 30% des isolats cliniques isolés en Europe et est souvent responsable d'infections cutanées primaires et de lésions de la peau dans les cas de cryptococcoses disséminées. Il existe peu de données concernant la diversité génétique de ce sérotype. Dans le cadre d'une collaboration internationale mise en place par Massimo Cogliati (Université de Milan, Italie), nous avons participé à l'étude moléculaire par MLST de 83 isolats de sérotype D responsables d'infections cutanées primaires, d'infections disséminées ou provenant de l'environnement ou d'infections vétérinaires. Cette étude suggère l'existence d'évènements de

¹⁶ Alanio A et al. Diversity of *Pneumocystis jirovecii* during Infection Revealed by Ultra-Deep Pyrosequencing.,” *Front Microbiol*, 2016 ; 7 : 733.

recombinaison dans la population de sérotype D, mais aucune corrélation entre l'origine géographique et le génotype¹⁷, résultats obtenus également dans l'analyse des souches de l'étude CryptoA/D.

Dans le cadre d'une collaboration internationale européenne, nous avons participé à l'étude moléculaire de souches environnementales de *C. neoformans* et *C. gattii*. Cette étude a permis le recueil de plus de 6000 échantillons provenant de plus 3000 arbres dont 5% étaient colonisés par des levures cryptococciques. Ce travail a permis de montrer que certaines espèces d'arbres étaient plus fréquemment colonisées par *C. neoformans* ou par *C. gattii*, avec des variations selon la période de l'année, et plus particulièrement dans les régions méditerranéennes. La majorité des isolats de *C. gattii* appartenait au groupe moléculaire VGI. Les isolats de *C. neoformans* étaient principalement du groupe VNI, mais les groupes VNII, VNIV et VNIII étaient aussi retrouvés. Ces résultats confirment donc la présence des deux espèces *neoformans* et *gattii* dans l'environnement au sein du bassin méditerranéen et montrent que les oliviers et les caroubiers sont des réservoirs importants pour ces espèces¹⁸.

Essai thérapeutique randomisé en Afrique

En collaboration avec le St Georges Hospital, University of London (primary investigator Pr Tom Harrison), le "medical research council" et l'Agence Nationale de Recherches sur le SIDA (ANRS) financent un essai thérapeutique dans trois pays (Malawi, Zambie, Cameroun) "ACTA". ACTA est une étude de phase III randomisée sur le traitement de la méningo-encéphalite cryptococcique dans le contexte de l'infection VIH. ACTA a inclus 680 patients en décembre 2016 et ambitionne de valider un traitement oral de l'infection reposant sur l'association de fluconazole à posologie élevée et de la flucytosine et d'un traitement raccourci à une semaine par amphotéricine B et fluconazole ou flucytosine en comparaison au traitement de référence par amphotéricine B et flucytosine pendant 14 jours. Les résultats de cet essai permettront l'actualisation des recommandations internationales sur la prise en charge de la méningite à *Cr. neoformans*. Des études ancillaires seront également réalisées au Royaume Uni et en France (pharmacocinétiques/dynamiques, coût efficacité, génotypage des isolats, analyses protéomiques et immunologiques et études sur la susceptibilité de l'hôte). Olivier Lortholary est l'investigateur principal (nord) pour la partie financée par l'ANRS.

Optimisation diagnostique des infections fongiques

Pneumocystoses

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

Les recommandations sont maintenant publiées dans 4 manuscrits dans Journal of Antimicrobial Chemotherapy en 2016^{19,20,21,22}.

¹⁷ Cogliati M. et al. Multilocus sequence typing analysis reveals that *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* is a recombinant population. Fungal Genet Biol. 2016;87:22-9

¹⁸ Cogliati et al. Environmental distribution of *Cryptococcus neoformans* and *C. gattii* around the Mediterranean basin. FEMS Yeast Res. 2016;16(7). pii: fow086.

¹⁹ Alanio A et al. ECIL guidelines for the diagnosis of *Pneumocystis jirovecii* pneumonia in patients with haematological malignancies and stem cell transplant recipients. J Antimicrob Chemother 2016;71(9):2386-96

²⁰ Maertens J et al. ECIL guidelines for preventing *Pneumocystis jirovecii* pneumonia in patients with haematological malignancies and stem cell transplant recipients. J Antimicrob Chemother 2016; 71(9):2397-404

²¹ Cordonnier C et al. *Pneumocystis jirovecii* pneumonia: still a concern in patients with haematological malignancies and stem cell transplant recipients. J Antimicrob Chemother 2016;71(9):2379-85

²² Maschmeyer G et al. ECIL guidelines for treatment of *Pneumocystis jirovecii* pneumonia in non-HIV-infected haematology patients. J Antimicrob Chemother 2016; 71:2405-13

Variation du nombre de copies de l'ARN 18S d'*Aspergillus fumigatus* analysé par droplet PCR

Dans le but d'optimiser la recherche d'ADN circulant d'*Aspergillus fumigatus* lors d'aspergillose invasive, nous avons évalué l'intérêt de la droplet PCR, méthode qui consiste à fragmenter l'échantillon à tester en gouttelettes, chacune étant testée par PCR pour la présence de l'ADN recherché. Le but était de voir si la digestion de l'ADN dans l'échantillon clinique pouvait générer davantage de copies, améliorant ainsi la sensibilité de la PCR diagnostique. Cet espoir a été déçu. L'explication est donc que l'ADN présent dans le sérum est déjà fragmenté. Ceci apporte cependant des arguments physiopathologiques sur l'infection aspergillaire. Par ailleurs, nous avons confirmé que chaque isolat possède un nombre variable de copie d'ARN ribosomal, ce qui peut expliquer certaines discordances entre laboratoire si la souche utilisée pour les contrôles n'est pas identique²³.

Etudes concernant les fongémies à levures

Fongémies en onco-hématologie

Nous avons analysé les facteurs de risque et le pronostic des fongémies dues aux six espèces les plus fréquentes de *Candida* chez des adultes atteints d'une pathologie onco-hématologique inclus dans l'ODL entre 2002 et 2014. Parmi les 3417 patients (3666 isolats), 1164 (34.1%) avaient une tumeur solide (45.7% digestive) et 586 (17.1%) une hémopathie maligne (41.8% lymphomes, 33.5% leucémies aiguës). Les patients ayant une hémopathie étaient plus jeunes, plus pré-exposés aux antifongiques, infectés par *C. tropicalis*, *C. krusei* ou *C. kefyr*, traités en première ligne par une échinocandine. Comparés aux patients hospitalisés dans d'autres services, les patients hospitalisés en réanimation étaient moins fréquemment infectés par *C. parapsilosis* ($p < 0.02$), avaient bénéficié d'une chirurgie récente ($p < 0.03$) et décédaient plus fréquemment à J30 et à J8 ($p < 0.0001$). L'augmentation de la mortalité globale en réanimation était observée chez les patients atteints de cancer ($p < 0.04$). Pour tous les patients, l'absence de prescription antifongique malgré la positivité connue de l'hémoculture augmentait le risque de décès. Le risque d'être infecté par une espèce donnée de *Candida* en comparaison à *C. albicans* était influencé par l'âge, le sexe, le type de tumeur maligne, l'hospitalisation en réanimation, la présence d'un cathéter veineux central, le statut VIH, une toxicomanie intra-veineuse et la pré-exposition aux antifongiques. En comparaison à *C. albicans*, *C. glabrata* (OR= 0.69 [0.54-0.89]) et *C. parapsilosis* (OR= 0.49 [0.35-0.67]) étaient associés à un risque diminué de décès à J8 et à J30.

Notre conclusion était que le type de tumeur maligne et l'hospitalisation en réanimation influençaient les caractéristiques des candidémies et donc méritaient d'être prises en compte dans la stratégie thérapeutique initiale. L'article vient d'être publié dans Intensive Care Medicine²⁴.

Fongémies dues aux levures rares

Les levures rares (UYS pour « uncommon yeast species » arbitrairement définies comme <2% des candidémies) sont souvent décrites en marge d'étude sur des espèces fréquentes ou sous forme de cas cliniques plus ou moins regroupés. Pour limiter les biais de publications et faire ressortir des facteurs de risques propres à ces UYS, nous avons utilisé l'ODL qui nous a permis de recueillir de façon exhaustive les cas liés à des espèces rares et fréquentes, survenant dans plusieurs centres, sans restriction à une population donnée, sans équivoque diagnostique puisqu'il s'agit de fongémie. L'atout supplémentaire de l'ODL est sa pérennité sur plusieurs années qui nous a permis de rassembler des

²³ Alanio A et al. Variation in copy number of the 28S rDNA of *Aspergillus fumigatus* measured by droplet digital PCR and analog quantitative real-time PCR. J. Microbiol. Methods 2016; 127 :160-163

²⁴ Lortholary O, Renaudat C, Sitbon K, Desnos-Ollivier M, Bretagne S, Dromer F, French Mycoses Study Group. The risk and clinical outcome of candidemia depending on underlying malignancy. Intensive Care Med. 2017 Mar 20. doi: 10.1007/s00134-017-4743-y. [Epub ahead of print]

données sur un nombre de cas liés à des espèces rares dépassant souvent les plus grandes séries publiées.

Nous avons analysé 338 épisodes de fongémies à UYS que nous avons comparé à 1998 épisodes de candidémies dues à *C. albicans* survenues pendant la même période (01/10/2002-31/12/2014). La première observation est la grande variété des espèces (35 UYS différentes comprenant 27 ascomycètes et 8 basidiomycètes). Onze de ces 35 espèces étaient définies comme résistantes à la caspofungine (MIC₅₀ >0.25 mg/L, CAS-R) et 15 comme résistantes au fluconazole (MIC₅₀>4 mg/L, FCZ-R). L'incidence des fongémies à UYS était stable au cours du temps autour de 10% pour l'ensemble des espèces. L'analyse multivariée retrouvait que les hémopathies malignes et (OR=2.39 [1.79-3.18]) et la pré-exposition aux antifongiques (OR=1.87 [1.30-2.69]) étaient des facteurs indépendants de prédisposition aux fongémies UYS comparées aux candidémies à *C. albicans*.

Cependant, si l'on considérait l'espèce au sein de ces levures rares, seule les fongémies due à *C. kefyr* (OR=4.01 [2.42-6.64]) et à *Trichosporon* spp. (OR=5.38 [1.72-16.81]) restaient associées aux hémopathies malignes, et celles dues à *Trichosporon* spp. (OR=15.67 [3.62-67.80]) ou *Geotrichum* spp. (OR=13.17 [3.33-52.03]) à une pré-exposition aux antifongiques. La mortalité globale à J30 était de 35%, non différente globalement pour les espèces FCZ-R ou CAS-R, mais très différente pour certaines espèces rares avec par exemple une mortalité significativement plus élevée en cas de fongémies dues à *Geotrichum* spp. ou à *C. dubliniensis*, ou plus basse en cas de fongémies due à *C. lusitaniae*. Ainsi, les conclusions souvent avancées sur le risque d'émergence d'espèces rares sous pression antifongiques et en hématologie doivent-elles être nuancées car les facteurs de risque de survenue des UYS sont très variables suivant l'espèce considérée, soulignant l'impératif d'une identification au niveau de l'espèce de tout isolat provenant d'une candidémie. Ces conclusions n'ont été possibles que parce que le nombre d'isolats analysés à travers ODL a été conséquent.

Cette analyse souligne encore une fois l'intérêt des programmes de surveillance mis en place au CNRMA avec la collaboration des mycologues et cliniciens français. On peut aussi rappeler le rôle du CNRMA dans l'identification ou la confirmation des identifications d'espèces rares, mais aussi pour les conseils de prise en charge des patients concernés. L'article vient d'être publié dans J. Antimicrob. Chemother.²⁵

Infections à coelomycètes

Les coelomycètes sont de plus en plus souvent rapportés comme responsables d'infections avec atteinte cutanée ou sous-cutanée chez des patients immunodéprimés ou non. Ils constituent un groupe hétérogène de champignons filamenteux avec des caractéristiques particulières en culture. Nous avons rapporté récemment 18 cas d'infections prouvées cutanées et ou sous-cutanées dus à des coelomycètes identifiés au CNRMA entre 2005 et 2014. L'âge médian était de 60 ans et tous les patients étaient originaires de zone tropicale ou sub-tropicale. Une immunodépression était retrouvée dans 89% des cas. Les lésions étaient des nodules, abcès ou plaques infiltrées de localisation distale. Différents genres ont été identifiés : *Medicopsis* (6), *Paraconiothyrium* (3), *Gloniopsis* (3), *Diaporthe* (3), *Peyronellaea* (2), *Lasiodiplodia* (1). Le traitement a consisté en une chirurgie d'excision complète (10) ou partielle (2) et/ou l'utilisation du voriconazole (5) et du posaconazole (4). L'analyse de la littérature retrouvait 48 autres cas.

Nos conclusions étaient que la suspicion d'infections à coelomycètes devait être évoquée devant des lésions cutanées ou sous-cutanées chez des immunodéprimés originaires de zone tropicale : l'approche diagnostique par séquençage jointe à l'approche phénotypique classique était cruciale pour l'identification des coelomycètes ; le traitement chirurgical doit être proposé pour des lésions uniques

²⁵ Bretagne S, Renaudat C, Desnos-Ollivier M, Sitbon K, Lortholary O, Dromer F; French Mycosis Study Group. Predisposing factors and outcome of uncommon yeast species-related fungaemia based on an exhaustive surveillance programme (2002-14). J Antimicrob Chemother. 2017 Mar 5. doi: 10.1093/jac/dkx045. [Epub ahead of print]

et les nouveaux triazolés doivent être proposés en cas de lésions extensives en particulier chez des immunodéprimés²⁶.

6.1 Les publications et communications en lien avec les activités du CNR

Invitations dans des congrès internationaux

- 7th Advances Against Aspergillosis (AAA-7), 3-5 March 2016, Manchester, UK: “Performance evaluation of multiplex PCR including *Aspergillus* – not so simple!” (S. Bretagne)
- 25th ECCMID, April 2016, Copenhagen, Danmark:
 - “Analysis of 306 episodes of yeast fungemia due to uncommon species uncovered important variations between species, predisposing factors, and outcome” (S. Bretagne)
 - “Fungal infections: diagnosis and management”; “Identification of Mucorales in human tissues: major contribution of PCR electrospray ionization mass spectrometry” (A. Alanio)
 - “Underlying solid tumor or hematological malignancy impacts characteristics of candidemia: a prospective study involving 3417 patients over 12 years” (O. Lortholary)
- 26th ECCMID, April 2016, Amsterdam, Pays-Bas: “Clinical Mycology Master Class” (A. Alanio)
- 3rd Asian Continuing antifungal research & education meeting, Singapore, 7-8 May 2016 (Organisateur : O. Lortholary)
- 3rd Asian Continuing antifungal research & education » meeting, Singapore, 7-8 May 2016: “Treatment of IFD in hematology patients; Breakthrough IFD in hematology : what should I do?” (O. Lortholary)
- “IFD in solid organ transplant recipients”, Kaohsiung, Tainan and Taipei, Taiwan May 2016 (O. Lortholary)
- ASM Microbe Congress, Boston MA, USA, 16-20 June 2016:
 - “Emerging infections in HSCT: molds other than *Aspergillus* and Mucorales” (O. Lortholary)
 - Non *aspergillus* non mucorales mold infections in all HSCT” (A. Alanio)
 - “Who Paves the Way for Fungi: Genes or Doctors?” (F. Lanternier)
- I-Nine, Paris 2016: “Invasive fungal infections, antifungal agents and mortality in patients with hematological malignancies” (F. Lanternier)
- CARE, Munich 2016: “Aspergillosis” (F. Lanternier), Diagnosis of *Pneumocystis jirovecii* infections (A. Alanio)
- 9th European Continuing antifungal research & education meeting, Munich, November 2016. « IFD: working together to meet today’s challenges » (Organisateur : O. Lortholary)
- Transplant Infectious Diseases Society, Brno, Czech Republic, November 2016: “IFD in solid organ transplant recipients” (O. Lortholary)
- 27th ECCMID (Avril 2017, Vienna). Mitochondrial *Pneumocystis jirovecii* gene expression: a promising tool for diagnosis (A. Alanio)
- 43th EBMT (26-29 Mars 2017, Marseille). Molecular demonstration of a pneumocystis outbreak in the stem cell transplant patients: Evidence for transmission in the daycare center. (A. Alanio)
- 2nd Duden Conference - 1st ISHAM/ECMM Meeting (Janvier 2017, Nijmegen, The Netherlands): How to do surveillance and measure prevalence of resistance in *Aspergillus fumigatus* (A. Alanio)

Congrès nationaux

- Les infections fongiques pour les internistes, Hôpital Georges Pompidou, Février 2016 (O. Lortholary)
- Striking differences in predisposing factors and outcome of uncommon yeast species-related fungaemia based on a cohort study (2002-2014). Congrès SFP/SFMM, Grenoble, France, 23-25 March 2016 (S. Bretagne)
- Soirée des internes d’hématologie, 2016 « Mucormycoses » (F. Lanternier)

²⁶ Guegan S, Lanternier F, Rouzaud C, Dupin N, Lortholary O. Fungal skin and soft tissue infections. Curr Opin Infect Dis. 2016; 29:124-30.

- Candidose chronique disséminée : internes d'hématologie français, Paris, Avril 2016 (O. Lortholary)
- Groupe Français des Myélodysplasies, Grenoble Mai 2016: « Prévention des infections chez les patients avec myélodysplasie » (O. Lortholary)
- Atelier FLI/IDMIT "Imagerie de l'infection et de l'inflammation", Institut Pasteur, Paris 2016 : « PET scanner et infections fongiques » (F. Lanternier)
- FungiLead (13 octobre 2016, Paris). Épidémies d'IFI : les nouvelles générations de séquençage à la rescousse (A. Alanio)
- Quart d'heure Pasteur. Institut Pasteur, Paris 2016 : « Infections fongiques » (F. Lanternier)
- Journées Nationales d'Infectiologie, Lille, 7 juin 2016 : « Nouveaux apports thérapeutiques antifongiques » (O. Lortholary)
- Congrès de la Société Française de Mycologie Médicale (Grenoble, 2016)
 - Utilisation de la digital PCR pour quantifier le nombre de copies d'ADN ribosomal 28S d'*Aspergillus fumigatus* : impact pour le diagnostic clinique (A. Alanio)
 - European study on *Pneumocystis jirovecii* short tandem repeats genotyping reveals wide population diversity with geographic specificities (A. Alanio)
- Congrès de la Société Française de Microbiologie (Paris, 2016)
 - Epidémie de mucormycose dans un centre de traitement des brûlés : des biomarkers diagnostics au séquençage complet des souches (A. Alanio)
 - Utilisation de la PCR digitale pour quantifier le nombre de copies d'ADN ribosomale 28S d'*Aspergillus fumigatus* : Impact pour le diagnostic (A. Alanio)
- Infections fongiques émergentes Séminaire plein air en Vienne, Poitiers 2016 (F. Lanternier)
- Principaux pathogènes fongiques, antifongiques et résistance, Groupe de Pathologie Infectieuse Pédiatrique, 10 juin 2016, Paris (O. Lortholary)
- Table ronde sur les mucormycoses Fungilead. Paris, Octobre 2016 (F. Lanternier)
- Société de Réanimation de Langue Française SRLF, Paris 2016 « Infections fongiques émergentes » (F. Lanternier)
- RICAI, Paris 12-13 décembre 2016 :
 - « Infections fongiques cutanées chez le transplanté » (F. Lanternier)
 - « Dosage des antifongiques: pour qui, pourquoi? » (O. Lortholary)
- Société Française de Mycologie Médicale (mars 2017, Toulouse) : "Taxonomie et Sensibilité antifongique des complexes d'espèces : Que faut-il retenir ?" conférence invitée Dea Garcia-Hermoso – Marie Desnos-Ollivier
- Les Infections fongiques en pédiatrie (24 février 2017, Paris). La PCR Mucorales. (A. Alanio)
- Quel azolé utiliser en 2017 dans l'aspergillose invasive . JNI 2017 (F. Lanternier)
- Où en est-on des bithérapies ? Journée du RésO-InfectiO-PACA-Est (F. Lanternier)
- Médicaments immunosuppresseurs et risque infectieux. SFAR 2017 (F. Lanternier)

Publications nationales

1. Aguilar C, Jullien V, Alanio A, Bretagne S, Frange P, lanternier F, et al. Antifongiques. EMC (Elsevier Masson SAS, Paris). 2016.
2. Robin C, Padoin C, Alanio A, Cordonnier C. Les antifongiques azolés antifilamenteux : indications et modalités de suivi thérapeutique. Hématologie. 2016 1;22(6):406–20.

Publications internationales

2016

1. Alanio A, Hauser PM, Lagrou K, Melchers W, Helweg-Larsen J, Matos O, Cesaro S, Maschmeyer G, Einsele H, Donnelly JP, Cordonnier C, Maertens J, Bretagne S, on behalf of the 5th European Conference on Infections in Leukemia (ECIL-5), a joint venture of The European Group for Blood and Marrow Transplantation (EBMT), The European Organization for Research

- and Treatment of Cancer (EORTC), the International Immunocompromised Host Society (ICHS) and The European LeukemiaNet (ELN). ECIL guidelines for treatment of *Pneumocystis jirovecii* pneumonia in patients with haematological malignancies and stem cell transplant recipients. *J Antimicrob Chemother.* 2016 ; 71(9):2386-96.
2. Alanio A, Sturny-Leclère A, Benabou M, Guigue N, Bretagne S. Variation in copy number of the 28S rDNA of *Aspergillus fumigatus* measured by droplet digital PCR and analog quantitative real-time PCR. *J Microbiol Methods.* 2016;127:160-163
 3. Alanio A, Gits-Muselli M, Mercier-Delarue S, Dromer F, Bretagne S. Diversity of *Pneumocystis jirovecii* during Infection Revealed by Ultra-Deep Pyrosequencing. *Front Microbiol.* 2016;7:733.
 4. Alanio A, Denis B, Hamane S, Raffoux E, Peffault de Latour R, Menotti J, Amorim S, Touratier S, Bergeron A, Bretagne S. Azole Resistance of *Aspergillus fumigatus* in Immunocompromised Patients with Invasive Aspergillosis. *Emerg Infect Dis.* 2016;22(1):157-8
 5. Alanio A, Denis B, Hamane S, Raffoux E, Peffault de la Tour R, Touratier S, Bergeron A, Bretagne S. New therapeutic strategies for invasive aspergillosis in the era of azole resistance: how should the prevalence of azole resistance be defined? *J Antimicrob Chemother* 2016; 71:2075–2078.
 6. Alanio A, Sturny-Leclère A, Benabou M, Guigue N, Bretagne S. Variation in copy number of the 28S rDNA of *Aspergillus fumigatus* measured by droplet digital PCR and analog quantitative real-time PCR. *J Microbiol Methods* 2016; 127:160–163.
 7. Alanio A, Hauser PM, Lagrou K, Melchers WJG, Helweg-Larsen J, Matos O, Cesaro S, Maschmeyer G, Einsele H, Donnelly JP, Cordonnier C, Maertens J, Bretagne S, 5th European Conference on Infections in Leukemia (ECIL-5), a joint venture of The European Group for Blood and Marrow Transplantation (EBMT), The European Organization for Research and Treatment of Cancer (EORTC), the Immunocompromised Host Society (ICHS) and The European LeukemiaNet (ELN). ECIL guidelines for the diagnosis of *Pneumocystis jirovecii* pneumonia in patients with haematological malignancies and stem cell transplant recipients. *J Antimicrob Chemother* 2016; 71:2386–2396.
 8. Angebault C, Lanternier F, Dalle F, Schrimpf C, Roupie A-L, Dupuis A, Agathine A, Scemla A, Paubelle E, Caillot D, Neven B, Frange P, Suarez F, d'Enfert C, Lortholary O, Bournoux M-E. Prospective Evaluation of Serum β -Glucan Testing in Patients With Probable or Proven Fungal Diseases. *Open Forum Infect Dis* 2016; 3:ofw128.
 9. Borman AM, Desnos-Ollivier M, Campbell CK, Bridge PD, Dannaoui E, Johnson EM.. Novel Taxa Associated with Human Fungal Black-Grain Mycetomas: *Emarellia grisea* gen. nov., sp. nov., and *Emarellia paragrisea* sp. nov. *J Clin Microbiol* 2016; 54:1738–1745.
 10. Cogliati M, Zani A, Rickerts V, McCormick I, Desnos-Ollivier M, Velegraki A, Escandon P, Ichikawa T, Ikeda R, Bienvenu AL, Tintelnot K, Tore O, Akcaglar S, Lockhart S, Tortorano AM, Varma A. Multilocus sequence typing analysis reveals that *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* is a recombinant population. *Fungal Genet Biol.* 2016; 87:22-9.
 11. Cogliati M, D'Amicis R, Zani A, Montagna MT, Caggiano G, De Giglio O, Balbino S, De Donno A, Serio F, Susever S, Ergin C, Velegraki A, Ellabib MS, Nardoni S, Macci C, Oliveri S, Trovato L, Dipineto L, Rickerts V, McCormick-Smith I, Akcaglar S, Tore O, Mlinaric-Missoni E, Bertout S, Mallié M, Martins Mda L, Vencà AC, Vieira ML, Sampaio AC, Pereira C, Griseo G, Romeo O, Ranque S, Al-Yasiri MH, Kaya M, Cerikcioglu N, Marchese A, Vezzulli L, Ilkit M, Desnos-Ollivier M, Pasquale V, Korem M, Polacheck I, Scopa A, Meyer W, Ferreira-Paim K, Hagen F, Theelen B, Boekhout T, Lockhart SR, Tintelnot K, Tortorano AM, Dromer F, Varma A, Kwon-Chung KJ, Inácio J, Alonso B, Colom MF. Environmental distribution of *Cryptococcus neoformans* and *C. gattii* around the Mediterranean basin. *FEMS Yeast Res.* 2016;16
 12. Cogliati M, Zani A, Rickerts V, McCormick I, Desnos-Ollivier M, Velegraki A, Escandón P, Ichikawa T, Ikeda R, Bienvenu A-L, Tintelnot K, Tore O, Akcaglar S, Lockhart S, Tortorano AM, Varma A. Multilocus sequence typing analysis reveals that *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* is a recombinant population. *Fungal Genet Biol* 2016; 87:22–29.
 13. Cordonnier C, Cesaro S, Maschmeyer G, Einsele H, Donnelly JP, Alanio A, Hauser PM, Lagrou K, Melchers W, Helweg-Larsen J, Matos O, Bretagne S, Maertens J, on behalf of the fifth European Conference on Infections in Leukemia (ECIL-5), a joint venture of The European

- Group for Blood and Marrow Transplantation (EBMT), The European Organization for Research and Treatment of Cancer (EORTC), the International Immunocompromised Host Society (ICHS) and The European LeukemiaNet (ELN). *Pneumocystis jirovecii* pneumonia: still a concern in patients with haematological malignancies and stem cell transplant recipients. *J Antimicrob Chemother.* 2016; 71(9):2379-85
14. Dellière S, Healey K, Gits-Muselli M, Carrara B, Barbaro A, Guigue N, Lecefel C, Touratier S, Desnos-Ollivier M, Perlin DS, Bretagne S, Alanio A. Fluconazole and Echinocandin Resistance of *Candida glabrata* Correlates Better with Antifungal Drug Exposure Rather than with MSH2 Mutator Genotype in a French Cohort of Patients Harboring Low Rates of Resistance. *Front Microbiol* 2016; 7:2038.
 15. Desbois A-C, Poirée S, Snanoudj R, Bougnoux M-E, Sberro-Soussan R, Lanternier F, Legendre C, Lortholary O, Scemla A.. Prognosis of Invasive Aspergillosis in Kidney Transplant Recipients: A Case-Control Study. *Transplant Direct* 2016; 2:e90.
 16. Garcia-Hermoso D, Desnos-Ollivier M, Bretagne S. Typing *Candida* Species Using Microsatellite Length Polymorphism and Multilocus Sequence Typing. *Methods Mol Biol.* 2016;1356:199-214
 17. Gamaletsou MN, Rammaert B, Bueno MA, Sipsas NV, Moriyama B, Kontoyiannis DP, Roilides E, Zeller V, Taj-Aldeen SJ, Miller AO, Petraitiene R, Lortholary O, Walsh TJ. *Candida* Arthritis: Analysis of 112 Pediatric and Adult Cases. *Open Forum Infect Dis* 2016; 3:ofv207.
 18. Gamaletsou MN, Rammaert B, Bueno MA, Sipsas NV, Moriyama B, Kontoyiannis DP, Roilides E, Zeller V, Taj-Aldeen SJ, Henry M, Petraitis V, Denning DW, Lortholary O, Walsh TJ, International Osteoarticular Mycoses Consortium. *Aspergillus* arthritis: analysis of clinical manifestations, diagnosis, and treatment of 31 reported cases. *Med Mycol* 2016; myw077.
 19. Gits-Muselli M, Benderdouche M, Hamane S, Mingui A, Feuilhade de Chauvin M, Guigue N, Picat M-Q, Bourrat E, Petit A, Bagot M, Alanio A, Bretagne S. **2016.** Continuous increase of *Trichophyton tonsurans* as a cause of tinea capitis in the urban area of Paris, France: a 5-year-long study. *Med Mycol* 2016; myw107
 20. Grosset M, Desnos-Ollivier M, Godet C, Kauffmann-Lacroix C, Cazenave-Roblot F. **2016.** Recurrent episodes of Candidemia due to *Candida glabrata*, *Candida tropicalis* and *Candida albicans* with acquired echinocandin resistance. *Med Mycol Case Rep* 14:20–23.
 21. Guegan S, Lanternier F, Rouzaud C, Dupin N, Lortholary O. Fungal skin and soft tissue infections. *Curr Opin Infect Dis.* 2016; 29:124-30.
 22. Guégan S, Garcia-Hermoso D, Sitbon K, Ahmed S, Moguelet P, Dromer F, Lortholary O and the French Mycosis Study Group. Ten-year experience of cutaneous and subcutaneous infections due to Coelomycetes in France. *Open Forum in Infect. Dis. (OFID)* 2016 ;3 (2): ofw106
 23. Lortholary O, Fernández-Ruiz M, Perfect JR. The current treatment landscape: other fungal diseases (cryptococcosis, fusariosis and mucormycosis). *J Antimicrob Chemother* 2016; 71:ii31–ii36.
 24. Legrand M, Gits-Muselli M, Boutin L, Garcia-Hermoso D, Maurel V, Soussi S, Benyamina M, Ferry A, Chaussard M, Hamane S, Denis B, Touratier S, Guigue N, Fréalle E, Jeanne M, Shaal J-V, Soler C, Mimoun M, Chaouat M, Lafaurie M, Mebazaa A, Bretagne S, Alanio A. **2016.** Detection of Circulating Mucorales DNA in Critically Ill Burn Patients: Preliminary Report of a Screening Strategy for Early Diagnosis and Treatment. *Clin Infect Dis*2016; 63:1312–1317.
 25. Maertens J, Cesaro S, Maschmeyer G, Einsele H, Donnelly JP, Alanio A, Hauser PM, Lagrou K, Melchers WJG, Helweg-Larsen J, Matos O, Bretagne S, Cordonnier C, 5th European Conference on Infections in Leukaemia (ECIL-5), a joint venture of the European Group for Blood and Marrow Transplantation (EBMT), the European Organisation for Research and Treatment of Cancer (EORTC), the Immunocompromised Host Society (ICHS) and the European LeukemiaNet (ELN). ECIL guidelines for preventing *Pneumocystis jirovecii* pneumonia in patients with haematological malignancies and stem cell transplant recipients. *J Antimicrob Chemother* 2016; 71:2397–2404.
 26. Maertens JA, Raad II, Marr KA, Patterson TF, Kontoyiannis DP, Cornely OA, Bow EJ, Rahav G, Neofytos D, Aoun M, Baddley JW, Giladi M, Heinz WJ, Herbrecht R, Hope W, Karthaus M, Lee DG, Lortholary O, Morrison VA, Oren I, Selleslag D, Shoham S, Thompson GR, 3rd, Lee M,

- Maher RM, Schmitt-Hoffmann AH, Zeiher B, Ullmann AJ. Isavuconazole versus voriconazole for primary treatment of invasive mould disease caused by *Aspergillus* and other filamentous fungi (SECURE): a phase 3, randomised-controlled, non-inferiority trial. *Lancet*. 2016; 387:760-9.
27. Marchionni E, Parize P, Lefevre A, Vironneau P, Bougnoux ME, Poirée S, Coignard-Biehler H, DeWolf SE, Amazzough K, Barchiesi F, Jullien V, Alanio A, Garcia-Hermoso D, Wassef M, Kania R, Lortholary O, Lanternier F. *Aspergillus* spp. invasive external otitis: favourable outcome with a medical approach. *Clin Microbiol Infect* 2016; 22:434–437.
 28. Maschmeyer G, Helweg-Larsen J, Pagano L, Robin C, Cordonnier C, Schellongowski P, on behalf of the 6th European Conference on Infections in Leukemia (ECIL-6), a joint venture of The European Group for Blood and Marrow Transplantation (EBMT), The European Organization for Research and Treatment of Cancer (EORTC), the International Immunocompromised Host Society (ICHS) and The European LeukemiaNet (ELN). ECIL guidelines for treatment of *Pneumocystis jirovecii* pneumonia in non-HIV-infected haematology patients. *J Antimicrob Chemother*. 2016; 71:2405-13
 29. Millon L, Herbrecht R, Grenouillet F, Morio F, Alanio A, Letscher-Bru V, Cassaing S, Chouaki T, Kauffmann-Lacroix C, Poirier P, Toubas D, Augereau O, Rocchi S, Garcia-Hermoso D, Bretagne S, French Mycosis Study Group. Early diagnosis and monitoring of mucormycosis by detection of circulating DNA in serum: retrospective analysis of 44 cases collected through the French Surveillance Network of Invasive Fungal Infections (RESSIF). *Clin Microbiol Infect*. 2016; 810.e1-810.e8
 30. Morio F, Barbarot S, Pineau S, Aubert H, Garcia-Hermoso D, de Hoog S, Lavergne RA, Le Pape P. Photo Quiz: A Cutaneous Lesion in a 66-Year-Old Traveler Returning from Thailand *J Clin Microbiol*. 2016;54(5):1179
 31. Morio F, Barbarot S, Pineau S, Aubert H, Garcia-Hermoso D, de Hoog S, Lavergne RA, Le Pape P. Answer to photo quiz *J Clin Microbiol*. 2016;54(5):1409.
 32. Nourrisson C, Garcia-Hermoso D, Morio F, Kauffmann-Lacroix C, Berrette N, Bonhomme J, Poirier P, Lortholary O, the French Mycosis Study Group. *Thermothelomyces thermophila* human infections. *Clin Microbiol Infect*. 2016 (in press)
 33. Pilmis B, Puel A, Lortholary O, Lanternier F. New clinical phenotypes of fungal infections in special hosts. *Clin Microbiol Infect* 2016 ; 22:681–687.
 34. Valero C, Buitrago MJ, Gits-Muselli M, Benazra M, Sturny-Leclère A, Hamane S, Guigue N, Bretagne S, Alanio A. Copy Number Variation of Mitochondrial DNA Genes in *Pneumocystis jirovecii* According to the Fungal Load in BAL Specimens. *Front Microbiol* 2016; 7:1413.

2017

1. Bailly S, Leroy O, Azoulay É, Montravers P, Constantin J-M, Dupont H, Guillemot D, Lortholary O, Mira J-P, Perrigault P-F, Gangneux J-P, Timsit J-F, AmarCAND2 Study Group. Impact of echinocandin on prognosis of proven invasive candidiasis in ICU: A post-hoc causal inference model using the AmarCAND2 study. *J Infect*. 2017 (in press)
2. Bretagne S, Renaudat C, Desnos-Ollivier M, Sitbon K, Lortholary O, Dromer F, French Mycoses Study Group. 2017. Predisposing factors and outcome of uncommon yeasts species-related fungaemia based on an exhaustive surveillance program (2002-2014). *J Antimicrobial Chemother* 2017. doi: 10.1093/jac/dkx045. [Epub ahead of print]
3. Cordonnier C, Alanio A, Cesaro S, Maschmeyer G, Einsele H, Donnelly JP, Hauser PM, Lagrou K, Melchers WJG, Helweg-Larsen J, Matos O, Bretagne S, Maertens J, a joint venture of The European Group for Blood and Marrow Transplantation (EBMT), The European Organization for Research and Treatment of Cancer (EORTC), the Immunocompromised Host Society (ICHS) and The European LeukemiaNet (ELN), Fifth European Conference on Infections in Leukemia (ECIL-5). *Pneumocystis jirovecii* pneumonia: still a concern in patients with haematological malignancies and stem cell transplant recipients-authors' response. *J Antimicrob Chemother* 2017 (in press).

4. Gauthier A, Jaubert J, Traversier N, Lemant J, Balu L, Garcia-Hermoso D, Welti S, Favel A, Picot S, Hoarau G. *Trametes polyzona*, an emerging filamentous basidiomycete in Réunion Island. *Mycoses* 2017 (in press)
5. Kwon-Chung KJ, Bennett JE, Wickes BL, Meyer W, Cuomo CA, Wollenburg KR, Bicanic TA, Castañeda E, Chang YC, Chen J, Cogliati M, Dromer F, Ellis D, Filler SG, Fisher MC, Harrison TS, Holland SM, Kohno S, Kronstad JW, Lazera M, Levitz SM, Lionakis MS, May RC, Ngamskulrongroj P, Pappas PG, Perfect JR, Rickerts V, Sorrell TC, Walsh TJ, Williamson PR, Xu J, Zelazny AM, Casadevall A. The Case for Adopting the “Species Complex” Nomenclature for the Etiologic Agents of Cryptococcosis. *mSphere* 2017; 2:e00357–16–7
6. Lortholary O, Renaudat C, Desnos-Ollivier M, Sitbon K, Bretagne S, Dromer F, French Mycoses Study Group. The risk and clinical outcomes of candidemia depending on underlying malignancy. *Intensive Care Med* 2017 doi: 10.1007/s00134-017-4743-y. [Epub ahead of print]
7. Taj-Aldeen SJ, Gamaletsou MN, Rammaert B, Sipsas NV, Zeller V, Roilides E, Kontoyiannis DP, Henry M, Petraitis V, Moriyama B, Denning DW, Lortholary O, Walsh TJ, International Osteoarticular Mycoses Consortium. Bone and joint infections caused by mucormycetes: A challenging osteoarticular mycosis of the twenty-first century. *Med Mycol* 2017 (in press)
8. Montravers P, Perrigault PF, Timsit JF, Mira J-P, Lortholary O, Leroy O, Gangneux JP, Guillemot D, Bensoussan C, Bailly S, Azoulay E, Constantin JM, Dupont H, AmarCAND2 Study Group. Antifungal therapy for patients with proven or suspected *Candida* peritonitis: Amarcand2, a prospective cohort study in French intensive care units. *Clin Microbiol Infect* 2017; 23:117.e1–117.e8.
9. Toussaint B, Lanternier F, Woloch C, Fournier D, Launay M, Billaud E, Dannaoui E, Lortholary O, Jullien V. An ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for the therapeutic drug monitoring of isavuconazole and seven other antifungal compounds in plasma samples. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 2017 ;1046:26-33.

Chapitre de livre – publications didactiques

1. Alanio A, Bretagne S. Performance evaluation of multiplex PCR including *Aspergillus*-not so simple! *Med Mycol* 2017;55:56–62.
2. Alanio A, Bretagne S. Challenges in microbiological diagnosis of invasive *Aspergillus* infections. *F1000Res.* 2017 17;6:157–10.
3. Garcia-Hermoso D, Desnos-Ollivier M, Bretagne S. Typing *Candida* Species Using Microsatellite Length Polymorphism and Multilocus Sequence Typing. *In Candida Species: Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology*, R. Calderone and R. Cihlar (eds.), vol. 1356, pp. 199-214. DOI 10.1007/978-1-4939-3052-4_15, © Springer Science+Business Media New York 2016
4. Rouzaud C, Hay R, Chosidow O, Dupin N, Puel A, Lortholary O, Lanternier F. Severe Dermatophytosis and Acquired or Innate Immunodeficiency: A Review. *J. Fungi* 2016, 2(1), 4; doi:10.3390/jof2010004
5. Rouzaud C, Lanternier F, Puel A. Primary immunodeficiencies and dermatophytosis. *Immunogenetics of Fungal Diseases*. Pr Carvalho. In press. Ed Springer. In press

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

RAS

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.

9 Annexe 1 : Missions & organisation du CNR

9.1 Rappel des missions et objectifs majeurs du CNR et des laboratoires associés

Le nouveau 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 champ des missions du CNRMA ne couvre plus les mycoses animales, mais s'est donc étendu aux pneumocystoses.

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, dès le début du nouveau mandat, 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.

9.2 Description détaillée 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 10). 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 (Figure 26).

Tableau 10 : Composition de l'équipe du CNRMA en 2016

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
Anne Boullié	Technicienne	100%	BTS / Technicien supérieur de laboratoire	Institut Pasteur
Reine Bouyssié	Assistante	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	100%	Thèse d'université / Ingénieur	Institut Pasteur
Françoise Dromer	Directeur du CNRMA	40%	Docteur en Médecine, Thèse d'université / Professeur Institut Pasteur	Institut Pasteur
Dea Garcia-Hermoso	Collaborateur technique/scientifique	100%	Thèse d'université / Ingénieur	Institut Pasteur
Cécile Gautier	Technicienne	100%	BTS / Technicien supérieur de laboratoire	Institut Pasteur
Fanny Lanternier	Collaborateur clinicien	20%	Docteur en médecine, Thèse d'université, 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

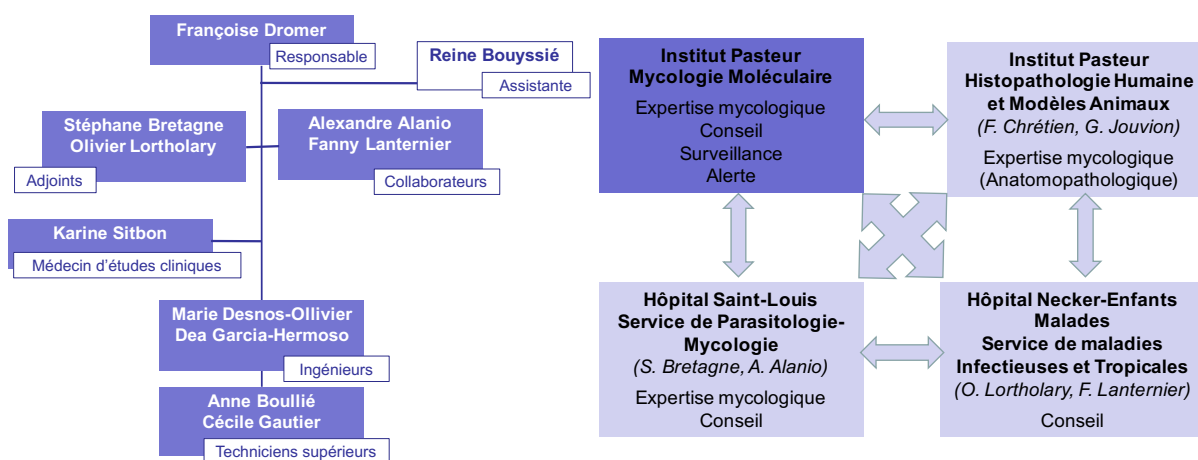


Figure 26 : Organigramme fonctionnel du CNRMA en 2016

9.3 Description détaillée des locaux et de l'équipement

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 27). Ils comprennent :

- 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 structures impliquées dans le diagnostic (CIBU, les CNRs Bordetella et Corynébactéries) et respectant la « marche en avant », situés à l'étage inférieur du même bâtiment.

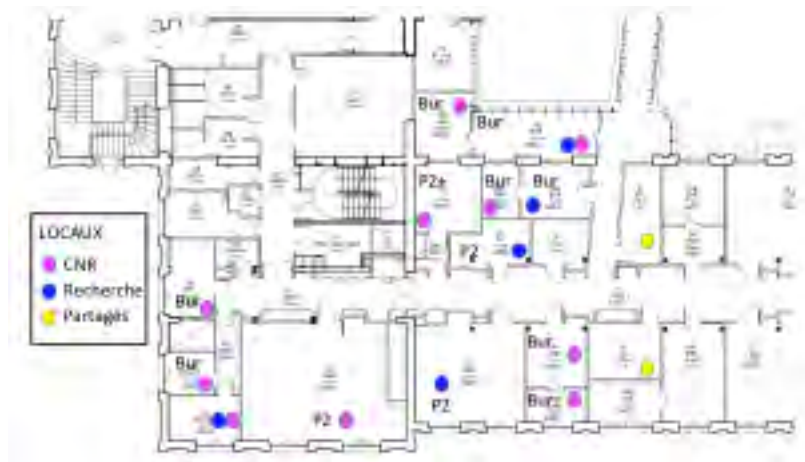


Figure 27 : Locaux du CNRMA

Les équipements principaux propres comprennent :

- PSM2 et incubateurs à CO₂, hottes chimiques
- Thermocycleurs (iCycler de Bio-Rad et LCR480 de Roche)
- MagNAlyser
- Extracteur semi-automatique KingFisher
- QUBit (fluoromètre pour quantification d'ADN, ARN et protéines)
- Caméras numériques, appareil photo Reflex
- Lecteur ELISA
- 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 (appareil partagé)

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) 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 Eurofins. 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) et de 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 la CIBU (ABIPrism 3600).

9.4 Description de la démarche qualité du laboratoire :

Historique de la démarche qualité à l'Institut Pasteur

En 1996, les Centres Nationaux de Référence (CNR) de l'Institut Pasteur ont entrepris une démarche qualité pour suivre le Guide de Bonne Exécution des Analyse en Biologie Médicale (GBEA) et, depuis 2008, dans le cadre des inspections de l'Agence nationale de sécurité du médicament et des produits de santé (ANSM), les exigences des arrêtés du 30 juillet 2004 et du 16 juillet 2007 liés aux Micro-Organismes et Toxines (MOT).

Projet ISO 15189 du Laboratoire de Référence et d'Expertise Multisite (LREMS) de l'Institut Pasteur

Ce projet s'inscrit dans l'objectif de répondre à l'ordonnance du 13 janvier 2010 et à la loi du 31 mai 2013 relative aux activités de biologie médicale. Les Centres Nationaux de Référence et d'Expertise de l'Institut Pasteur et la Cellule d'Intervention Biologique d'Urgence (CIBU) sont organisés en Multisite et constituent le LREMS.

Le projet 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 ;
- 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.

Actions d'importance 2016 conduites auprès des CNR de l'Institut Pasteur à Paris et Lyon

- Janvier à Mars 2016 : réalisation des revues qualité des CNR.
- 1^{er} Avril 2016 : demande d'extension d'accréditation pour les CNR des Papillomavirus, E. Coli, Salmonelles, Shigelles et Vibriions Cholera (en attente de la notification de réception du dossier).
- Mai 2016 : notification par le COFRAC du renouvellement de l'accréditation du LREMS (**Mycooses invasives et antifongiques** ainsi que CIBU, Anaérobies, Coqueluche et autres bordetelloses, Corynébactéries du complexe Diphtheriae, Hantavirus, Fièvres Hémorragiques Virales Virus Influenzae, Leptospirose, Listeria, Méningocoques, Peste et autres yersiniooses, Rage). Attestation d'accréditation disponible sur <https://www.cofrac.fr/annexes/sect8/8-2588.pdf>
- 23 Mai 2016 : revue de direction du LREMS.
- Juin-Juillet 2016 et septembre-octobre 2016 : audits internes technique et qualité.
- 4^{ème} trimestre 2016 : article dans la revue Compétences du COFRAC concernant l'accréditation des CNR de l'Institut Pasteur avec un focus sur le CNR des Fièvres Hémorragiques Virales.

- Octobre 2016 : report de l'audit de surveillance COFRAC en Janvier 2017.

Perspectives 2017

- Janvier à Mars 2017 : réalisation des revues qualité des CNR.
- 16 au 20 janvier 2017 : audit de surveillance COFRAC ; les conclusions de l'audit de surveillance de Janvier 2017 ont été positives, le rapport d'évaluation indique que les évaluateurs accordent leur confiance au LREMS.
- Avant le 22 mai 2017 : revue de direction du LREMS.
- Juin-Juillet 2017 et septembre-octobre 2017 : audits internes technique et qualité.
- Septembre 2017 : organisation de groupes de travail technique pour les prochains projets de validation de méthodes et finalisation des dossiers de validation de méthode pour une demande d'extension prochaine.
- Courant 2017 : ajout de nouvelles méthodes dans le périmètre d'accréditation, pour les CNR ayant déjà des techniques accréditées sous la même portée d'accréditation.
- Fin 2017-début 2018 : audit de surveillance et/ou d'extension du LREMS.

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>). Le CNR poursuit l'extension du périmètre d'accréditation selon les conditions imposées par la Loi du 30 mai 2013 (2013-442).

10 Annexe 2 : Capacités techniques du CNR

10.1 Liste des techniques de référence: diagnostic/identification, typage, évaluation de la sensibilité aux anti-infectieux :

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

- ✓ Identification phénotypique complète des levures et des champignons filamenteux avec assimilation des sucres, 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)^{27,28}. 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®), la micafungine (Mycamine®) et l'anidulafungine (non commercialisée en France).
- ✓ Identification des isolats d'espèces communes de champignons par MALDI-TOF
- ✓ 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).

²⁷ EUCAST Definitive Document EDef 7.1: method for the determination of broth dilution MICs of antifungal agents for fermentative yeasts. Clin Microbiol Infect. 2008; 14:398-405.

²⁸ EUCAST Technical Note on the method for the determination of broth dilution minimum inhibitory concentrations of antifungal agents for conidia-forming moulds. Clin Microbiol Infect. 2008; 14:982

- ✓ Identification de *Candida dubliniensis* par PCR duplex en utilisant les amorces spécifiques d'une partie du gène de l'actine²⁹ et les amorces universelles ITS1/ITS4 (technique accréditée COFRAC selon la norme 15189).
- ✓ Diagnostic anatomopathologique / immuno-histochimie
- ✓ Diagnostic moléculaire sur tissus/échantillons frais, congelés ou fixés
- ✓ Détection des mutations dans le gène *Cyp51A* pour les isolats d'*Aspergillus fumigatus* résistants aux antifongiques azolés³⁰
- ✓ Détection des mutations dans les gènes *Fks* pour les isolats de *Candida albicans*, *C. glabrata*, *C. tropicalis*, *C. krusei*, *C. lusitaniae* résistants aux échinocandines.

Techniques mises en place en 2016

- Ajout de nouvelles cibles pour l'identification de diverses espèces de levures et de champignons filamenteux
- Mise au point d'une PCR quantitative permettant l'identification en urgence de *Geotrichum* spp. (*G. candidum*, *M. capitatum*, *S. clavata*) et du clone épidémique de 2012

10.2 Liste des marqueurs épidémiologiques disponibles

- Pour *C. albicans*, 5 séquences microsatellites (CDC3, HIS3, EF3, STPK, CDR1)^{31,32}, et les 7 loci MLST (AAT1a, ACC1, ADP1, MPIb, SYA1, VPS13, ZWF1)³³
- Pour *C. glabrata*, 5 séquences microsatellites (RPM2, MTI, ERG, Cg4, Cg6)³⁴
- Pour *C. parapsilosis*, 3 séquences microsatellites (CP1, CP4, CP6)³⁵
- Pour *Aspergillus fumigatus*, 4 séquences microsatellites A, B, C et D³⁶
- Pour *C. tropicalis*, 6 loci MLST (MDR1, XYR1, SAPT4, SAPT2, ZWF1a, ICL1)³⁷, et 2 séquences microsatellites (URA3 et CT14)³⁸
- Pour *Cr. neoformans*, sérotypage (cytométrie en flux à l'aide d'un anticorps monoclonal anti-polyoside capsulaire³⁹ 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 SOD1⁴⁰)
- Pour *Candida krusei*, 6 loci MLST (ADE2, LYS2, HIS3, LEU2, TRP1 et MPD1)⁴¹

²⁹ Donnelly SM, *et al.* Phylogenetic analysis and rapid identification of *Candida dubliniensis* based on analysis of ACT1 intron and exon sequences. *Microbiology*. 1999; 45:1871-1882.

³⁰ Mellado E, *et al.* Identification of two different 14-alpha sterol demethylase-related genes (*cyp51A* and *cyp51B*) in *Aspergillus fumigatus* and other *Aspergillus* species. *J Clin Microbiol*. 2001; 39:2431 (erratum p4225).

³¹ Foulet F, *et al.* Microsatellite markers as a typing system for *Candida glabrata*. *J Clin Microbiol*. 2005; 43:4574-9.

³² Stephan F, *et al.* Molecular diversity and routes of colonization of *Candida albicans* in a surgical intensive care unit, as studied using microsatellite markers. *Clin Infect Dis*. 2002; 35:1477-83.

³³ Bougnoux ME, *et al.* Collaborative consensus for optimized multilocus sequence typing of *Candida albicans*. *J Clin Microbiol*. 2003; 41:5265

³⁴ Foulet F, *et al.* Microsatellite marker analysis as a typing system for *Candida glabrata*. *J Clin Microbiol*. 2005;43:4574

³⁵ Irinyi L, *et al.* ISHAM-ITS reference DNA barcoding database - the quality controlled standard tool for routine identification of human and animal pathogenic fungi. *Med Mycol*.

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

³⁷ Tavanti A, *et al.* Multilocus sequence typing for differentiation of strains of *Candida tropicalis*. *J Clin Microbiol*. 2005; 43: 5593-600.

³⁸ Desnos-Ollivier M, *et al.* Clonal population of flucytosine-resistant *Candida tropicalis* from blood cultures, Paris, France. *Emerg Infect Dis*. 2008; 14:557

³⁹ Dromer F, *et al.* Serotyping of *Cryptococcus neoformans* by using a monoclonal antibody specific for capsular polysaccharide. *J Clin Microbiol*. 1993; 31:359.

⁴⁰ Meyer W, *et al.* Consensus multi-locus sequence typing scheme for *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii*. *Med Mycol*. 2009; 47:561

⁴¹ Jacobsen MD, *et al.* Strain Typing and Determination of Population Structure of *Candida krusei* by Multilocus Sequence Typing. *J Clin Microbiol*. 2007; 45:317

- Pour *Cryptococcus gattii*, 7 loci MLST (IGS1, CAP59, URA5, PLB1, GPD1, SOD1, LAC1)⁴²
- 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.

10.3 Collections de souches, antigènes ou immun-sérums de référence :

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 d'assimilation des composés carbonés (ID32C, ou 50CH, BioMérieux) avant 2014 et depuis parMALDI-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 ITS⁴³
- ✓ en cas d'identification de *Trichosporon sp.*, séquençage systématique de la région IGS1 de l'ADN ribosomique⁴⁴
- ✓ en cas d'identification de *Debaryomyces sp.* ou de *C. lusitaniae*, séquençage systématique d'une partie du gène codant l'actine⁴⁵
- ✓ en cas d'identification de *M. guilliermondii*, séquençage systématique d'une partie du gène *RPBI*
- ✓ en cas d'identification de *C. neoformans* détermination du sérotype par amplification de régions des gènes *Gpa1* et *Pak1* avec des amorces spécifiques du sérotype A ou D et/ou séquençage de la région IGS du gène codant l'ARNribosomique
- ✓ détermination de la sensibilité à 8 antifongiques systémiques (amphotéricine B, 5-fluorocytosine, fluconazole, voriconazole, posaconazole, isavuconazole, caspofungine, micafungine)
- ✓ en cas de moindre sensibilité à la caspofungine (CMI \geq 0,5 μ g/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* 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.

⁴² Hagen F, et al. Autochthonous and dormant *Cryptococcus gattii* infections in Europe. Emerging Infect Dis. 2012; 10:1618

⁴³ 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

⁴⁴ Sugita T, et al. Sequence Analysis of the Ribosomal DNA Intergenic Spacer 1 Regions of *Trichosporon* Species. J Clin Microbiol. 2002, 40;1826

⁴⁵ Martorell P, et al. Sequence-based identification of species belonging to the genus *Debaryomyces* FEMS Yeast research. 2005; 5:1157

- ✓ 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 28 genres et 101 espèces différents (1 à 2878 isolats/espèce) et se répartissant en :

- près de 4750 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.
- plus de 2400 souches de levures provenant d'autres sites profonds ou superficiels, stockées congelées en glycérol 40% à -80°C, et depuis 2009 en glycérol 20% dans l'azote liquide.
- plus de 3000 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 ACDSsee et des séquences dans une base de données gérée par le logiciel BioloMics.

La collection comprend des souches appartenant à 92 genres et 335 espèces différents, (1 à 146 isolats/espèce) :

- ✓ près de 2800 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.

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.

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 ACDSsee.

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 28). 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 28 : 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 1572 séquences (ITS, 26S, IGS, actine, FKS) pour 1490 souches de levures et 1485 séquences (18S, 28S, ITS, calmoduline,

actine, β -tubuline, EF1- α , RPB1, RPB2, CYP51A) pour 771 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).

10.4 Liste des techniques (diagnostic/identification, typage, sensibilité aux anti-infectieux...) 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 taxonomie, nous avons multiplié, selon les genres étudiés, les gènes cibles et les amorces pour une identification moléculaire polygénique (Tableau 11).

Tableau 11 : 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 ⁴⁶
Complexe d'espèces <i>Fusarium spp</i>	Factor d'élongation (TEF1- α)	EF1 / EF2 ⁴⁷
	RNA polymérase II (RPB2)	5F2/ 7CR ⁴⁸
Complexe d'espèces <i>Pseudallescheria / Scedosporium</i>	β -tubuline	TUB-F/ TUB-R ⁴⁹
<i>Phaeoacremonium spp</i>	β -tubuline	T1 /Bt2b ⁵⁰
Coelomycètes <i>Phoma</i> -like	β -tubuline	TUB2-F / TUB4-R ⁵¹
<i>Trichosporon spp.</i>	IGS1 / ADNr	26SF/5SR ⁴⁴
<i>Debaryomyces spp.</i>	actine	CA21/CA15R ⁴⁵
<i>Clavisporea lusitaniae</i>	actine	CA16mod/CA5 ⁵²

⁴⁶ Balajee S, et al. *Aspergillus lentulus* sp. nov., a new sibling species of *A. fumigatus*. Eukaryot Cell. 2005; 4:625-32.

⁴⁷ O'Donnell K. et al. Phylogenetic diversity and microsphere array-based genotyping of human pathogenic *Fusaria*, including isolates from the multistate contact lens-associated U.S. keratitis outbreaks of 2005 and 2006. J Clin Microbiol. 2007; 45:2235-48.

⁴⁸ O'Donnell K, Cigelnik E. Two divergent intragenomic rDNA ITS2 types within a monophyletic lineage of the fungus *Fusarium* are nonorthologous. Mol Phylogenet Evol. 1997; 7:103-16.

⁴⁹ Cruse M, et al. Cryptic species in *Stachybotrys chartarum*. Mycologia. 2002; 94:814-22.

⁵⁰ Mostert L, et al. Species of *Phaeoacremonium* associated with infections in humans and environmental reservoirs in infected woody plants. J Clin Microbiol. 2005; 43:1752-67.

⁵¹ Aveskamp MM, et al. DNA phylogeny reveals polyphyly of *Phoma* section *Peyronellaea* and multiple taxonomic novelties. Mycologia. 2009; 101:363-82.

⁵² Guzman et al. Phylogenetic analysis of the angiosperm-floricolous insect-yeast association: Have yeast and angiosperm lineages co-diversified? *Molecular Phylogenetics and Evolution* 68 (2013) 161–175

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

Diagnostic des mycoses endémiques

La sérologie par électro-synérèse a définitivement été abandonnée par le CNRMA en raison de ses mauvaises 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 ou la moelle (tube EDTA rempli au maximum). 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 à :

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

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 testés 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 6, Tableau 7). 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 marneffei*) de façon à recouvrir entièrement la culture est préconisé pour une décontamination totale. A noter pour l'espèce *Cladophialophora bantiana* un temps de contact de 24h est préconisé pour une décontamination totale.

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

10.5 Techniques transférées par le CNRMA

Le CNRMA transfère vers les CC-CNRMA les techniques d'identification moléculaire et en particulier la technique d'extraction de l'ADN, les amorces⁵³ et paramètres d'amplification utilisés pour le séquençage des régions ITS de l'ADN ribosomique des levures et champignons filamenteux (Figure 29). Voici en résumé le protocole d'amplification utilisé pour amplifier ces régions avec les couples d'amorces V9D/LS266 ou ITS5/LS266.

Amorce	Séquence 5'-3'
V9D	TTAAgTCCCTgCCCTTgTA
ITS5	ggAAgTAAAAGTCgTAACAAgg
LS266	gCATTCCCAAACAACgACTC

Volume de réaction PCR (50µl)		Conditions PCR (iCycler thermocycler BioRad)	
Concentration finale		95°C	10min
♦ 1X tampon PCR (Roche)		94°C	30 sec
♦ 2.5mM MgCl ₂ (Roche)		55°C (filamenteux) ou 58°C (levures)	30 sec
♦ 0.25mM dNTP			30 sec
♦ 25 pmol de chaque primer		72°C	30 secs
♦ 1.25U AmpliTaq DNA polymerase (Roche)			
♦ 3µl ADN		72°C	10 min

} 30 cycles

Figure 29 : Protocole d'amplification des régions ITS utilisé au CNRMA
(V9D et ITS5 = amorces sens ; LS266 = amorce antisens)

⁵³ White TJ, *et al.* Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, White TJ (eds), PCR Protocols. San Diego: Academic.1990; 315.

11 Annexe 3 : Liste des collaborateurs du CNRMA

Liste des CC-CNRMA formant RESSIF

CHU d'Amiens représenté par le Dr. Taieb Chouaki
CHU d'Angers représenté par le Dr. Jean-Philippe Bouchara
CHU de Besançon représenté par le Pr. Laurence Millon
CHU de Caen représenté par le Dr. Julie Bonhomme
CHU de Clermont-Ferrand représenté par le Dr. Philippe Poirier
CHU de Guadeloupe représenté par le Dr. Muriel Nicolas
CHU de Guyane représenté par le Pr. M. Demar
Institut Gustave Roussy représenté par le Dr. Elisabeth Chachaty
CHU de Limoges représenté par le Dr. Bernard Bouteille
CHU de Martinique représenté par le Dr. Nicole Desbois
CHU de Nantes représenté par le Dr. Florent Morio
CHU de Nice représenté par le Dr. Martine Gari-Toussaint
CH d'Orléans représenté par le Dr. Didier Poisson
CHU de Paris/Cochin représenté par le Dr. André Paugam
CHU de Paris/Saint Louis représenté par le Pr. Stéphane Bretagne
CHU de Paris/hôpital Necker-Enfants Malades représenté par le Dr. Marie-Elisabeth Bougnoux
CHU de Poitiers représenté par le Dr. Catherine Kauffmann-Lacroix
Hôpital des Quinze-Vingt représenté par le Dr. L. Merabet
CHU de Reims représenté par le Dr. Dominique Toubas
CHU de Rennes représenté par le Pr. Jean-Pierre Gangneux
CHU de Rouen représenté par le Pr. Loïc Favennec
CH de Saint Etienne représenté par le Dr. Hélène Raberin
CH de Strasbourg représenté par le Dr. Valérie Letscher-Bru
CHU de Toulouse représenté par le Dr. Sophie Cassaing
CHU de Tours représenté par le Pr. Jacques Chandénier
CH de Versailles représenté par le Dr. Odile Eloy

Membres du réseau métropolitain

Agen, Laboratoire de Biochimie, Centre Hospitalier
Aix-en-Provence, Laboratoire de Bactériologie-Virologie, Centre Hospitalier Général
Albi, Laboratoire de Biologie Médicale, Centre Hospitalier Général
Alençon, Laboratoire de Microbiologie-Sérologie, Centre Hospitalier
Amiens, Laboratoire de Parasitologie-Mycologie, CHRU Hôpital Sud et Hôpital Sud
Angers, Laboratoire de Parasitologie-Mycologie, Centre Hospitalier Universitaire
Angoulême, Laboratoire de Microbiologie, Centre Hospitalier
Annecy, Laboratoire de Biologie Médicale, Centre Hospitalier Général
Annemasse, Laboratoire de Biologie Médicale, Centre Hospitalier
Antibes, Laboratoire de Biologie Médicale, Centre Hospitalier Général
Argenteuil, Laboratoire de Biologie Clinique, Centre Hospitalier Victor Dupouy
Arles, Laboratoire d'Hématologie-Microbiologie, Centre Hospitalier Général
Arpajon, Laboratoire de Biologie Médicale, Centre Hospitalier Général
Arras, Laboratoire de Bactériologie-Immunologie, Centre Hospitalier
Aubervilliers, Laboratoire de Biologie Médicale, Polyclinique d'Aubervilliers
Aulnay, Laboratoire de Biologie Médicale, Centre Hospitalier Général Robert Ballanger
Avignon, Laboratoire de Biologie A, Centre Hospitalier de la Durance
Bayonne, Laboratoire de Bactériologie-Sérologie, Centre Hospitalier de la Côte Basque
Besançon, Laboratoire de Parasitologie-Mycologie, CHRU Jean Minjoz
Blois, Laboratoire de Biologie Médicale, Centre Hospitalier Général
Bobigny, Laboratoire de Parasitologie-Mycologie, Hôpital Avicenne
Bondy, Laboratoire de Bactériologie, Hôpital Jean Verdier

Bordeaux, Laboratoire de Parasitologie-Mycologie, CHR Hôpital Saint-André
 Boulogne Billancourt, Laboratoire de Microbiologie-Hygiène, Hôpital Ambroise Paré
 Bourg en Bresse, Laboratoire de Bactériologie, Centre Hospitalier Général
 Bourges, Laboratoire de Biologie Médicale, Centre Hospitalier Général
 Brest, Laboratoire de Microbiologie, Centre Hospitalier Régional
 Brive la Gaillarde, Laboratoire de Biologie Médicale, Centre Hospitalier Général
 Bry sur Marne, Laboratoire de Microbiologie, Hôpital Sainte Camille
 Caen, Laboratoire de Microbiologie, Centre Hospitalier Universitaire
 Cahors, Hôpital de Gourdon, Centre Hospitalier
 Chalon sur Saône, Laboratoire de Biologie Médicale, Centre Hospitalier
 Chambéry, Laboratoire de Microbiologie, Centre Hospitalier
 Chartres, Laboratoire de Microbiologie, Centre Hospitalier
 Cherbourg, Laboratoire de Biologie Médicale, Centre Hospitalier des Armées René-le-Bas
 Cholet, Laboratoire de Biologie Médicale, Centre Hospitalier
 Clamart, Laboratoire de Biologie Médicale, Hôpital des Armées Percy
 Clamart, Service de Bactériologie-Virologie, Hôpital Antoine Béclère
 Clermont-Ferrand, Laboratoire de Bactériologie-Virologie, Centre Hospitalier
 Clichy, Laboratoire de Microbiologie, Hôpital Beaujon
 Colmar, Laboratoire de Microbiologie, CHG Louis Pasteur
 Colombes, Unité de Parasitologie-Mycologie, Hôpital Louis Mourier
 Corbeil-Essonnes, Laboratoire de Microbiologie, Centre Hospitalier
 Coulommiers, Laboratoire de Biologie, Centre Hospitalier René Arbelletier
 Creil, Laboratoire d'Hématologie, Centre Hospitalier Général
 Créteil, Laboratoire de Microbiologie, Centre Hospitalier Intercommunal
 Créteil, Laboratoire de Parasitologie-Mycologie, Hôpital Henri Mondor
 Dax, Laboratoire, Centre Hospitalier Général
 Dieppe, Laboratoire de Biologie Médicale, Centre Hospitalier Général
 Dreux, Laboratoire, Centre Hospitalier Général
 Eaubonne, Laboratoire d'Immuno-Bactério-Hématologie, Centre Hospitalier Emile Roux
 Elbeuf, Laboratoire de Microbiologie, Hôpital Feugrais
 Evry, Laboratoire Central de Biologie, Centre Hospitalier Louise-Michel
 Flers, Laboratoire de Chimie Biologique, CHG Jacques Monod
 Fréjus, Laboratoire de Biologie Médicale, CHI de Fréjus-Saint-Raphaël
 Fresnes, Laboratoire de Biologie Médicale, Hôpital Pénitentiaire
 Gap, Laboratoire de Biologie Médicale, CHI des Alpes du Sud
 Garches, Laboratoire de Microbiologie, Hôpital Raymond Poincaré
 Gonesse, Laboratoire de Bactério-Virologie-Hygiène Hospitalière, Centre Hospitalier
 Grenoble, Laboratoire de Parasitologie-Microbiologie, CHRU Albert Michallon
 La Roche-sur-Yon, Laboratoire de Biologie Médicale, CHD Roche-sur-Yon Luçon Montaigu
 Lagny sur Marne, Laboratoire de Biologie Médicale, Centre Hospitalier
 Laval, Laboratoire de Bactério-Parasito-Virologie, Centre Hospitalier
 Le Chesnay, Laboratoire de Bactériologie, Centre Hospitalier Mignot
 Le Havre, Laboratoire de Bactériologie-Virologie, Centre Hospitalier Général
 Le Kremlin Bicêtre, Laboratoire de Parasitologie-Microbiologie, Hôpital Bicêtre
 Le Mans, Service de Microbiologie Médicale et Hygiène Hospitalière, Centre Hospitalier
 Libourne, Laboratoire de Microbiologie, CHG Hôpital Garderose
 Limoges, Laboratoire de Parasitologie-Mycologie, Centre Hospitalier Dupuytren
 Longjumeau, Laboratoire de Biologie Médicale, Centre Hospitalier Général
 Lons le saunier, Laboratoire, Centre Hospitalier Général
 Lyon 4, Laboratoire de Microbiologie, Hôpital de la Croix-Rousse
 Mantes la Jolie, Laboratoire de Microbiologie, CH de Mantes-la-Jolie
 Marseille 8, Laboratoire de Biologie Médicale, Hôpital Fondation Saint-Joseph
 Marseille, Laboratoire de Parasitologie-Mycologie, CHU – La Timone
 Martignes, Laboratoire de Biologie Médicale, Centre Hospitalier Général
 Meaux, Laboratoire de Microbiologie, Centre Hospitalier
 Montargis, Laboratoire de Biologie Médicale, Centre Hospitalier
 Montbéliard, Laboratoire Bactériologie-Immunologie, CHG André Boulloche
 Montfermeil, Laboratoire de Biologie, Centre Hospitalier

Montpellier, Laboratoire de Parasitologie-Mycologie, CHU – Institut Botanique
 Montreuil, Laboratoire de Biologie Médicale, Centre Hospitalier Intercommunal
 Mulhouse, Laboratoire de Biologie Médicale, Hôpital Emile Muller
 Nancy, Laboratoire de Mycologie Médicale, CHR Hôpital Fournier
 Nantes, Laboratoire de Parasitologie-Mycologie, CHRU Hôtel-Dieu
 Neuilly, Laboratoire de Bactériologie, Hôpital Américain
 Nevers, Laboratoire de Bactériologie-Immunologie, Centre Hospitalier
 Nice, Laboratoire de Parasitologie-Mycologie, Centre Hospitalier de l'Archet
 Nîmes, Laboratoire de Bactério-Parasitologie, Centre Hospitalier Universitaire
 Niort, Laboratoire de Biologie Médicale, Centre Hospitalier
 Orléans, Laboratoire de Biologie Médicale, Centre Hospitalier Régional
 Paris 5, Laboratoire de Microbiologie, Institut Curie
 Paris 10, Laboratoire de Bactériologie, Groupe Hospitalier Lariboisière – Fernand Widal
 Paris 10, Laboratoire de Parasitologie-Microbiologie, Hôpital Saint-Louis
 Paris 12, Laboratoire de Biologie Médicale, Hôpital des Quinze-Vingts
 Paris 12, Laboratoire de Microbiologie, Hôpital Trousseau
 Paris 14, Laboratoire de Biologie Médicale, Institut Mutualiste Montsouris
 Paris 14, Laboratoire de Parasitologie-Mycologie, Groupe Hospitalier Cochin Port-Royal
 Paris 18, Laboratoire de Parasitologie-Mycologie, CHU Bichat-Claude-Bernard
 Paris 19, Service de Bactériologie, Hôpital Robert Debré
 Pau, Laboratoire de Bactériologie, Centre Hospitalier Général
 Perpignan, Laboratoire de Biologie Médicale, CHG Maréchal Joffre
 Poissy, Laboratoire de Biologie Médicale, Centre Hospitalier Intercommunal
 Poitiers, Laboratoire de Parasito-Mycologie et Sérologie, CHRU de la Milétrie
 Pontoise, Laboratoire de Bactériologie, Centre Hospitalier René Dubos
 Provins, Laboratoire de Biologie M. Maugerie, Centre Hospitalier Léon Binet
 Reims, Laboratoire de Parasitologie-Mycologie, CHRU Hôpital Maison Blanche
 Rennes, Laboratoire de Parasitologie-Mycologie, CHU Hôpital de Pontchaillou
 Roanne, Laboratoire de Séro-Hémato-Bactériologie, Centre Hospitalier Général
 Rodez, Laboratoire de Biologie Médicale, Centre Hospitalier
 Rouen, Laboratoire de Parasitologie-Mycologie, Hôpital Charles-Nicolle
 Saint-Cloud, Laboratoire de Biologie Médicale, Centre Hospitalier
 Saint-Denis, Laboratoire de Microbiologie-Sérologie-Parasitologie, Centre Hospitalier Général
 Saint-Etienne, Laboratoire de Parasitologie-Mycologie, CHU Hôpital Nord
 Saint-Germain-en-Laye, Laboratoire de Biologie Médicale, Centre Hospitalier Général
 Saint-Julien-en-Genevois, Laboratoire de Biologie Médicale, Centre Hospitalier
 Saint-Mandé, Laboratoire de Biologie Médicale, HIA Begin
 Saint-Maurice, Laboratoire de Biologie Médicale, Hôpital National
 Saint-Nazaire, Laboratoire de Biologie Médicale, Centre Hospitalier Général
 Sens, Laboratoire de Biologie Médicale, Centre Hospitalier
 Strasbourg, Laboratoire de Biochimie, CHRU Hôpital de Hautepierre
 Thonon les Bains, Service de Biologie, Centre Hospitalier
 Toul, Laboratoire de Parasitologie-Mycologie, CHU de Nancy Hôpital Jeanne d'Arc
 Toulon Armées, Laboratoire de Bactériologie, HIA Sainte-Anne
 Toulouse, Laboratoire de Microbiologie, CHU Hôpital Purpan
 Tourcoing, Laboratoire de Biologie Médicale, CH Gustave Dron
 Tours, Laboratoire de Parasitologie-Mycologie, CHRU Hôpital Bretonneau
 Troyes, Laboratoire de Bactériologie-Virologie, Centre Hospitalier
 Tulle, Laboratoire d'Analyses, Centre Hospitalier
 Valence, Laboratoire de Biologie, Centre Hospitalier
 Valenciennes, Laboratoire de Biologie Clinique, Centre Hospitalier
 Vannes, Service de Bactériologie, Centre Hospitalier Bretagne Atlantique
 Vernon, Laboratoire, Centre Hospitalier Général Saint-Louis
 Versailles, Département de Biologie, Hôpital Richaud
 Villejuif, Laboratoire de Bactériologie, Hôpital Paul Brousse
 Villejuif, Laboratoire de Biologie Clinique, Institut Gustave Roussy
 Villeneuve Saint-Georges, Laboratoire de Bactériologie, Centre Hospitalier Intercommunal

Membres du réseau dans les DOM-TOM

Basse-Terre, Guadeloupe, Laboratoire de Biologie Médicale, Centre Hospitalier Général
Cayenne, Guyane, Laboratoire, Centre Hospitalier
Cayenne, Guyane, Laboratoire, Institut Pasteur
Saint-Laurent du Maroni, Guyane, Laboratoire, CH Ouest Guyanais « Franck Joly »
Fort-de-France, Laboratoire de Microbiologie, CHRU Pierre Zobda Quitman
Kourou, Guyane, Laboratoire, Centre Hospitalier
Le Lamentin, Martinique, Laboratoire de Biologie Médicale, Centre Hospitalier Général
Mamoudzou, Mayotte, Laboratoire, Centre Hospitalier de Mayotte
Noumea, Laboratoire de Biologie Médicale, CHT G. Bouret
Noumea, Laboratoire de Biologie Médicale, Institut Pasteur
Papeete, Tahiti, Laboratoire de Biologie Médicale, Centre Hospitalier Territorial
Papeete, Tahiti, Laboratoire de Biologie Médicale, HIA J. Prince
Pointe-à-Pitre, Guadeloupe, Laboratoire de Parasitologie-Mycologie, CHR de Pointe-à-Pitre-Abymes
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
Mayotte, Centre Hospitalier