Santé publique France
12 rue du Val d'Osne – 94415 Saint Maurice Cedex
www.santepubliquefrance.fr

**Centre National de Référence Mycoses invasives et antifongiques**
Institut Pasteur, 28 rue du Docteur Roux, 75015 Paris

**Tél. :** 01 45 68 83 54

https:/www.pasteur.fr/fr/sante-publique/CNR/les-cnr/mycoses-invasives-antifongiques

CNRMA
IFI

# RAPPORT ANNUEL D'ACTIVITE 2024

## *Année d'exercice 2023*

## CNR Mycoses invasives et antifongiques

| | Organisme / Structure d'hébergement | Responsable |
|---|---|---|
| **Laboratoire CNR** | Institut Pasteur | Fanny Lanternier |
| **Laboratoire Associé - AspCNord** | **CHU Rennes** | Jean-Pierre Gangneux |
| **Laboratoire Associé-AspCSud** | **CHU Bordeaux** | Laurence Delahes |
| **Laboratoire Associé-INUSUAL** | **CHU de la Pitié Salpetrière** | Arnaud Fekkar |
| **Laboratoire Associé** | Cliquez ou appuyez ici pour entrer du texte. | Cliquez ou appuyez ici pour entrer du texte. |

## GUIDE DE REMPLISSAGE

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

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

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

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

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

- *Les annexes 1 et 2 ont pour objet de rappeler les missions et l'organisation du CNR d'une part, ses capacités techniques d'autre part. Ces éléments sont pour la plupart déjà disponibles dans votre dossier de candidature. Seuls les éléments nouveaux (changement d'organisation, de locaux, nouvelles capacités …) doivent figurer dans le corps du rapport.*

- *L'annexe 3 regroupe des informations confidentielles, à l'attention de Santé publique France et de son Comité des CNR, non destinées à être rendues publiques : permanence du CNR, détenteurs d'autorisations MOT (Micro-Organismes et Toxines), détenteurs d'autorisations d'exercer la biologie médicale (AEBM), résultats de recherche non encore publiés ou sous embargo, difficultés rencontrées, liste des activités menées par le CNR en lien avec des entreprises ou établissements industriels ou commerciaux dont les produits entrent dans le champ d'expertise du CNR (cf déclarations d'intérêts et engagement déontologique signé par les responsables des CNR (en précisant la nature des activités, les financements éventuels obtenus et la destination de ces financements). Cette annexe 3 doit figurer dans un document PDF distinct ou être détachable de la version papier fournie.*

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

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

**Guide de remplissage** ..... **2**
**1. CNRMA-IFI** ..... **7**
**Résumé analytique** ..... **7**
**Faits marquants** ..... **7**
**Executive summary** ..... **8**
**Highlights** ..... **8**
**1.1 Missions et organisation du CNRMA-IFI** ..... **9**
**Organigramme** ..... **9**
**Mission et Organisation** ..... **10**
**Démarche Qualité** ..... **11**
**1.2 Activités d'expertise** ..... **11**
1.2.1 Evolution des techniques ..... 11
1.2.2 Travaux d'évaluation des techniques, réactifs et trousses ..... 12
1.2.3 Techniques transférées vers d'autres laboratoires ..... 13
1.2.4 Collections de matériel biologique ..... 14
1.2.5 Interfaces avec les réseaux de surveillance nationaux ou internationaux ..... 14
1.2.6 Activités d'expertises ..... 15
1.2.7 Activités de séquençage ..... 18
1.2.8 Partage de séquences produites par les CNRMA-IFI ..... 19
**1.3 Activités de surveillance** ..... **20**
1.3.1 Description du réseau de partenaires ..... 21
1.3.2 Surveillance de l'évolution et des caractéristiques des infections ..... 24
1.3.3 Surveillance de la résistance des agents pathogènes aux anti-infectieux ..... 28
1.3.4 Enquêtes ou études ponctuelles concourant à la surveillance ..... 39
**1.4 Alertes** ..... **40**
**1.5 Activités de mise à disposition de l'information, de formation et de conseil** ..... **43**
1.5.1 Conseil et expertise aux professionnels de santé ..... 43
1.5.2 Conseil et expertise aux autorités sanitaires ..... 43
1.5.3 Conseil et expertise pour d'autres cibles (médias, grand public …) ..... 43
**1.6 Travaux de recherche et publications en lien direct avec l'activité du CNRMA-IFI** ..... **44**
1.6.1 Activités de recherche en cours lors de l'année N, concernant uniquement celles ayant un lien direct avec les missions et activités du CNR ..... 44
1.6.2 Liste des publications et communications de l'année N, concernant uniquement celles ayant un lien direct avec les missions et activités du CNR ..... 44
**1.7 Coopération avec les laboratoires de santé animale, de sécurité sanitaire des aliments, environnementaux** ..... **48**
**1.8 Programme d'activité pour les années suivantes** ..... **49**
**1.9 Annexe 1 : Missions & organisation du CNRMA-IFI** ..... **50**
1.9.1 Missions du CNR et de ses éventuels laboratoires associés ..... 50
1.9.2 Organisation du CNR et de ses éventuels laboratoires associés ..... 50
1.9.3 Locaux et équipements ..... 50
1.9.4 Collections de matériel biologique ..... 52
1.9.5 Démarche qualité du laboratoire ..... 53

**1.10 Annexe 2 : Capacités techniques du CNRMA-IFI ..... 54**
1.10.1 Liste des techniques de référence ..... 54
1.10.2 Liste des techniques recommandées par le CNR ..... 55
**2. CNRMA-LABORATOIRE ASSOCIE INUSUALE ..... 57**
**Résumé analytique - Faits marquants ..... 57**
**Executive summary - Highlights ..... 57**
**2.1 Missions et organisation du CNRMA-Laboratoire Associé INuSuAle ..... 58**
**Organigramme ..... 58**
**Mission et Organisation ..... 58**
**Démarche Qualité ..... 58**
**2.2 Activités d'expertise ..... 59**
2.2.1 Evolution des techniques ..... 59
2.2.2 Travaux d'évaluation des techniques, réactifs et trousses ..... 59
2.2.3 Techniques transférées vers d'autres laboratoires ..... 59
2.2.4 Collections de matériel biologique ..... 59
2.2.5 Activités d'expertises ..... 60
2.2.6 Activités de séquençage ..... 61
**2.3 Activités de surveillance ..... 61**
**61**
2.3.1 Description du réseau de partenaires ..... 61
2.3.2 Surveillance de l'évolution et des caractéristiques des infections ..... 63
2.3.3 Surveillance de la résistance des agents pathogènes aux anti-infectieux ..... 67
2.3.4 Interfaces avec les réseaux de surveillance nationaux ou internationaux ..... 67
2.3.5 Enquêtes ou études ponctuelles concourant à la surveillance ..... 67
**2.4 Alertes ..... 68**
**2.5 Activités de mise à disposition de l'information, de formation et de conseil ..... 69**
2.5.1 Conseil et expertise aux professionnels de santé ..... 69
2.5.2 Conseil et expertise aux autorités sanitaires ..... 69
2.5.3 Conseil et expertise pour d'autres cibles (médias, grand public …) ..... 69
2.5.4 Travaux de recherche et publications en lien direct avec l'activité du CNR ..... 69
2.5.5 Activités de recherche en cours lors de l'année N, concernant uniquement celles ayant un lien direct avec les missions et activités du CNR ..... 69
2.5.6 Liste des publications et communications de l'année N, concernant uniquement celles ayant un lien direct avec les missions et activités du CNR ..... 69
**2.6 Coopération avec les laboratoires de santé animale, de sécurité sanitaire des aliments, environnementaux ..... 69**
**2.7 Programme d'activité pour les années suivantes ..... 70**
**2.8 Annexe 1 : Missions & organisation du CNRMA-Laboratoire associé INUSUALe ..... 70**
2.8.1 Missions du CNR et de ses éventuels laboratoires associés ..... 70
2.8.2 Organisation du CNR et de ses éventuels laboratoires associés ..... 71
2.8.3 Locaux et équipements ..... 72
2.8.4 Collections de matériel biologique ..... 72
2.8.5 Démarche qualité du laboratoire ..... 72
**2.9 Annexe 2 : Capacités techniques du CNRMA-Laboratoire associé InUSUALe ..... 73**

2.9.1 Liste des techniques de référence ....73
2.9.2 Liste des techniques recommandées par le CNR ....73
3. CNRMA-LABORATOIRES ASSOCIES ASPERGILLOSES CHRONIQUES 74
**Résumé analytique ....74**
**Faits marquants ....74**
**Executive summary ....74**
**Highlights ....74**
**3.1 Missions et organisation du CNR ....75**
**Organigramme ....75**
**Mission et Organisation ....76**
**Démarche Qualité ....78**
**3.2 Activités d'expertise ....79**
3.2.1 Evolution des techniques ....79
3.2.2 Travaux d'évaluation des techniques, réactifs et trousses ....79
3.2.3 Techniques transférées vers d'autres laboratoires ....80
3.2.4 Collections de matériel biologique ....80
3.2.5 Activités d'expertises ....81
3.2.6 Activités de séquençage ....85
3.2.7 Partage de séquences produites par les CNR ....87
**3.3 Activités de surveillance ....88**
3.3.1 Description du réseau de partenaires ....88
3.3.2 Surveillance de l'évolution et des caractéristiques des infections ....89
3.3.3 Surveillance de la résistance des agents pathogènes aux anti-infectieux ....89
3.3.4 Interfaces avec les réseaux de surveillance nationaux ou internationaux ....89
3.3.5 Enquêtes ou études ponctuelles concourant à la surveillance ....89
**3.4 Alertes ....90**
**3.5 Activités de mise à disposition de l'information, de formation et de conseil ....91**
3.5.1 Conseil et expertise aux professionnels de santé ....91
3.5.2 Conseil et expertise aux autorités sanitaires ....91
3.5.3 Conseil et expertise pour d'autres cibles (médias, grand public …) ....91
**3.6 Travaux de recherche et publications en lien direct avec l'activité du CNR ....92**
3.6.1 Activités de recherche en cours lors de l'année N, concernant uniquement celles ayant un lien direct avec les missions et activités du CNR ....92
3.6.2 Liste des publications et communications de l'année N, concernant uniquement celles ayant un lien direct avec les missions et activités du CNR ....92
**3.7 Coopération avec les laboratoires de santé animale, de sécurité sanitaire des aliments, environnementaux ....95**
**3.8 Programme d'activité pour les années suivantes ....95**
**3.9 Annexe 1 : Missions & organisation du CNR ....96**
3.9.1 Missions du CNR et de ses éventuels laboratoires associés ....96
3.9.2 Organisation du CNR et de ses éventuels laboratoires associés ....96
3.9.3 Locaux et équipements ....96
3.9.4 Collections de matériel biologique ....97
3.9.5 Démarche qualité du laboratoire ....97

**3.10 Annexe 2 : Capacités techniques du CNR....100**
3.10.1 Liste des techniques de référence....100
3.10.2 Liste des techniques recommandées par le CNR....101
**3.11 Annexe 3 CNRMA-IFI: Autres informations (non destinées à être rendues publiques)....103**
3.11.1 Permanence du CNRMA-IFI....103
3.11.2 Autorisations MOT....103
3.11.3 Autorisations d'exercer la biologie médicale....104
3.11.4 Résultats de recherches non encore publiés ou sous embargo....104
3.11.5 Difficultés rencontrées par le CNR au cours de l'année N, y compris en termes de mise à disposition de la subvention versée par Santé publique France....104
3.11.6 Liste des activités menées par le CNR en lien avec des entreprises ou établissements industriels ou commerciaux dont les produits entrent dans le champ d'expertise du CNR....104
3.11.7 Autres remarques à destination du comité des CNR....104
**3.12 Annexe 3 CNRMA-Laboratoire associé InuSUAL: Autres informations (non destinées à être rendues publiques)105**
3.12.1 Permanence du CNR....105
3.12.2 Autorisations MOT....105
3.12.3 Autorisations d'exercer la biologie médicale....106
3.12.4 Résultats de recherches non encore publiés ou sous embargo....106
3.12.5 Difficultés rencontrées par le CNR au cours de l'année N, y compris en termes de mise à disposition de la subvention versée par Santé publique France....106
3.12.6 Liste des activités menées par le CNR en lien avec des entreprises ou établissements industriels ou commerciaux dont les produits entrent dans le champ d'expertise du CNR....106
3.12.7 Autres remarques à destination du comité des CNR....106
**3.13 Annexe 3 Laboratoire associé AspC : Autres informations (non destinées à être rendues publiques)....107**
3.13.1 Permanence du CNR....107
3.13.2 Autorisations MOT....107
3.13.3 Autorisations d'exercer la biologie médicale....107
3.13.4 Résultats de recherches non encore publiés ou sous embargo....107
3.13.5 Difficultés rencontrées par le CNR au cours de l'année N, y compris en termes de mise à disposition de la subvention versée par Santé publique France....107
3.13.6 Liste des activités menées par le CNR en lien avec des entreprises ou établissements industriels ou commerciaux dont les produits entrent dans le champ d'expertise du CNR....108
3.13.7 Autres remarques à destination du comité des CNR....108

# 1. CNRMA-IFI

## RESUME ANALYTIQUE

### Faits marquants

Le Centre National de Référence des Mycoses Invasives et Antifongiques (CNRMA) a pour mission la surveillance, l'expertise, l'alerte et le conseil pour l'ensemble des infections fongiques invasives en France. En 2023 se sont associés 2 laboratoires associés AspC pour la surveillance des aspergilloses chroniques et le laboratoire associé INUSUal avec pour mission principale l'identification numérique grâce au MALDI-Tof des agents fongiques ainsi que leur surveillance et la participation active aux alertes.

Pour le CNRMA-IFI, l'année 2023 a été marquée par la construction et animation d'un nouveau réseau national de surveillance SINFONI (Surveillance des INfections FONgiques Invasives) comprenant 60 centres hospitalo-universitaires et hospitaliers répartis sur le territoires métropolitain et ultra marin, la mise en place d'un nouveau questionnaire. Un conseil scientifique du CNRMA-IFI a été mis en place pour une gestion multidisciplinaire intégrant des aspects de santé globale.

En 2023, 3666 cas ont été déclarés dont 54% de fongémies, 15% de pneumocystoses et aspergilloses invasives, 4% de mucormycoses. Le taux de mortalité à 3 mois de 40%. Les pathologies malignes sont présentes chez 38% des patients diagnostiqués pour une infection. Parmi les terrains à risque 5% patients avaient une infection virale grippale ou par le SARS CoV2. 704 souches ont été reçues au CNRMA.

Concernant les fongémies investiguées en méthode EUCAST, le nombre d'isolats résistants aux échinocandines reste très faible en 2023 (<1%), le pourcentage d'isolats de *C. parapsilosis* et *C. glabrata* résistants au fluconazole est en augmentation depuis 2020, respectivement de 14.8% et 17% en 2023. Le pourcentage de souches d'*Aspergillus* résistantes aux azolés parmi les aspergilloses invasives est d'environ 11%

Une note de recommandations pour la surveillance et la prévention des infections et colonisations à *Candida auris* a été établie avec le SFMM, la SF2H et diffusée aux sociétés savantes concernées en juin 2023. Deux cas d'infections et 9 de colonisations ont été déclarés en 2023. Nous avons également participé à l'exploration de cas groupés d'infections invasives à *Trichosporon* en lien avec le LA-INuSuAle

# EXECUTIVE SUMMARY

## Highlights

The mission of the Centre National de Référence des Mycoses Invasives et Antifongiques (NRCMA) is to monitor, assess, alert and advise on all invasive fungal infections (IFI) in France. In 2023, 2 associated laboratories, AspC for the surveillance of chronic aspergillosis, and INUSUal for the numerical identification of fungal agents using MALDI-Tof, as well as their surveillance and active participation in alerts, have joined forces.

For NRCMA-IFI, 2023 was marked by the construction and management of a new national surveillance network, SINFONI (Surveillance des INfections FONgiques Invasives), comprising 60 university and hospital centers in mainland France and the French overseas territories, and the introduction of a new questionnaire. A NRCMA-IFI scientific advisory board has been set up to ensure multidisciplinary management, integrating global health aspects.

In 2023, 3,666 cases were reported, of which 54% were fungal infections, 15% invasive pneumocystis and aspergillosis, and 4% mucormycosis. The 3-month mortality rate was 40%. Malignant pathologies were present in 38% of patients diagnosed with an infection. Among high-risk sites, 5% of patients had an influenza virus or SARS CoV2 infection. 704 strains were received at NRCMA-IFI.

Among the fungal strains investigated using the EUCAST method, the number of echinocandin-resistant isolates remains very low in 2023 (<1%), while the percentage of fluconazole-resistant *C. parapsilosis* and *N. glabratus* isolates has been rising since 2020, to 14.8% and 17% respectively in 2023. The percentage of azole-resistant *Aspergillus* strains among invasive aspergillosis is around 11%.

A set of recommendations for the surveillance and prevention of *Candida auris* infections and colonization has been drawn up in conjunction with the SFMM and SF2H, and distributed to the relevant learned societies in June 2023. Two cases of infection and 9 cases of colonization were reported in 2023. We also took part in the investigation of clustered cases of invasive *Trichosporon* infections in conjunction with LA-INuSuAle.

## 1.1 Missions et organisation du CNRMA-IFI

Aucun changement n'est intervenu au cours de l'année 2023 concernant les missions et l'organisation du CNRMA (Figure 1). Des changements au-niveau du personnel sont intervenus depuis le début de l'année (Tableau 1). Nous indiquons ici l'organigramme du CNRMA-IFI actuel (Figure 2). Depuis le 1er janvier 2023, le CNRMA est rattaché au Département de Mycologie de l'Institut Pasteur et comprend dans sa structure un groupe de recherche intitulé Mycologie Translationnelle. De plus, trois laboratoires associés ont également été créés. Le laboratoire associé des Aspergilloses Chroniques (LA-AspC) est proposé par les services de Parasitologie-Mycologie des CHU de Bordeaux et de Rennes, adossés à l'équipe 2 de l'U1045 (Inserm Bordeaux) et l'équipe 2 de l'Irset (UMR S_1085 Inserm) à Rennes; et le laboratoire associé Identification Numérique, Surveillance épidémiologique, Alerte (LA-INuSuAle) est proposé par le service de Parasitologie-Mycologie du CHU de La Pitié-Salpêtrière (AP-HP, Sorbonne Université), adossé à l'Institut Pierre Louis d'Epidémiologie et de Santé Publique (iPLESP, UMR_S 1136 INSERM/UPMC), et au centre de recherche SCAI - Sorbonne Center for Artificial Intelligence (Sorbonne Université). L'activité de ces laboratoires pour l'année 2023 est rapportée indépendamment pour chaque laboratoire.

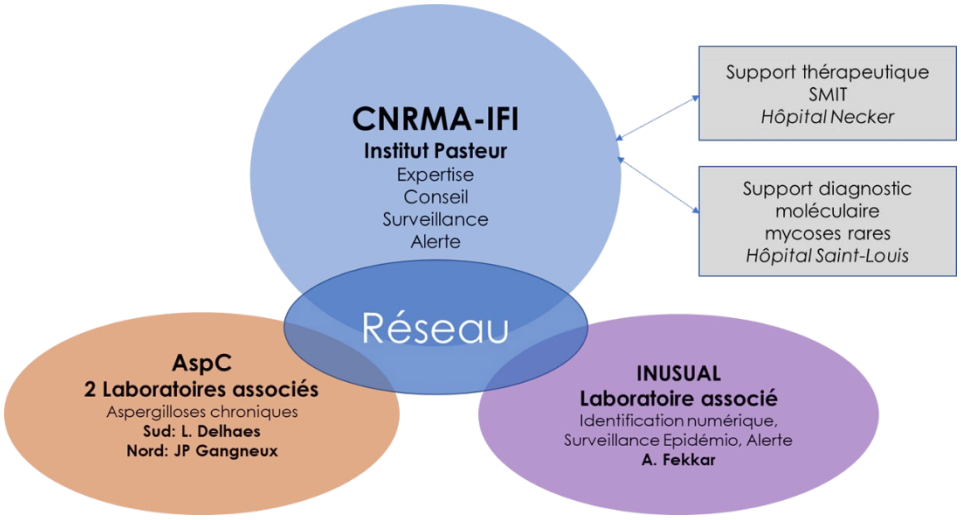



*Figure 1:Structuration du CNRMA et des laboratoires associés*

## Organigramme

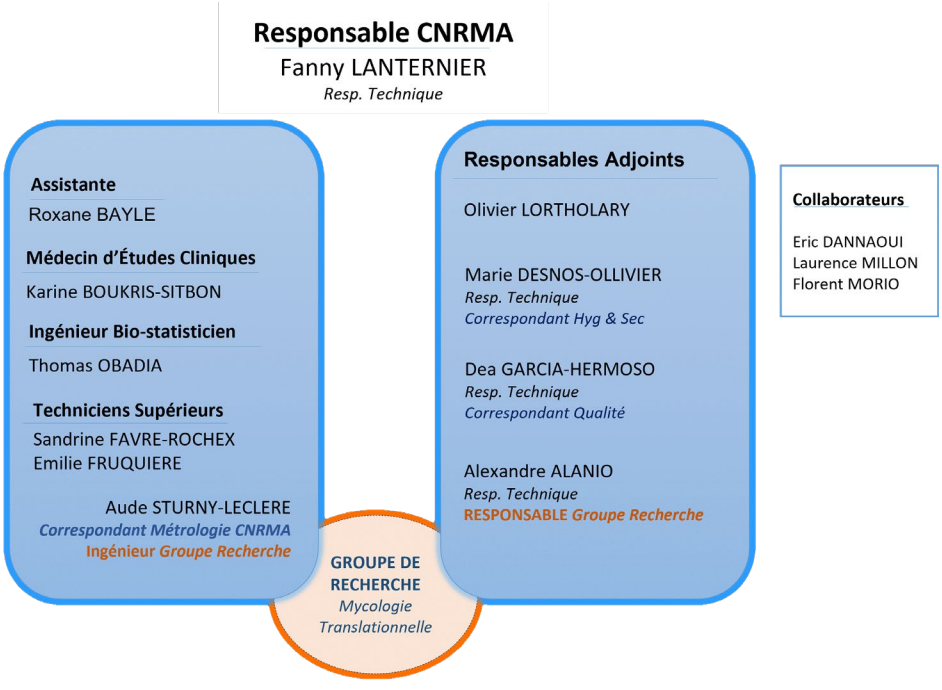



*Figure 2. Organigramme du CNRMA-IFI*

*Tableau 1. Liste du personnel travaillant au CNRMA entre janvier et décembre 2023*

| Nom | Fonction | ETP | Qualification/statut | Organisme payeur |
|---|---|---|---|---|
| **Alexandre Alanio** | Responsable adjoint/ Responsable groupe de recherche Mycologie Translationnelle | 20% | Docteur en médecine, Thèse d'université / PU-PH Hôpital Saint Louis | AP-HP / Université Paris Cité |
| **Christèle Auguste** (depart 17/03/2023) | Assistante | 30% | Secrétaire de Direction | Institut Pasteur |
| **Roxane Bayle** (depuis 06/03/2023) | Assistante | 40% | Technicienne administrative de gestion | Institut Pasteur |
| **Karine Boukris-Sitbon** | Médecin d'Etudes Cliniques | 50% puis 60% depuis 01/09/2023 | Docteur en Médecine / Cadre Administratif et Technique | Institut Pasteur |
| **Marie Desnos-Ollivier** | Responsable adjoint | 100% | Thèse d'université / Ingénieur | Institut Pasteur |
| **Sandrine Favre-Rochex** (depuis 01/06/2023) | Technicienne | 100% | BTS / Technicien supérieur de laboratoire | Institut Pasteur |
| **Emilie Fruquière** | Technicienne | 100% | BTS / Technicien supérieur de laboratoire | Institut Pasteur |
| **Dea Garcia-Hermoso** | Responsable adjoint | 100% puis 80% depuis 01/11/2023 | Thèse d'université / Ingénieur | Institut Pasteur |
| **Fanny Lanternier** | Responsable du CNRMA | 50% | Docteur en médecine, Thèse d'université / PU-PH Hôpital Necker-Enfants Malades | AP-HP / Université Paris Cité |
| **Olivier Lortholary** | Responsable adjoint | 20% | Docteur en Médecine, Thèse d'université / PUPH Hôpital Necker-Enfants Malades | AP-HP / Université Paris Cité |
| **Thomas Obadia** (depuis 01/03/2023) | Ingénieur Biostatistiques | 25% | Thèse d'université / Ingénieur | Institut Pasteur |
| **Aude Sturny-Leclère** | Ingénieur de recherche | 100% (Groupe de recherche attaché au CNRMA-IFI) | Ingénieur | Institut Pasteur |

## Mission et Organisation

Les Missions, les locaux et équipements, les collections et la démarche qualité sont détaillés en Annexe 1.

## Démarche Qualité

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

Ci-après le récapitulatif des analyses réalisées en 2023 déclaré à l'ARS

| CNR | Famille | Sous famille | Activités de biologie médicale | Nb analyses 2022 | Accrédité A ou Non Accrédité NA |
|---|---|---|---|---|---|
| CNR Mycoses invasives & Antifongiques | Microbiologie | Parasito-Mycologie | Distinction moléculaire entre *Candida albicans* et *C. dubliniensis* | 38 | A |

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

Demande d'extension prévue

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

## 1.2 Activités d'expertise

Les techniques disponibles au CNRMA sont détaillées en Annexe 2.

### 1.2.1 Evolution des techniques

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

**PCR *Cryptococcus neoformans/gatii* complex**
Nous avons également développé et validés[1] une PCR temps réel ciblant *C. neoformans, C. deneoformans* et *C. gattii* complex que nous proposons aux centres français qui le souhaitent pour le diagnostic et le suivi des cryptococcoses neuroméningées, disséminées ou localisées (site expertise moléculaire Saint-Louis).

**PCR *Candida auris***
Nous proposons une PCR temps réel ciblant *C.auris* permettant le criblage des patients à risque de contamination par *C. auris* directement à partir des échantillons cliniques (site expertise moléculaire Saint-Louis)

[1] Lancet Microbe 2024, doi: 10.1016/S2666-5247(23)00362-2.

**Test de sensibilité aux antifongiques**
Depuis 2003, la détermination de la susceptibilité aux antifongiques pour les levures et champignons filamenteux était réalisée en utilisant une version modifiée de la méthode de référence par dilution en milieu liquide de l'EUCAST (European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing). En 2023, nous avons décidé de suivre la procédure originale proposée. De ce fait, pour les champignons filamenteux nous avons substitué le milieu AM3 utilisé pour analyser l'amphotéricine B et nous avons modifié la lecture des plaques en prenant une réduction ≥90% de la densité optique (DO) par rapport à celle du témoin sans antifongique comme la valeur de la CMI. Pour les levures, les antifongiques micafungine et l'amphotéricine B sont désormais testées en RPMI.

### 1.2.2 Travaux d'évaluation des techniques, réactifs et trousses

**Intérêt du beta-D-glucane dans le diagnostic des IFI**
Récemment, une évaluation de l'intérêt du BDG a été mise en place dans le contexte des recommandations européennes de l'ECIL-9 (A. Alanio) avec l'analyse bibliographique des performances du BDG dans les fusarioses et les scedosporioses. Notre évaluation de la littérature (nombre de cas analysable restreints) a abouti à des valeurs de sensibilité de 76,7% et 81,5% pour le diagnostic des fusarioses et des scedosporioses, respectivement[2].

**Développement d'un test rapide de diagnostic de la cryptococcose**
Une évaluation du test dans le sérum chez des patients asymptomatiques à risque a montré un taux de faux positif important qui a pu être diminué avec l'utilisation d'un protocole de chauffage simple (100°C 5 min) avec un impact existant mais minime sur la sensibilité. Par ailleurs, ce test a montré des limites en termes de sensibilité pour le diagnostic des cryptococcose liés à *C. gattii* complex[3].

**Cryptococcose, histoplasmose et talaromycose: *Evaluation et implémentation de nouveaux outils de diagnostic rapides pour les IFI sur le terrain***
Afin d'étudier le poids de l'histoplasmose en Afrique chez les patient VIH (PVVIH), nous avons initié un premier travail de recherche à partir d' bio-banque d'échantillons de patients pris en charge pour une tuberculose (STATIS ANRS-12290), l'étude **EVADIAG-Histo**. Nous avons bénéficié un contrat d'initiation ANRS en janvier 2023. Les objectifs d'EVADIAG-Histo sont les suivants : (I) évaluation de deux nouveaux tests antigéniques rapides pour le diagnostic de l'histoplasmose et, (II) étude de prévalence de l'histoplasmose sur deux sites d'Afrique Sub-saharienne (Abidjan en Côte d'Ivoire et Mbarara en Ouganda). Le projet STATIS 2014-2017, a pris en charge des patients ambulatoires (CD4+ <100 cells) dans deux bras de traitement antituberculeux. Sur l'année 2023, en parallèle des démarches juridiques et administratives (dossiers IRB, CESREES, CNIL et Comité Ethique Abidjan), au travers d'une première mission sur site (juillet 2023) nous avons déterminé les indices de performances de ces nouveaux TDRs (sensibilité et spécificité) et étudié la prévalence de l'histoplasmose sur un premier groupe de patients à risques (patients décédés durant l'étude et patients sans preuve microbiologique de tuberculose) sur le site d'Abidjan (site I). Aux vues de résultats très satisfaisants, nous avons fait une demande d'extension de budget à l'ANRS pour évaluer la prévalence de la co-infection histoplasmose tuberculose, sur l'intégralité de la cohorte STATIS de la Côte d'Ivoire (accepté en décembre 2023). La seconde mission s'est déroulée sur Abidjan en février 2024. Les analyses sont en cours. Les démarches juridiques sur le site de l'Ouganda (site II) sont encore en cours et la mission pour Mbarara se profile pour juin 2024.
Dans la continuité d'EVADIAG-Histo, nous avons décidé de poursuivre ce travail sur la même bio banque d'échantillons (STATIS) sur le site du Cambodge, également partenaire de cette étude (199 patients inclus), avec l'Institut Pasteur de Phnom Penh (**FUNgi-Cam**). Nous étudierons la prévalence de la cryptococcose, de l'histoplasmose et de la talaromycose, trois infections fongiques invasives insuffisamment diagnostiquées chez les PVVIH, par manque de connaissances et de méthodes diagnostiques locales. Nous avons obtenu une subvention de recherche par l'ANRS (2024-2026) à la suite du dépôt du projet aux appels d'offres du printemps 2023. Grâce aux données satisfaisantes obtenues sur les sites Africains, nous avons sélectionné le test MiraVista, pour la méthode de diagnostic rapide pour l'histoplasmose. Les tests antigéniques utilisés pour le diagnostic de la

[2] Med Mycol 2023, doi: 10.1093/mmy/myad061
[3] Med Mycol 2022, doi: 10.1093/mmy/myac078.

talaromycoses (test rapide et ELISA) sont encore en cours de validation. Les données obtenues pour *Talaromyces* participeront à finaliser une évaluation en cours avec une collègue chercheur de Duke University.
En combinant les nouveaux outils de diagnostic, la formation appropriée des cliniciens et des équipes de laboratoire et l'accessibilité aux traitements, la mortalité liée à la cryptococcose, à l'histoplasmose et à la talaromycose, pourrait être réduite. Dans les zones à forte prévalence du VIH et de la tuberculose, nous pensons qu'il est essentiel de mettre ces stratégies pour une meilleure prise en charge des PVVIH.
A noter, grâce aux performances obtenus sur les tests rapides de l'antigène *Histoplasma* urinaire dans l'étude EVADIAG-Histo, le test rapide MiraVista sera mise en place en 2024 au laboratoire de mycologie de l'hôpital Saint-Louis.

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

**Identification de l'espèce par test multiplex dans les hémocultures**
Nous avons évalué le panel BCID 2 méthode Biofire (Biomérieux) pour l'identification des *Candida* dans les hémocultures. Sur les 3 hémoculture à *Candida albicans* incluse dans cette étude, seules 2 (66%) ont pu être détectées par la méthode BCID2[5].

### 1.2.3 Techniques transférées vers d'autres laboratoires

| Techniques transférées | Par | Vers Laboratoire | Lieu |
|---|---|---|---|
| Détermination de concentrations minimales inhibitrices (CMIs) par la méthode EUCAST pour les champignons filamenteux de l'ordre de Mucorales. | Dea Garcia-Hermoso et Emilie Fruquière | CHU Besançon (centre SINFONI) | Formation de Julie Rousselot au CNRMA-IFI |
| Protocole standardisé pour qPCR en temps réel *C. auris** | Alexandre Alanio | Réseau SINFONI | Nantes, Strasbourg, Nancy et Amiens |
| Protocole standardisé pour qPCR en temps réel *Histoplasma capsulatum* | Alexandre Alanio<br><br>Aude Sturny-Leclère | Réseau SINFONI | CHU Martinique |

* La qPCR en temps réel *C. auris* spécifique permet une détection moléculaire rapide de *C. auris* aussi directement dans les échantillons cliniques. Elle est indiquée lors des phases de screening à l'hôpital après la détection d'un cas fortuitement ou directement en dépistage à l'arrivée à l'hôpital à la place ou en complément de la culture fongique. Ces dernières années plusieurs méthodes ont été développées en particulier dans les pays où des épidémies ont lieu régulièrement. A l'hôpital Saint-Louis, à l'occasion d'un cas de transmission en réanimation brulés, nous avons mis en place une qPCR *C. auris* spécifique permettant de détecter au minimum une CFU. Elle est actuellement utilisée en routine pour cribler les patients à risque des Hôpitaux Saint-Louis Lariboisière Bichat Beaujon Louis Mourier et Robert Debré. Un protocole standardisé en termes de méthode d'extraction et d'amplification a été rédigé et partagé avec les centres du réseau SINFONI. A ce jour, le protocole a été partagé avec 4 centres (Nantes, Strasbourg, Nancy et Amiens) qui sont en train de l'implémenter localement. D'autres

[4] Journal of Fungi 2022, doi: 10.3390/jof8080786.
[5] Microbial Spectr 2023, doi: 10.1128/spectrum.02547-22.

centres utilisent des kits commerciaux qui sont par définition plus onéreux.

Le protocole d'extraction et le protocole de qPCR histoplasma permettant le diagnostic moléculaire de l'histoplasmose[6] a été transféré au CHU de la Martinique (Pr Nicole Desbois) permettant le diagnostic fiable et rapide des histoplasmoses en zone de forte endémie.

### 1.2.4 Collections de matériel biologique

L'organisation, les conditions de stockage et de mise à disposition des collections de matériel biologique du CNR sont détaillées en annexe 1. Tous les isolats reçus au CNRMA pour expertise ou dans le cadre des surveillances sont stockés selon les conditions détaillées dans l'annexe 1.
**Au cours de l'année 2023** : 704 isolats ont été reçus et 618 ont été analysés et stockés au CNRMA (détails dans le chapitre 2.5).
De plus, à la demande de certains laboratoires nous avons transmis des isolats cliniques, après accords des correspondants expéditeurs et signature d'un MTA et selon les normes de sécurité en vigueur (Tableau 2).

***Tableau 2. Matériel biologique distribué par le CNRMA en 2023***

| Nature du matériel biologique | Quantité | Destinataire |
|---|---|---|
| souche | 30 | Westerdijk Fungal Biodiversity Institute, Utrecht, Netherlands |
| souche | 43 | Laboratoire Parasitologie-Mycologie, CHU Lille |
| souche | 8 | Hôpital de la Croix Rousse, CHU Lyon |

Actuellement le CNRMA-IFI conserve plus de 4000 souches de champignons filamenteux, 162 de souches de classe 3 et 13 807 souches de levures, provenant d'isolats cliniques. Le détail des espèces et des conditions de stockage est donné dans l'annexe 1.

### 1.2.5 Interfaces avec les réseaux de surveillance nationaux ou internationaux

Une surveillance des infections et colonisations à *Candida auris* est recommandée en France. Une note ((https://www.pasteur.fr/sites/default/files/note_cauris_juin_2023.pdf) a été réalisée entre le CNRMA, la SFMM et la SF2H pour proposer des mesures de dépistage ainsi que recommander la déclaration des cas d'infections et colonisations par e-sin auprès de Santé Publique France ainsi que la réalisation d'une déclaration des données épidémiologiques auprès du CNRMA ainsi que l'envoi de la souche pour antifongigramme en EUCAST et l'analyse des données de génome entier (cf Chapitre 4).
Le CNRMA participe à la surveillance européenne concernant les infections à *Candida auris* mis en place par l'ECDC, *Candida* auris survey collaborative group.
Une alerte européenne via l'eCDC a également été mise en place concernant les médiastinites à *Trichosporon* spp. en juin 2023.

Nous sommes co-responsables d'un réseau de surveillance européen de la résistance financé par le programme JPIAMR. (PI Paul Verweij TN, Co-PI: Ana Alastruey (ES), Lewis White (UK), Alexandre Alanio (FR)). L'objectif de ce réseau est de mettre en place en 2025 un protocole standardisé de surveillance épidémiologique de la résistance aux antifongiques focalisé sur *Aspergillus fumigatus* et *Candida* spp.. Une grande réunion sera mise ne place en 2024 impliquant les centres du réseau européen (4 centres Français inclus), les représentants des institutions impliqués dqns la lutte contre la résistance aux antifongiques (OMS, ECDC), des représentants des sociétés savantes internationales (ISHAM, ECMM) permettant d'aboutir à un consensus en termes de protocole épidémiologiques et de stratégie de travail pour le futur.

[6] J Mol Diagn, doi: 10.1016/j.jmoldx.2021.02.007

### 1.2.6 Activités d'expertises

Le CNRMA a reçu 704 échantillons en 2023 dont 12% n'étaient pas conformes soit en-dehors des missions (espèces fréquentes ne nécessitant pas un envoi n=28; mycoses superficielles n=32) soit acheminés par erreur sur le site de l'Institut Pasteur pour le laboratoire de Parasitologie-Mycologie de l'Hôpital Saint Louis (n=15) . Cette proportion plus importante de non-conformité par rapport aux années antérieures s'explique par le grand nombre de nouveaux centres correspondants qui n'étaient pas habitués aux conditions d'envoi des échantillons.

Conformément à notre revue de contrat 97% des résultats ont été rendus dans un délai de moins de 10 jours. En cas de sollicitation pour une urgence, les résultats sont fournis généralement en moins de 48h ouvrés par courriel et/ou appel téléphonique.

Des avis concernant la prise en charge diagnostique et thérapeutiques des infections fongiques sont réalisés par les Pr Fanny Lanternier et Olivier Lortholary en collaboration avec l'ensemble des cliniciens du service de maladies infectieuses et tropicales de l'hôpital Necker Enfants malades via une ligne téléphonique dédiée et l'adresse générique cnrma@pasteur.fr , en particulier le Dr Perrine Parize. Par ailleurs a été mise en place une RCP nationale par visioconférence avec des mycologues, infectiologues et pharmacologues ainsi que le support du secrétariat du service de maladies infectieuses et tropicales de l'Hôpital Necker Enfants Malades. Un compte rendu résumant les recommandations est envoyé par mail aux médecins ayant sollicités l'avis. Nous avons donné 320 avis entre mars 2022 et novembre 2023 pour 75 aspergilloses invasives, 44 mucormycoses, 44 candidémies ou candidoses invasives,17 cryptococcoses, 11 candidoses disséminées chroniques, 11 étiologie indéterminée – suspicion IFI, 9 scedosporioses, 7 fusarioses, 6 trichosporonoses, 8 histoplasmoses, 3 *Phaeoacremonium*, 2 *Exophiala*.

La totalité des échantillons reçus dans le cadre de la surveillance provenaient des hôpitaux français, de France métropolitaine (86.65%) et des DOM-COM (13.35%) avec des localisations diverses : sang (43.18%), poumon (19.17%), peau (9.66%), système nerveux central (4.12%), os/articulations (3.41%), sphère ORL (2,84%), œil (2.69%), urines (1,99%), entre autres.

Le bilan pour l'année 2023 est présenté dans le tableau 3.

***Tableau 3. Bilan des expertises pour l'année 2023***

| | Nombre de souches concernées | | | |
|---|---|---|---|---|
| | **TOTAL** | **levures** | **filamenteux** | **Classe 3** |
| Nombre d'avis donnés dans le cadre de la RCP nationale | 320 | | | |
| Nombre d'avis cliniques donnés en dehors de la RCP | >800 | | | |
| Nbre de fiches de déclarations monitorées | 4513** | - | - | - |
| Nbre de souches expertisées | 618/704* | 387 | 217 | 14 |
| Détermination profil MALDI-Tof | 387 | 387 | - | - |
| Détermination de la sensibilité aux antifongiques (EUCAST) | 575 | 387 | 188 | - |
| nb. souches/amplification PCR et Séquençage Sanger | 445 | 228 | 217 | 14 |
| Sérotypage *C. neoformans* complex par PCR | 57 | 57 | - | - |
| Génotypage par MLST | 14 | 14 | - | - |
| Génotypage par microsatellites | 22 | 22 | | - |
| Détection mutation liée à la résistance<br>- *FKS*<br>- *CYP51A/ERG11* | <br>11<br>69 | <br>11<br>49 | <br><br>20 | <br>-<br>- |
| Séquençage génome entier | 125 | 90 | 35 | - |
| Diagnostic moléculaire échantillons biologiques (envoi CNRMA=> SLS) | 10 | 1 | 2 | 7 |

**certaines souches ne sont pas expertisées car soit annulées soit aucune croissance et donc analyse complète impossible ** 3586 fiches concernent des cas de 2023 et 927 concernent des cas antérieurs déclarés de façon rétrospective dans le cadre des surveillances RESSIF et ODL. Ces déclarations concernent 721 épisodes de PCP (154 dans RESSIF ; 567 dans SINFONI)*

## Expertise 2023 sur les levures

En 2023, 339 isolats de levures ont été analysées au CNRMA-IFI. Ces isolats appartenaient à 40 espèces différentes. Les espèces principales (plus de 10 isolats reçus) étaient *Cryptococcus neoformans complex, Nakaseomyces glabratus, Candida parapsilosis, Candida tropicalis, Candida albicans, Trichosporon austroamericanum, Clavispora lusitaniae, Candida auris* et *Rhodotorula mucilaginosa* (Figure 3).

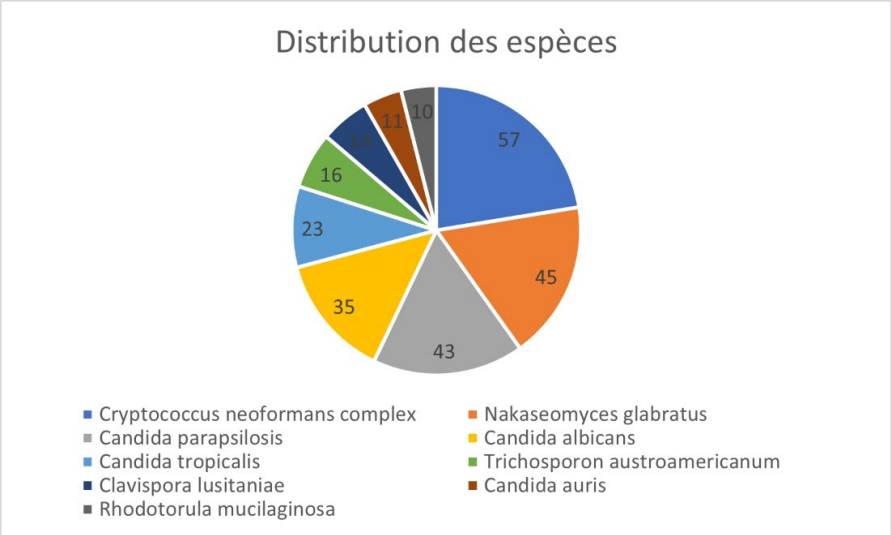



*Figure 3 : Répartition des espèces de levures reçues au CNRMA-IFI en 2023*

## Expertise 2023 sur les champignons filamenteux

En 2023, les champignons filamenteux reçus au CNRMA-IFI étaient isolés principalement des poumons (45%), de la peau (21%), du sang (7%), de la sphère ORL (7%), de l'œil (6%), mais aussi des os (3%), des articulations (3%), du cerveau (2%) et de l'appareil digestif (1%).

Nous avons caractérisé cette année 82 espèces de 37 genres différents appartenant aux 13 Ordres (Figure 4). Dans l'ordre des *Eurotiales* comme chaque année le genre *Aspergillus* était majoritaire suivi par les genres *Penicillium*, *Talaromyces* et *Rasamsonia.*

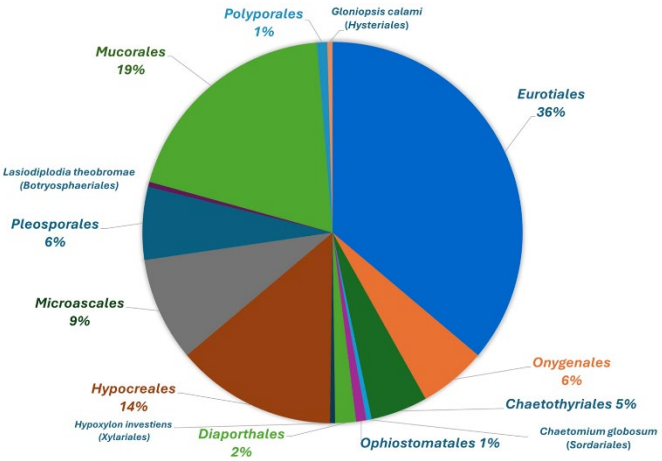



*Figure 4 : Répartition des genres identifiés selon l'Ordre correspondant en 2023*

La section *Fumigati* du genre *Aspergillus* (Figure 4) était la plus représentée avec plus de 58% et *A. fumigatus* comme espèce majoritaire. *Aspergillus flavus* était la seule espèce identifiée dans la section *Flavi* (14%). Les espèces d'*A. tubingensis* et *A. welwitschiae* dans la section *Nigri* ont représenté plus de 10% de l'ensemble des sections du genre (Figure 5).

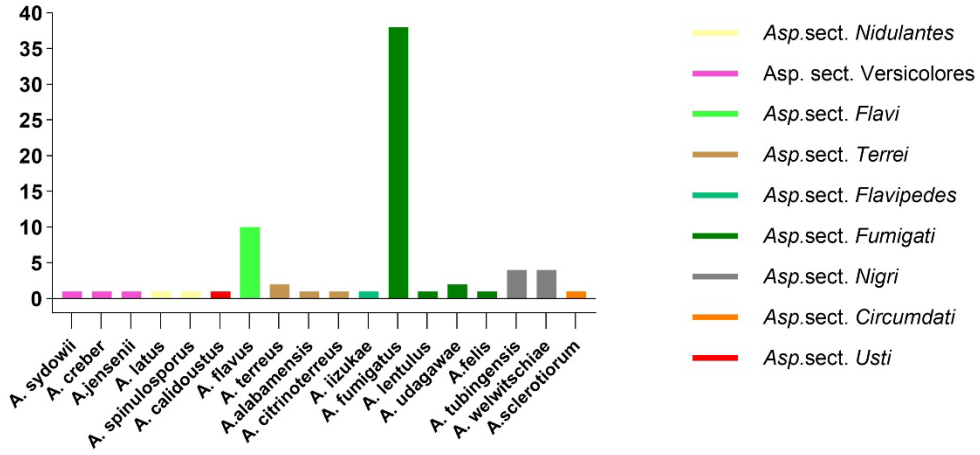



*Figure 5 Distribution des 76 souches d'Aspergillus par espèce et par section*

Plus de 30 espèces fongiques ont été responsables d'infections cutanées. Parmi ces espèces, *Mucor circinelloides* était l'espèce majorotaire responsable de 12% des atteintes cutanées, suivi des espèces du genre *Alternaria* (8%), *Fonsecaea* (8%), de *Neocosmospora solani* (6%) et *Phaeoacremonium spp*. (6%).
Les espèces de genres *Fusarium* et *Neocosmospora* ont compté pour presque la moitié des cas de fongémies à champignons filamenteux en 2023 suivi des espèces *d'Histoplasma capsulatum* (17%), *Exophiala* (12%) entre autres. Une prédominance d'espèces de *Fusarium* et *Neocosmospora* (53%) ont été responsable d'une quinzaine des atteintes oculaires. Plusieurs membres de l'ordre des *Mucorales* : *Rhizopus arrhizus*, *R. microsporus*, *Saksenaea* sp.ont été identifiés dans 65% des atteintes de la sphère ORL.

En 2023 nous avons réalisé la confirmation ou l'identification de 12 souches d'*Histoplasma* et de 2 souches de *Cladophialophora bantiana*. L'accès au laboratoire de confinement type 3 permet de manipuler ces champignons de classe 3.

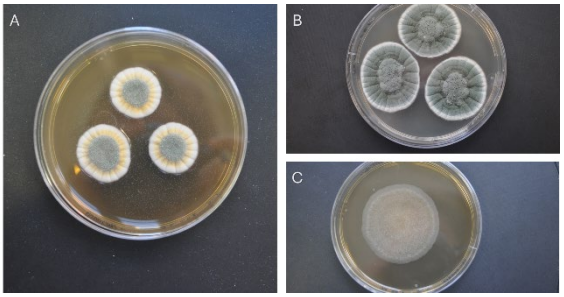



*Figure 6 :Aspects macroscopiques des colonies d'Aspergillus creber (A), de Penicillium glabrum (B) et Mucor racemosus (C)*

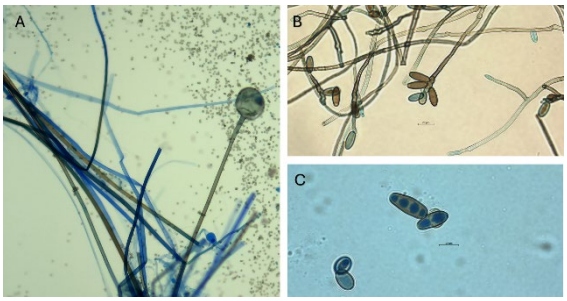



*Figure 7 : Appareil sporifère de Rhizopus arrhizus (A), conidies avec des distosepta de Curvularia spicifera (syn. Bipolaris spicifera) (B,C)*

### 1.2.7 Activités de séquençage

En 2023, le total des produits PCR envoyés est de 1563 pour 228 isolats de levures et 217 isolats de champignons filamenteux, le nombre d'isolat dont le génome entier a été séquencé est de 125.

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

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

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

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

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

| | |
|---|---|
| ☐ NON | **Si NON, est-ce prévu ? A quelle échéance ?** |
| ✖ OUI | Dans le cas de la surveillance et comme detaillé dans l'annexe 2, nous faisons du séquençage multi-locus pour l'ensemble des champignons filamenteux et des levures rares. De plus, dans le cas d'épidemies nous faisons selon le groupe fongique du séquençage multilocus et/ou génome complet. |

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

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

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

**En 2023, le séquençage génome entier de 62 souches a été réalisé dans des investigations de cas groupés pour des souches de *Candida auris*, *Trichosporon cf. inkin*, *Saprochaete clavata* et *Magnusiomyces capitatus*. De plus, le génotypage par microsatellites a été fait pour 22 souches de *C. parapsilosis* et par MLST pour 14 souches (11 N. *glabratus* et 3 C. *tropicalis*).**

**Séquençage utilisé à des fins de surveillance :**

| | Nbre d'espèces concernées | Nbre d'isolats |
|---|---|---|
| Séquençage Sanger pour identification | 40 levures, 82 champignons filamenteux | 445 |
| Séquençage NGS | 5 | 125 |
| Séquençage *FKS* | 3 | 11 |
| Séquençage *CYP51A/ERG11* | 2 | 69 |
| Génotypage microsatellites | 1 | 22 |
| Génotypage MLST | 2 | 14 |

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

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

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

Dans des bases de données publiques (European Nucleotide Archive (ENA) par exemple) avec ou sans métadata associées : Les données de séquençage génome entier (données brutes, fastq files) ainsi que les séquences issues du séquençage Sanger (fasta files) sont déposées dans les bases de données publiques, généralement NCBI, lorsque ces données sont utilisées pour des publications dans des journaux à comité de lecture. Les données de séquences correspondant aux séquences MLST sont déposées régulièrement dans les bases de données accessibles en ligne existantes (pour *C. tropicalis, C. glabrata, C. neoformans*).

### 1.2.8 Partage de séquences produites par les CNRMA-IFI

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

calmoduline, actine, beta-tubuline, EF1-alpha, RPB1, RPB2, CYP51A) pour 1273 souches de champignons filamenteux.

## 1.3 Activités de surveillance

Au cours de l'année 2023, 972 fiches de déclarations ont été remplies de façon rétrospective par les correspondants hospitaliers dans le cadre de la surveillance des infections fongiques invasives en France en 2022 qui était faite dans le cadre du précédent réseau de surveillance RESSIF (réseau RESSIF, n=888) ou dans le cadre de la surveillance des fongémies en Ile de France (ODL, n=32). Toutes les fiches de déclaration sont monitorées, principalement par Karine Boukris-Sitbon, sur le serveur Voozanoo. Les données de surveillance de 2012 à 2022 ont été complétées monitorées et sauvegardées. Elles pourront être importées dans Redcap afin de pouvoir poursuivre la surveillance de RESSIF vers SINFONI.
Au cours de l'année 2023, 3666 fiches de déclarations ont été faites de façon prospective sur le serveur RedCap dans le cadre du nouveau système de surveillance SINFONI. Actuellement 2575 déclarations dans le cadre de la surveillance SINFONI ont été monitorées, 60 déclarations en-dehors de la surveillance (centres collaborateurs mais infection hors périmètre de surveillance) et 191 déclarations correspondant à des demandes d'expertise (centres ne participant pas à la surveillance SINFONI).

La répartition des infections fongiques invasives selon le type d'agent pathogène est comparable en 2023 avec celle observée grâce à la surveillance RESSIF au cours de l'année 2022 (Figures 8-9). Cependant le nombre de déclarations et le nombre de centres déclarants ont considérablement augmenté rendant beaucoup plus représentatif de l'épidémiologie nationale le nouveau système SINFONI.

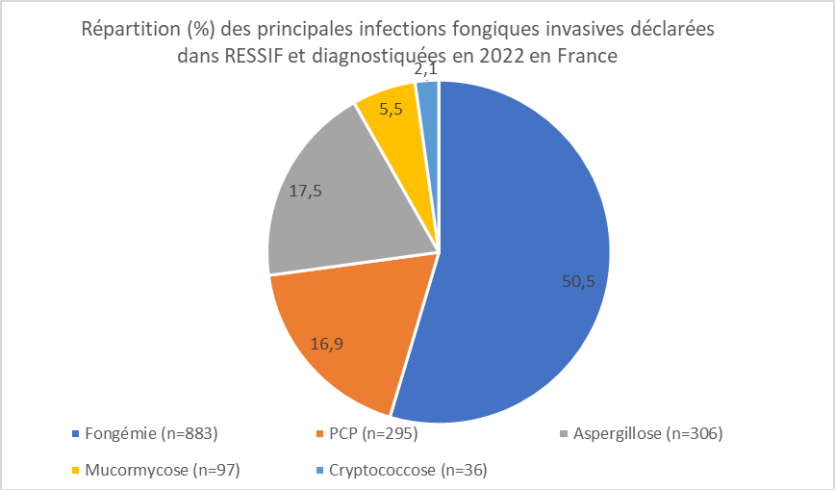



*Figure 8 : répartition des infections fongiques en France diagnostiqués en 2022*

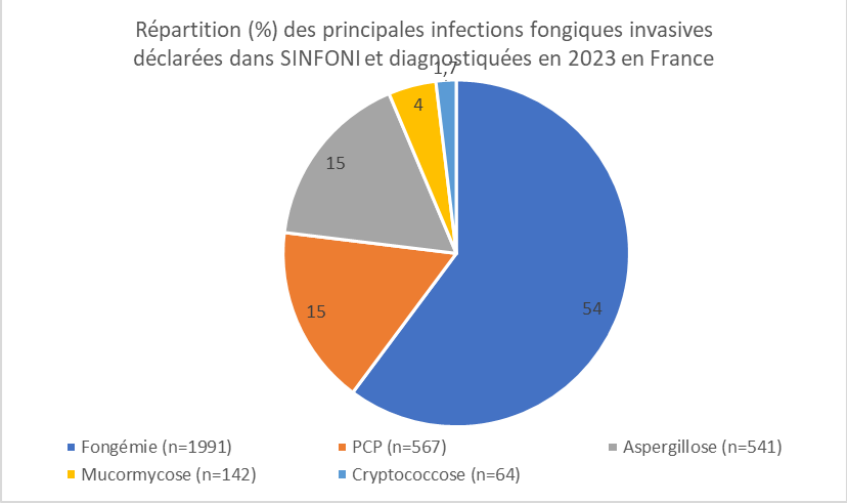



*Figure 9 : répartition des infections fongiques en France diagnostiqués en 2023*

Les principales données concernant l'épidémiologie des infections fongiques invasives issues de la surveillance SINFONI sont détaillées dans le chapitre 1.3.2

### 1.3.1 Description du réseau de partenaires

L'activité de surveillance mise en place par le CNRMA-IFI s'appuie sur l'interaction entre le réseau des correspondants hospitaliers, détaillé ensuite, ainsi que les laboratoires associés et les services hospitaliers du SMIT de l'hôpital Necker et du laboratoire de Parasitologie-Mycologie de l'hôpital Saint Louis, ayant une activité de support (Figure 1).

Nous avons également mis en place depuis janvier 2023 des comités et conseils organisationnels :

**(i) Un comité scientifique** qui a pour but notamment de valider les propositions d'études ponctuelles et qui permet d'avoir une vision transversale des problèmes liées aux champignons, par exemple en termes d'hygiène hospitalière, d'agronomie, de santé vétérinaire, de pharmacologie. En effet ce comité comprend les membres cadres du CNRMA-IFI, les collaborateurs hospitalo-universitaires, les responsables des laboratoires associés, la présidente de la Société Française de Mycologie Médicale, le directeur scientifique de l'Institut Pasteur, deux vétérinaires spécialisés dans les infections fongiques, un pharmacien hospitalier, un hygiéniste hospitalier, un chercheur agronome. Ce comité s'est réuni deux fois au cours de l'année 2023 (06/07/2023 et 27/11/2023)

**(ii) Un comité de coordination**, comprenant les membres cadre du CNRMA-IFI, les collaborateurs hospitalo-universitaires, un comité constitué de trois correspondants hospitaliers. Ce comité a pour but de valider les projets d'études rétrospcectives utilisant les données de surveillance du CNRMA-IFI, proposés par les correspondants du réseau et de veiller au respect des règles de publication et de diffusion des informations.

Le CNRMA-IFI a organisé une première Journée SINFONI le 20/12/2023, sur le campus de l'Institut Pasteur. Durant cette journée nous avons comptabilisé 58 participants en présentiel et 26 participants à distance correspondants à 59 centres collaboratifs du réseau de surveillance. Lors de cette journée 15 présentations ont été proposées, présentant des données de surveillance du CNRMA-IFI, des laboratoires associés, des retours d'expériences de collaborateurs concernant des problèmes de santé liées aux champignons.

Nous avons mis en place un nouveau réseau de surveillance des infections fongiques invasives (L'année 2023 a été marquée la construction d'un nouveau réseau de surveillance des infections fongiques invasives SINFONI (Surveillance des Infections Fongiques Invasives) comprenant 60 centres hospitalo-universitaires et hospitaliers répartis sur le territoires métropolitain et ultra marin (description Figures 10-12, et liste détaillée ci-après), la construction d'un nouveau questionnaire de recueil des données épidémiologiques simplifiées pour chaque infection fongique invasive dans l'outil Redcap.



*Figure 10 : Répartition des 35 centres hospitaliers de métropole participant à la surveillance SINFONI en 2023*

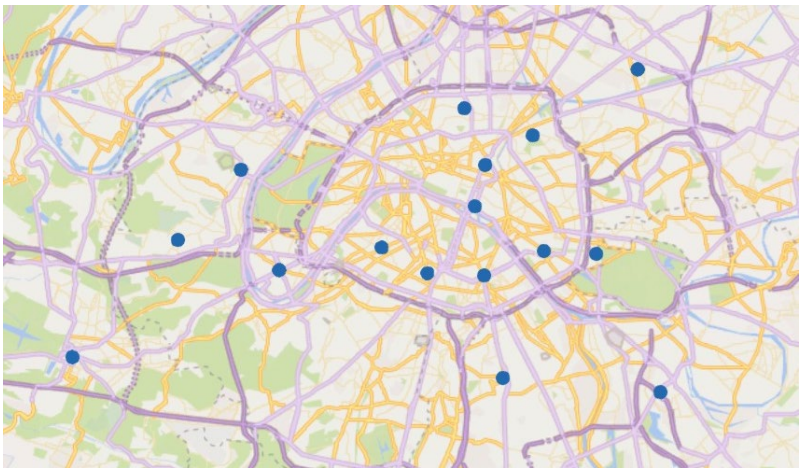


*Figure 11 : Répartition des 19 centres hospitaliers de la région Ile de France participant à la surveillance SINFONI en 2023*

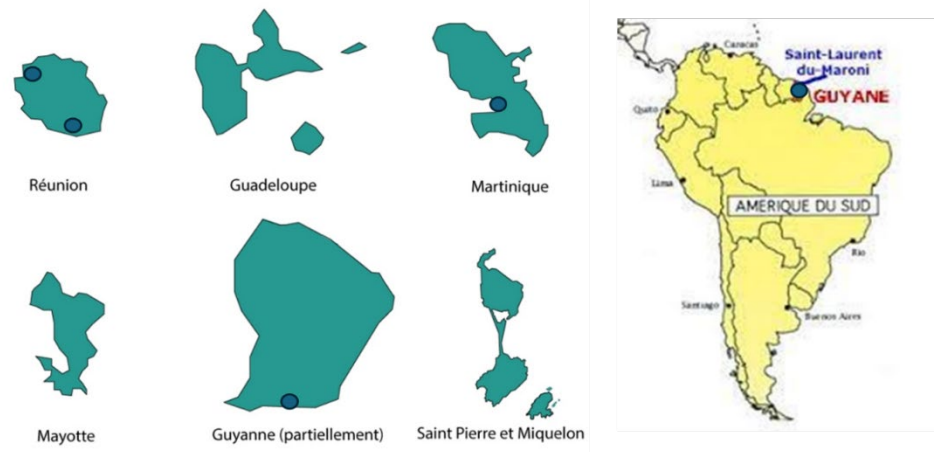



*Figure 12: Répartition des 5 centres hospitaliers des DOM-COM participant à la surveillance SINFONI en 2023*

Liste des centres participant à la surveillance SINFONI

| Outre mer | ile de France | |
|---|---|---|
| Guadeloupe | Paris Bichat | Ajaccio Corse |
| Guyane/St Laurent du Maroni | Paris Cochin | Amiens |
| La Reunion Nord / St Denis | Paris HEGP | Angers |
| La Reunion Sud/ St Pierre | Paris Lariboisière | Antibes |
| Martinique | Paris Marie Lannelongue-St Joseph | Besançon |
| | Paris Necker | Bordeaux |
| | Paris Pitié-Salpetrière | Brest |
| | Paris Robert Debré | Caen |
| | Paris St Antoine | Chalon sur Saone |
| | Paris St Louis | Clermont |
| | Bobigny Avicenne | Dijon |
| | Boulogne Ambroise Paré | Grenoble |
| | Créteil Henri Mondor | Lille |
| | Garches (RPC) | Limoges |
| | St Denis | Marseille ( IPC ) |
| | St Mandé Begin | Montpellier |
| | Suresnes (Foch) | Nancy |
| | Versailles | Nantes |
| | Villejuif IGR | Nevers |
| | | Nice |
| | | Nimes |
| | | Orleans |
| | | Perigueux |
| | | Poitiers |
| | | Reims |
| | | Rennes |
| | | Rouen |
| | | St Etienne |
| | | Strasbourg |
| | | Toulon |
| | | Toulouse |
| | | Tourcoing |
| | | Tours |
| | | Valence |
| | | Valencienne |
| | | Vannes |

### 1.3.2 Surveillance de l'évolution et des caractéristiques des infections

**Données épidémiologiques année 2023 SINFONI**

Les données de surveillance des infections fongiques invasives de l'année 2023 ont été générées par le réseau SINFONI. L'analyse des données ayant été faite en mars 2024, un nombre important de dossiers (n=1091) n'ont pas pu être monitorés et des données de mortalité sont manquantes pour 651 patients. L'analyse a été effectuée sur l'ensemble de la base de données. Ces données seront donc à consolider.

Des infections fongiques invasives ont été déclarées chez 3666 patients par les 60 centres participant à la surveillance. L'âge médian des patients au diagnostic était de 63 ans. 187 cas (5.3%) ont été rapportés chez des enfants de moins de 15 ans et 1551 (44%) chez des patients de 65 ans et plus. Une majorité de patients (62.1%) étaient des hommes.

**Répartition des infections**

La répartition des infections fongiques invasives principales dans SINFONI en 2023 est la suivante : 1991 fongémies (54%) ; 567 pneumocystoses (15%) ; 541 aspergilloses (15%) ; 152 mucormycoses (4%) et 64 cryptococcoses (1.7%).

Les caractéristiques démographiques des patients pour les principales infections fongiques et leur survie à 3 mois sont représentées dans le tableau 4.

***Tableau 4** : Caractéristiques des patients avec les principales infections fongiques invasives dans SINFONI en 2023*

| | Fongémie à levure | Pneumocystose | Aspergillose invasive | Mucormycose | Cryptococcose | Fusariose |
|---|---|---|---|---|---|---|
| **Masculin** | 1,234.0 (61.7%) | 331.0 (58.4%) | 344.0 (63.6%) | 105.0 (69.1%) | 44.0 (68.8%) | 19.0 (54.3%) |
| **Age** | 64.0 (50.0, 73.0) | 64.0 (52.0, 73.0) | 62.0 (51.0, 71.0) | 61.0 (44.5, 69.0) | 55.0 (37.8, 67.5) | 57.5 (39.5, 65.0) |
| **Enfants** | 119.0 (6.0%) | 18.0 (3.2%) | 22.0 (4.5%) | 9.0 (7.6%) | 1.0 (1.6%) | 1.0 (3.3%) |
| **Plus de 65 ans** | 921.0 (46.6%) | 251.0 (45.3%) | 189.0 (39.0%) | 45.0 (37.8%) | 17.0 (27.4%) | 7.0 (23.3%) |
| **Décédé à 3 mois** | 740.0 (44.9%) | 115.0 (25.2%) | 217.0 (46.6%) | 64.0 (50.4%) | 8.0 (16.7%) | 10.0 (38.5%) |
| **COVID récent** | 78.0 (3.9%) | 16.0 (2.8%) | 43.0 (7.9%) | 7.0 (4.6%) | 1.0 (1.6%) | 1.0 (2.9%) |
| **Grippe récente** | 14.0 (0.7%) | 1.0 (0.2%) | 20.0 (3.7%) | 1.0 (0.7%) | 0.0 (0.0%) | 0.0 (0.0%) |
| **CAR Tcells** | 15.0 (0.8%) | 8.0 (1.4%) | 18.0 (3.3%) | 4.0 (2.6%) | 0.0 (0.0%) | 0.0 (0.0%) |
| **Ibrutinib** | 3.0 (0.2%) | 2.0 (0.4%) | 7.0 (1.3%) | 1.0 (0.7%) | 0.0 (0.0%) | 0.0 (0.0%) |

### Répartition des infections par centre et sur le territoire

Le nombre d'infections fongiques invasive par région et la répartition des infections par région est représenté sur la Figure 13

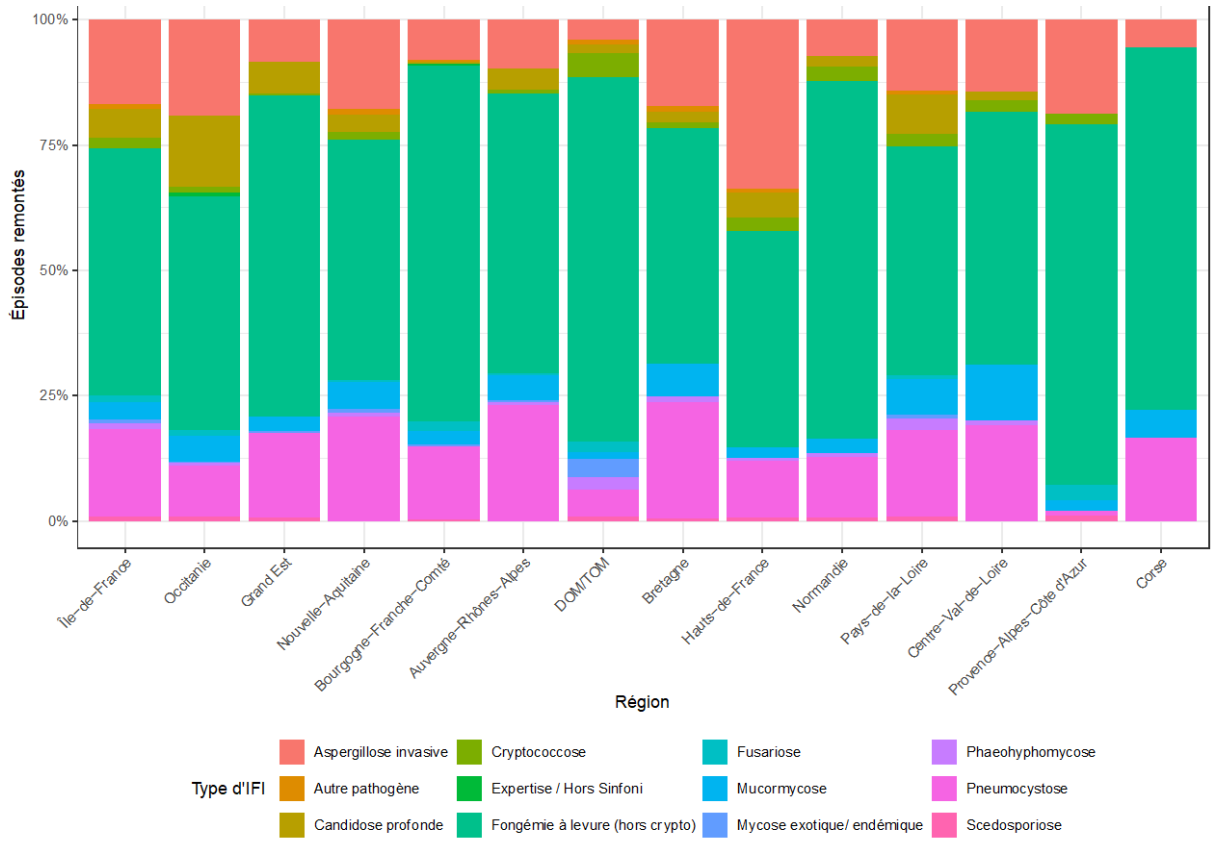



*Figure 13 : Répartition des infections fongiques selon les régions*

### Terrains spécifiques

Les terrains de l'ensemble des infections fongiques invasives étaient les suivants: hémopathie maligne (20%) ; tumeur solide (18.5%) ; transplantation d'organe (10%) ; maladie de système (6%) ; infection par le VIH (5%) et cirrhose (4%).

Nous avons mis en place la surveillance de certains facteurs de risque. Concernant les infections fongiques invasives survenant après une infection virale respiratoire. 151 IFI sont survenues après une infection par le SARS CoV2 et 38 après une infection par la grippe. En particulier, parmi les aspergilloses ; 7.9% sont survenues après une infection par le SARS-CoV2 et 3.7% après la grippe.

Dans l'année, 50 patients ont développé une infection fongique invasive après des CAR T cell.

On a également recensé 14 patients ayant développé une IFI alors qu'ils étaient sous ibrutinib et 5 sous acalabrutinib. 87 patients ont développé une IFI alors qu'ils étaient traités par fingolimod.

### Devenir

La mortalité des patients à 3 mois était de 39.8% Ces données sont à moduler avec les données manquantes pour 651 patients et 275 perdus de vus. Les mucormycoses restent associées à la mortalité la plus élevée à 3 mois de 50% et les cryptococcoses à la mortalité la plus faible à 16%. Ces données seront à réajuster avec la récupération des données manquantes.

### Fongémies à levure

1991 patients ont été rapportés avec une fongémie à levure dont 62% d'hommes, 6% étaient des enfants et 47% avaient plus de 65 ans

La mortalité à 3 mois était de 45%, sous réserve des données manquantes de 351 patients. 40% des patients

étaient hospitalisés en réanimation, 45% en secteur de médecine et 15% en chirurgie.
25% avaient une tumeur solide en cours de traitement et 11% une hémopathie maligne, 6% étaient transplantés d'organe solides, 16.7% étaient diabétiques
30% avaient eu une chirurgie dans le mois précédent l'infection, 9.2% avaient eu une corticothérapie.
La répartition des espèces était la suivante (Figure 14) :*Candida albicans* (45%), *Nakaseomyces glabratus* (syn. *Candida glabrata*) (19%), *C. parapsilosis* (17%), C. tropicalis (8.6%), *Pichia kudriavzevii* (syn. *Candida krusei)* (3%), *Clavispora lusitaniae* (*Candida lusitaniae*)(2.6%)

120 patients étaient pré exposés aux azolés et 84 aux échinocandines. La répartition des espèces était variable en fonction de la pré- exposition aux antifongiques avec une moins grande part de *Candida albicans*, et une plus grande part de *C. parapsilosis* chez les patients pré-exposés.
Les patients pré- exposés aux antifongiques étaient plus jeunes mais la mortalité était plus importante chez les patients pré-exposés aux echinocandines
Le traitement de première ligne après identification de l'espèce était la échinocandines chez 72% (caspofungine chez 68% et micafungine chez 4%) et fluconazole chez 26%, et voriconazole chez 2%.

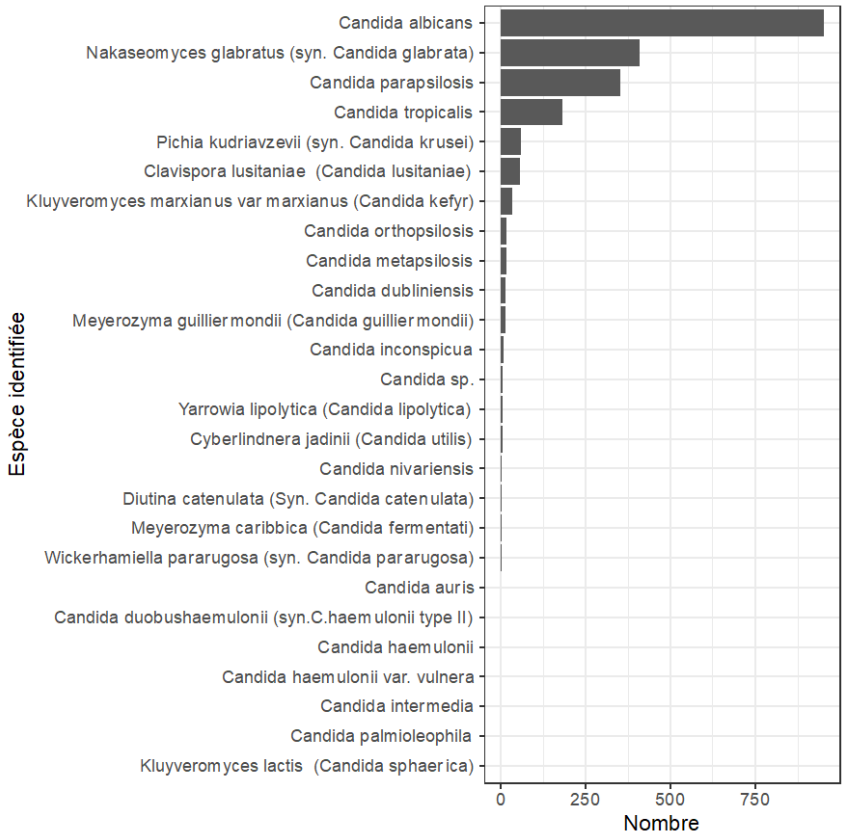



*Figure 14. Répartition des espèces responsables de fongémies à levure sur l'année 2023 dans le cadre de la surveillance SINFONI*

**Pneumocystose**
566 cas de pneumocystose ont été déclarés, 58% chez des hommes, 19 cas pédiatriques, 45% chez des patients de plus de 65 ans. 23% des patients étaient hospitalisés en réanimation au diagnostic.
23% des patients avaient une hémopathie maligne, 19% une tumeur solide en cours de traitement, 17% une transplantation d'organe et 14% une maladie de système. Seulement 109 patients (19%) des patients étaient infectés par le VIH. 25% de patients sont décédés à 3 mois.

**Aspergilloses invasives**

540 cas d'aspergilloses invasives ont été déclarés en 2023, 64% chez des hommes, d'une médiane d'âge de 64 ans, 25 chez des enfants. Une culture positive était retrouvée chez 394 patients. La répartition des espèces est représentée dans la Figure 5. Soixante-treize (73%) pourcent des infections étaient dues à *Aspergillus fumigatus* et 27% à d'autres espèces d'*Aspergillus* non *fumigatus*. 72 patients ont développé une aspergillose invasive en cours de traitement par posaconazole, isavuconazole, itraconazole ou voriconazole.

47% des patients étaient décédés à 3 mois (sous réserve de 74 inconnus, 25 perdus de vue). La mortalité des patients avec une aspergillose à *A. fumigatus* était plus importante que celle des patients infectés avec une infection à *A. non fumigatus*.

42% étaient diagnostiqués en réanimation, 46% étaient diagnostiqués chez des patients avec hémopathie maligne et 8% avec une tumeur solide en cours de traitement. 18% étaient transplantés d'organe.

8% avaient une infection SARS-CoV2 récente et 4% une infection grippale.

Sur le plan thérapeutique : 44% des patients ont reçus du voriconazole, 29% de l'isavuconazole, 4.9% du posaconazole, 23% de l'amphotéricine B liposomale.

**Mucormycoses**

En 2023, 150 cas de mucormycoses ont été déclarés, dont 70% chez des hommes avec un âge médian de 61 ans, et 6% chez des enfants. Le taux de mortalité à 3 mois est de 50%

Parmi ces patients 31% étaient hospitalisés en réanimation au moment du diagnostic, 60% des patients avaient une hémopathie maligne et 6% une tumeur solide en cours de traitement, 13% une transplantation d'organe, 15% un diabète. La majorité des patients étaient diagnostiqués par PCR seule (Figure 15).

A noter que 32 patients ont développé une mucormyose sous traitement par posaconazole ou isavuconazole.

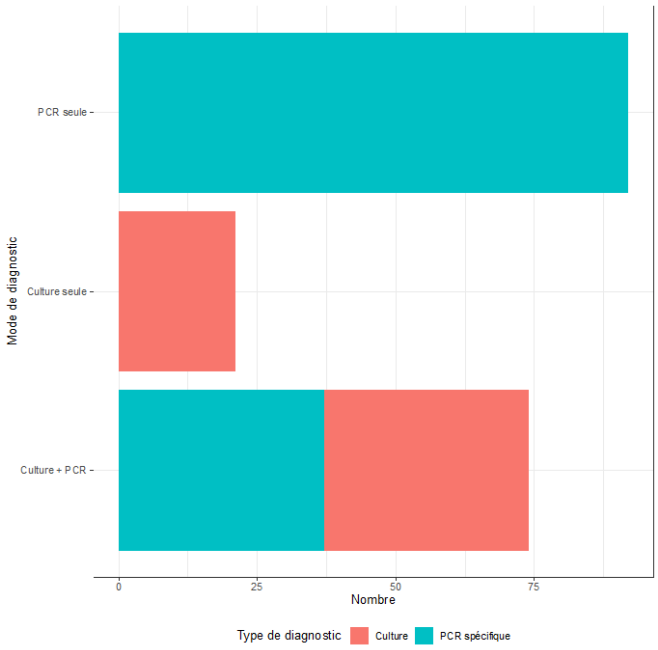



*Figure 15 : Moyens diagnostics des patients diagnostiques pour une mucormycose en 2023*

**Cryptococcose**

Concernant la cryptococcose la mortalité à 3 mois était de 20%, 45 % des patients étaient positifs pour le VIH.

### 1.3.3 Surveillance de la résistance des agents pathogènes aux anti-infectieux

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

**Définitions utilisées pour exprimer la résistance**

Nous retranscrivons ici les seuils établis par le comité EUCAST pour *Candida* et *Cryptococcus* spp. (Tableau 5) et *Aspergillus* spp. (Tableau 6).

***Tableau 5: valeurs des seuils (breakpoints) établis par l'EUCAST pour les levures des espèces fréquentes (d'après le document EUCAST v10.0)***

| Antifungal agent | MIC breakpoint (mg/L) | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | *Candida albicans* | | | *Candida dubliniensis* | | *Candida glabrata* | | *Candida krusei* | | *Candida parapsilosis* | | *Candida tropicalis* | | *Candida guilliermondii* | | *Cryptococcus neoformans* | | Non-species related breakpoints for *Candida*[1] | |
| | S ≤ | R > | ATU | S ≤ | R > | S ≤ | R > | S ≤ | R > | S ≤ | R > | S ≤ | R > | S ≤ | R > | S ≤ | R > | S ≤ | R > |
| Amphotericin B | 1 | 1 | | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | IE | IE | 1 | 1 | IE | IE |
| Anidulafungin | 0.03 | 0.03 | | | | 0.06 | 0.06 | 0.06 | 0.06 | 4 | 4 | 0.06 | 0.06 | IE[2] | IE[2] | - | - | IE | IE |
| Caspofungin | Note[3] | Note[3] | | | | Note[3] | Note[3] | Note[3] | Note[3] | Note[3] | Note[3] | Note[3] | Note[3] | IE[2] | IE[2] | - | - | IE | IE |
| Fluconazole | 2 | 4 | | 2 | 4 | 0.001[4] | 16 | - | - | 2 | 4 | 2 | 4 | IE[2] | IE[2] | IE | IE | 2 | 4 |
| Isavuconazole | IE | IE | | IE | IE | IE | IE | IE | IE | IE | IE | IE | IE | IE | IE | IE | IE | IE | IE |
| Itraconazole | 0.06 | 0.06 | | 0.06 | 0.06 | IE[2] | IE[2] | IE[2] | IE[2] | 0.125 | 0.125 | 0.125 | 0.125 | IE[2] | IE[2] | IE | IE | IE | IE |
| Micafungin | 0.016 | 0.016 | 0.03 | | | 0.03 | 0.03 | IE[5] | IE[5] | 2 | 2 | IE[5] | IE[5] | IE[5] | IE[5] | - | - | IE | IE |
| Posaconazole | 0.06 | 0.06 | | 0.06 | 0.06 | IE[2] | IE[2] | IE[2] | IE[2] | 0.06 | 0.06 | 0.06 | 0.06 | IE[2] | IE[2] | IE | IE | IE | IE |
| Voriconazole[6] | 0.06[7] | 0.25[7] | | 0.06[7] | 0.25[7] | IE | IE | IE | IE | 0.125[7] | 0.25[7] | 0.125[7] | 0.25[7] | IE[2] | IE[2] | IE | IE | IE | IE |

***Tableau 6: Valeurs des seuils (breakpoints) établis par l'EUCAST pour les souches de certaines espèces d'Aspergillus (d'après le document EUCAST v10.0)***

| Antifungal agent | MIC breakpoint (mg/L) | | | | | | | | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | *A. flavus* | | | *A. fumigatus* | | | *A. nidulans* | | | *A. niger* | | *A. terreus* | | | Non-species related breakpoints[1] | |
| | S ≤ | R > | ATU | S ≤ | R > | ATU | S ≤ | R > | ATU | S ≤ | R > | S ≤ | R > | ATU | S ≤ | R > |
| Amphotericin B | - | - | | 1 | 1 | | - | - | | 1 | 1 | - | - | | IE | IE |
| Anidulafungin | IE | IE | | IE | IE | | IE | IE | | IE | IE | IE | IE | | IE | IE |
| Caspofungin | IE | IE | | IE | IE | | IE | IE | | IE | IE | IE | IE | | IE | IE |
| Fluconazole | - | - | | - | - | | - | - | | - | - | - | - | | - | - |
| Isavuconazole | 1 | 2 | 2 | 1 | 2 | 2 | 0.25 | 0.25 | | IE[2] | IE[2] | 1 | 1 | | IE | IE |
| Itraconazole[4] | 1 | 1 | 2 | 1 | 1 | 2 | 1 | 1 | 2 | IE[2,5] | IE[2,5] | 1 | 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 | 0.25 | 0.25 | IE[2] | IE[2] | | IE[2] | IE[2] | 0.125 | 0.25 | 0.25 | IE | IE |
| Voriconazole[4] | IE[2] | IE[2] | | 1 | 1 | 2 | 1 | 1 | 2 | IE[2] | IE[2] | IE[2] | IE[2] | | IE | IE |

*Tableau 7 : Valeurs seuils de CMI (mg/L) au-dessus desquelles les correspondants sont invités à envoyer la souche au CNRMA-IFI pour confirmation par technique EUCAST. Ces valeurs ont été déterminées à partir des données des fournisseurs et de la littérature (Breakpoint, ECOFF)*

| Espèce concernée | *A. fumigatus* | *C. albicans* | *Nakaseomyces glabratus (C. glabrata)* | *C. parapsilosis* | *C.tropicalis* | *Pichia kudriavzevii (C. krusei)* | *Kluyveromyces marxianus (C. kefyr)* |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| **Technique Etest** | **Valeurs seuil de CMI (mg/L) au-dessus desquelles les isolats peuvent être envoyés pour confirmation de résistance par technique EUCAST** | | | | | | |
| **AmphotericineB** | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| **5 flucytosine** | | 16 | 0,25 | 1 | 1 | 256 | 1 |
| **Fluconazole** | - | 1 | 32 | 2 | 2 | | 1 |
| **Itraconazole** | 1 | | | | | | |
| **Voriconazole** | 0,5 | 0,125 | 1 | 0,125 | 0,125 | 0,5 | 0,03 |
| **Posaconazole** | 0,25 | 0,06 | 8 | 0,06 | 0,06 | 0,5 | 0.06 |
| **Caspofungine** | 0,125 | 0,25 | 0,125 | 2 | 0,25 | 0,25 | 0.016 |
| **Micafungine** | 0,016 | 0,25 | 0,06 | 2 | 0,25 | 0,25 | 0,03 |
| **Anidulafungine** | 0.016 | 0,25 | 0,125 | | 0,25 | 0,25 | 0,01 |
| **Technique Sensititre** | **Valeurs seuil de CMI (mg/L) au-dessus desquelles les isolats peuvent être envoyés pour confirmation de résistance par technique EUCAST** | | | | | | |
| **AmphotericineB** | 1 | 2 | 2 | 1 | 2 | 4 | 1 |
| **5 flucytosine** | | 1 | 0,25 | 0,5 | 0,5 | 256 | 1 |
| **Fluconazole** | | 1 | 32 | 2 | 2 | | 1 |
| **Itraconazole** | 1 | | | | | | |
| **Voriconazole** | 0.5 | 0,016 | 2 | 0,03 | 0,5 | 1 | 0.03 |
| **Posaconazole** | 0,06 | 0,06 | 4 | 0,25 | 1 | 1 | 0.06 |
| **Caspofungine** | 0,125 | 0,25 | 0,25 | 2 | 0,25 | 1 | 0.06 |
| **Micafungine** | 0,016 | 0,06 | 0,03 | 4 | 0,06 | 0,25 | 0.03 |
| **Anidulafungine** | 0.016 | 0,125 | 0,125 | | 0,5 | 0,25 | 0.016 |

En rouge valeur maximale car les espèces sont naturellement résistantes

## LEVURES

Pour les levures, depuis 2003 nous utilisons la technique standardisée définie par l'EUCAST pour déterminer la sensibilité aux azolés et à la 5-fluorocytosine. Depuis 2015 nous testons également l'isavuconazole.

Nous avons modifié la technique en utilisant le milieu AM3 au lieu du milieu RPMI pour la caspofungine, et établi qu'une CMI de la caspofungine au-dessus de 0,25 mg/L pour une espèce de *Candida* autre que celles du complexe *C. parapsilosis/ orthopsilosis/metapsilosis,* était habituellement associée à une mutation dans le hot spot d'un ou plusieurs gènes *Fks.*

Les années précédentes nous utilisions également une version modifiée de la technique pour la micafungine et l'amphotéricine B. Nous avons décidé de suivre la technique standardisée pour la micafungine et l'amphotéricine B afin de pouvoir utiliser les valeur seuils établies pour définir la résistance des espèces fréquentes et pouvoir plus facilement comparer les données générées au CNRMA avec les données généralement décrites dans la littérature. Nous présenterons donc ici les données de sensibilité aux azolés, à la 5-fluorocytosine et à la caspofungine pour les isolats testés entre 2003 et 2024 (Tableau 8) et uniquement depuis le 1er mars 2023 pour la micafungine et l'amphotéricine B (Tableaux 9 et 10).

***Tableau 8*** *: Profil de sensibilité des levures aux antifongiques testés entre 01/01/2003 et 22/02/2024*

| Espèces étudiées | Valeurs des CMI50 / CMI90 mg/L pour les antifongiques* | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| **Espèce (nbre d'isolats testés)** | **5-FC** | **Fluco** | **Vori** | **Posa** | **Isavu** | **Caspo**** |
| *C. albicans* (n=3760) | ≤0.12/0.5 | 0.25/0.5 | ≤0.01/≤0.01 | ≤0.01/0.06 | ≤0.007/≤0.007 | 0.03/0.06 |
| *C. dubliniensis* (n=176) | ≤0.12/≤0.12 | ≤0.12/0.25 | ≤0.01/≤0.01 | 0.03/0.06 | ≤0.007/≤0.007 | 0.015/0.03 |
| *Nakaseomyces glabratus (syn. C. glabrata* ) (n=1525) | ≤0.12/≤0.12 | 16/64 | 0.25/1 | 0.5/2 | 0.12/0.5 | 0.06/0.12 |
| *C. nivariensis* (n=19) | 0.5/1 | 2/4 | 0.06/0.12 | 0.12/0.25 | 0.03/0.06 | 0.03/0.12 |
| *C. parapsilosis* (n=1041) | ≤0.12/0.25 | 0.5/4 | ≤0.01/0.06 | 0.06/0.12 | 0.015/0.06 | 0.25/1 |
| *C. orthopsilosis* (n=79) | ≤0.12/≤0.12 | 0.5/8 | 0.03/1 | 0.06/0.12 | 0.015/0.25 | 0.06/0.25 |
| *C. metapsilosis* (n=65) | ≤0.12/0.12 | 1/2 | 0.03/0.06 | 0.03/0.06 | 0.015/0.015 | 0.06/0.12 |
| *C. tropicalis* (n=752) | ≤0.12/32 | 0.5/4 | 0.03/0.12 | 0.03/0.12 | ≤0.007/0.03 | 0.03/0.06 |
| *Pichia kudriavzevii (syn. C. krusei)* (n=394) | 2/4 | 32/64 | 0.25/0.5 | 0.12/0.25 | 0.12/0.25 | 0.12/0.25 |
| *Pichia cactophila (syn. C. Inconspicua*) (n=57) | 2/4 | 16/32 | 0.12/0.25 | 0.12/0.12 | 0.12/0.25 | 0.03/0.06 |
| *Kluyveromyces marxianus (syn. C. kefyr)* (n=196) | 0.5/8 | 0.25/0.5 | ≤0.01/≤0.01 | 0.06/0.12 | ≤0.007/≤0.007 | 0.015/0.03 |
| *Meyerozyma guilliermondii (syn. C. guilliermondii)* (n=141) | ≤0.12/0.25 | 8/64 | 0.12/0.5 | 0.25/0.5 | 0.25/4 | 0.06/0.12 |
| *Meyerozyma caribbica (syn. C. fermentati)* (n=39) | ≤0.12/≤0.12 | 4/64 | 0.12/0.5 | 0.25/0.5 | 0.12/0.5 | 0.12/0.5 |
| *Clavispora lusitaniae (syn. C. lusitaniae)* (n=313) | ≤0.12/0.5 | 0.25/0.5 | ≤0.01/≤0.01 | ≤0.01/0.06 | ≤0.007/0.015 | 0.03/0.06 |
| *C. haemulonii* (n=51) | ≤0.12/0.5 | 32/>64 | >8/>8 | 2/>8 | >4/>4 | 0.03/0.06 |
| *Candida duobushaemulonii* (n=49) | ≤0.12/>64 | 32/>64 | >8/>8 | 2/>8 | 0.12/>4 | 0.015/0.03 |
| *C. auris* (n=39) | ≤0.12/>64 | 64/>64 | 0.25/2 | ≤0.01/0.12 | 0.03/0.25 | 0.03/0.03 |
| *C. palmioleophila* (n=22) | ≤0.12/0.5 | 8/32 | 0.12/0.25 | 0.12/0.25 | -/- | 0.06/0.25 |
| *Cyberlindnera jadinii* (n=27) | ≤0.12/1 | 1/4 | 0.06/0.12 | 0.12/0.25 | 0.03/- | 0.015/0.12 |
| *Cyberlindnera fabianii (syn. Pichia fabianii)* (n=15) | ≤0.12/≤0.12 | 0.5/1 | 0.03/0.03 | 0.12/0.25 | ≤0.007/0.03 | 0.03/0.06 |
| *Wickerhamomyces anomalus (syn. C. pelliculosa)* (n=42) | ≤0.12/16 | 2/4 | 0.12/0.25 | 0.25/0.5 | 0.06/0.12 | 0.03/0.06 |
| *Kodamaea ohmeri (syn. Pichia ohmeri)* (n=41) | ≤0.12/1 | 4/16 | 0.03/0.12 | 0.03/0.12 | 0.015/0.03 | 0.06/>4 |
| *Pichia norvegensis* (n=23) | 4/8 | 16/64 | 0.25/0.5 | 0.12/0.12 | 0.12/0.5 | 0.03/0.06 |
| *S. cerevisiae* (n=82) | ≤0.12/≤0.12 | 8/16 | 0.12/0.25 | 0.5/1 | 0.06/0.25 | 0.12/0.25 |
| *Wickerhamiella pararugosa (syn. C. pararugosa)* (n=12) | 0.25/16 | 8/16 | 0.06/0.25 | 0.06/0.12 | 0.12/- | 0.06/0.12 |
| *Yarrowia lipolytica (syn. C. lipolytica)* (n=37) | 32/>64 | 4/16 | 0.06/0.25 | 0.25/1 | 0.12/2 | 0.12/0.5 |
| *Galactomyces candidus (syn. Geotrichum candidum)* (n=41) | 0.25/1 | 16/64 | 0.25/1 | 0.25/1 | 0.25/2 | 1/>4 |
| *Magnusiomyces capitatus (syn. G. capitatum)* (n=66) | ≤0.12/0.25 | 8/16 | 0.06/0.5 | 0.12/0.5 | 2/>4 | >4/>4 |
| *Magnusiomyces clavatus (syn. G. clavatum)* (n=222) | 0.5/1 | 16/64 | 0.25/1 | 0.5/1 | 2/>4 | >4/>4 |
| *Cryptococcus neoformans (Cr. neoformans* var. *grubii)* (n=1119) | 4/16 | 4/8 | 0.06/0.12 | 0.06/0.25 | 0.12/0.25 | >4/>4 |
| *Cr. deneoformans (syn. Cr. neoformans* var. *neoformans)* (n=249) | 4/16 | 1/4 | 0.03/0.06 | 0.03/0.12 | 0.06/0.25 | >4/>4 |
| *Cr. neoformans* hybrides AD (n=202) | 4/16 | 4/8 | 0.03/0.12 | 0.06/0.12 | 0.06/0.25 | >4/>4 |
| *Cr. gattii* complex (n = 35) | 2/8 | 8/16 | 0.12/0.25 | 0.25/0.25 | 0.25/0.25 | >4/>4 |
| *Rhodotorula mucilaginosa* (n=79) | 0.25/1 | >64/>64 | 2/4 | 0.5/2 | 1/2 | >4/>4 |
| *Trichosporon asahii* (n=83) | 64/>64 | 4/8 | 0.06/0.25 | 0.25/0.5 | 0.5/1 | >4/>4 |

***Tableau 9: Profil de sensibilité des levures aux antifongiques pour les isolats des espèces fréquentes reçus pour confirmation de résistance, testés au CNRMA, entre le 30/03/2023 et 19/02/2024.***

***N.B.** : Les isolats des espèces fréquentes étaient envoyés au CNRMA pour confirmation de la sensibilité aux antifongiques uniquement si une ou plusieurs valeurs de CMI déterminée par technique bandelette (Etest ou Sensititre) est au-dessus des valeurs sélectionnées (cf tableau des seuils xxx). **Les valeurs de CMI50 et CMI90 présentées dans le tableau ne reflètent donc pas le profil classique de sensibilité pour ces espèces mais uniquement le profil des souches reçues au CNRMA au cours de la dernière année***

| **Espèces étudiées** | | **Valeurs des CMI50 / CMI90 mg/L pour les antifongiques*** | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| **Nom d'usage en clinique (nbre d'isolats testés)** | **Nom actuel** | **AMB** | **5-FC** | **Fluco** | **Vori** | **Posa** | **Isavu** | **Caspo**** | **Mica** |
| ***C. albicans* (n=26)** | | 0.5/0.5 | ≤0.12/>64 | 0.25/8 | ≤0.010.12 | ≤0.01/0.12 | ≤0.007/0.12 | 0.015/0.03 | 0.015/0.03 |
| ***C. glabrata* (n=45)** | ***Nakaseomyces glabratus*** | 0.5/1 | ≤0.12/≤0.12 | 64/>64 | 0.25/0.5 | 0.5/1 | 0.25/0.5 | 0.03/0.06 | 0.015/0.06 |
| ***C. parapsilosis* (n=55)** | | 0.5/1 | ≤0.12/1 | 1/16 | ≤0.01/0.25 | 0.03/0.06 | 0.015/0.06 | 0.25/0.5 | ½ |
| ***C. tropicalis* (n=23)** | | 0.5/0.5 | 32/64 | 0.5/1 | 0.03/0.06 | ≤0.01/0.03 | ≤0.007/0.03 | 0.015/0.03 | 0.03/0.06 |
| ***C. krusei* (n=8)** | ***Pichia kudriavzevii*** | 1/- | 4/- | 32/- | 0.25/- | 0.12/- | 0.12/- | 0.06/- | 0.12/- |
| ***C. kefyr* (n=6)** | ***Kluyveromyces marxianus*** | 0.5/- | 0.5/- | 0.25/- | ≤0.01/- | 0.06/- | ≤0.007/- | ≤0.007/- | 0.06/- |

* AMB (amphotéricine B), 5-FC (5-fluorocytosine), Fluco (fluconazole), Vori (voriconazole), Posa (posaconazole), Isavu (Isavuconazole, testé depuis 2015), Caspo (caspofungine), Mica (micafungine). Les valeurs de CMI50 sont déterminées pour les espèces pour lesquelles au moins 5 isolats ont été testés. Les valeurs de CMI90 sont calculées pour les espèces pour lesquelles au moins 10 isolats ont été testés.
**la caspofungin est testée en milieu AM3 à la place du milieu RPMI

***Tableau 10 : Profil de sensibilité des levures aux antifongiques pour les isolats des espèces rares testés au CNRMA, entre le 30/03/2023 et 19/02/2024.***

*Les souches des espèces rares étaient envoyées au CNRMA par les centres hospitaliers dans le cadre majoritairement de la surveillance nationale des infections fongiques invasives, de façon exhaustive et sans biais de sélection. Les données de CMI50 et CMI90 représentent donc le profil habituellement observé pour les isolats cliniques de ces espèces. Seules les espèces pour lesquelles au-moins 5 isolats ont été testés sont présentées ici.*

| **Espèces étudiées** | **Valeurs des CMI50 / CMI90 mg/L pour les antifongiques*** | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| **(nbre d'isolats testés)** | **AMB** | **5-FC** | **Fluco** | **Vori** | **Posa** | **Isavu** | **Caspo**** | **Mica** |
| *C. lusitaniae* (n=13) | 0.25/0.5 | ≤0.12/0.5 | ≤0.12/0.5 | ≤0.01/≤0.01 | ≤0.01/≤0.01 | ≤0.007/0.12 | 0.03/0.03 | 0.12/0.25 |
| *C. auris* (n=14) | 1/1 | ≤0.12/0.25 | 64/>64 | 2/2 | 0.06/- | 0.12/0.25 | 0.03/0.03 | 0.25/0.5 |
| *S. cerevisiae* (n=6) | 0.5/- | ≤0.12/- | 8/- | 0.12/- | 0.25/- | 0.06/- | 0.12/- | 0.25/- |
| *Y. lipolytica* (n=5) | 1/- | >64/- | 8/- | 0.12/- | 1/- | 0.25/- | 0.25/- | 1/- |
| *M. capitatus* (n=6) | 1/- | ≤0.12/- | 8/- | 0.25/- | 0.25/- | 1/- | >4/- | 2/- |
| *M. clavatus* (n=8) | 1/- | 0.25/- | 8/- | 0.125/- | 0.12/- | 1/- | >4/- | >4/- |
| *Cr. neoformans* (n=36) | 0.5/1 | 8/16 | 8/16 | 0.06/0.25 | 0.12/0.25 | 0.12/0.5 | >4/>4 | >4/>4 |
| *Cr. deneoformans* (n=13) | 0.5/0.5 | 4/16 | 4/16 | 0.06/0.25 | 0.12/0.5 | 0.12/0.5 | >4/>4 | >4/>4 |
| *Rhodotorula mucilaginosa* (n=5) | 0.5/- | 0.25/- | >64/- | 4/- | 0.5/- | 1/- | >4/- | >4/- |
| *Trichosporon asahii* (n=8) | 4/- | >64/- | 2/- | 0.03/- | 0.12/- | 0.5/- | >4/- | >4/- |

* AMB (amphotéricine B), 5-FC (5-fluorocytosine), Fluco (fluconazole), Vori (voriconazole), Posa (posaconazole), Isavu (Isavuconazole, testé depuis 2015), Caspo (caspofungine), Mica (micafungine). Les valeurs de CMI50 sont déterminées pour les espèces pour lesquelles au moins 5 isolats ont été testés. Les valeurs de CMI90 sont calculées pour les espèces pour lesquelles au moins 10 isolats ont été testés.
**la caspofungin est testée en milieu AM3 à la place du milieu RPMI

**Profil de sensibilité des espèces et détection des résistances**

La surveillance des fongémies à levures en Ile de France (Observatoire Des Levures, ODL) mise en place depuis octobre 2002 a pris fin le 31 décembre 2022. Cette surveillance impliquait pour les centres participants l'envoi systématique de tous les isolats de levures isolés des hémocultures, associés à une fiche de déclaration particulière. Ces isolats étaient reçus au CNRMA et la détermination de la sensibilité aux antifongiques était effectuée sans biais de sélection, nous permettant d'avoir un aperçu pour la région Parisienne des profils de sensibilité des espèces de levures fréquentes et de l'éventuelle augmentation ou apparition de phénomènes de résistance. Nous avons cessé cette surveillance car la participation de certains centres semblait diminuée au fil des années et l'augmentation du nombre de centres participants dans le nouveau système de surveillance SINFONI risquait d'augmenter considérablement le nombre d'isolats de toutes les espèces reçus au CNRMA. Nous avons choisi à la place de prévoir d'une part que les centres participants à SINFONI complètent les données de sensibilité aux antifongiques obtenues dans leur centre pour tous les isolats responsable d'infection fongique invasive (ces données sont majoritairement déterminées par des techniques non standardisées types Etest, Sensititre, Micronaut) et d'autre part d'organiser une enquête ponctuelle durant laquelle tous les centres participants feront parvenir leur isolats de levures responsables d'infections invasives quelle que soit l'espèce et le profil de sensibilité. Cette étude que nous espérons annuelle devrait débuter en 2024 et durer un mois chaque année. Les isolats reçus seront donc testés de façon standardisée et nous permettrons d'avoir une vision globale des profils de sensibilité des espèces fréquentes de levures au niveau national.

Si l'on analyse les données issues de la surveillance ODL concernant la sensibilité aux azolés des souches de *C. parapsilosis* responsables de fongémies, on observe une augmentation surtout depuis 2020 (Figure 16). Ces données sont également rapportées dans la littérature depuis quelques années surtout depuis la pandémie de Covid19, notamment en Espagne et en Afrique du Sud, et est souvent liée à un clone persistant dans un hôpital. Il est important de noter que pour la surveillance de l'ODL, les cas de *C. parapsilosis* résistants aux azolés sont observés uniquement dans deux centres hospitaliers de la région parisienne.

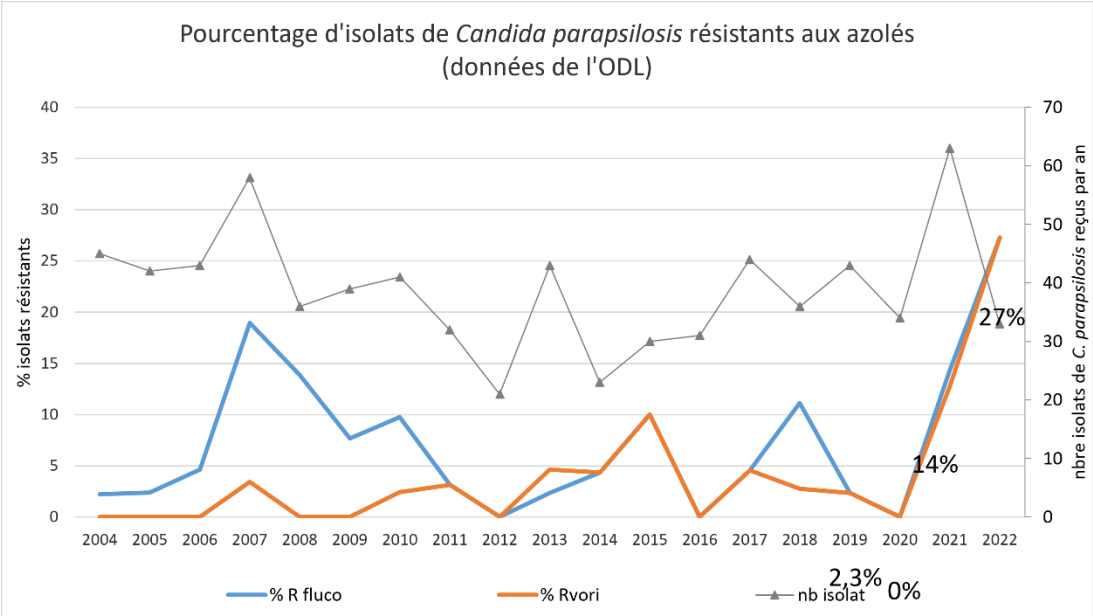



***Figure 16**: Proportion des isolats de C. parapsilosis responsables de fongémies en Ile de France et résistant au fluconazole ou au voriconazole selon les breakpoint EUCAST*

Nous avons effectué de façon rétrospective et prospective le génotypage par technique microsatellites pour 44 isolats de *C. parapsilosis* et le séquençage de la région codant de ERG11, gène qui présente dans la majorité des cas de résistance au fluconazole une modification d'acide aminé (principalement la mutation Y132F). La majorité des isolats avaient la mutation Y132F (82%). Le génotypage, effectué grâce à 4 marqueurs microsatellites (CP1/CP4/CP6/B5), a permis de montrer que dans un hôpital donné la majorité des isolats résistants appartenaient à un même cluster. D'après les données des différents systèmes de surveillance mis en place par le CNRMA depuis 2002, nous pouvons conclure que *C. parapsilosis* reste la 3ème espèce responsable de fongémie à levures et que des souches résistantes au fluconazole (CMI en EUCAST > 4mg/L) sont apparues depuis 2004 et depuis 2006 pour le voriconazole (CMI EUCAST > 0.25mg/L). Plus d'une trentaine de centres hospitaliers étaient concernés de façon ponctuelle avec des pics de fréquence notamment en 2007, 2018 et 2021 et une augmentation générale significative depuis 2020 sur l'ensemble du territoire. Cependant 3 centres hospitaliers sont concernés

principalement avec la présence d'un cluster clonal confirmant la possibilité d'un cluster au sein d'un établissement. Aucune résistance aux échinocandines n'a été observé pour l'instant parmi toutes les souches de *C. parapsilosis* reçues au CNRMA-IFI depuis 2002.

Parmi les souches de *C. parapsilosis* ou *N. glabratus* responsables de fongémies en 2023 déclarées dans le cadre de la surveillance SINFONI, certaines souches ont été identifiées comme ayant des CMI élevées au fluconazole par les techniques de bandelettes Etest ou la technique en milieu liquide colorimétrique Sensititre. La détermination de la sensibilité au fluconazole par la technique standardisée en milieu liquide EUCAST, a dans la majorité des cas (72-66%), pour les souches reçues au CNRMA-IFI, confirmé cette résistance (Tableau 11).

***Tableau 11**. Proportion des isolats résistants au fluconazole responsables de fongémies en 2023*

| espèce | Nbre de cas de fongémies diagnostiquées en 2023 | Nbre de souches ayant des CMI >32mg/L au fluconazole (Etest ou Sensititre) | Nbre de souches reçues au CNRMA-IFI | Nbre de souches confirmées résistantes au fluconazole (CMI > 16mg/L) par la technique EUCAST |
|---|---|---|---|---|
| *N. glabratus* | 364 | 51 | 18 | 13 |
| *C. parapsilosis* | 334 | 46 | 9 | 6 |

En 2023, une seule souche de *C. albicans* a été confirmée comme résistante aux échinocandines avec identification d'une mutation dans la région HS2 du gène *Fks* codant la betaglucansynthase, enzyme cible de cette classe d'antifongiques. De plus 5 souches de *C. glabrata* ont été confirmées comme résistantes sur les 45 souches testées au CNRMA-IFI.

## CHAMPIGNONS FILAMENTEUX

Depuis 2003, le CNRMA-IFI a déterminé la sensibilité à 8 antifongiques (ATF) systémiques de plus de 3900 isolats de champignons filamenteux (Tableaux 13). Les données sur l'isavuconazole sont présentées plus loin dans un tableau séparé (Tableau 14) car le nombre de souches est plus limité. Ces isolats nous sont envoyés pour de multiples raisons : principalement dans le cadre de la surveillance nationale (RESSIF puis SINFONI) mais également pour des raisons de 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.
Depuis 2023, nous avons substitué le milieu AM3 utilisé pour tester la sensibilité à l'amphotéricine B par le milieu RPMI qui est préconisé dans la méthode de référence EUCAST https://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/AFST/Files/EUCAST_EDef_9.4_method_for_susceptibility_testing_of_moulds.pdf
De plus, nous avons modifié la lecture des plaques. Nous considérons désormais pour l'ensemble des molécules, que la plus faible concentration entraînant une réduction ≥90% de la densité optique (DO) par rapport à celle du témoin sans antifongique est la valeur de la CMI.

### Détection des résistances champignons filamenteux aux antifongiques

Nous présentons dans le Tableau 12, les profils de sensibilité déterminés en 2023 avec les modifications mentionnées ci-dessus pour lesquels plus de 5 isolats ont été testés.

L'analyse précise de la résistance aux azolés en France pour les souches *d'A. fumigatus se* fera via une enquête « flash » prévue dans ce mandat. Au cours de cette étude qui aura lieu sur une période limitée nous souhaitons recevoir tous les isolats d'*A. fumigatus* responsables d'infections invasives déclarés dans le cadre de SINFONI et déterminer les CMIs aux azolés. Dans le cadre de la surveillance SINFONI nous recevons les isolats de champignons filamenteux responsables d'infections invasives. Dans le cas particulier des isolats *d'Aspergillus fumigatus* seuls ceux ayant un profil de sensibilité inhabituel (CMIs élevées aux azolés ou autres ATF) sont envoyés au CNRMA-IFI pour confirmation de la résistance. Ceci nous permettra d'évaluer le pourcentage de résistance chez cette espèce. Nous avons séparé, dans les tableaux 13 et 14, les souches pour lesquelles les CMI de l'itraconazole étaient élevées (>1mg/L), avec parfois une résistance croisée pour le voriconazole et le posaconazole, de façon à mieux mettre en évidence le profil des souches sauvages.

A travers la détermination des profils de sensibilité nous observons des "résistances" qui font partie du profil naturel des certaines espèces et qui ne représentent pas des résistances acquises sous traitement antifongique.

Parmi les espèces cryptiques d'*Aspergillus* section *Fumigati*, nous retrouvons *Aspergillus lentulus* qui se caractérise par des CMI très élevées à l'amphotéricine B. Nous avons séparé les espèces majoritaires d'*Aspergillus* section *Nidulantes* telles qu'*A. nidulans* et *A. quadrilineatus* qui diffèrent dans leurs profils de sensibilité à l'amphotéricine B et à la caspofungine. Certaines espèces émergentes, comme les *Aspergillus* de la section *Usti*, particulièrement *Aspergillus calidoustus* (l'espèce la plus fréquemment rencontrée en clinique) ont des profils de sensibilité particuliers avec des CMI élevées pour tous les azolés et les échinocandines. Les membres du genre *Fusarium*, à l'exception du complexe d'espèces *Fusarium dimerum* pour l'amphotéricine B, sont caractérisés par une résistance à la plupart des antifongiques systémiques, y compris les nouveaux azolés et les échinocandines. Les espèces *Lomentospora prolificans*, *Scopulariopsis brevicaulis* et *Microscus cirrosus* ont des profils multirésistants.

Pour les *Mucorales*, nous retrouvons une bonne activité *in vitro* de l'amphotéricine B et une activité du posaconazole variable selon les espèces, et l'absence d'activité du voriconazole et des échinocandines.

Les champignons mélanisés ont globalement une bonne sensibilité à l'amphotéricine B et aux azolés. On peut remarquer que l'activité des différents azolés n'est pas toujours équivalente, au sein d'une même espèce. Certaines espèces ont des CMI basses pour l'itraconazole et le posaconazole et des CMI hautes pour le voriconazole (*Mucorales*, *Exophiala dermatitidis*, ou la forme mycélienne de *Sporothrix* schenckii). A l'inverse, des CMI basses pour le voriconazole et hautes pour l'itraconazole et le posaconazole sont observées pour d'autres espèces (*Trichoderma* spp.).

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

Pour les isolats testés à partir de 2023, nous intégrons dans un même tableau les CMI d'isavuconazole en raison de la modification dans la technique (Tableau 12).

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).

### 2023

***Tableau 12** : Profil de sensibilité des champignons filamenteux aux antifongiques pour les espèces pour lesquelles au moins 5 isolats ont été testés à partir de 2023 (MAJ 15/03/2024).*

| | | Valeurs des CMI50 / CMI90 (mg/L) pour les antifongiques[a] | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| **Espèce** (nombre d'isolats testés) | **AMB[a]** | **Itra** | **Vori** | **Posa** | **Isavu** | **Caspo** | **Mica** | **Terbi** |
| *Cunninghamella berthollethiae* (n =5) | 2/- | **>8/-** | >8/- | 1/- | >4/- | >4/- | >4/- | 0.5/- |
| *Rhizopus arrhizus* (n =14) | 0.125/0.5 | 8/≥8 | >8/>8 | 1/>8 | >4/>4 | >4/- | >4/- | >8/>8 |
| *Rhizopus microsporus* (n=9) | 0.5/- | 4/- | >8/- | 1/- | 2/- | >4/- | >4/- | 1/- |
| *Mucor circinelloides* (n=8) | 0.125/- | ≥8 | >8/- | 1/- | >4/- | >4/- | >4/- | >8/- |
| | | | | | | | | |
| *Aspergillus fumigatus* (n=27) | 0.5/1 | 0.25/0.5 | 0.5/2 | 0.06/0.25 | 1/2 | 0.5/1 | 0.015/0.03 | 2/2 |
| *Aspergillus fumigatus* CMI itra>1mg/L) (n=24) | 0.5/1 | >8/>8 | 2/4 | 0.5/1 | 8/8 | 0.5/8 | 0.015/0.03 | 2/4 |
| *Aspergillus flavus* (n=12) | 2/>4 | 0.25/0.25 | 1/1 | 0.25/0.25 | 1/2 | 4/4 | 0.015/0.03 | 0.06/0.125 |
| *Aspergillus welwitschiae* (n=6) | 0.5/- | 1/- | 1/- | 0.25/- | 2/- | 0.5/ | 0.015/- | 0.25/- |
| *Aspergillus tubingensis* (n=6) | 0.5/- | 4/- | 2/- | 0.5/- | 4/- | 2/- | 0.007/- | 0.25/- |
| *Neocosmospora solani* (n=6) | >2/- | >8/- | 8/- | >8/- | >4/- | >4/- | >4/- | >8 |
| *Fusarium annulatum* (n=7) | >4/- | >8/- | 8/- | >8/- | >4/- | >4/- | >4/- | 2/- |
| *Scedosporium apiospermum* (n=11) | >4/>4 | >8/>8 | 1/-1 | 2/>8 | >4/- | 2/- | 2/≥4 | >8 |
| *Purpureocillium lilacinum* (n=5) | >4/- | 4/- | 0.25/- | 0.125/- | 0.5/- | >4/- | 2/- | 0.25/- |

*[a] valeurs de CMI en milieu RPMI avec lecture de ≥90% d'inhibition*

## TABLEAUX CMI 2003 à 2022

***Tableau 13*** *Profil de sensibilité des champignons filamenteux aux antifongiques de 2003 à 2022*

| | Valeurs des CMI50 / CMI90 (mg/L) pour les antifongiques | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| **Espèce (nombre d'isolats testés)** | **AMB** | **Itra** | **Vori** | **Posa** | **Caspo** | **Mica** | **Terbi** |
| *Cunninghamella bertholletiae* (n=20) | 0.5/1 | 8/≥8 | ≥8/≥8 | 0.5/1 | ≥4/≥4 | ≥4/≥4 | 0.12/0.25 |
| *Cunninghamella* spp. (n=8) | 4/- | 2/- | ≥8/- | 1/- | ≥4/- | ≥4/- | 0.12/- |
| *Lichtheimia corymbifera* (n =81) | 0.5/0.5 | 1/4 | ≥8/≥8 | 0.5/0.5 | ≥4/≥4 | ≥4/≥4 | 0.5/1 |
| *Lichtheimia ornata* (n=7) | 0.25/- | 0.5/- | ≥8/- | 0.5/- | ≥4/- | ≥4/- | 0.5/- |
| *Lichtheimia ramosa* (n=79) | 0.12/0.25 | 2/≥8 | ≥8/≥8 | 0.5/1 | ≥4/≥4 | ≥4/≥4 | 1/2 |
| *Mucor circinelloides* (n=87) | 0.06/0.12 | ≥8/≥8 | ≥8/≥8 | 1/≥8 | ≥4/≥4 | ≥4/≥4 | ≥8/≥8 |
| *Mucor velutinosus* (n=16) | 0.06/0.25 | ≥8/≥8 | ≥8/≥8 | 0.5/2 | ≥4/≥4 | ≥4/≥4 | ≥8/≥8 |
| *Mucor indicus* (n=16) | 0.06/0.12 | ≥8/≥8 | ≥8/≥8 | 1/2 | ≥4/≥4 | ≥4/≥4 | ≥8/≥8 |
| *Mucor* spp. (n=12) | 0.12/0.25 | ≥8/≥8 | ≥8/≥8 | 2/≥8 | ≥4/≥4 | ≥4/≥4 | ≥8/≥8 |
| *Rhizomucor pusillus* (n=62) | 0.06/0.12 | 0.5/1 | ≥8/≥8 | 0.25/0.5 | ≥4/≥4 | ≥4/≥4 | 0.25/0.5 |
| *Rhizomucor miehei* (n=11) | 0.03/0.06 | 0.06/0.12 | 2/-/≥8 | 0.06/0.12 | ≥4/≥4 | 2 /≥4 | 0.25/0.5 |
| *Rhizopus arrhizus* (n =128) | 0.12/0.25 | 1/≥8 | ≥8/≥8 | 0.5/2 | ≥4/≥4 | ≥4/≥4 | ≥8/≥8 |
| *Rhizopus microsporus* (n=85) | 0.06/0.25 | 2/≥8 | ≥8/≥8 | 0.5/2 | ≥4/≥4 | ≥4/≥4 | 0.5/1 |
| *Saksenaea vasiformis* complex (n=5) | 8/- | 0.25/- | 8/- | 0.12/- | ≥4/- | ≥4/- | 0.25/- |
| *Syncephalastrum racemosum* (n=6) | 0.03/- | 1/- | ≥8/- | 0.5/- | ≥4/- | ≥4/- | 0.5/- |
| | | | | | | | |
| *Aspergillus fumigatus* (n=356) | 0.25/0.5 | 0.25/0.5 | 0.25/0.5 | 0.06/0.12 | 0.5/0.5 | 0.015/0.03 | 1/2 |
| *Aspergillus fumigatus* CMI itra>1mg/L) (n=133) | 0.25/0.5 | ≥8/≥8 | 2/4 | 0.5/2 | 0.5/0.5 | ≤0.007/0.03 | 1/4 |
| *Aspergillus lentulus* (n=6) | >4/- | 1/- | 1/- | 0.25/- | 2/- | ≤0.007/- | 0.25/- |
| *Aspergillus hiratsukae* (n=7) | 0.5/- | 0.25/- | 0.5/- | 0.06/- | 0.5/- | ≤0.007/- | 0.125/- |
| *Aspergillus flavus* (n=216) | 1/4 | 0.12/0.25 | 0.5/0.5 | 0.12/0.25 | 0.25/0.5 | ≤0.007/0.03 | 0.03/0.06 |
| *Aspergillus parasiticus* (n=7) | 2/- | 0.125/- | 0.5/- | 0.06/- | 0.25/- | ≤0.007/- | 0.015/- |
| *Aspergillus tamarii* (n=10) | 0.5/1 | 0.06/0.25 | 0.25/0.5 | 0.06/0.12 | 0.25/0.5 | ≤0.007/0.01 | ≤0.01/0.03 |
| *Aspergillus* section *Nidulantes* (n=14) | 1/2 | 0.25/1 | 0.25/0.5 | 0.12/0.25 | 0.5/2 | ≤0.007/- | 0.06/0.25 |
| *Aspergillus nidulans* (n=38) | 2/>4 | 0.12/0.5 | 0.12/0.25 | 0.06/0.25 | 0.5/4 | 0.015/0.06 | 0.12/0.5 |
| *Aspergillus quadrilineatus* (n=17) | 0.5/1 | 0.12/0.25 | 0.12/0.25 | 0.12/0.25 | 2/2 | ≤0.007/0.03 | 0.12/0.12 |
| *Aspergillus* section *Nigri* (n=24) | 0.25/0.5 | 1/4 | 0.5/1 | 0.25/0.5 | 0.25/0.5 | 0.01/0.25 | 0.12/0.25 |
| *Aspergillus tubingensis* (n=35) | 0.25/0.5 | 1/8 | 1/2 | 0.25/0.5 | 0.25/0.5 | ≤0.007/0.015 | 0.25/0.25 |
| *Aspergillus welwitschiae* (n=29) | 0.5/1 | 1/2 | 0.5/1 | 0.25/0.5 | 0.25/0.5 | 0.007/0.015 | 0.12/0.25 |
| *Aspergillus* section *Usti* (n=28) | 0.5/1 | 2/≥8 | 4/8 | ≥8/≥8 | 2/≥4 | 0.25/4 | 0.25/0.5 |
| *Aspergillus calidoustus* (n=29) | 1/2 | ≥8/≥8 | 4/8 | ≥8/≥8 | 0.5/4 | 0.015/0.06 | 0.25/0.5 |
| *Aspergillus terreus* (n=62) | 4/>4 | 0.06/0.25 | 0.5/1 | 0.06/0.12 | 0.5/1 | ≤0.007/0.03 | 0.06/0.12 |
| *Aspergillus sydowii* (n=8) | 2/- | 0.5/- | 0.5/- | 0.25/- | 0.12/- | ≤0.007/- | 0.06/- |
| *Aspergillus versicolor* (n=9) | 1/- | 0.25/- | 0.25/- | 0.12/- | 0.5/- | 0.03/- | 0.25/- |
| *Penicillium* spp. (n=30) | 0.5/4 | 1/≥8 | 8/≥8 | 1/≥8 | 2/≥4 | 0.12/2 | 0.25/1 |
| *Penicillium chrysogenum* (n=8) | 0.5/- | 0.25/- | 1/- | 0.25/- | 0.5/- | 0.03/- | 0.25/- |
| *Paecilomyces variotii* (n=16) | 0.06/0.5 | 0.12/0.5 | 8/≥8 | 0.12/0.5 | 2/4 | 0.03/0.25 | 1/8 |
| *Fusarium solani* complex (n=255) | 4/>4 | ≥8/≥8 | 8/≥8 | ≥8/≥8 | ≥4/≥4 | ≥4/≥4 | ≥8/≥8 |
| -*Fusarium falciforme* (n=17) | 2/>4 | 8/≥8 | 8/≥8 | ≥8/≥8 | ≥4/≥4 | ≥4/≥4 | ≥8/≥8 |
| *Fusarium oxysporum* complex (n=186) | 2/4 | ≥8/≥8 | 2/8 | 2/≥8 | ≥4/≥4 | ≥4/≥4 | 2/4 |
| *Fusarium proliferatum* (n=138) | 4/>4 | ≥8/≥8 | 4/8 | 8/≥8 | ≥4/≥4 | ≥4/≥4 | 1/2 |
| *Fusarium verticillioides* (n=23) | >4/>4 | ≥8/≥8 | 2/4 | 0.5/1 | ≥4/≥4 | ≥4/≥4 | 0.5/1 |
| | | | | | | | |

| Espèce (nombre d'isolats testés) | AMB | Itra | Vori | Posa | Caspo | Mica | Terbi |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| *Bisifusarium dimerum* (n= 35) | 0.25/0.5 | ≥8/≥8 | 2/4 | ≥8/≥8 | ≥4/≥4 | ≥4/≥4 | 0.5/1 |
| *Fusarium incarnatum-equiseti complex* (n=6) | 1/- | ≥8/- | 2/- | 1/- | ≥4/- | ≥4/- | 4/- |
| *Sarocladium kiliense* (n=11) | >4/>4 | ≥8/≥8 | 0.5/1 | 1/≥8 | 4/≥4 | 4/≥4 | 0.5/0.5 |
| *Purpureocillium lilacinum* (n=58) | >4/>4 | 2/≥8 | 0.25/0.5 | 0.25/0.5 | ≥4/≥4 | 2/≥4 | 0.25/0.5 |
| *Trichoderma orientale* (n=5) | 1/- | ≥8/- | 1/- | 1/- | 0.5/- | 0.03/- | 0.5/- |
| *Trichoderma longibrachiatum* (n=26) | 1/2 | ≥8/≥8 | 0.5/1 | 1/2 | 0.5/1 | 0.06/0.25 | 1/2 |
| *Phaeoacremonium parasiticum* (n=27) | 0.5/2 | ≥8/≥8 | 0.25/0.25 | 0.25/0.5 | ≥4/≥4 | ≥4/≥4 | 0.12/0.5 |
| *Pleurostoma richardsiae* (n=7) | 0.25/- | 0.25/- | 0.5/- | 0.25/- | 4/- | 1/- | 1/- |
| *Coniochaeta hoffmannii* (n=7) | 0.25/- | 0.25/- | 1/- | 0.12/- | 2/- | 2/- | 0.25/- |
| *Thermothelomyces thermophilus* (n=10) | 1/2 | 0.12/- | 0.12/- | 0.06/- | 4/- | 0.5/- | 2/- |
| *Sporothrix schenckii* (n=20) | 1/2 | 0.5/1 | 8/≥8 | 0.5/1 | ≥4/≥4 | ≥4/≥4 | 0.06/0.12 |
| *Sporothrix globosa* (n=6) | 8/- | 1/- | ≥8/≥8 | 1/2 | ≥4/- | 1/- | 0.25 |
| *Scedosporium apiospermum* (n=124) | >4/>4 | 1/8 | 0.5/1 | 0.5/1 | 1/2 | 0.25/1 | ≥8/≥8 |
| *Scedosporium boydii* (n=48) | >4/>4 | 0.5/8 | 0.25/0.5 | 0.25/1 | 1/2 | 0.25/1 | ≥8/≥8 |
| *Scedosporium ellipsoideum* (n=9) | >4/- | 1/- | 0.5/- | 1/- | 0.5/- | 0.25/- | ≥8/- |
| *Scedosporium aurantiacum* (n=10) | >4/>4 | 4/≥8 | 0.5/1 | 1/2 | 8/8 | 8/8 | ≥8/≥8 |
| *Scedosporium dehoogii* (n=12) | >4/>4 | 0.5/1 | 0.25/0.5 | 0.5/1 | 2/2 | 0.25/0.5 | ≥8/≥8 |
| *Scedosporium minutisporum* (n=5) | 8/- | 0.5/- | 0.25/- | 0.5/- | 2/- | 0.25/- | ≥8/- |
| *Lomentospora prolificans* (n=43) | >4/>4 | ≥8/≥8 | 8/≥8 | ≥8/≥8 | 4/≥4 | 4/≥4 | ≥8/≥8 |
| *Microascus cirrosus* (n=11) | >4/>4 | ≥8/- | ≥8/- | ≥8/- | 4/- | ≥4/- | 2/- |
| *Scopulariopsis brevicaulis* (n=22) | >4/>4 | ≥8/≥8 | 8/≥8 | ≥8/≥8 | 1/4 | 0.25/1 | 2/8 |
| *Doratomyces* spp. (n=5) | 2/- | ≥8/- | 4/- | 1/- | 1/- | 0.12/- | 2/- |
| *Chaetomium globosum*. (n=6) | 4/- | 0.06/- | 0.25/- | 0.12/- | 0.5/- | 0.12/- | 8/- |
| *Chaetomium spp.* (n=7) | 1/- | 0.25/- | 0.25/- | 0.25/- | 1/- | 0.25/- | 1/4 |
| *Curvularia spicifera* (n=8) | 0.06/- | 0.25/ | 0.5/- | 0.06/- | 0.5/- | 0.06/- | 0.5/- |
| *Alternaria infectoria* complex (n=28) | 0.25/0.5 | 0.5/1 | 4/≥8 | 0.12/0.5 | 0.5/1 | 0.06/0.12 | 0.5/1 |
| *Alternaria alternata* complex (n=39) | 0.5/1 | 1/8 | 2/4 | 0.25/0.5 | 0.5/≥4 | 0.25/≥4 | 4/≥8 |
| *Medicopsis romeroi* (n=7) | 0.5/- | 4/- | 0.5/- | 1/- | 4/- | 2/- | 0.12/- |
| *Neoscytalidium dimidiatum* (n=7) | 0.12/- | ≥8/- | 0.12/- | 0.5/- | 0.5/- | 0.12/- | 0.5/- |
| *Aureobasidium spp.* (n=8) | 0.25/- | 0.03/- | 0.12/- | 0.06/- | 1/- | 1/- | 1/- |
| *Exophiala dermatitidis* (n=37) | 0.12/0.25 | 0.5/1 | 0.06/0.5 | 0.12/0.5 | 4/≥4 | 1/≥4 | 0.06/0.25 |
| *Exophiala jeanselmei* (n=11) | 0.5/1 | 0.25/0.5 | 0.25/0.5 | 0.25/- | 1/- | 2/- | 0.06/- |
| *Exophiala oligosperma* (n=6) | 0.25/- | 0.25/- | 0.25/- | 0.25/- | ≥4/- | 2/- | 0.03/- |
| *Exophiala spinifera* (n=14) | 0.12/0.25 | 0.03/0.05 | 0.12/0.25 | 0.03/0.25 | 2/2 | 0.25/2 | 0.06/0.25 |
| *Fonsecaea monophora* (n=13) | 0.5/2 | ≤0.01/- | 0.06/0.12 | 0.01/0.06 | 0.5/- | 0.5/1 | 0.03/0.12 |
| *Fonsecaea pedrosoi* (n=11) | 0.25/1 | 0.12/0.25 | 0.06/0.25 | 0.06/0.12 | 0.5/1 | 1/- | 0.03/0.12 |
| *Fonsecaea nubica* (n=20) | 0.5/1 | ≤0.01/0.5 | 0.06/0.12 | 0.03/0.25 | 1/2 | 0.5/4 | 0.03/0.25 |
| *Hormographiella aspergillata* (n=6) | 0.06/- | ≥8 | 1/- | 2/- | 4/- | 4/- | 8/- |

***Tableau 14**. Profil de sensibilité des filamenteux à 4 azolés, dont **l'isavuconazole** pour les espèces pour lesquelles au moins 5 isolats ont été testés depuis janvier 2015 jusqu'à 2022*

| | Valeurs des CMI50/CMI90 (mg/L) pour les azolés | | | |
|---|---|---|---|---|
| **Espèce (nbre d'isolats)** | **Posaconazole** | **Itraconazole** | **Voriconazole** | **Isavuconazole** |
| *Cunninghamella bertholletiae* (n=14) | 1/1 | ≥8/≥8 | ≥8/≥8 | >4/>4 |
| *Lichtheimia corymbifera* (n=37) | 0.5/0.5 | 0.5/2 | ≥8/≥8 | 4/>4 |
| *Lichtheimia ramosa* (n=29) | 0.5/1 | 1/≥8 | ≥8/≥8 | >4/>4 |
| *Mucor circinelloides* (n=53) | 2≥8 | ≥8/≥8 | ≥8/≥8 | >4/>4 |
| *Mucor indicus* (n=13) | 1/2 | ≥8/≥8 | ≥8/≥8 | >4/>4 |
| *Mucor velutinosus* (n=10) | 1/- | ≥8/- | ≥8/- | >4/- |
| *Rhizopus arrhizus* (n=69) | 0.5/4 | 4/≥8 | ≥8/≥8 | 4/>4 |
| *Rhizopus microsporus* (n=50) | 1/≥8 | ≥8/≥8 | 8/≥8 | 4/>4 |
| *Rhizomucor pusillus* (n=18) | 0.25/0.25 | 0.5/0.5 | ≥8/≥8 | 4/>4 |
| *Rhizomucor miehei* (n=6) | 0.06/0.125 | 0.06/0.125 | 2/≥8 | 0.5/1 |
| *Aspergillus fumigatus* (n=163) | 0.06/0.12 | 0.25/0.5 | 0.25/1 | 0.5/1 |
| *Aspergillus fumigatus* itraR (CMI>1mg/L) n=70) | 0.5/2 | ≥8/≥8 | 4/4 | 4/>4 |
| *Aspergillus lentulus* (n=6) | 0.25/- | 1/- | 1/- | 1/- |
| *Aspergillus flavus* (n=121) | 0.125/0.125 | 0.125/0.25 | 0.5/1 | 0.5/1 |
| *Aspergillus parasiticus* (n=5) | 0.06/- | 0.125/- | 1/ - | 0.5/- |
| *Aspergillus nidulans* (n=12) | 0.06/0.25 | 0.125/0.25 | 0.125/0.25 | 0.125/0.5 |
| *Aspergillus quadrilineatus* (n=7) | 0.125/- | 0.125/- | 0.12/- | 0.125/- |
| *Aspergillus tubingensis* (n=22) | 0.25/0.5 | 1/≥8 | 1/2 | 4/>8 |
| *Aspergillus welwitschiae* (n=21) | 0.25//0.5 | 1/2 | 0.5/1 | 2/2 |
| *Aspergillus calidoustus* (n=20) | ≥8/≥8 | ≥8/≥8 | 4/8 | 2/4 |
| *Aspergillus terreus* (n=27) | 0.06/0.12 | 0.06/0.125 | 0.5/1 | 0.5/1 |
| *Fusarium solani complex* (n=106) | ≥8/≥8 | ≥8/≥8 | 8/≥8 | >4/>4 |
| *Fusarium oxysporum complex* (n=77) | 2/≥8 | ≥8/≥8 | 2/4 | >4/>4 |
| *Fusarium proliferatum* (n=65) | 2/≥8 | ≥8/≥8 | 4/8 | >4/>4 |
| *Fusarium verticillioides* (n=7) | 0.25/- | 16/- | 1/- | >4/- |
| *Fusarium dimerum* complex (n=19) | ≥8/≥8 | ≥8/≥8 | 2/4 | >4/>4 |
| *Purpureocillium lilacinum* (n=30) | 0.25/0.5 | 4/≥8 | 0.25/0.5 | 1/4 |
| *Trichoderma longibrachiatum* (n=9) | 1/- | ≥8/- | 0.5/- | >4/- |
| *Phaeoacremonium parasiticum* (n=17) | 0.25/0.5 | ≥8/≥8 | 0.25/0.5 | 2/4 |
| *Scedosporium apiospermum* (n=56) | 0.5/1 | 0.5/8 | 0.25/0.5 | 2/4 |
| *Scedosporium boydii* (n=16) | 0.25/1 | 1/≥8 | 0.25/0.5 | 2/>4 |
| *Lomentospora prolificans* (n=16) | ≥8/≥8 | ≥8/≥8 | 8/≥8 | >4/>4 |
| *Microascus cirrosus* (n=5) | 2/- | ≥8/≥8 | 4/≥8 | >4/>4 |
| *Scopulariopsis brevicaulis* (n=9) | ≥8/- | ≥8/- | 8/- | 4/- |
| *Alternaria alternata* complex (n=12) | 0.25/0.5 | 1/8 | 2/4 | 4/8 |
| *Exophiala dermatitidis* (n=10) | 0.03/0.25 | 0.06/0.5 | 0.25/4 | 0.5/4 |
| *Fonsecaea pedrosoi* (n=5) | 0.06/ - | 0.125/ - | 0.06/- | 0.125/- |
| *Fonsecaea monophora* (n=8) | ≤0.01/- | 0.015/- | 0.06/- | 0.03/- |
| *Fonsecaea nubica* (n=12) | 0.03/0.12 | 0.015/0.25 | 0.06/0.12 | 0.06/0.25 |

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

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

Nous sommes conscients du défi que représente la gestion des espèces difficiles à traiter ou des nouvelles espèces. Nous continuons donc de déterminer la sensibilité à l'olorofim pour ces souches. Nous avons expertisé en 2023 une collection de 180 isolats cliniques identifiés par séquençage. Nous avons obtenu des résultats reproductibles pour les valeurs basses de CMI pour plusieurs isolats multi-résistants tels que le complexe d'espèces *Fusarium fujikuroi* et *F. oxysporum*; *Microascus* et *Scopulariopsis*. Notre objectif est de constituer une base de données qui sera un atout majeur pour les cliniciens et mycologues.

**Recherche des mutations dans le gène *CYP51A***

En 2023, nous avons recherché des mutations se trouvant dans le gène *CYP51A* de 20 isolats d'*A. fumigatus* ayant des CMI élevés aux azolés. La mutation la plus fréquente était TR34/L98H (14 souches) suivi de G448S (4 souches).

Dans la Figure 16 sont représentées les principales substitutions non synonymes décrites pour le gène cible et son promoteur. Les souches résistantes aux azolés portent des mutations ponctuelles dans la région codante soit en combinaison ou en absence de répétitions en tandem dans le promoteur. Les mécanismes pouvant expliquer la résistance sont connus pour un certain nombre des mutations.

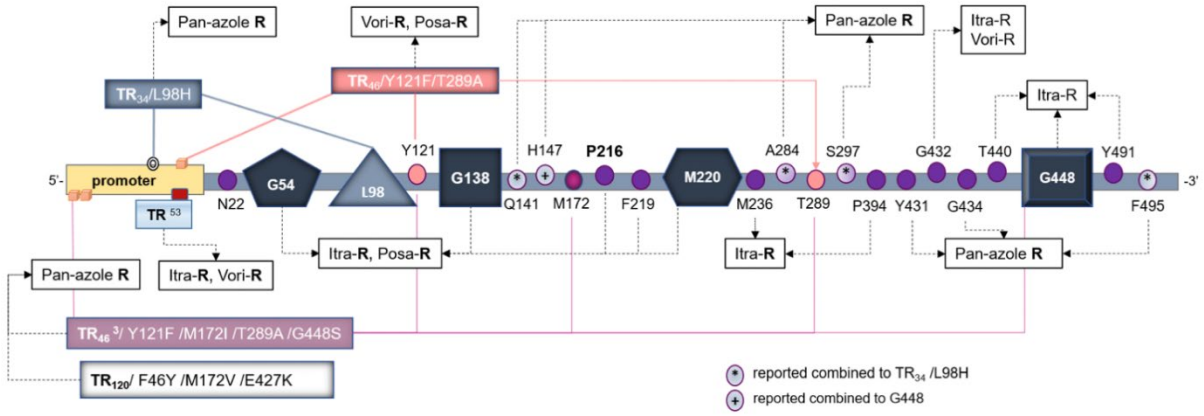



*Figure 16. Schéma du gène Cyp51A d'A. fumigatus et principales mutations. Les régions hotspot sont indiquées : G54, L98, G138, M220, G448. Les constructions génétiques ont démontré que ces mutations peuvent être responsables d'un phénotype de résistance aux antifongiques azolés (modifié d'Alanio A. et al.) Itra: itraconazole ; Vori : voriconazole ; Posa : posaconazole ; TR, tandem repeat ; R, résistant*

**Bilan des diagnostics moléculaires**

**Diagnostic sur prélèvements sanguins, urinaires ou respiratoires**

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

Le diagnostic d'histoplasmose a donc été possible à partir de prélèvement invasifs (biopsies de tissu pathologique), superficiel (e.g. écouvillon cutané/buccal) et à partir de sang prélevé sur anticoagulant. Un total de 46 prélèvements de 22 patients a été détecté positif sur 2131 tests réalisés en 2023. Les données de l'évaluation, de cette qPCR ont été publiées et la qPCR développée rendue publique et en cours d'évaluation à travers un programme de validation de contrôle externe européen (Dr Dunja Wilmes, Berlin)[7].

Après avoir développé une qPCR *Fusarium* spp., nous proposons cet examen pour les centres français depuis 2022. En 2023, nous avons réalisés 225 tests avec 32 prélèvements positifs (14,2%) chez 21 patients principalement à partir de prélèvements cutanés et respiratoires.

### 1.3.4 Enquêtes ou études ponctuelles concourant à la surveillance

*NA*

[7] Mycoses 2023, doi: 10.1111/myc.13603.

## 1.4 Alertes

Le CNRMA-IFI peut être informé par plusieurs voies d'alertes (Figure 17). Les actions menées à la suite d'une alerte sont présentées dans la Figure 18.

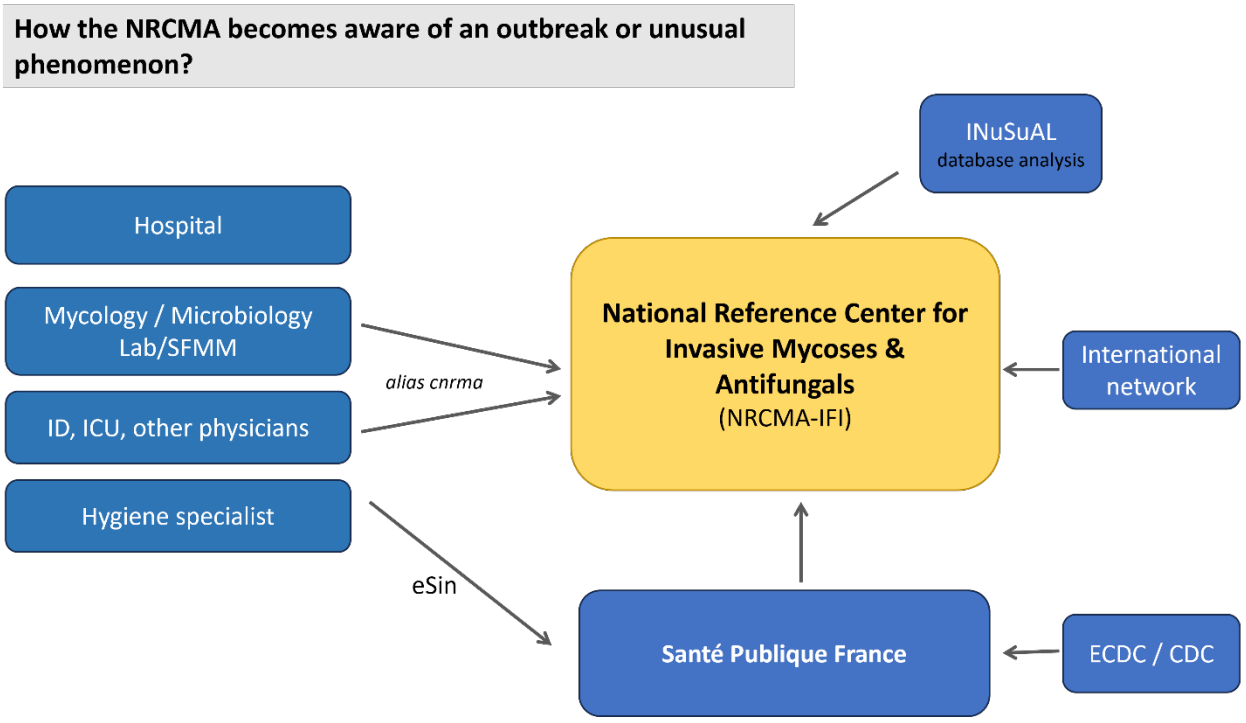



*Figure 17. Système d'informations pour les alertes*

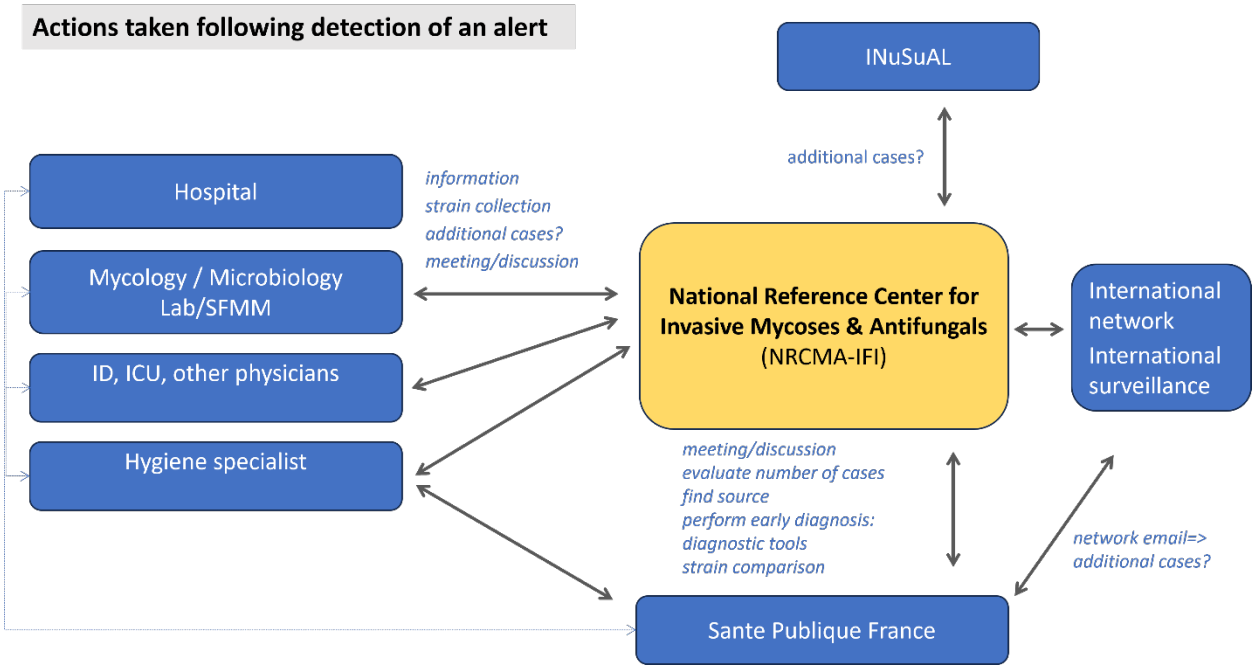



*Figure 18. Diagramme décisionnel en cas d'alerte*

Le CNRMA-IFI a été sollicité une fois pendant l'année 2023 par la DGS, et a participé à une réunion du CORRUSS (21/06/2023) concernant les cas groupés d'infection à *Trichosporon austroamericanum*. Le CNRMA-IFI a également été sollicité une fois en 2023, pour présenter les données épidémiologiques des infections/colonisations à *C. auris* en France par le ministère de la Santé. Nous avons également participé à 2 journées de signalements des CPIAS au siège de Santé Publique France pour présenter les données concernant ces deux pathogènes (Journée Signalement des infections associées aux soins du 30/05/2023; ½ Journée Signalement des infections associées aux soins le 21/12/2023).

Au cours de l'année 2023, nous avons été informés de 19 signalements e-sin par Santé Publique France et/ou les correspondants mycologues et/ou hygiénistes de 16 centres hospitaliers. Les signalements concernaient majoritairement des cas d'infections et/ou colonisations à *Candida auris* (n=11), 5 cas d'infections à *Trichosporon spp.*, 2 cas d'infection à *Magnusiomyces clavatus (syn. Geotrichum clavatum*) dans un même hôpital, 1 infection à *Scedosporium apiospermum*, 4 cas de Pneumopathies à Mucorales + *Aspergillus* dans un même hôpital et 2 cas d'infection respiratoires à Mucorales dans un même hôpital. Le CNRMA fait partie du groupe européen de surveillance des infections et colonisations à *C. auris* (Candida auris survey) et a participé à l'analyse des données européennes de l'ECDC. Pour les infections à *M .clavatus* les deux souches nous ont été envoyées et le séquençage génome entier a permis de comparer les séquences de ces souches avec les séquences des souches précédemment analysées au CNRMA-IFI. Les deux cas étaient dus à des souches génétiquement identiques mais n'appartenant pas à des clades épidémiques précédemment identifiés.

***Candida auris***

Parmi les 11 cas (2 infections et 9 colonisations) de *C. auris* en 2023, dans 7 cas des souches nous ont été envoyées pour lesquelles nous avons pu effectuer le séquençage génome entier pour la détermination du clade géographique et le génotypage. La majorité des cas (5/7) étaient dus à des souches du Clade I (initialement le Clade Indien) et deux autres cas à des souches du Clade III chez des patients rapatriés d'Ukraine. Un cas de transmission entre patient dans un même hôpital a aussi été confirmé par séquençage. Depuis janvier 2024, 4 cas de colonisations ont été rapportés dans 2 centres hospitaliers. Deux cas de transmission ont été identifiés dans un hôpital à partir d'un patient colonisé par une souche du clade III et rapatrié d'Ukraine.

Nous avons mis en place depuis septembre 2023, un questionnaire en ligne sur le serveur RedCap afin de suivre les cas de colonisations à *C. auris* en France et également le suivi des patients au cours du temps et les éventuels cas contact. Nous avons également ajouté une page concernant les actualités épidémiologiques sur le site web du CNRMA-IFI (https://www.pasteur.fr/fr/sante-publique/centres-nationaux-reference/cnr/mycoses-invasives-antifongiques/actualites-epidemiologiques).

En collaboration avec la Société Française de Mycologie Médicale (SFMM), la Société Française d'Hygiène Hospitalière (SF2H) et le laboratoire associé du CNRMA-UNUSAL nous avons publié, en juin 2023, une note sur les données épidémiologiques des infections/colonisations à *C. auris* et les modalités de surveillance et de dépistage (https://www.pasteur.fr/sites/default/files/note_cauris_juin_2023.pdf ).

Depuis 2007, 39 cas d'infections (n=12) ou colonisations (n=27) à *C. auris* ont été recensés en France grâce au réseau du CNRMA et aux signalements faits à SPF (Figure 19). Les cas ont été rapportés dans 22 centres hospitaliers en France. La majorité des cas ont été isolés chez des patients rapatriés de pays étrangers.

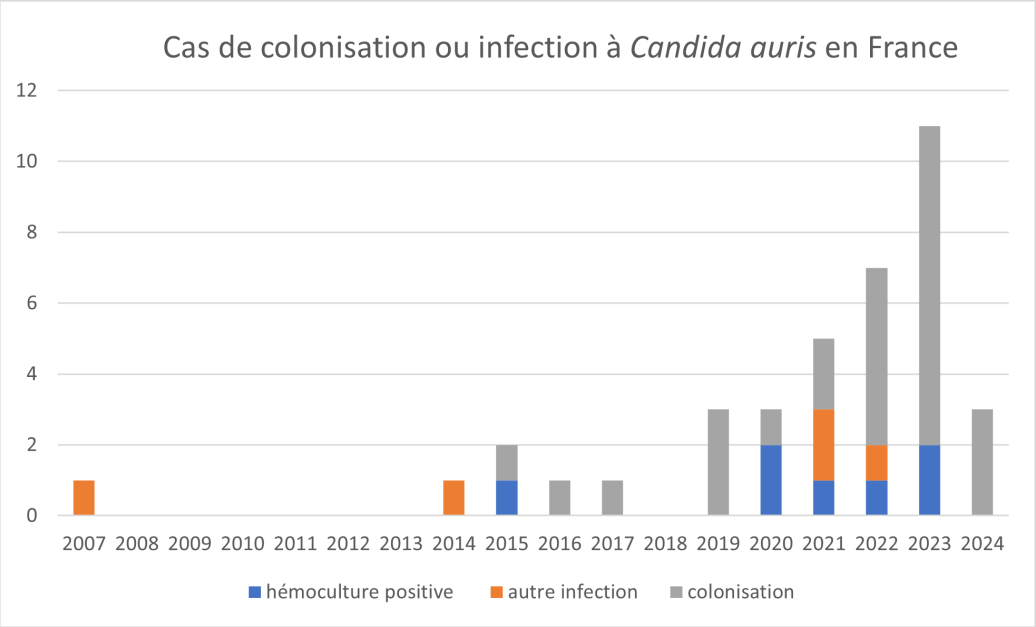



*Figure 19 : évolution au cours des années des nombres de cas de colonisations et infections à C. auris en France*

Nous avons cette année débuté une collaboration avec le laboratoire d'hydrologie/Unité de Microbiologie (ANSES de Nancy, Benoit Gassilloud) afin de travailler sur la détection des champignons et en particulier de *C. auris* dans les boues d'eaux usées. Cette collaboration a pour but d'être prêts à investiguer les eaux usées de certains bassins de population pour détecter la présence de certains pathogènes fongiques d'intérêt pour la santé publique et au premier lieu *C. auris*. Les méthodes d'extraction spécifiques pour la détection de *C. auris* sont en cours d'optimisation. Une douzaine d'échantillons d'eaux usées collectés à Nancy au moment de la détection de *C. auris* au CHU de Nancy ont été investiguées et sont revenues négatifs, suggérant que la contamination environnementale de *C. auris* en provenance des eaux usées du CHU était faible ou inexistante.

***Trichosporon austroamericanum* sp. *novo***

Un signalement concernant des cas de médiastinites à *Trichosporon inkin* nous avait été fait en décembre 2021 dans un hôpital. Des nouveaux cas ont également été reportés au cours de l'année 2022. Le séquençage de la région IGS1 puis du génome entier a confirmé que ces isolats appartenaient en fait à une espèce proche de *T. inkin* non encore décrite. En collaboration avec Elaine Cristina de Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado à São Paulo, Brésil et de Ferry Hagen du Westerdijk Fungal Biodiversity Institute à Utrecht aux Pays-Bas, nous avons décrit cette espèce et avons proposé le nom de *Trichosporon austroamericanum* (publication acceptée dans Mycopathologia).

Au cours de l'année 2023, 1 centre nous a signalé 3 cas d'infection à cette espèce chez des patients greffés rénaux. La comparaison des données de génome entier suppose que les trois souches ne sont pas liées génétiquement. D'autre part, nous avons reçu des souches de l'hôpital nous ayant signalé les premiers cas en 2021, correspondant à 8 souches isolées en 2023 mais aussi 11 isolées entre 2015 et 2022 et à 2souches environnementales isolées en 2023 dans 2 blocs opératoires. La comparaison des SNPs sur la totalité du génome suggère que les isolats retrouvés dans l'environnement hospitaliers ne semblent pas avoir de lien génétique avec les isolats cliniques. De même les isolats cliniques ne semblent pas tous liés entre eux, certains clusters de 2-3 isolats sont possiblement identifiés. Le génome de référence de cette nouvelle espèce n'étant pas actuellement disponible nous avons fait l'analyse en prenant un assemblage de novo d'un isolat clinique séquencé avec la technique Illumina. Nous espérons optimiser l'extraction de l'ADN pour pouvoir faire un séquençage génome entier longreads par exemple avec nanopore et un assemblage de novo plus précis pour affiner l'analyse des SNPs. Actuellement nous supposons que plusieurs souches multiclonales sont présentes dans l'environnement hospitalier et/ou possiblement sur la peau de certains patients et que certaines souches ont pu provoquer une infection chez certains patients principalement des patients ayant subis des chirurgies cardio-vasculaires.

## 1.5 Activités de mise à disposition de l'information, de formation et de conseil

### 1.5.1 Conseil et expertise aux professionnels de santé

Une activité importante de conseils thérapeutiques est réalisée par les Pr. Fanny Lanternier et Olivier Lortholary pour la prise en charge d'infections fongiques complexes documentées ou des suspicions d'infections fongiques invasives. Cette activité est faite sur sollicitation de collègues mycologues, infectiologues, hématologues, pédiatres, transplanteurs, réanimateurs, chirurgiens, pneumologues des différents centres hospitaliers français universitaires et généraux. Nous sommes sollicités soit par l'adresse email générique du CNRMA, soit par téléphone au service de maladies infectieuses de l'hôpital Necker. Les avis concernant des infections fongiques sont réalisés par les Pr Fanny Lanternier et Olivier Lortholary en collaboration avec l'ensemble des cliniciens du service de maladies infectieuses et tropicales de l'hôpital Necker Enfants malades via une ligne téléphonique dédiée et l'adresse générique cnrma@pasteur.fr, en particulier le Dr Perrine Parize.

Par ailleurs a été mise en place une RCP nationale par visioconférence avec des mycologues, infectiologues et pharmacologues ainsi que le support du secrétariat du service de maladies infectieuses et tropicales de l'Hôpital Necker Enfants Malades. Un compte rendu résumant les recommandations est envoyé par mail aux médecins ayant sollicités l'avis. Nous avons donné 320 avis entre Mars 2022 et Novembre 2023 pour 75 aspergilloses invasives, 44 mucormycoses, 44 candidémies ou candidoses invasives,17 cryptococcoses, 11 candidoses disséminées chroniques, 11 étiologie indéterminée – suspicion IFI, 9 scedosporioses, 7 fusarioses, 6 trichosporonoses, 8 histoplasmoses, 3 *Phaeoacremonium*, 2 *Exophiala*.

Les réponses sont faites soit directement par téléphone, soit en réponse aux emails soit par une RCP pour les questions plus complexes avec un compte-rendu écrit. Cette activité clinique n'est pas quantifiable mais les deux cliniciens sont sollicités au moins 3/5 fois par jour. Le nombre de réponses via la RCP hebdomadaire est de l'ordre de 5 demandes par semaine.

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

Nous sommes intervenus auprès de plusieurs centres avec des cas de colonisations à *C. auris* pour conseil sur le diagnostic des cas contacts et le suivi (Cf. Chapitres 2.3 concernant le transfert de technique et chapitre 4 réponse aux alertes).

### 1.5.2 Conseil et expertise aux autorités sanitaires

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

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

### 1.5.3 Conseil et expertise pour d'autres cibles (médias, grand public …)

Le CNRMA a participé au Pasteurdon en septembre 2023 afin de sensibiliser le grand publique sur l'importance des infections fongiques, sa gravité, les terrains à risque, la résistance en particulier en lien avec l'exposition aux fongicides azolés ainsi que le rôle du climat : Interviews presse et radio au CNRMA-IFI https://www.pasteur.fr/fr/pasteurdon-2023-recherche-vit-nous#dp. Deux articles sur les candidoses pour le grand publique (Notre temps) et pour un public plus spécialisé (Biologiste Infos) ont été publiés (A Alanio).

## 1.6 Travaux de recherche et publications en lien direct avec l'activité du CNRMA-IFI

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

**Tomographie de cohérence optique plein champ plein champ (FF-OCT) dans l'imagerie et le suivi de la croissance *d'Aspergillus fumigatus***

Le diagnostic des infections fongiques invasives sous cutanées se base généralement sur les examens directs et histopathologiques. Malheureusement plusieurs cas peuvent passer inaperçus (comme dans les aspergilloses invasives) ce qui justifie le développement d'une nouvelle approche diagnostique couplée avec des outils d'imagerie. L'introduction de l'utilisation de la tomographie dynamique de cohérence optique plein champ (D-FF-OCT) dans le diagnostic fongique, permet l'obtention des structures tridimensionnelles ultra résolues et semble renvoyer une information métabolique sur les différentes espèces fongiques[8]. Ici, pour la première fois, nous montrons l'utilité du D-FF-OCT dans l'imagerie de cellules vivantes et le suivi des étapes de croissance du champignon *Aspergillus fumigatus*. L'objectif est de créer un nouvel outil dédié à la recherche et au diagnostic en mycologie médicale. Les résultats de la D-FF-OCT ont permis la visualisation dynamique du trafic des vacuoles intracellulaires mais aussi le suivi métabolique des différentes phases du développement des hyphes, conidiophores et têtes aspergillaires, cela avec ou sans stress antifongique. En collaboration avec Thomas Maldiney (CHU de Dijon), nous avons apporté notre expérience en mycologie : (i) dans l'adaptation de la microculture (conditions de culture et d'incubation) pour les acquisitions (ii) sur les conditions choisies pour le stress antifongique et (iii) sur la reconnaissance des structures conidiogènes d'*A.fumigatus*[9].

**Pneumocystoses**

Les données associées aux pneumocystoses issues de la base RESSIF 2012-2022 font actuellement l'objet d'une analyse détaillées. Une analyse préliminaire orientées sur les pneumocystoses de transplantation a été présentée à la Société Française de Transplantation (Brest, Dec 2023). Ces données feront l'objet d'une publication spécifique courant 2024-2025. En résumé, l'analyse porte sur plus de 3000 cas adultes dans 25 centres RESSIF, représentant seulement 14,5% de PVVIH, 27,3% avec hémopathie maligne, 20,4% avec cancer solides et 15,5% chez les transplantés d'organes solides et 21,9% autres. Chez les transplanté d'organes les transplanté rénaux représentait 67,4%. La mortalité à 30 jours varie significativement en fonction des maladies sous-jacentes avec une mortalité faible chez les PVVIH (<10%), intermédiaire chez les transplantés d'organe (<20%) et forte en onco-hématologie et autres (>30%).

**Cryptococcose**

L'étude portant sur la cryptococcose chez les sujets séronégatifs pour le VIH en France entre 2005 et 2020 a été publiée[10] : 652 cas de cryptococcose ont été rapportés. La majorité (66%) étaient dues à *Cryptococcus neoformans* sérotype A. La majorité des sujets (63%) avaient une cryptococcose neuroméningée et/ou disséminée. Parmi les 652 patients, 102 étaient transplantés d'organe solide, 209 avaient une néoplasie (32%, dont 80% avaient une hémopathie maligne), et 204 avaient un autre facteur de risque (31%, les plus fréquents étant une maladie auto-immune, une insuffisance hépatique ou rénale, et une sarcoïdose, et parmi lesquels 53% avaient reçu une corticothérapie systémique).

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

*(i)* ***Publications nationales***

*Candida auris en France en 2023 : épidémiologie nationale, diagnostic, prévention. Alanio A, Bigot J, Desnos-Ollivier M, Parneix P, Berger-Carbonne A, Lanternier F, Botterel F. Revue Hygiènes. volume-xxxi-6-decembre-2023*

[8] J Mycol Med 2022, doi: 10.1016/j.mycmed.2022.101303.

[9] *Dynamic full-field optical coherence tomography for live-cell imaging and growth-phase monitoring in Aspergillus fumigatus Maldiney T, Garcia-Hermoso D, Sitterlé E, Chassot JM, Thouvenin O, Boccara C, Blot M, Piroth L, Quenot JP, Charles PE, Aimanianda V, Podac B, Boulnois L, Dalle F, Sautour M, Bougnoux ME, Lanternier F. Front Cell Infect Microbiol. 2023 Jul 12;13:1183340. doi: 10.3389/fcimb.2023.1183340. PMID: 37502605*

[10] OFID 2023, doi: 10.1093/ofid/ofad658.

*(ii)* ***Publications internationales***

*1. Candida haemulonii complex, an emerging threat from tropical regions? Françoise U, Desnos-Ollivier M, Le Govic Y, Sitbon K, Valentino R, Peugny S, Chouaki T, Mazars E, Paugam A, Nicolas M, Desbois-Nogard N, Lortholary O; French Mycoses Study Group. PLoS Negl Trop Dis. 2023 Jul 31;17(7):e0011453. doi: 10.1371/journal.pntd.0011453. eCollection 2023 Jul.PMID: 37523406*

*2. Invasive aspergillosis in liver transplant recipients. Melenotte C, Aimanianda V, Slavin M, Aguado JM, Armstrong-James D, Chen YC, Husain S, Van Delden C, Saliba F, Lefort A, Botterel F, Lortholary O. Transpl Infect Dis. 2023 Jun;25(3):e14049. doi: 10.1111/tid.14049. Epub 2023 Mar 16.PMID: 36929539*

*3. Guideline adherence and survival of patients with candidaemia in Europe: results from the ECMM Candida III multinational European observational cohort study. Hoenigl M, Salmanton-García J, Egger M, Gangneux JP, Bicanic T, Arikan-Akdagli S, Alastruey-Izquierdo A, Klimko N, Barac A, Özenci V, Meijer EFJ, Khanna N, Bassetti M, Rautemaa-Richardson R, Lagrou K, Adam KM, Akalin EH, Akova M, Arsic Arsenijevic V, Aujayeb A, Blennow O, Bretagne S, Danion F, Denis B, de Jonge NA, Desoubeaux G, Drgona L, Erben N, Gori A, García Rodríguez J, Garcia-Vidal C, Giacobbe DR, Goodman AL, Hamal P, Hammarström H, Toscano C, Lanternier F, Lass-Flörl C, Lockhart DEA, Longval T, Loughlin L, Matos T, Mikulska M, Narayanan M, Martín-Pérez S, Prattes J, Rogers B, Rahimli L, Ruiz M, Roilides E, Samarkos M, Scharmann U, Sili U, Sipahi OR, Sivakova A, Steinmann J, Trauth J, Turhan O, Van Praet J, Vena A, White PL, Willinger B, Tortorano AM, Arendrup MC, Koehler P, Cornely OA; ECMM Candida III Study Group.Lancet Infect Dis. 2023 Jun;23(6):751-761. doi: 10.1016/S1473-3099(22)00872-6. Epub 2023 Feb 15.PMID: 37254300*

*4. Improving Diagnosis of Pulmonary Mucormycosis: Leads From a Contemporary National Study of 114 Cases. Coste A, Conrad A, Porcher R, Poirée S, Peterlin P, Defrance C, Letscher-Bru V, Morio F, Gastinne T, Bougnoux ME, Suarez F, Nevez G, Dupont D, Ader F, Halfon-Domenech C, Ducastelle-Leprêtre S, Botterel F, Millon L, Guillerm G, Ansart S, Boutoille D, Ledoux MP, Herbrecht JE, Robin C, Melica G, Danion F, Blanchard E, Paccoud O, Garcia-Hermoso D, Lortholary O, Herbrecht R, Lanternier F; French Mycoses Study Group. Chest. 2023 Nov;164(5):1097-1107. doi: 10.1016/j.chest.2023.06.039. Epub 2023 Jul 5.PMID: 37419276*

*5. Coregulation of extracellular vesicle production and fluconazole susceptibility in Cryptococcus neoformans. Rizzo J, Trottier A, Moyrand F, Coppée JY, Maufrais C, Zimbres ACG, Dang TTV, Alanio A, Desnos-Ollivier M, Mouyna I, Péhau-Arnaude G, Commere PH, Novault S, Ene IV, Nimrichter L, Rodrigues ML, Janbon G. mBio. 2023 Aug 31;14(4):e0087023. doi: 10.1128/mbio.00870-23. Epub 2023 Jun 13. PMID: 37310732*

*6. Atypical imaging patterns during lung invasive mould diseases: lessons for clinicians. Casutt A, Lamoth F, Lortholary O, Prior JO, Tonglet A, Manuel O, Bergeron A, Beigelman-Aubry C. Eur Respir Rev. 2023 Sep 27;32(169):230086. doi: 10.1183/16000617.0086-2023. Print 2023 Sep 30. PMID: 37758271*

*7. Invasive fungal diseases in patients with autoimmune diseases: a case series from the French RESSIF network. Galmiche S, Thoreau B, Bretagne S, Alanio A, Paugam A, Letscher-Bru V, Cassaing S, Gangneux JP, Guegan H, Favennec L, Minoza A, Morio F, Bonhomme J, Desoubeaux G, Eloy O, Hasseine L, Sasso M, Millon L, Bellanger AP, Poirier P, Moniot M, Chouaki T, Huguenin A, Dalle F, Bouteille B, Nicolas M, Desbois-Nogard N, Bougnoux ME, Danion F, Poindron V, Néel A, Boukris-Sitbon K, Lanternier F, Terrier B; French Mycoses Study Group. RMD Open. 2023 Aug;9(3):e003281. doi: 10.1136/rmdopen-2023-003281. PMID: 37558492*

*8. Refractory Microascus Bronchopulmonary Infection Treated with Olorofim, France. Faure E, Brugière O, de Verdiere SC, Vuotto F, Limousin L, Cardot E, Cordier C, Coulon P, Garcia-Hermoso D, Lortholary O, Lanternier F. Emerg Infect Dis. 2023 Nov;29(11):2401-2403. doi: 10.3201/eid2911.230984. PMID: 37877687*

*9. Performance of clinical metagenomics in France: a prospective observational study. Fourgeaud J, Regnault B, Ok V, Da Rocha N, Sitterlé É, Mekouar M, Faury H, Milliancourt-Seels C, Jagorel F, Chrétien D, Bigot T, Troadec É, Marques I, Serris A, Seilhean D, Neven B, Frange P, Ferroni A, Lecuit M, Nassif X, Lortholary O, Leruez-Ville M, Pérot P, Eloit M, Jamet A. Lancet Microbe. 2024 Jan;5(1):e52-e61. doi: 10.1016/S2666-5247(23)00244-6. Epub 2023 Dec 1. PMID: 38048804*

*10. A conceptual framework for nomenclatural stability and validity of medically important fungi: a proposed global consensus guideline for fungal name changes supported by ABP, ASM, CLSI, ECMM, ESCMID-EFISG, EUCAST-AFST, FDLC, IDSA, ISHAM, MMSA, and MSGERC. de Hoog S, Walsh TJ, Ahmed SA, Alastruey-Izquierdo A, Alexander BD, Arendrup MC, Babady E, Bai F-Y, Balada-Llasat J-M, Borman A, Chowdhary A, Clark A, Colgrove RC, Cornely OA, Dingle TC, Dufresne PJ, Fuller J, Gangneux J-P, Gibas C, Glasgow H, Gräser Y, Guillot J, Groll AH, Haase G, Hanson K, Harrington A, Hawksworth DL, Hayden RT, Hoenigl M, Hubka V, Johnson K, Kus JV, Li R, Meis JF, Lackner M, Lanternier F, Leal SM Jr, Lee F, Lockhart SR, Luethy P, Martin I, Kwon-Chung KJ, Meyer W, Nguyen MH, Ostrosky-Zeichner L, Palavecino E, Pancholi P, Pappas PG, Procop GW, Redhead SA, Rhoads DD, Riedel S, Stevens B, Sullivan KO, Vergidis P, Roilides E, Seyedmousavi A, Tao L, Vicente VA, Vitale RG, Wang Q-M, Wengenack NL, Westblade L, Wiederhold N, White L, Wojewoda CM, Zhang SX. J Clin Microbiol. 2023 Nov 21;61(11):e0087323. doi: 10.1128/jcm.00873-23. Epub 2023 Oct 26. PMID: 37882528*

11. Invasive bone and joint infections from the French Scedosporiosis/lomentosporiosis Observational Study (SOS) cohort: no mortality with long-term antifungal treatment and surgery. Blez D, Bronnimann D, Rammaert B, Zeller V, Delhaes L, Hustache L, Grenouillet F, Traversier N, Bonhomme J, Chouaki T, Perpoint T, Persat F, Bougnoux ME, Bayle S, Quaesaet L, Nevez G, Boutoille D, Morio F, Pougnet L, Queyrel-Moranne V, Heym BE, Guillemain R, Dannaoui É, Roux A, Garcia-Hermoso D, Lanternier F. Med Mycol. 2023 Mar 2;61(3):myad023. doi: 10.1093/mmy/myad023. PMID: 36813259
12. New antifungals development: rezafungin in candidiasis treatment. Desnos-Ollivier M, Lanternier F. Lancet Infect Dis. 2024 Mar;24(3):229-231. doi: 10.1016/S1473-3099(23)00627-8. Epub 2023 Nov 23. PMID: 38008098
13. Kicking sleepers out of bed: Macrophages promote reactivation of dormant Cryptococcus neoformans by extracellular vesicle release and non-lytic exocytosis. de Castro RJA, Marina CL, Sturny-Leclère A, Hoffmann C, Bürgel PH, Wong SSW, Aimanianda V, Varet H, Agrawal R, Bocca AL, Alanio A. PLoS Pathog. 2023 Nov 30;19(11):e1011841. doi: 10.1371/journal.ppat.1011841. eCollection 2023 Nov. PMID: 38033163
14. How Applicable Is the Single-Dose AMBITION Regimen for Human Immunodeficiency Virus-Associated Cryptococcal Meningitis to High-Income Settings? Harrison TS, Lawrence DS, Mwandumba HC, Boulware DR, Hosseinipour MC, Lortholary O, Meintjes G, Mosepele M, Jarvis JN. Clin Infect Dis. 2023 Mar 4;76(5):944-949. doi: 10.1093/cid/ciac792. PMID: 36166405
15. Disseminated Cryptococcosis Following Eculizumab Therapy: Insight Into Pathogenesis. Lortholary O, El-Sissy C, Leporrier J, Sze Wah Wong S, Dannaoui E, Fremeaux-Bacchi V, Aimanianda V. Open Forum Infect Dis. 2023 Mar 24;10(4):ofad159. doi: 10.1093/ofid/ofad159. eCollection 2023 Apr. PMID: 37065989
16. Gradient concentration strip-specific epidemiological cut-off values of antifungal drugs in various yeast species and five prevalent Aspergillus species complexes. Mercier V, Letscher-Bru V, Bougnoux ME, Delhaes L, Botterel F, Maubon D, Dalle F, Alanio A, Houzé S, Dannaoui E, Cassagne C, Cassaing S, Durieux MF, Fekkar A, Bouchara JP, Gangneux JP, Bonhomme J, Dupont D, Costa D, Sendid B, Chouaki T, Bourgeois N, Huguenin A, Brun S, Mahinc C, Hasseine L, Le Gal S, Bellanger AP, Bailly E, Morio F, Nourrisson C, Desbois-Nogard N, Perraud-Cateau E, Debourgogne A, Yéra H, Lachaud L, Sasso M. Clin Microbiol Infect. 2023 May;29(5):652.e9-652.e15. doi: 10.1016/j.cmi.2022.11.030. Epub 2022 Dec 9. PMID: 36509375
17. Multicenter Evaluation of the FilmArray Blood Culture Identification 2 Panel for Pathogen Detection in Bloodstream Infections. Caméléna F, Péan de Ponfilly G, Pailhoriès H, Bonzon L, Alanio A, Poncin T, Lafaurie M, Dépret F, Cambau E, Godreuil S, Chenouard R, Le Monnier A, Jacquier H, Berçot B. Microbiol Spectr. 2023 Feb 14;11(1):e0254722. doi: 10.1128/spectrum.02547-22. Epub 2022 Dec 15. PMID: 36519852
18. Multi-locus sequence typing and phylogenetics of Cryptococcus neoformans AD hybrids. Cogliati M, Chidebelu PE, Hitchcock M, Chen M, Rickerts V, Ackermann S, Desnos Ollivier M, Inácio J, Nawrot U, Florek M, Kwon-Chung KJ, Yang DH, Firacative C, Puime CA, Escandon P, Bertout S, Roger F, Xu J. Fungal Genet Biol. 2024 Feb;170:103861. doi: 10.1016/j.fgb.2023.103861. Epub 2023 Dec 19. PMID: 38128716
19. Caspofungin sequestration in a polyacrylonitrile-derived filter: Increasing the dose does not mitigate sequestration. Baud FJ, Jullien V, Desnos-Ollivier M, Lamhaut L, Lortholary O. Int J Antimicrob Agents. 2023 Dec;62(6):107007. doi: 10.1016/j.ijantimicag.2023.107007. Epub 2023 Oct 13. PMID: 37839719
20. Genetic diversity and microevolution in clinical Cryptococcus isolates from Cameroon. Sephton-Clark P, Temfack E, Tenor JL, Toffaletti DL, Loyse A, Molloy SF, Perfect JR, Bicanic T, Harrison TS, Lortholary O, Kouanfack C, Cuomo CA. Med Mycol. 2023 Dec 1;61(12):myad116. doi: 10.1093/mmy/myad116. PMID: 37952096
21. Painless Nodules on the Left Hand of a Kidney Transplant Recipient. Le Moulec T, Nyga R, Maes-Clavier C, Garcia-Hermoso D, Chouaki T, Titeca-Beauport D.Clin Infect Dis. 2023 Nov 11;77(9):1353-1355. doi: 10.1093/cid/ciad247.PMID: 37952121
22. A multicentre external quality assessment: A first step to standardise PCR protocols for the diagnosis of histoplasmosis and coccidioidomycosis. Wilmes D, Hagen F, Verissimo C, Alanio A, Rickerts V, Buitrago MJ.Mycoses. 2023 Sep;66(9):774-786. doi: 10.1111/myc.13603. Epub 2023 May 11.PMID: 37169736
23. Development and validation of a new quantitative reverse transcription PCR assay for the diagnosis of human sporotrichosis. Marques de Macedo P, Sturny-Leclère A, Freitas DFS, Ghelfenstein-Ferreira T, Gutierrez-Galhardo MC, Almeida MA, Rodrigues AM, Pautet T, Hamane S, Almeida-Paes R, Zancopé-Oliveira RM, Alanio A. Med Mycol. 2023 Jul 6;61(7):myad063. doi: 10.1093/mmy/myad063. PMID: 37491705
24. Successful Rezafungin Treatment of an Azole-Resistant Chronic Mucocutaneous Candidiasis in a STAT-1 Gain-of-Function Patient. Melenotte C, Ratiney R, Hermine O, Bougnoux ME, Lanternier F. J Clin Immunol. 2023 Aug;43(6):1182-1184. doi: 10.1007/s10875-023-01519-2. Epub 2023 May 29. PMID: 37247108
25. Cryptococcus neoformans Infections Differ Among Human Immunodeficiency Virus (HIV)-Seropositive and HIV-Seronegative Individuals: Results From a Nationwide Surveillance Program in France. Paccoud O, Desnos-Ollivier M, Cassaing S, Boukris-Sitbon K, Alanio A, Bellanger AP, Bonnal C, Bonhomme J, Botterel F, Bougnoux ME, Brun S, Chouaki T, Cornet M, Dannaoui E, Demar M, Desbois-Nogard N, Durieux MF, Favennec L, Fekkar A, Gabriel

*F, Gangneux JP, Guitard J, Hasseine L, Huguenin A, Le Gal S, Letscher-Bru V, Mahinc C, Morio F, Nicolas M, Rouges C, Cateau E, Persat F, Poirier P, Ranque S, Roosen G, Roux AL, Sasso M, Lortholary O, Lanternier F; French Mycoses Study Group. Open Forum Infect Dis. 2023 Dec 22;11(2):ofad658. doi: 10.1093/ofid/ofad658. eCollection 2024 Feb. PMID: 38344129*

*26. Reduction in mortality from HIV-related CNS infections in routine care in Africa (DREAMM): a before-and-after, implementation study. Mfinanga S, Kanyama C, Kouanfack C, Nyirenda S, Kivuyo SL, Boyer-Chammard T, Phiri S, Ngoma J, Shimwela M, Nkungu D, Fomete LN, Simbauranga R, Chawinga C, Ngakam N, Heller T, Lontsi SS, Aghakishiyeva E, Jalava K, Fuller S, Reid AM, Rajasingham R, Lawrence DS, Hosseinipour MC, Beaumont E, Bradley J, Jaffar S, Lortholary O, Harrison T, Molloy SF, Sturny-Leclère A, Loyse A; DREAMM Consortium.Lancet HIV. 2023 Oct;10(10):e663-e673. doi: 10.1016/S2352-3018(23)00182-0. PMID: 37802567*

*27. Bronchial aspirate obtained during bronchoscopy yields increased fungal load compared to bronchoalveolar lavage fluid in patients at risk of invasive aspergillosis and Pneumocystis pneumonia. Dellière S, Amar Y, Hamane S, Aissaoui N, Denis B, Bergeron A, Tazi A, Alanio A.Med Mycol. 2023 Dec 1;61(12):myad120. doi: 10.1093/mmy/myad120.PMID: 37996394*

*28. A Functional Polymorphism in IL-1B Is Associated With Immune Reconstitution Inflammatory Syndrome of Chronic Disseminated Candidiasis. Rammaert B, Bochud PY, Brunel AS, Wojtowicz A, Candon S, Gallego Hernanz MP, Lortholary O. Open Forum Infect Dis. 2023 Feb 14;10(3):ofad078. doi: 10.1093/ofid/ofad078. eCollection 2023 Mar. PMID: 36879623*

*29. Allergic fungal rhinosinusitis and eosinophilic mucin chronic rhinosinusitis: Differential diagnostic criteria. A two-center comparative study following STROBE methodology. Dubois A, Simon F, Alanio A, Guillonnet A, Kaci R, Herman P, Lecanu JB, Verillaud B. Eur Ann Otorhinolaryngol Head Neck Dis. 2023 Nov;140(6):267-270. doi: 10.1016/j.anorl.2023.10.007. Epub 2023 Oct 11. PMID: 37833161*

*30. Cryptococcal meningitis and cerebral vasculitis in a patient with primary intestinal lymphangiectasia: a case report. Mathurin M, Devatine S, Kopp-Derouet A, Guillonnet A, Alanio A, Lourenco N, Manda V, Delcey V, Molina JM, Sellier P. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2023 Oct;42(10):1263-1267. doi: 10.1007/s10096-023-04657-y. Epub 2023 Sep 5. PMID: 37668805*

*31. Multifocal cutaneous phaeohyphomycosis caused by Paraconiothyrium cyclothyrioides in an immunocompromised patient: A case report. Malaure C, Hoang S, Bagny K, Tauziède-Espariat A, Garcia-Hermoso D, Kamus L, Traversier N, Miltgen G, Garrigos T. J Dermatol. 2023 Jun;50(6):e179-e180. doi: 10.1111/1346-8138.16706. Epub 2023 Jan 5. PMID: 36601708*

*32. Re: 'Which trial do we need? Combination treatment of Pneumocystis jirovecii pneumonia in non-HIV infected patients' by Cornely et al. Desoubeaux G, Lemaignen A, Alanio A, Ehrmann S. Clin Microbiol Infect. 2023 Jun 14:S1198-743X(23)00279-3. doi: 10.1016/j.cmi.2023.06.004. Online ahead of print.PMID: 37321395*

*33. First case of subcutaneous cystic phaeohyphomycosis due to Phialophora chinensis in a kidney transplant recipient in Martinique. Pruvot C, Messagier AL, Garcia-Hermoso D, Lebailly F, Aglae C, Desbois-Nogard N.Med Mycol Case Rep. 2022 Dec 25;39:18-22. doi: 10.1016/j.mmcr.2022.12.003. eCollection 2023 Mar. PMID: 36620427*

*34. Performance of the beta-glucan test for the diagnosis of invasive fusariosis and scedosporiosis: a meta-analysis. Lamoth F, Nucci M, Fernadez-Cruz An Azoulay E, Lanternier F, Bremerich J, Einsele H, Johnson E, Lernbecher T, Mercier T, Porto L, Verweij P, White L, Maertens J, Alanio A, European Conference on Infections in Leukemia. Med Mycol 2023 Jul 6;61(7).DOI: 10.1093/mmy/myad061. PMID: 37381179*

*(iii)* ***Communications nationales***

*Marie Desnos-Ollivier Congrès Société Française de Mycologie Médicale (SFMM) Marrakech, Maroc, 24-27 mai 2023*

*Alexandre Alanio, Fanny Lanternier et Marie Desnos-Ollivier RICAI Paris, 18-19 décembre*

*(iv)* ***Communications internationales***

*Dea Garcia-Hermoso et Marie Desnos-Ollivier Trends in Medical Mycology TIMM Athènes, 19-23 octobre 2023*

*(v)* ***Conférences sur invitation***

*Olivier Lortholary et Alexandre Alanio ICCC Kampala, Uganda 5-8 janvier 2023*
*Alexandre Alanio Congrès Société Française de Mycologie Médicale (SFMM) Marrakech, Maroc, 24-27 mai 2023*
*Aude Sturny-Leclère PAMWG (Panafrican Mycology ISHAM working group), Nairobi, Kenya 30-31 mai 2023*
*Fanny Lanternier ECMID Copenhagen, 15-18 avril 2023*
*Dea Garcia-Hermoso Infocus Triple Frontera, Asuncion, Paraguay 13-19 juin 2023*
*Dea Garcia-Hermoso German Mycological Society, Lehesten, Allemagne 18 -21 septembre 2023*
*Fanny Lanternier et Alexandre Alanio Trends in Medical Mycology TIMM Athènes, 19-23 octobre 2023*

## 1.7 Coopération avec les laboratoires de santé animale, de sécurité sanitaire des aliments, environnementaux

Nous poursuivrons notre collaboration avec L'ANSES sur la détection des pathogènes fongiques dans les boues d'eaux usées afin de pouvoir se préparer le cas échéant à monitorer la présence de certains champignons dans certains bassins de populations.

Depuis 2023, nous collaborons plus activement avec deux vétérinaires spécialisés dans les infections fongiques animales (Jacques Guillot, laboratoire Oniris, Ecole Vétérinaire de Nantes ; Grégory Jouvion, Ecole Vétérinaire de Maisons-Alfort). En effet, ils ont rejoint le comité scientifique du CNRMA-IFI afin de nous faire part de leur expérience et pouvoir notamment détecter les éventuels risques de zoonoses fongiques. Ils ont participé à notre réunion annuelle SINFONI en faisant deux présentations orales.

## 1.8 Programme d'activité pour les années suivantes

Au cours de la prochaine année, nous allons pouvoir compléter le monitoring des données de la surveillance SINFONI de 2023, centraliser l'ensemble des souches et finaliser l'analyse des données qui permettra d'obtenir des données cliniques et biologiques complètes et consolidées.

Les années à venir vont permettre de poursuivre et optimiser la surveillance SINFONI avec les 60 centres avec des données plus en temps réel ainsi que la réception des souches d'infection.

Nous allons mettre en place de manière semestrielle une analyse des données pour suivre l'évolution temporelle et géographique des infections, des terrains sous-jacents ainsi que de la résistance aux antifongiques. Ceci sera réalisé en lien avec le laboratoire INuSUALe.

Sera également poursuivie l'étude des terrains spécifiques en particulier avec les nouvelles thérapeutiques (CAR T cells, anticorps bispécifiques,*etc*) ainsi que l'émergence d'espèces (sont actuellement surveillées *C. auris, C. haemulonii, Trichosporon austroamericanum sp. nov, Magnusiomyces clavatus* (syn. *Saprochaete clavata*)*).*

Nous réaliserons une nouvelle réunion annuelle avec l'ensemble du réseau SINFONI en décembre 2024.

Nous avons défini comme projets prospectifs avec le conseil scientifique

- une enquête flash, prévue à l'automne 2025, permettant la collecte, pendant un mois, des isolats des espèces fréquentes responsables d'IFI (*Aspergillus fumigatus, Candida albicans, Nakaseomyces glabratus (syn. Candida glabrata), C. parapsilosis, C. tropicalis, Pichia kudriavzevii (syn. Candida krusei), Clavispora lusitaniae).* Nous réaliserons la détermination des profils de sensibilité en technique standardisée EUCAST afin (i) de comparer les données de sensibilité obtenues par techniques commercialisées *vs.* Technique EUCAST, (ii) de confirmer les données obtenues précédemment concernant la proportion d'isolats résistants (iii) détecter d'éventuels phénomènes ou clusters de résistance. D'autres part le génotypage sera réalisé sur la majorité des isolats afin d'étudier la diversité génétique des espèces fréquentes parmi les isolats cliniques en France.
- des projets prospectifs nationaux sur les mucormycoses, les histoplasmoses et les candidémies à point de départ du cathéter en analysant les délais de pousse et différenciel de pousse (KT-périph) pour lequel une réunion de lancement a déjà été réalisée avec le comité de pilotage.

Nous réaliserons des réunions régulières de travail avec les vétérinaires pour la surveillance des zoonoses fongiques possibles ainsi qu'avec les médecins d'hygiènes hospitalière pour le suivi et l'analyse des infections fongiques liées au soin et leur prévention.

Nous allons également pouvoir continuer l'analyse les données épidémiologiques de 10 ans de surveillance RESSIF entre 2012 et 2022. Nous sommes en train de finaliser des analyses en cours et des projets spécifiques seront réalisées avec des centres collaborateurs.

Nous allons augmenter le nombre de souches investiguées en WGS incluant des souches *d'Aspergillus fumigatus* résistants aux azolés, des souches d'*Histoplasma capsulatum ;* des souches d'espèces rares de filamenteux (*Nannizziopsis obscura*), des souches d'espèces rares, émergentes et/ou résistantes de levures (*Trichosporon spp, C. parapsilosis…).* Ces analyses nous permettront d'étudier la diversité génétique de certaines espèces, certains gènes de résistance et d'effectuer des analyses phylogénétiques.

Maintenant les laboratoires associés mis en place nous allons continuer à travailler en collaboration sur les circuits d'alertes et de surveillance de la résistance.

## 1.9 Annexe 1 : Missions & organisation du CNRMA-IFI

### 1.9.1 Missions du CNR et de ses éventuels laboratoires associés

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

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

En ce qui concerne l'activité de surveillance, la diversité des genres et espèces fongiques en cause et la complexité des pathologies engendrées et des populations à risque compliquent le recueil des données. Nous continuons la surveillance passive de toutes les mycoses invasives, ainsi que la surveillance active via un nouveau réseau SINFONI mis en place au 1er janvier 2023 dont l'objectif est l'exhaustivité de déclarations aussi bien des pathogènes fongiques rares que fréquents. Nous avons ajouté un questionnaire pour la surveillance des infections et colonisations à *Candida auris,* disponible depuis septembre 2023. Ces surveillances sont microbiologiques et épidémiologiques.

### 1.9.2 Organisation du CNR et de ses éventuels laboratoires associés

En 2023, le CNRMA était rattaché directement au Département de Mycologie de l'Institut Pasteur, comprend un groupe de recherche intitulé Mycologie Translationnelle, et avait 3 laboratoires associés.

Le CNRMA-IFI ainsi que chaque laboratoire associé a détaillé les effectifs de personnels dans les chapitres « 1.1 ; 2.1 et 3.1 Missions et Organisation du CNR »

### 1.9.3 Locaux et équipements

Des locaux, ont été attribués au CNRMA-IFI dans le bâtiment Duclaux (rez de chaussée haut, aile Fourneau) au 28 rue du Dr. Roux. Ils comprennent pour l'année 2023 (Figure 20):

-Des locaux dédiés à l'activité du CNRMA-IFI : un laboratoire P2, 1 bureau séparé, 2 espaces de bureaux partagés, des placards fermés à clés pour les dossiers du CNR.
-Des locaux partagés avec le groupe de recherche Mycologie Translationnelle: un laboratoire P2 et un laboratoire P2+, 2 espaces de bureaux partagés, 1 bureau partagé pour le secrétariat avec la secrétaire du département Biologie Cellulaire et Infection.
-Des locaux partagés avec le CNR Listeria au même étage : pièce PCR, pièce d'incubateurs, pièce de pesée, ou dans le même bâtiment : chambre froide
-Des locaux partagés avec d'autres unités : pièce de congélateurs à -80°C, pièce de containers à azote (03SS01, batiment Sergent, pièce azote batiment 08), laboratoire P3, pièce MALDI-Tof
-Des locaux partagés avec d'autres structures impliquées dans le diagnostic (CIBU, les CNR Bordetella et Corynébactéries) et respectant la « marche en avant », situés à l'étage inférieur du même bâtiment.

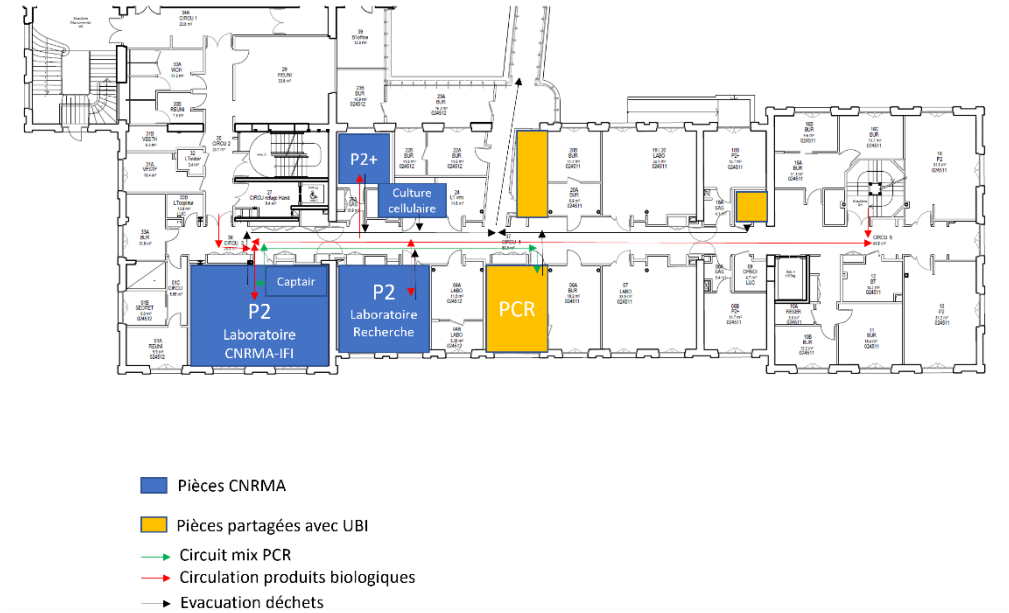



*Figure 20 : Principaux locaux d'activité du CNRMA-IFI, localisés dans le batiment Duclaux, aile Fourneaux, rez-de-chaussé haut au 28 rue du Docteur Roux, Institut Pasteur, Paris*

Les équipements principaux propres et/ou partagés comprennent :
-PSM2 et incubateurs à CO2, hottes chimiques
-Thermocycleurs (iCycler et C1000 de Bio-Rad et LCR480 de Roche)
-MagNAlyser
-Extracteur semi-automatique KingFisher
-QUBit (fluoromètre pour quantification d'ADN, ARN et protéines)
-Nanodrop 1000
-Caméras numériques, appareil photo Reflex
-Lecteur de plaques par spectrométrie (Tecan, Multiskan Go)
-Compteur de cellules (Luna)
-Microscopes : optiques, contraste interférentiel, inversé, à épifluorescence
-Loupe binoculaire
-Ordinateurs
-Containers d'azote
-Congélateurs à -20°C, à -80°C et réfrigérateurs
-Etuves et incubateurs agités et non agités
-Enceinte illuminée Memmert
-Bioscreen
-Cytométrie en flux (Guava)

Certains appareils nécessitent un étalonnage et/ou une maintenance régulières obligatoires effectuées par des sociétés extérieures dans le cadre de l'accréditation COFRAC (pipettes, congélateurs, réfrigérateurs, appareils de PCR, extracteur).

Certains appareils sont mutualisés avec l'unité de Biologie des Infections / CNR Listeria (Multitron Pro – INFORS, G:Box Syngène).
Les logiciels suivants sont utilisés sous licences propres pour :
-l'édition, l'analyse des séquences, la construction des arbres :Sequencher, Geneious, Bionumerics
-La gestion des bases de données microbiologiques, le monitoring des données cliniques: BioloMICS (BioAware®), Lagon et VOOZANOO® (EpiConcept)
-l'analyse statistiques des données épidémiologiques: Stata®
-l'analyse des données, la rédaction des articles, des rapports, des présentations, compte-rendu: GraphPrism, Adobe Acrobat, BioRender, ACDsee, EndNote

Des logiciels en accès libre sont également utilisés pour :
-l'analyse des séquences, la construction d'arbres :Galaxy, MEGA, IQTREE, Archeopteryx, iTol

-l'analyse des données de microsatellites : PeakScanner
-le monitoring des données de surveillance du réseau SINFONI: RedCap
-l'analyse statistiques des données épidémiologiques: R

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 le prestataire Eurofins Genomics à Cologne.
Le CNRMA bénéficie des "services" disponibles sur le campus de l'Institut Pasteur au sein de la Coordination des Centres Nationaux de Référence (CCR), des animaleries A2 et A3, la plateforme milieu de l'Institut Pasteur (préparation des tampons et milieux), la plateforme « matériels » et la plateforme de microbiologie mutualisée (P2M) pour le séquençage génome entier. Un spectromètre de masse Sirius de chez Burker pour le MALDI-TOF est également disponible. En cas d'urgence, le séquençage est assuré par le pôle de génotypage des pathogènes (PGP) de la CIBU (ABIPrism 3600).

### 1.9.4 Collections de matériel biologique

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

Ainsi, est exigée pour le transfert du matériel biologique et des données associées à des équipes extérieures, la mise en place a minima d'un accord de transfert de matériel biologique (MTA) ou d'un accord de collaboration selon la nature des interactions entre les deux parties.

**Collection des levures :**
La collection du CNRMA comprend ainsi des souches bien caractérisées appartenant à plus de 30 genres et plus de 110 espèces différents (1 à 3700 isolats/espèce) et se répartissant en :
•près de 6800 souches de nombreuses espèces de levures isolées d'hémocultures en région parisienne entre octobre 2002 et décembre 2022 dans le cadre de l'Observatoire des Levures, stockées congelées en glycérol 40% à -80°C, et depuis 2009 en glycérol 20% dans l'azote liquide.
•plus de 3900 souches de levures provenant d'autres sites profonds ou superficiels, stockées congelées à -20°C entre 2002 et 2006, à -80°C depuis 2007, et en double depuis 2009 dans l'azote liquide.
•plus de 3100 souches de *Cr. neoformans* provenant de la surveillance de la cryptococcose en France depuis 1991. Seules les souches reçues depuis 2001 ont été analysées comme décrit ci-dessus et stockées congelées. Les souches antérieures étaient initialement stockées dans l'eau distillée stérile à 4°C, mais ont été progressivement remises en culture et stockées à -80°C et dans l'azote liquide.
•S'y ajoutent des souches de référence (contrôle de qualité, souches types) importantes pour les activités d'expertise. Elles proviennent des collections internationales (ATCC, CBS) et sont conservées à -80°C. Elles ne peuvent être distribuées.

**Collection des champignons filamenteux :**
La collection comprend des souches appartenant à 102 genres et 383 espèces différents, (1 à 421 isolats/espèce) :
•près de 4200 souches d'origine clinique, y compris des souches de champignons dimorphiques stockées en laboratoire P3+ à -80°C
•auxquelles s'ajoutent des souches de référence ou des souches type provenant de diverses collections (CBS, ATCC, IP, NRRL) non distribuables.
Les isolats sont stockés à -80°C et dans l'azote liquide.

### 1.9.5 Démarche qualité du laboratoire

**Le CNR des Mycoses Invasives et Antifongiques** fait partie des Centres Nationaux de Référence placés sous la responsabilité de l'Institut Pasteur qui sont au nombre de 15. Ils sont organisés en multisite et constituent, avec la Cellule d'Intervention Biologique d'Urgence (CIBU), le Laboratoire de Référence et d'Expertise Multisite (LREMS). Le LREMS est sous démarche d'accréditation.

Cette accréditation répond à l'ordonnance du 13 janvier 2010 et à la loi du 30 mai 2013 relative aux activités de biologie médicale.
Le projet d'accréditation ISO 15189 de l'Institut Pasteur est une démarche dynamique pilotée par :

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

Les services supports de l'Institut Pasteur participent également à la démarche d'accréditation du LREMS en apportant les ressources nécessaires au bon déroulement des activités. Les services supports critiques sont régulièrement audités dans le cadre de leurs activités en interne mais également par les organismes de certification et d'accréditation.
Le LREMS est accrédité selon la norme ISO 15189 version 2012 sous le n° 8-2588, Examens Médicaux.
L'annexe d'accréditation ainsi que les sites et la portée sont disponibles sur le site du COFRAC www.cofrac.fr.
L'ensemble des CNR/CIBU participent annuellement à des contrôles externes de la qualité. Ceux-ci n'étant pas des programmes pérennes, lorsque ces CQE sont suspendus ou ne sont pas organisés annuellement, les CNR organisent/participent à des essais inter laboratoires avec des laboratoires homologues ou confrères européens ou mondiaux. Dans le cas où cette organisation est impossible, le CNR organise en interne des exercices à l'aveugle afin de maintenir les compétences du personnel et du laboratoire.

**L'année qualité 2023 du CNRMA-IFI** s'est organisée comme suit

| Etapes clés LRE-MS | Périodes de réalisation |
|---|---|
| Revue qualité 2023 | **4 mars 2024** |
| Revue de direction LREMS | 4 juillet 2023 |
| Audits internes qualité et technique | **4 décembre 2023** |
| Audit de surveillance S5 COFRAC | 14 au 17 novembre 2023 |
| Finalisation des dossiers de validation de méthode pour les extensions et les ajouts | NA |

Lors de l'évaluation COFRAC de novembre 2023, les évaluateurs ont accordé leur confiance au LREMS qui a démontré lors de son évaluation une réponse aux exigences qualité et techniques de la norme ISO 15189 v 2012.

**Perspectives 2024 :**
En 2024, le LREMS effectue sa transition vers la version 2022 de la norme ISO 15189. Un plan de transition a été établi par le service Qualité et il est déployé tout au long de l'année 2024 au sein des CNR.

| Etapes clés | Prévision de réalisation |
|---|---|
| Revues qualité LRE | Janvier-avril 2024 |
| Audits internes qualité et technique | Juin - décembre 2024 |
| Revue de direction LRE-MS | à planifier |
| Audi de surveillance COFRAC | Juin 2025 (demande faite au COFRAC sur le maintien de cette date. |

## 1.10 Annexe 2 : Capacités techniques du CNRMA-IFI

### 1.10.1 Liste des techniques de référence

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

- Identification phénotypique complète des levures et des champignons filamenteux avec profils protéiques par spectrométrie de masse, fermentation de certains sucres, croissance sur milieux spéciaux, réalisation de cultures "3 points", de cultures sur lames, détermination des vitesses et des températures maximales de croissance
- Détermination de la sensibilité aux antifongiques par une technique en milieu liquide standardisée par le comité européen (EUCAST). Les antifongiques testés sont le fluconazole (Triflucan®), l'itraconazole (Sporanox®), la 5-fluorocytosine (Ancotil®), l'amphotéricine B (Fungizone®), le voriconazole (V-fend®), le posaconazole (Noxafil®), l'isavuconazole (Cresemba®), la terbinafine (Lamisil®), la caspofungine (Cancidas®), et la micafungine (Mycamine®). A noter que le protocole standardisé est modifié pour la caspofungine pour les levures.
- Identification des isolats d'espèces communes de champignons par MALDI-TOF (Sirius Bruker)
- Extraction et dosage 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, hors espèces fréquentes de levures identifiées par MALDI-ToF, et, pour certaines espèces, séquençage d'autres loci (voir plus loin).
- Identification de *Candida dubliniensis* par PCR duplex en utilisant les amorces spécifiques d'une partie du gène de l'actine et les amorces universelles ITS1/ITS4 (**technique accréditée COFRAC selon la norme 15189**).
- Identification des espèces *S. clavata*, *M. capitatus* et *C. auris* par PCR en temps réel
- Génotypage par marqueurs microsatellites, ou MLST pour les espèces *C. albicans, C. glabrata, C. tropicalis, C. krusei, C.parapsilosis, C. auris, , M. capitatus, C. neoformans/C. gattii et A. fumigatus* :
- Pour *C. albicans*, 5 séquences microsatellites (CDC3, HIS3, EF3, STPK, CDR1), et les 7 loci MLST (AAT1a, ACC1, ADP1, MPIb, SYA1, VPS13, ZWF1)
    - Pour *C. glabrata*, 6 loci MLST (FKS1, LEU2, NMT1, TRP1, UGP1, URA3)
    - Pour C. *parapsilosis*, 4 séquences microsatellites (CP1, CP4, CP6, B5)
    - Pour *Aspergillus fumigat*us, 4 séquences microsatellites A, B, C et D
    - Pour *C. auris*, 12 marqueurs microsatellites (M2a,M1b,M2c, M3-Ia, M3-Ib, M3-Ic, M3-Iia, M3-IIb, M3-IIc, M9a, M9b, M9c)2
    - Pour *C. tropicalis*, 6 loci MLST (MDR1, XYR1, SAPT4, SAPT2, ZWF1a, ICL1)
    - Pour *Cr. neoformans*, sérotypage par PCR spécifiques (Pak1 et Gpa1)) et typage par la technique MLST (7 loci : CAP59, URA5, LAC1, IGS1, GPD1, PLB1 et SOD1 )
    - Pour *C. krusei*, 6 loci MLST (ADE2, LYS2, HIS3, LEU2, TRP1 et MPD1)
    - Pour *Cr.gattii*, 7 loci MLST (IGS1, CAP59, URA5, PLB1, GPD1, SOD1, LAC1)
- PCR diagnostique histoplasmose, coccidioidomycose, mucormycose, pneumocystose, fusariose, Cauris, Cryptococcus (site hôpital Saint-Louis du CNRMA)
- Détection des mutations dans le gène Cyp51A pour les isolats *d'A. fumigatus* résistants aux antifongiques azolés
- Détection des mutations dans le gène CYP51B pour les isolats *d'A. fumigatus* résistants aux antifongiques azolés (Mellado et al. 2001)
- Détection des mutations dans les gènes Fks pour les isolats *d'A.fumigatus* ayant un profil élevé à la caspofungine
- Détection des mutations dans le gène ERG11 pour les isolats de C. *parapsilosis* résistant au fluconazole
- Détection des mutations dans les gènes Fks pour les isolats de *C. albicans, C. glabrata, C. tropicalis, C. krusei, C. lusitaniae, C. dubliniensis, C. kefyr* ayant des profils de sensibilité anormaux pour les échinocandines.
- 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

### 1.10.2 Liste des techniques recommandées par le CNR

Nous nous sommes attachés depuis plusieurs années à améliorer l'identification phénotypique des champignons (ajout de nouveaux milieux, amélioration des images numériques, développement des cultures sur lame). Cette étape phénotypique est primordiale pour éviter les erreurs d'attribution de séquences déposées dans les banques publiques (on estime à au moins 20% les erreurs d'identification dans GenBank, et probablement plus pour les germes rares comme les champignons filamenteux). De plus, en raison des ambiguïtés non levées par les séquences ITS et 28S de l'ADNr généralement utilisées en taxonomie, nous avons multiplié, selon les genres étudiés, les gènes cibles et les amorces pour une identification moléculaire polygénique. Le Tableau 15 récapitule les principales cibles utilisées et les références correspondantes, sachant que certains genres nécessitent une analyse multigénique. Il faut aussi savoir que les changements taxonomiques rendent parfois difficiles les identifications. Il peut être utile pour suivre ces changements de se référer par exemple au site Index Fungorum (http://www.indexfungorum.org ). La base de données est consultable gratuitement en ligne et fournit la liste des espèces dans chaque genre, avec pour chacune d'elle le taxon correct, la citation d'auteur, la date et le support de publication, voire une image de celui-ci, ainsi qu'un rappel de la position de l'espèce dans la classification traditionnelle.

***Tableau 15 : Principales cibles et amorces utilisées pour l'identification de certains groupes fongiques***

| | | |
|---|---|---|
| ***Complexe d'espèces A. fumigatus*** | β-tubuline | Bt2a/ Bt2b[11] |
| ***Espèces d'Aspergillus autres que section Fumigati*** | β-tubuline | Bt2a/ Bt2b |
| | Calmoduline | CL1/CL2a[12] |
| ***Complexe d'espèces Fusarium spp*** | Factor d'élongation (TEF1-α) | EF1 / EF2[13] |
| | RNA polymerase II (RPB2) | 5F2/ 7CR[14] |
| ***Scedosporium* spp.** | β-tubuline | TUB-F/ TUB-R[15] |
| ***Phaeoacremonium* spp** | β-tubuline | T1 /Bt2b[16] |
| ***Sporothrix spp.*** | Calmoduline | CL1/CL2a |
| ***Trichoderma* spp.** | Factor d'élongation (TEF1-α) | EF1 / EF2 |
| **Coelomycètes** | β-tubuline | TUB2-F / TUB4-R[17] |
| ***Trichosporon* spp.** | IGS1 / ADNr | 26SF/5SR |
| ***Debaryomyces* spp.** | actine | CA21/CA15R**Erreur ! Signet non défini.** |
| ***Clavispora lusitaniae*** | actine | CA16mod/CA5[18] |
| ***Arthrographis* spp.** | actine | Act1/Act4R |
| **Complexe *M. guilliermondii*** | RPBI | |

**Diagnostic des mycoses endémiques**

La sérologie par électro-synérèse a définitivement été abandonnée par le CNRMA en raison de ses mauvaises performances en particulier chez le patient VIH. Il s'agissait d'une technique "maison" utilisant des réactifs (antigènes et sérums de référence) commercialisés qui sont de qualité inconstante, obligeant à des mises au point répétées lors des changements de lot. Par ailleurs, la reproductibilité des résultats, indépendamment de ces problèmes de réactifs, est très mauvaise. La contribution de la sérologie au diagnostic des mycoses exotiques est très faible. Ainsi, sur les 3500 sérologies enregistrées dans la base de données du CNRMA en 9 ans, moins de 8% étaient positives, mais avec de grandes différences en fonction du contexte clinique (<4% de positivité de la sérologie histoplasmose chez les patients VIH positif vs. 14% chez les sujets séronégatifs pour le VIH par

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

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

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

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

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

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

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

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

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 endémiques se fait sur échantillons frais ou fixés en routine au laboratoire expert site Saint-Louis. La technique permet la recherche sur le sang (tube EDTA), la moelle et tout autre liquide ou biopsie. Des lésions cutanées ou des ulcérations buccales peuvent être prélevées par écouvillonnage, les écouvillons secs ou dans un milieu de préservation peuvent être alors envoyés. Tout échantillon doit être envoyé à 4°C accompagné d'un mail

à cnrma@pasteur.fr ou d'une fiche de demande d'expertise au site SLS du CNRMA (fiche sur le site web du CNRMA-IFI) :

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

**Détermination de la sensibilité aux antifongiques des isolats de champignons pathogènes**
La réalisation et l'interprétation des techniques disponibles ne sont pas évidentes. En effet, les techniques standardisées en Europe (EUCAST) ou aux Etats-Unis (CLSI) ne sont pas commercialisées et sont de réalisation difficile en routine. 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).

La meilleure solution est toujours de bien identifier l'espèce, car les CMI des isolats sauvages d'une espèce donnée ont une distribution particulière à l'espèce. Il faut donc considérer qu'en l'absence de pression antifongique, les isolats d'une même espèce ont un profil sauvage.

# 2. CNRMA-LABORATOIRE ASSOCIE INUSUALE

## RESUME ANALYTIQUE - FAITS MARQUANTS

Le CNRMA-Laboratoire associé INuSuAle est un laboratoire associé au CNR Mycoses et Antifongiques. Il a été créé en 2023. Ses principales missions comprennent des activités de surveillance et d'alerte épidémiologique, d'expertise et de conseil.
L'ensemble des activités développées par le CNRMA-Laboratoire associé INuSUAle repose sur l'identification numérique en ligne des agents fongiques à partir de leur spectre de masse MALDI-ToF à l'aide d'une application appelée MSI-2 (*mass spectrometry identification*) utilisée à ce jour par plus de 250 utilisateurs dans le monde dont 95 sont répartis sur le territoire national, métropole et outre-mer. En plus du service rendu aux laboratoires utilisateurs qui ont accès à une identification rapide, fiable, gratuite et plus précise que celles permises par les constructeurs de spectromètre de masse, l'utilisation de MSI-2 dans le cadre du CNR INuSuAle permet de générer des données et de développer un système de surveillance épidémiologique basée sur les résultats d'identification obtenus, d'aider à la constitution de cohortes pour étudier des espèces fongiques rares ou d'identification difficile et de contribuer à la réponse aux alertes.
En 2023, plus de 146 000 identifications d'agents fongiques ont été obtenues grâce à MSI-2 par les laboratoires membres du réseau du CNR INuSuAle. Ces derniers sont des laboratoires de microbiologie de centres hospitaliers, des laboratoires de mycologie de centre hospitaliers universitaires, des laboratoires d'analyse de biologie médicale privés ou des laboratoires vétérinaires.
En 2023, année qui servira de référence puisqu'elle correspond à la création du CNR INuSuAle, les pathogènes fongiques banals et les pathogènes fongiques à risque d'émergence ou présentant des profils de résistance contraignant les autorités sanitaires à une vigilance accrue sont demeurés à des niveaux d'identification stables dans le temps et l'espace sur l'ensemble du territoire national.

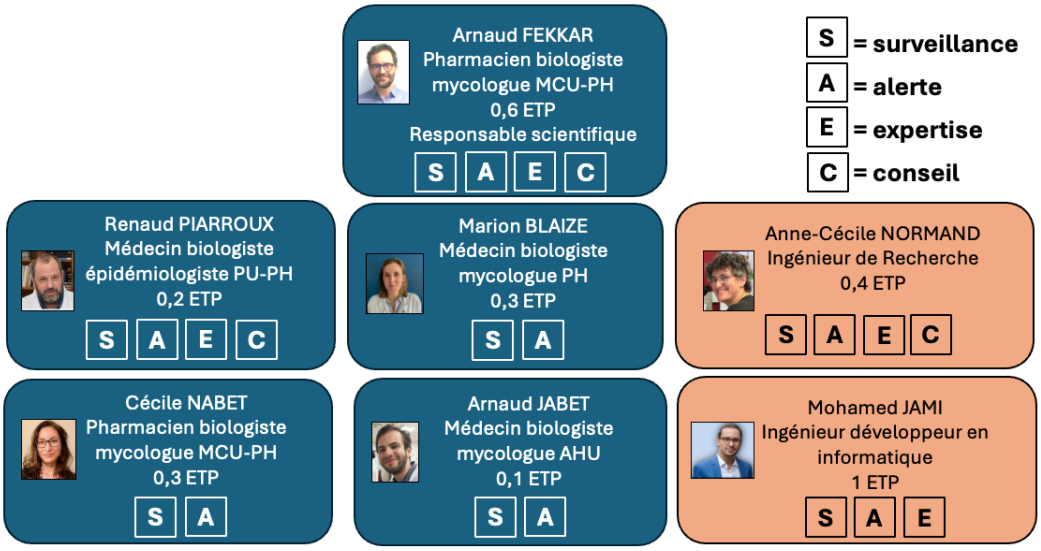
## EXECUTIVE SUMMARY - HIGHLIGHTS

The National Reference Center INuSuAle is a laboratory created in 2023 and associated with the NRC Invasive Mycosis and Antifungal. Its main missions include epidemiological surveillance and alert, expertise and consultancy.
All the activities developed by the NRC INuSUAle are based on the on-line digital identification of fungal agents based on their MALDI-ToF mass spectrum, using an application called MSI-2 (mass spectrometry identification) developed by the NRC team and currently used by over 250 users worldwide, 95 of whom are located in France (metropolitan and overseas). In addition to the service provided to user laboratories, which have access to rapid, reliable and free identification that is more precise than that provided by mass spectrometer manufacturers, the use of MSI-2 within the NRC enables data to be generated and an epidemiological surveillance system to be developed based on the identification results obtained, to help build cohorts to study rare fungal species or those difficult to identify, and to contribute to the response to alerts.
In 2023, over 146,000 identifications were obtained thanks to MSI-2 for member laboratories of the NRC INuSuAle network. These include hospital microbiology laboratories, teaching hospital mycology laboratories, private medical biology analysis laboratories and veterinary laboratories.
In 2023, a benchmark year since it corresponds to the creation of CNR INuSuAle, common fungal pathogens have remained stable over the months. Fungal pathogens at risk of emergence, or with resistance profiles requiring heightened vigilance on the part of health authorities, remained at stable levels of identification throughout France.

## 2.1 Missions et organisation du CNRMA-Laboratoire Associé INuSuAle

### ORGANIGRAMME

**ORGANIGRAMME DU CNR « INuSuAle »**




### MISSION ET ORGANISATION

Les missions du CNRMA-LA INuSuAle comprennent des activités de surveillance, d'alerte, d'expertise et de conseil. Les activités d'expertise et de conseil sont centrées sur l'identification numérique en ligne des agents fongiques à partir de leur spectre de masse MALDI-ToF à l'aide d'une application appelée MSI-2 (*mass spectrometry identification*) utilisée à ce jour régulièrement par 95 utilisateurs répartis sur le territoire national (métropole et outre-mer). Les données générées permettent de développer un système de surveillance épidémiologique basée sur les résultats d'identification obtenus, d'aider à la constitution de cohortes pour étudier des espèces fongiques rares ou d'identification difficile, et enfin de contribuer à la réponse aux alertes.

### DEMARCHE QUALITE

Le CNRMA-Laboratoire associé INuSUAle est situé dans le périmètre du service de Parasitologie-Mycologie de l'Hôpital de La Pitié-Salpêtrière. Ce service est accrédité pour toutes les familles d'analyses ayant trait aux actes de mycologie médicale. Des visites du COFRAC sont régulièrement effectuées ; la prochaine est planifiée pour la deuxième quinzaine du mois d'octobre. L'accréditation est réalisée selon la norme ISO 15189 dans le cadre de l'accréditation du Pôle de biologie du CHU La Pitié-Salpêtrière sous la supervision du Dr Feriel Touafek, responsable assurance qualité dans le service. Le laboratoire de Parasitologie-Mycologie de l'hôpital de La Pitié-Salpêtrière a été confirmée dans son accréditation pour les méthodes reconnues, adaptées ou développées (portée B) pour la recherche et l'identification d'agents fongiques en microscopie optique, culture, spectrométrie de masse et biologie moléculaire. N° accréditation COFRAC : 8-3253, portée flexible. Date de validité du 01/05/2023 au 31/03/2028 : liste des sites et portées disponibles sur le site du Cofrac - https://www.cofrac.fr.

## 2.2 Activités d'expertise

**Ne mentionnez ici que les évolutions intervenues lors de l'année N**
*Rappelez en quelques lignes dans un encadré les éléments clefs de l'année en termes de production d'expertise*

**Présentez en annexe 2 la description des techniques disponibles au CNR**
(*telles que décrites dans le dossier de candidature déposé en début de mandat ou dans le rapport précédent*).
.

L'expertise du CNRMA-Laboratoire associé INuSuAle consiste à rendre l'identification d'un agent fongique à partir d'un spectre de masse soumis à l'application MSI-2 par le laboratoire partenaire. Cette expertise est produite en temps réel pour l'ensemble des utilisateurs.
En 2023, 95 laboratoires ont utilisé l'application pour un total de 146 748 spectres identifiés dont 75 972 filamenteux et 50 111 levures, le reste étant des identifications de dermatophytes.

### 2.2.1 Evolution des techniques

Listez ici les nouvelles techniques développées ou en développement.

### 2.2.2 Travaux d'évaluation des techniques, réactifs et trousses

Décrivez ici brièvement les techniques / réactifs / trousses évalués, les méthodes employées, l'état d'avancement de ces travaux et le cas échéant les principaux résultats ou renvois vers une publication.

### 2.2.3 Techniques transférées vers d'autres laboratoires

Les missions du CNRMA-Laboratoire associé INuSuAle n'impliquent pas de transfert de techniques.
Nous répondons aux besoins des laboratoires rencontrant des difficultés pour l'identification des agents fongiques par spectrométrie de masse. Des tutoriels sont à disposition en lignes pour les aspects techniques.

### 2.2.4 Collections de matériel biologique

Les missions du CNRMA-Laboratoire associé INuSuAle n'incluent pas de collections de matériel biologique.

### 2.2.5 Activités d'expertises

L'expertise est produite en temps réel pour l'ensemble des utilisateurs.
En 2023, 95 laboratoires ont utilisé l'application pour un total de 146 748 spectres identifiés dont 75 972 filamenteux et 50 111 levures, le reste étant des identifications de dermatophytes.

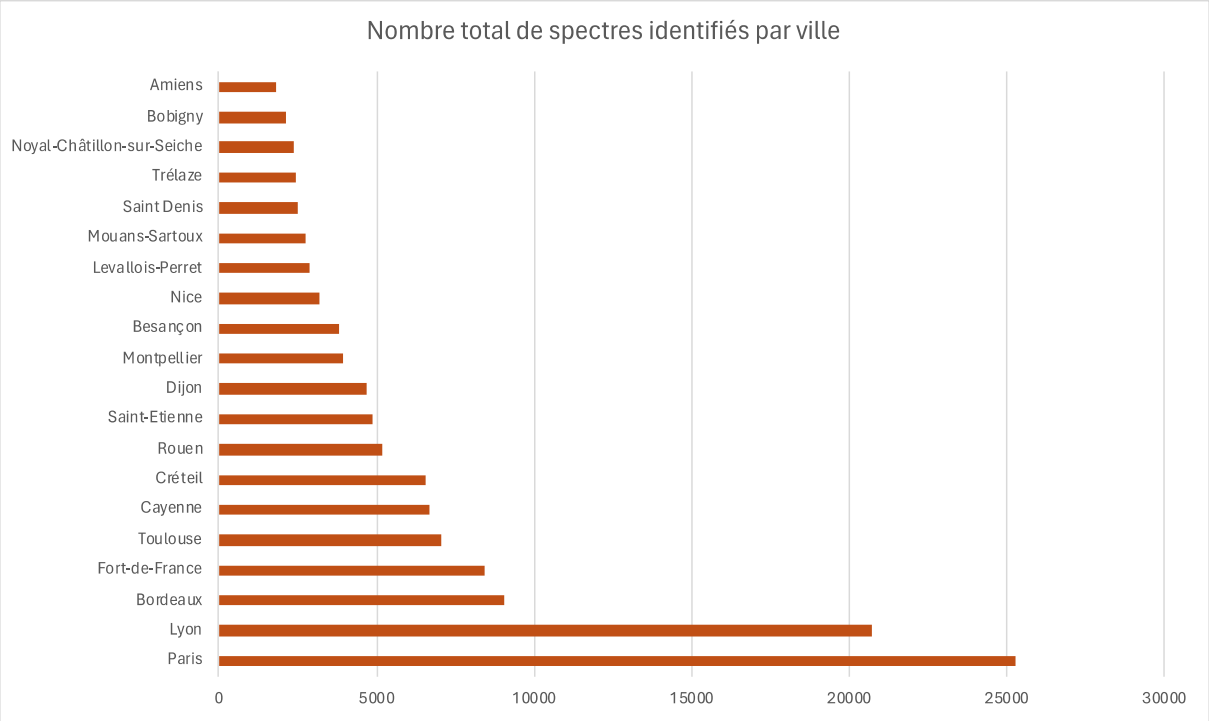



Figure 1 : nombre de spectre de masse correspondant à l'identification de pathogènes fongiques (levure et filamenteux hors dermatophytes) entre le 1er janvier et le 31 décembre 2023 ; analyse par ville pour les 20 villes ayant produit le plus d'identification

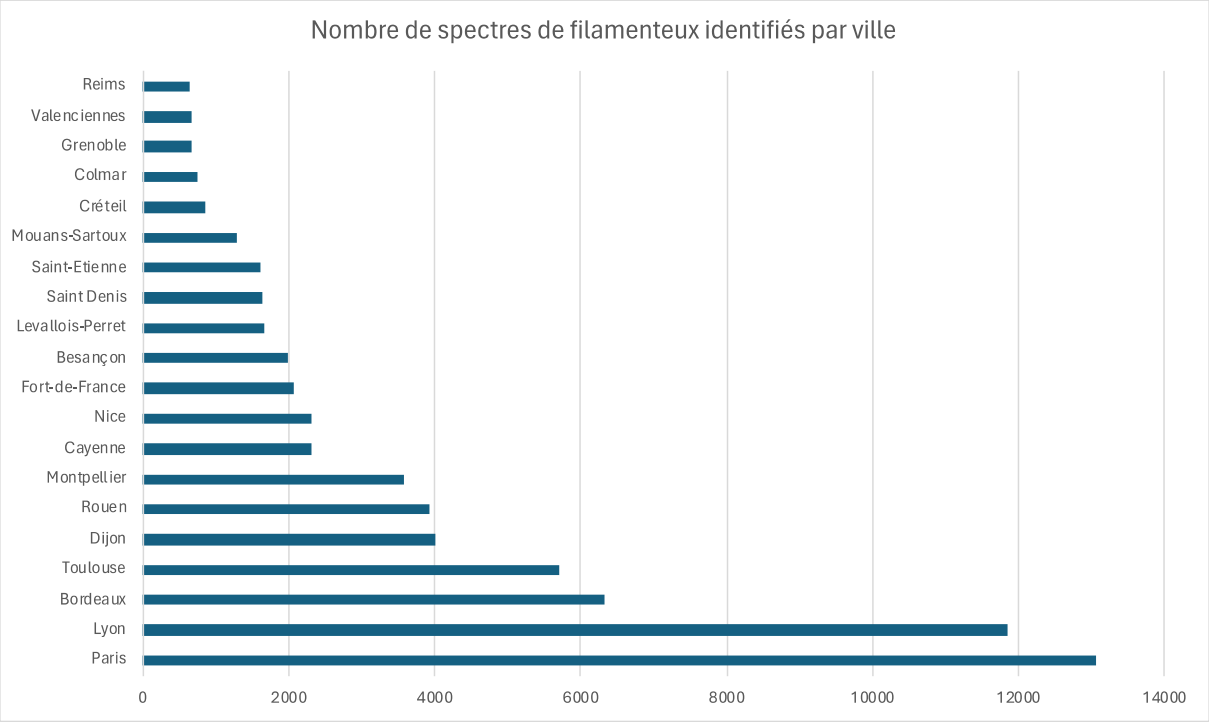



Figure 2 : nombre de spectre de masse correspondant à l'identification de pathogènes fongiques filamenteux (hors dermatophytes) entre le 1er janvier et le 31 décembre 2023 ; analyse par ville pour les 20 villes ayant produit le plus d'identification

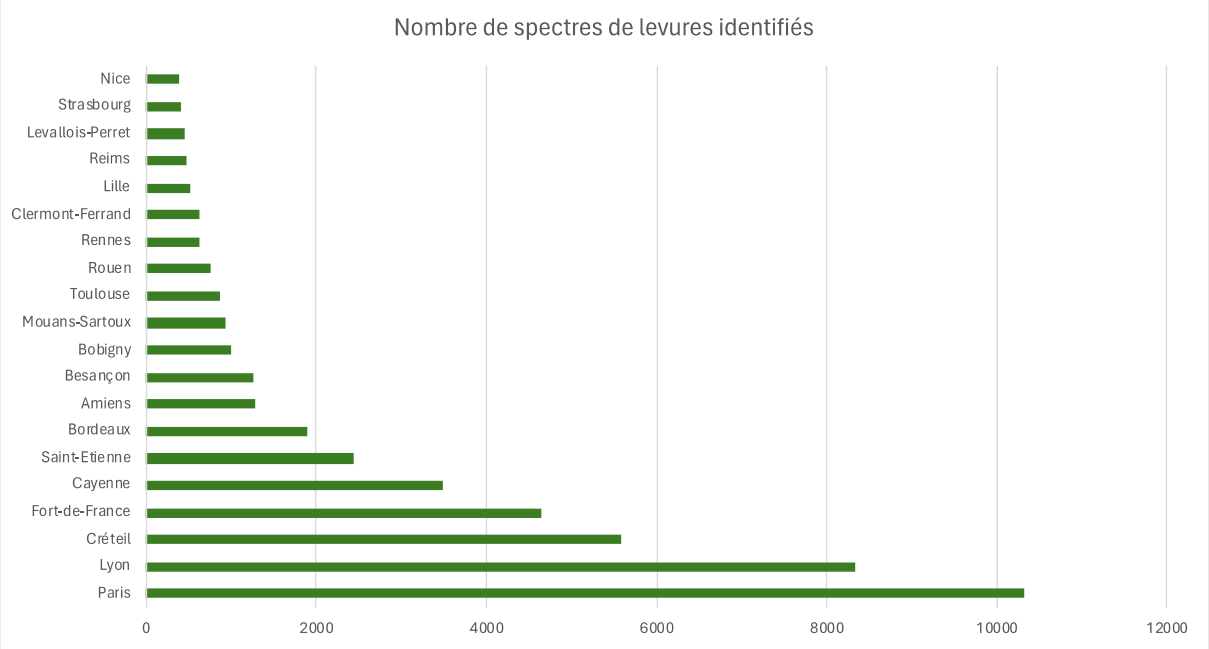



Figure 3 : nombre de spectre de masse correspondant à l'identification de levures entre le 1er janvier et le 31 décembre 2023 ; analyse par ville pour les 20 villes ayant produit le plus d'identification

### 2.2.6 Activités de séquençage

**Les missions du CNR INuSuAle n'impliquent pas d'activités de séquençage**

## 2.3 Activités de surveillance

**Éléments clefs de 2023 en termes de surveillance**

En 2023, plus de 146 000 identifications d'agents fongiques ont été obtenues grâce à MSI-2 par les laboratoires membres du réseau du CNRMA-Laboratoire Associé INuSuAle. Ces derniers sont des laboratoires de microbiologie de centres hospitaliers, des laboratoires de mycologie de centre hospitaliers universitaires, des laboratoires d'analyse de biologie médicale privés ou des laboratoires vétérinaires.
Les pathogènes fongiques banals et les pathogènes fongiques à risque d'émergence ou présentant des profils de résistance contraignant les autorités sanitaires à une vigilance accrue sont demeurés à des niveaux d'identification stables dans le temps et l'espace sur l'ensemble du territoire national.

### 2.3.1 Description du réseau de partenaires

Les utilisateurs produisant le plus d'analyses (en nombre de spectres identifiés) sont les laboratoires spécialisés en mycologie médicale des CHU (85,5%) puis les laboratoires d'analyses de biologie médicales d'exercice libéral (7,3%), suivi des laboratoires de microbiologie polyvalents des hôpitaux ou structures hospitalière à but non lucratif (6,6%). Le reste (0,6%) correspond à une activité de biologie vétérinaire.

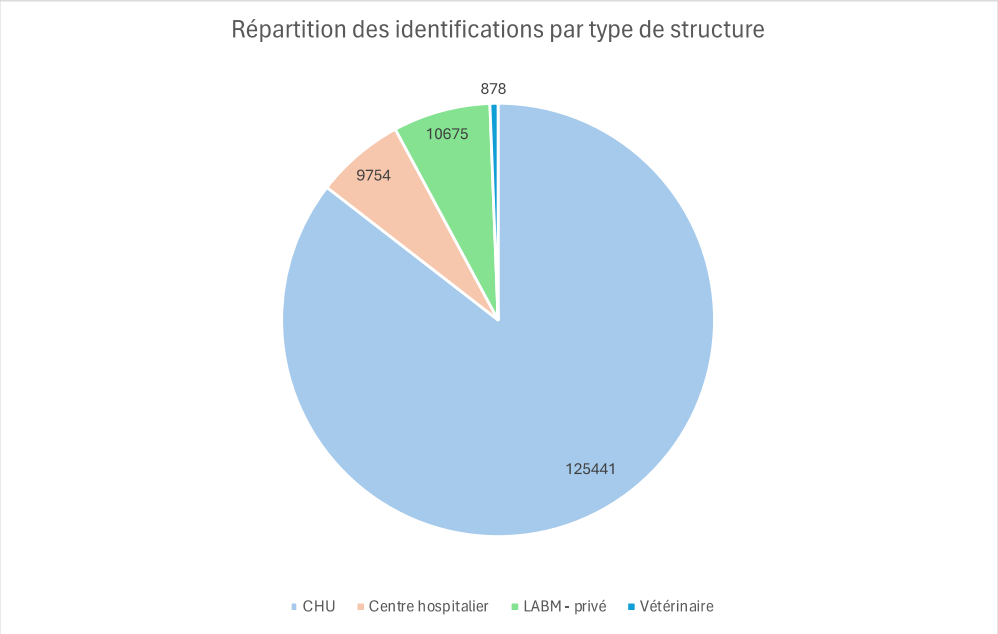



Figure 4 : répartition des laboratoire membres du CNR INuSuAle par type d'activité

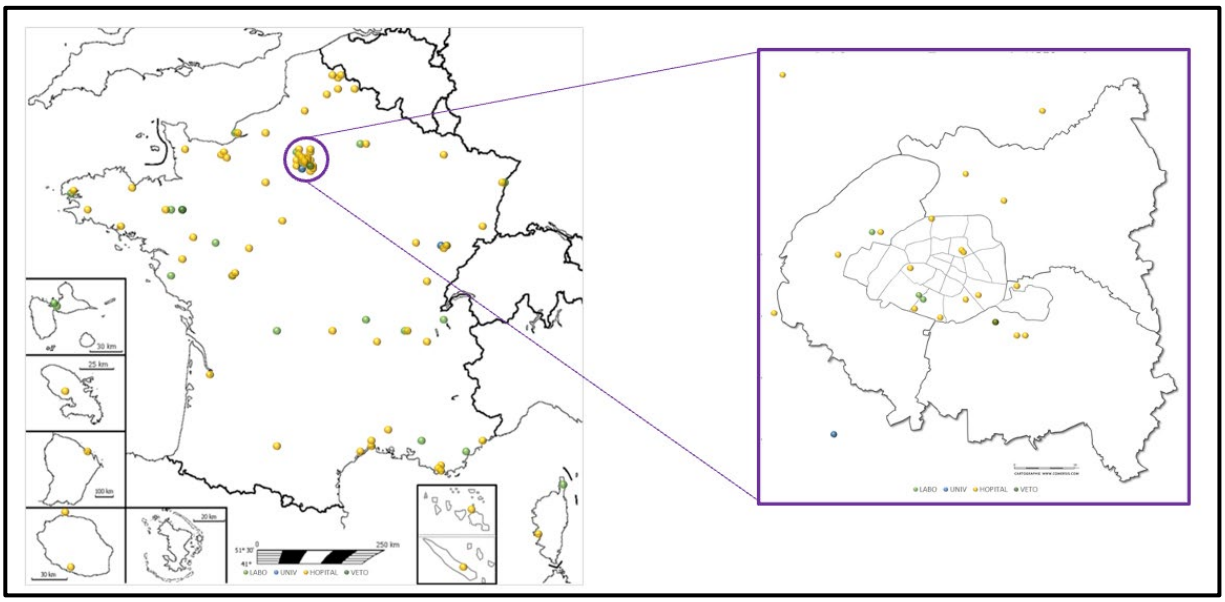


Figure 5 : répartition territoriale des 95 laboratoires partenaires du CNR INuSUAle utilisant la spectrométrie de masse MALDI-TOF couplée à l'utilisation de l'application MSI-2 pour l''identification des pathogènes fongiques

Pour sa création, le réseau de surveillance d'INuSuAle comprend 95 utilisateurs répartis au sein de laboratoires de microbiologie de centres hospitaliers, de laboratoire de mycologie de centre hospitaliers universitaires, de laboratoire d'analyse de biologie médicale privés et de laboratoires vétérinaires.

En 2023, un sondage nous a permis de mieux cerner les utilisateurs par type d'activités.

Les utilisateurs se répartissent en utilisateurs réguliers et en utilisateurs occasionnel. La couverture épidémiologique va dépendre de l'utilisation que fait chaque utilisateur de la spectrométrie de masse pour d'identification des divers pathogènes fongiques ; avec deux variables principales : 1. La nature de l'agent pathogène : levures ou champignon filamenteux et 2. L'exhaustivité des agents fongiques identifiés par MSI-2, sachant que d'autres méthodes d'identification restent utilisées par les centres (base de données MALDI-TOF « constructeur », macro-microscopie, milieu chromogène, séquençage moléculaire).

Parmi les membres du réseau, une douzaine de centres sont des utilisateurs réguliers qui privilégient une approche plus exhaustive de l'utilisation de MSI-2 (Figure 6).

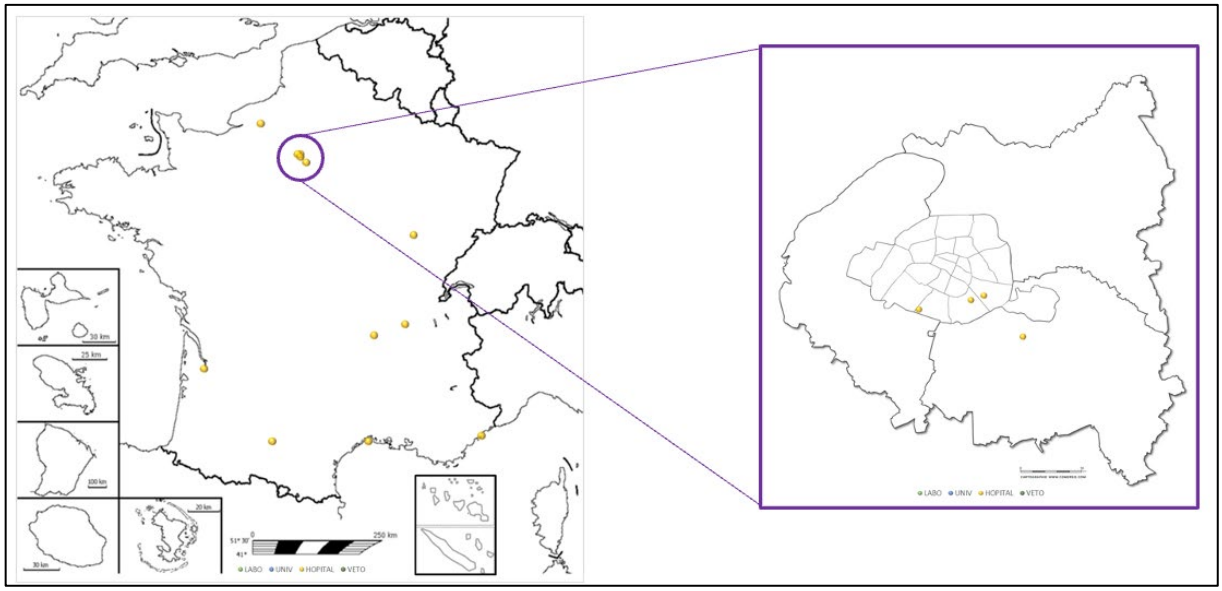


Figure 6 : répartition territoriale des 12 laboratoires de mycologie de CHU partenaires du CNR INuSUAle et ayant une activité large et régulière d'identification des pathogènes fongiques par spectrométrie de masse MALDI-TOF couplée à l'utilisation de l'application MSI-2

### 2.3.2 Surveillance de l'évolution et des caractéristiques des infections

A ce jour, les missions du CNR INuSuAle n'impliquent pas la collecte des données patients tels que âge, sexe ou type d'infection

De façon globale, nous proposons des analyses de données par spectre.
Pour les centres qui ont une utilisation large à exhaustive, nous sommes en mesure de réaliser une analyse par isolats en « dédoublonnant » les spectres.
Pour 2023, nous pouvons obtenir pour deux laboratoires (CHU Bordeaux et CHU La Pitié-Salpêtrière) des données plus précises qui incluent la nature du prélèvement à partir duquel le champignon est isolé. Cela est possible grâce à un système de codage consistant en un mnémonique ajouté au numéro de dossier du spectre.

**Surveillance des principaux pathogènes fongiques filamenteux**

**Aspergillus spp.**

Une analyse globale des spectres soumis montre un nombre relativement stable et homogène des *Aspergillus* spp identifiés sur le territoire national, avec néanmoins un pic en octobre et un creux en avril / mai (Figure 7). Le genre *Aspergillus* est dominé par la section *Fumigati*, puis les sections *Flavi* et *Nigri*. Parmi les *Fumigati*, on observe une nette prédominance d'*Aspergillus fumigatus stricto sensu* et une minorité d'espèce présentant naturellement un profil de sensiblité altérée tels que *A. lentulus*, *A. udagawae* ou *A. hiratsukae* (Figure 8). La section *Flavi* est quant à elle dominée par l'espèce *A. flavus* (Figure 9).

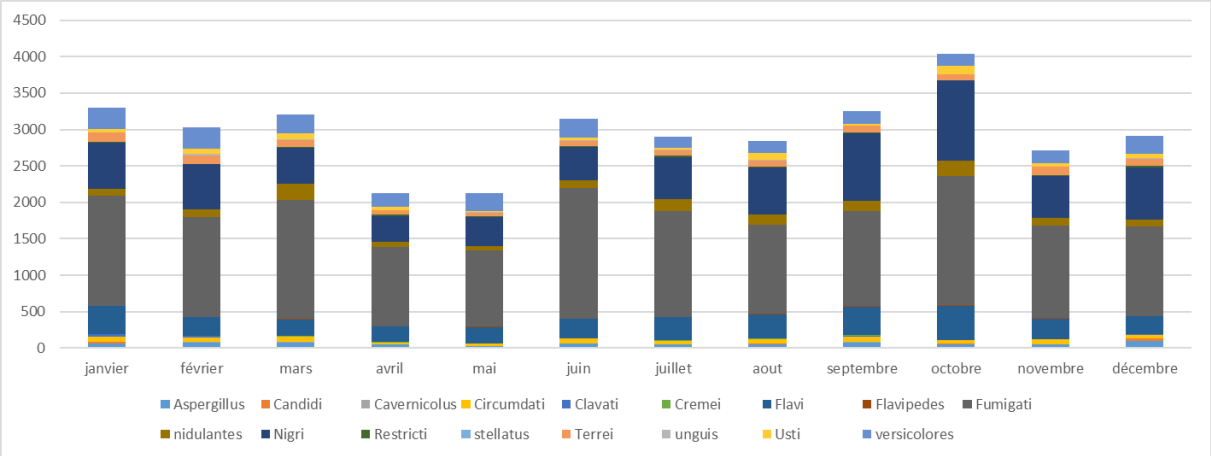



Figure 7 : nombre de spectres de masse et répartition par section des *Aspergillus spp*. identifiés (score > 20) entre janvier 2023 et décembre 2023 par l'ensemble des laboratoires du réseau du CNR INuSuAle

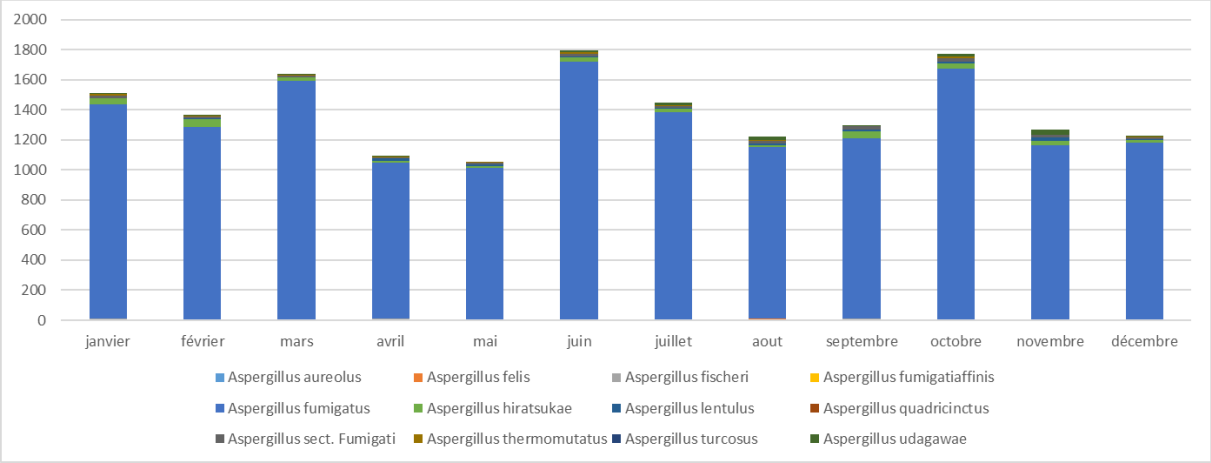



Figure 8 : nombre de spectres de masse et répartition par espèce des *Aspergillus* section *Fumigati* identifiés (score > 20) entre janvier 2023 et décembre 2023 par l'ensemble des laboratoires du réseau du CNR INuSuAle

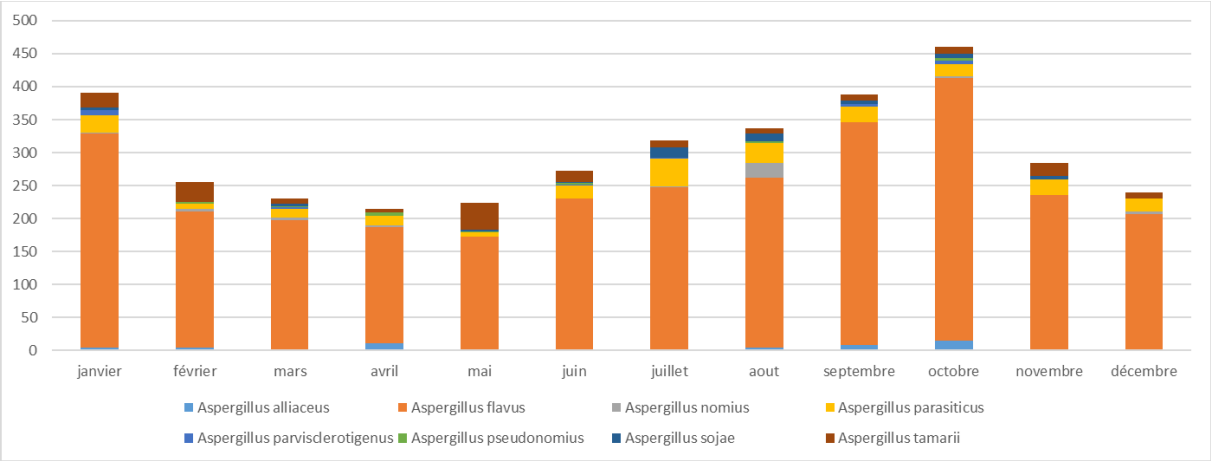



Figure 9 : nombre de spectres de masse et répartition par espèce des *Aspergillus* section *Flavi* identifiés (score > 20) entre janvier 2023 et décembre 2023 par l'ensemble des laboratoires du réseau du CNR INuSuAle

## Mucorales

A l'échelle globale (analyse par spectre), on observe une grande diversité avec une prépondérance de deux espèces : *Mucor circinelloides* et *Rhizopus arrhizus*.

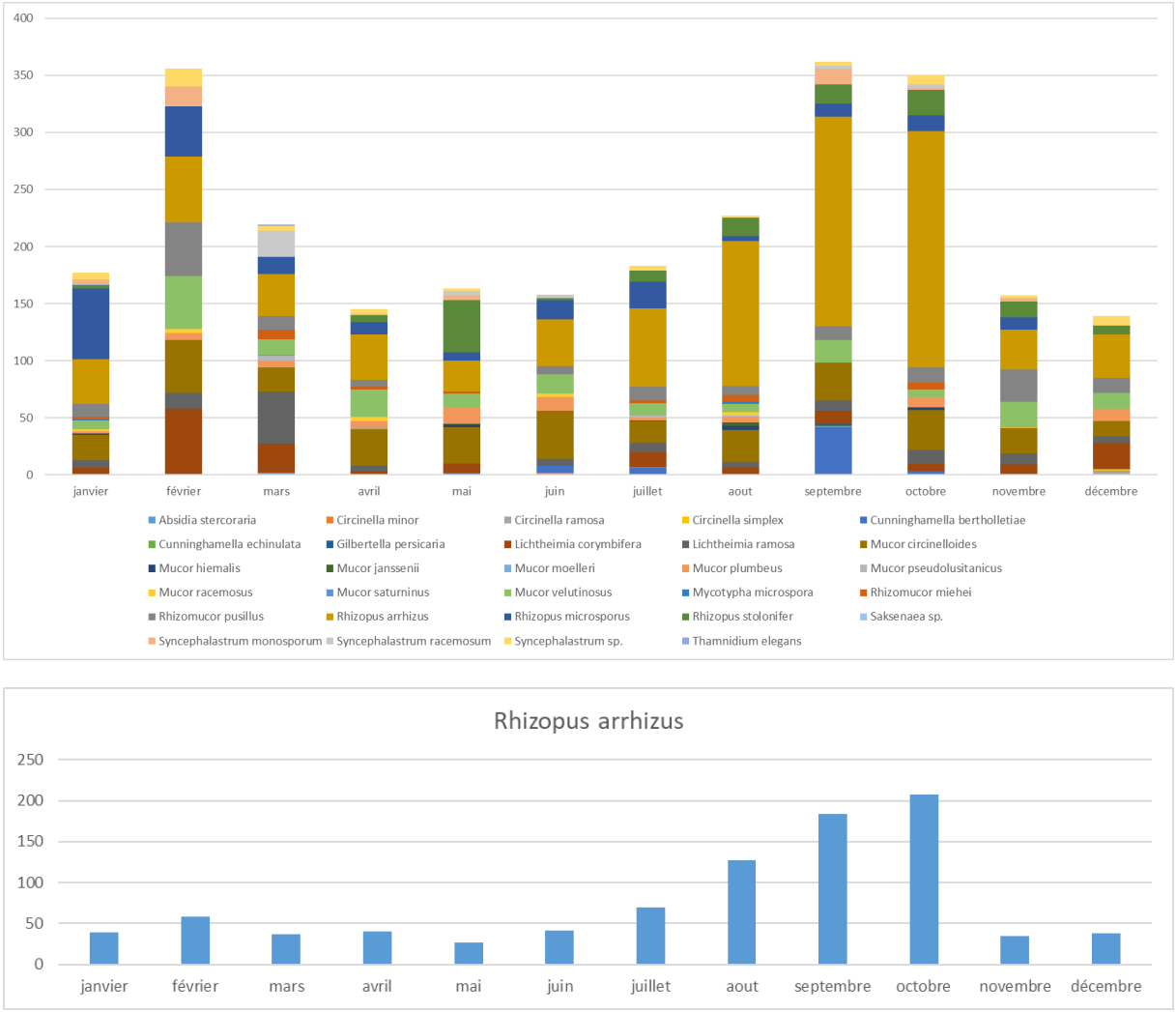






Figure 10 : A. Nombre de spectres de masse et répartition par genre et espèce des pathogènes fongiques de l'ordre des Mucorales identifiés entre janvier 2023 et décembre 2023 par l'ensemble des laboratoires du réseau du CNR INuSuAle. B. Nombre de spectres de masse pour l'espèce *Rhizopus arrhizus* sur la même période.

Nous confirmons un phénomène déjà observé antérieurement par notre équipe, à savoir un phénomène marqué de saisonnalité pour *Rhizopus arrhizus* qui présente un pic d'identification en septembre-octobre, et qui n'est pas observé pour les autres espèces de *Mucorales*.

Ces données sont superposables aux données consolidées des 12 centres utilisateurs réguliers obtenues en dédoublonnant les spectres (Figure 11).

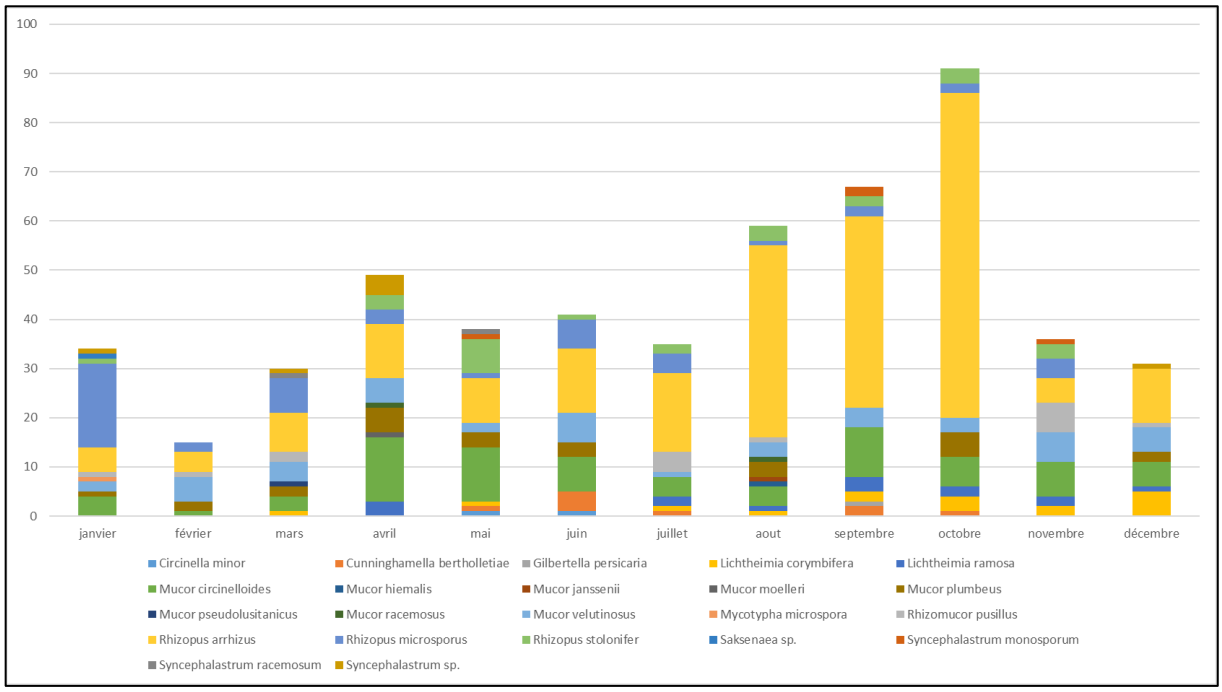



Figure 11 : nombre d'isolats et répartition par genre et espèce des pathogènes fongiques de l'ordre des Mucorales identifiés entre janvier 2023 et décembre 2023 par les 12 laboratoires collaborateurs réguliers du réseau du CNR INuSuAle.

**Surveillance des pathogène émergents de la famille des *Metchnikowiaceae***

Cette famille appartient au clade CTG et comprend des espèces actuellement sous surveillance en raison de leur capacité à produire des cas groupés ou à acquérir plus facilement que les autres espèces des résistances aux antifongiques. Les espèces d'importance en pathologie humaine sont *Clavispora lusitaniae,* les epsèces du clade « Haemulonii » (*Candida haemulonii*, *C. duobushaemulonii*, *Candida haemulonii var. vulnera*, *C. pseudohaemulonii*), *Candida vulturna* et les différents clades de *Candida auris.*

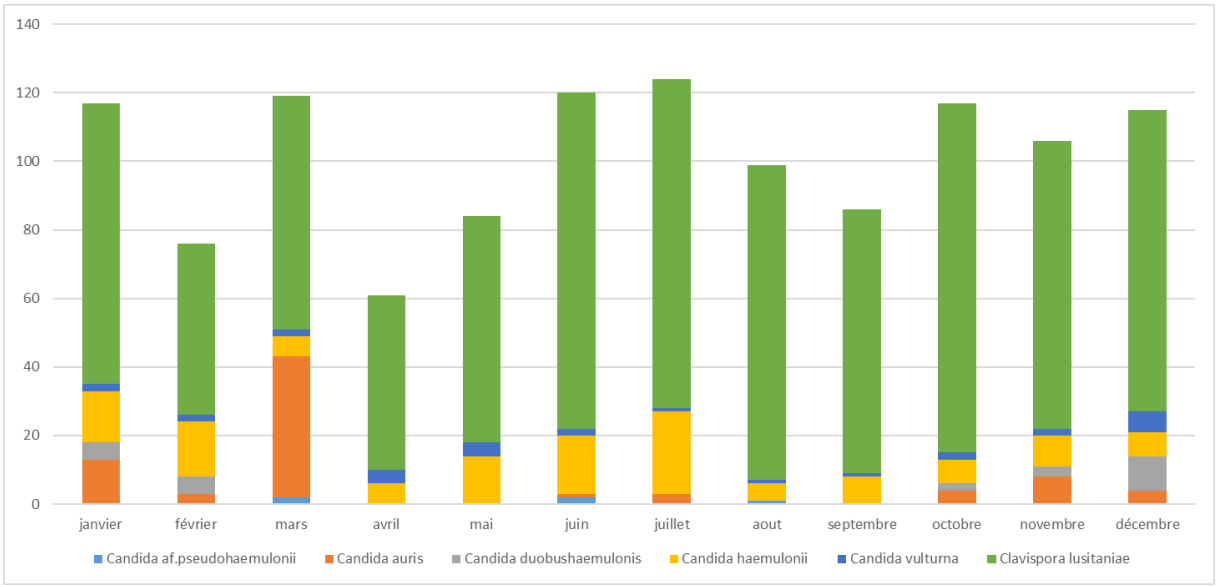



Figure 12 : nombre d'isolats et répartition par genre et espèce des pathogènes fongiques de la famille des *Metchikowiaceae* identifiés entre janvier 2023 et décembre 2023 par les laboratoires du réseau du CNR INuSuAle.

Ce groupe de pathogènes est dominé par *Clavispora lusitaniae*. Pour l'année 2023, on n'observe pas d'augmentation particulière dans l'identification de l'une ou l'autre des espèces de la famille des *Metchnikowiaceae*.

La présence d'un plus grand nombre d'identification pour *Candida auris* correspond, renseignements pris auprès des centres impliqués, à des activités hors routine et non à l'isolement d'un *C. auris* dans les prélèvements d'un patient.

Par ailleurs, il existe une répartition géographique propre à certaines espèces qui sont plus volontiers isolées dans les Caraïbes. Ainsi, *C. haemuloni* est principalement identifié à Cayenne et en Martinique (Figure 13). De même, l'espèce *C. vulturna* qui présente des CMI très élevées aux différents antifongiques de la classe des azolés ainsi qu'à l'amphotéricine B est quasi-exclusivement retrouvée dans cette zone géographique.

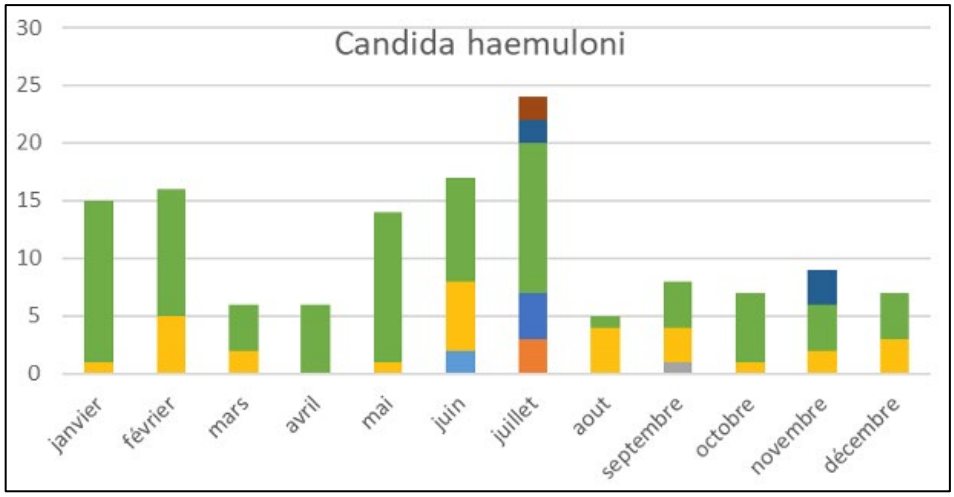



Figure 13 : identification de *C. haemuloni* entre janvier 2023 et décembre 2023. Vert : CHU de Cayenne : Jaune : CHU de la Martinique.

### 2.3.3 Surveillance de la résistance des agents pathogènes aux anti-infectieux

Le CNRMA-Laboratoire associé INuSuAle assure la surveillance des espèces naturellement résistante. Des développements sont en cours pour tenter d'identifier par une méthode couplant analyse de spectre de masse couplée à des approches d'intelligence artificielle (*deep learning*) des profils de masse correspondant à des résistances acquises par des espèces habituellement sensibles.

### 2.3.4 Interfaces avec les réseaux de surveillance nationaux ou internationaux

Nous collaborons avec le BCCM/IHEM : Belgian Coordinated Collections of Micro-organisms / Instutute of Hygiene and Epidemiology-Mycology Laboratory (Belgique) dans le cadre du développement de la base MSI-2 pour l'identification des spectres de masses issus de champignons. Cette collaboration fait l'objet d'une convention de partenariat signée par SCIENSANO, Sorbonne Université, INSERM et APHP.
Nous collaborons avec le CDC, le laboratoire de référence en mycologie d'Espagne (Centre National pour la Microbiologie, Institut de Santé Carlos III, Madrid) pour le partage d'isolats fongiques présentant des mécanismes de résistances et/ou impliqués dans des cas groupés/phénomènes émergents.

### 2.3.5 Enquêtes ou études ponctuelles concourant à la surveillance

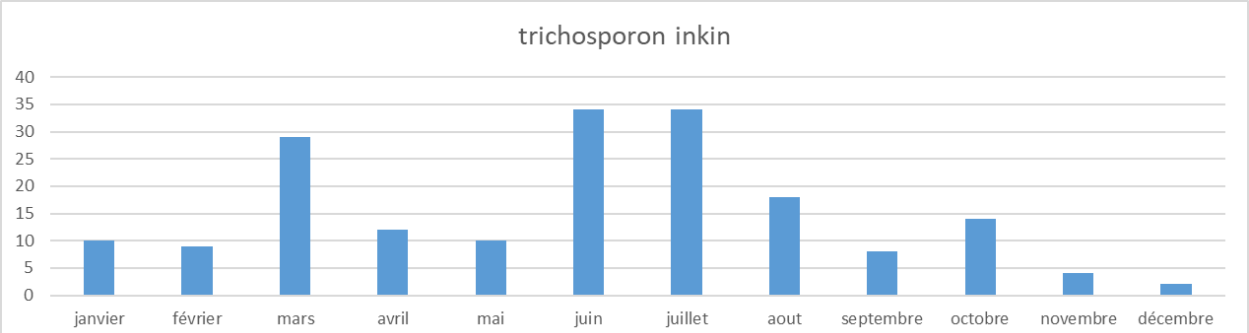
*NA*

## 2.4 Alertes

Cas groupés d'infections invasives à *Trichosporon inkin/Trichosporon austroamericanum*.

Nous intervenons dans l'investigation de cas groupées d'infections invasives à *Trichosporon inkin/Trichosporon austroamericanum* en lien avec le CNRMA-IFI (site Pasteur), SPF, l'APHP (Service Prévention du Risque Infectieux), l'équipe PCI (Prévention & Contrôle de l'Infection) de La Pitié-Salpêtrière, le CPIAS d'Île-de-France. En effet, nous observons une émergence d'infections invasives à *Trichosporon austroamericanum sp. nov./ T. inkin* chez des patients qui ont tous en commun d'avoir subi une intervention chirurgicale cardiovasculaire récente. Ces cas sont intrigants en raison de leur distribution simultanée dans 7 hôpitaux non apparentés situés dans 3 pays. La recherche active et le signalement de cas similaires devraient être encouragés au niveau international.

Alors que les *Candida* spp. sont souvent responsables d'infections post-chirurgicales, d'autres genres de levures comme les *Trichosporon* spp. sont rarement impliqués. Plusieurs cas d'infections invasives dues à des levures rares apparentées à *Trichosporon inkin* ont été rapportées dont de nombreux cas dans notre institution. Cette espèce est maintenant décrites comme la nouvelle espèce *Trichosporon austroamericanum sp. nov.* Nous avons investigué d'autres cas potentiels. Tous les cas impliquant des levures identifiées comme *Trichosporon inkin sensu lato* (colonisation ou infection) en utilisant la base de données MSI-2 ont été inclus. Nous avons également pris en compte les cas d'infections qui nous ont été rapportés par des collègues.
Au total, nous avons colligé 43 cas d'infections invasives (c'est-à-dire fongémies, médiastinites, pleurésies ou infections disséminées) dues à la levure rare *Trichosporon inkin sensu lato* survenues dans sept hôpitaux européens entre avril 2015 et novembre 2023 : quatre hôpitaux en France (deux à Paris et deux en région), un hôpital en Belgique et deux hôpitaux en Espagne. Le nombre de cas se répartit comme suit : 36 cas en France, 4 en Belgique et 3 en Espagne. Ces cas sont survenus exclusivement chez des patients ayant subi une intervention chirurgicale cardiovasculaire récente, sur un mode semi-épidémique. Il y avait 36 hommes et 7 femmes, l'âge moyen était de 59 ans. Vingt patients (46,5%) avaient subi une transplantation cardiaque. Les autres patients avaient subi une intervention chirurgicale majeure liée à l'implantation de dispositifs tels que des appareils d'assistance circulatoire, des cœurs artificiels ou des défibrillateurs cardiaques implantables. La mortalité toutes causes confondues au 90e jour était de 64,7 %. Une méthode de génotypage basée sur 3 microsatellites semble indiquer une certaine diversité génétique parmi les isolats, écartant l'hypothèse d'un clone circulant unique. Des conseils d'hygiène ont été donnés et de nombreuses investigations ont été menées ou sont en cours. A ce jour, aucune source commune d'infection n'a été identifiée.




**Implémentation de la base MSI-2**
A cette occasion, nous avons implémenté la base MSI-2 afin qu'elle soit en mesure de discriminer les isolats de *Trichosporon inkin stricto sensu* des isolats de *Trichosporon austroamericanum nov. sp.*
Parmi les références qui ont été incluses dans la base de données de référence en ligne, huit des 13 espèces de *Trichosporon* sont représentées par au moins une souche de collection pour un total de 18 souches de collection incluses comme références. Des isolats bien caractérisés issus de la routine quotidienne de notre laboratoire ont été ajoutés pour compléter l'ensemble des espèces représentées dans la base de données de référence MSI-2, en particulier en ce qui concerne *Trichosporon austroamericanum* ; espèce pour laquelle aucune souche de référence n'était disponible au moment de l'implémentation. Un total de 225 spectres ont été produits pour

construire les 37 références qui font actuellement partie de la base de données MSI-2, avant une étape de validation interne. Cette étape a été suivie d'une validation externe : un ensemble de 57 isolats de *Trichosporon* spp (74 spectres) obtenus dans la routine quotidienne de quatre hôpitaux (La Pitié-Salpêtrière, Paris ; Saint-Antoine, Paris ; CHU Pellegrin, Bordeaux ; Hôpital Erasme, Bruxelles, Belgique) a été utilisé comme contrôle externe du processus d'identification. Les isolats ont été envoyés à l'hôpital de La Pitié-Salpêtrière où les spectres ont été acquis. Ce panel comprenait 1 *T. asteroides* (non représenté dans la base de données MSI-2), 3 *T. asahii*, 7 *T. inkin* et 46 *T. austroamericanum*. L'identification de tous les isolats a été confirmée par séquençage de la région IGS. La validation externe a été tout à fait satisfaisante en dehors du défaut attendu concernant les deux spectres de *T. asteroides* qui ont été identifiés comme *T. japonicum*. Tous les autres spectres soumis à l'application, quelle que soit l'espèce, ont été correctement identifiés au niveau de l'espèce.

## 2.5 Activités de mise à disposition de l'information, de formation et de conseil

### 2.5.1 Conseil et expertise aux professionnels de santé

NA

### 2.5.2 Conseil et expertise aux autorités sanitaires

NA

### 2.5.3 Conseil et expertise pour d'autres cibles (médias, grand public …)

NA

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

*NA*

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

*NA*

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

*NA*

## 2.6 Coopération avec les laboratoires de santé animale, de sécurité sanitaire des aliments, environnementaux

Des collaborations ont été établies avec le Pr Jacques Guillot, du laboratoire Oniris (Ecole Nationale Vétérinaire) de Nantes pour l'identification des pathogènes fongiques canins et équins notamment. Une étude ancillaire s'intéresse à la saisonnalité des filamenteux.

## 2.7 Programme d'activité pour les années suivantes

Les objectifs sont d'augmenter l'exhaustivité de la surveillance en incitant les partenaires à utiliser l'application MSI-2 pour l'ensemble des isolats fongiques, quelle que soit le type de champignon (levure, filamenteux, dermatophytes) et la nature de prélèvement.

Le second objectif est de constituer un groupe de partenaire parmi les utilisateurs réguliers et représentatifs de l'activité globale et susceptible d'utiliser le codage de la nature du prélèvement.

Le troisième objectif est de développer un module de surveillance épidémiologique pour le CNR INuSuAle. Pour cela, des scripts seront préparés par Mohamed Jami, développeur informatique sous la supervision d'Arnaud Fekkar, responsable d'INuSuAle et de Renaud Piarroux, épidémiologiste. Le but sera d'automatiser l'interrogation de la base de données de résultats de MSI-2, ainsi que la production des cartes et les figures nécessaires à la surveillance épidémiologique.
Afin de ne pas biaiser les résultats de surveillance épidémiologique d'une espèce fongique donnée, seuls seront inclus dans le tableau de bord global les centres qui utilisent l'application de manière systématique pour l'identification de ces champignons.
En cas d'alerte spécifique, l'ensemble des spectres identifiés par MSI-2 pourra faire l'objet d'un criblage à la recherche de nouveaux cas.

## 2.8 Annexe 1 : Missions & organisation du CNRMA-Laboratoire associé INUSUALe

### 2.8.1 Missions du CNR et de ses éventuels laboratoires associés

**CNRMA-Laboratoire associé INuSuAle**

Nos activités d'identification des agents fongiques et de surveillance épidémiologique sont intimement liées, et ce par l'existence d'un outil unique : l'application MSI-2 d'identification des agents fongiques par spectrométrie de masse MALDI-ToF, accessible en ligne au plus grand nombre.

La surveillance épidémiologique que nous mettons en place permet d'obtenir des informations sur la circulation des espèces qui présentent naturellement des sensibilités diminuées aux antifongiques, telles que les espèces cryptiques d'*Aspergillus*, les champignons du genre *Fusarium* spp. ou encore les moisissures de l'ordre des Mucorales. La surveillance inclut également des espèces à potentiel épidémique tel que par exemple *Candida auris*, *Saprochaete clavata*, ou *Trichosporon inkin.*

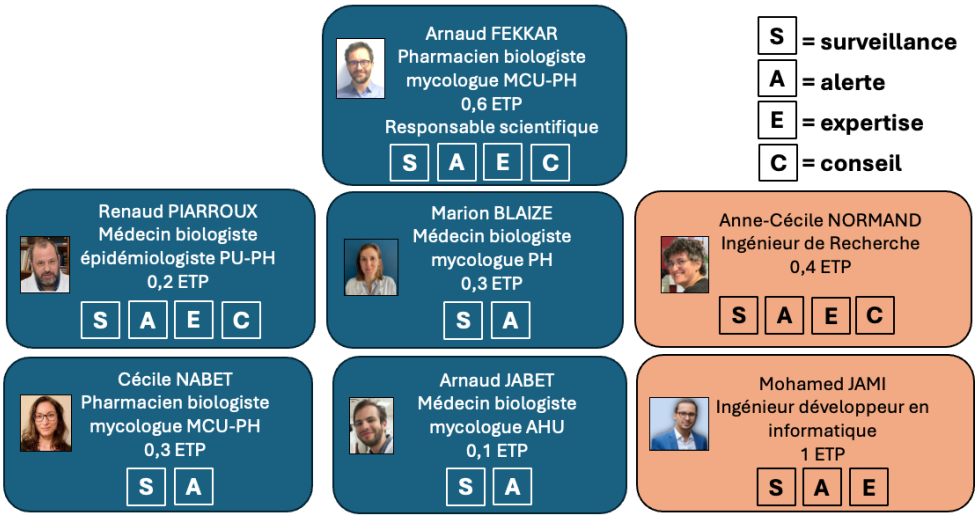
Dans le cadre d'une contribution aux réseaux de surveillance européens et internationaux et de réalisation de projets d'enquêtes concourant à la surveillance, l'application MSI-2, par sa capacité à identifier sur une aire géographique extrêmement vaste toute sorte de champignons filamenteux et de levures, y compris les espèces rares, pourra aider à la constitution de séries et à la mise en relation de centres souhaitant travailler sur un pathogène commun.

L'application MSI-2 pourra générer des alertes lorsque le nombre de spectres d'une espèce ou d'un genre fongique dépassera un seuil donné. Ce seuil d'alerte sera spécifique à chaque espèce et tiendra compte des caractéristiques temporelle et spatiale de l'agent fongique surveillé.

### 2.8.2 Organisation du CNR et de ses éventuels laboratoires associés

**CNRMA-Laboratoire associé INuSuAle, responsable scientifique : Dr Arnaud Fekkar, MCU-PH**

**ORGANIGRAMME DU CNR « INuSuAle »**




**Équipe**

Biologistes mycologues

- Dr Arnaud Fekkar, MCU-PH (Sorbonne Université – APHP – CIMI-Paris [Sorbonne Université UMRS CR7, INSERM U1135, CNRS ERL8255]).
Responsable scientifique, animateur du réseau, participe à la surveillance épidémiologique (environ 60% de son activité hospitalière). Développement de projets, étude de cohorte, analyse des indicateurs de surveillance en fonction des espèces ciblées.

- Dr Marion Blaize, AHU (Sorbonne Université – APHP – CIMI-Paris [Sorbonne Université UMRS CR7, INSERM U1135, CNRS ERL8255]), (environ 30% de son activité hospitalière). Participe à la surveillance épidémiologique, interlocutrice avec les mycologues, mise en place et analyse hebdomadaire des indicateurs de surveillance.

- Dr Cécile Nabet, MCU-PH (Sorbonne Université – APHP - UMRS 1136 IPLESP),
(environ 30% de son activité hospitalière).
Participe à la surveillance épidémiologique, interlocutrice avec les mycologues, mise en place et analyse hebdomadaire des indicateurs de surveillance.

- Dr Arnaud Jabet, AHU (Sorbonne Université – APHP - UMRS 1136 IPLESP),
(environ 10% de son activité hospitalière).
Participe à la surveillance épidémiologique, mise en place et analyse hebdomadaire des indicateurs de surveillance.

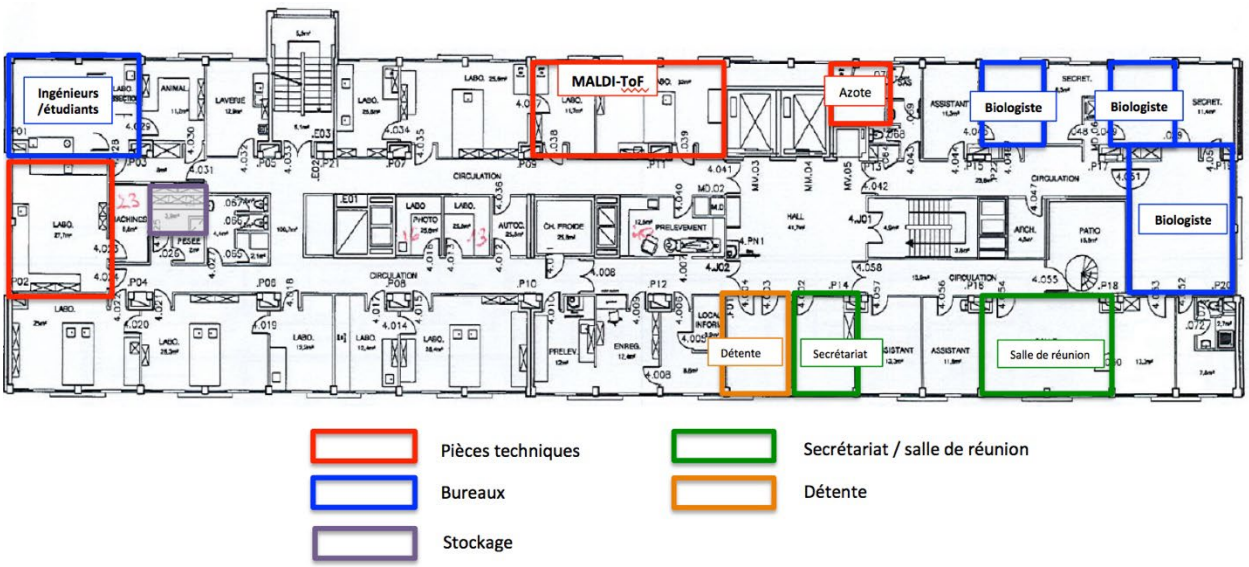
– Biologiste et épidémiologiste
- Pr Renaud Piarroux, PU-PH (Sorbonne Université – APHP - UMRS 1136 IPLESP), chef du service de Parasitologie-Mycologie
Conception des algorithmes, supervision du développement de l'application et des travaux en IA, extraction et analyse des données issues de l'application (environ 20% de son activité hospitalière)

– Ingénieur de recherche
Dr Anne-Cécile Normand (ingénieure APHP temps plein), assure la maintenance de la base de données MSI-2, la

supervision des manipulations de spectrométrie de masse, la préparation des manipulations (environ 40% de son activité)

– Ingénieur développeur en informatique
Mohamed Jami (ingénieur APHP temps plein), développeur en informatique, assure la maintenance de la base de données MSI-2, assure l'interface, écrit les scripts nécessaires à la récupération des données épidémiologiques. Analyse des données issues de l'application. Développement d'un programme qui *in fine* permettra de trier les spectres de masse en fonction de leur catégorie.

### 2.8.3 Locaux et équipements




Pièces techniques et bureau
Spectromètre de masse MALDI-TOF Bruker
Matériel informatique et logiciels (6 postes), disque de sauvegarde, connexions internet sécurisées

### 2.8.4 Collections de matériel biologique

*NA*

### 2.8.5 Démarche qualité du laboratoire

*NA*

## 2.9 Annexe 2 : Capacités techniques du CNRMA-Laboratoire associé InUSUALe

*Rappelez ici les informations suivantes (pour la plupart déjà disponibles dans votre dossier de candidature) en les mettant si nécessaire à jour :*

### 2.9.1 Liste des techniques de référence

*Listez ici les techniques (diagnostic/identification, typage, évaluation de la sensibilité aux anti-infectieux, …) utilisées par le CNR, **en mentionnant explicitement lesquelles sont accréditées à échéance de l'année N**.*

### 2.9.2 Liste des techniques recommandées par le CNR

*Listez ici les techniques (diagnostic/identification, typage, évaluation de la sensibilité aux anti-infectieux, …) recommandées par le CNR aux autres laboratoires.*

# 3. CNRMA-LABORATOIRES ASSOCIES ASPERGILLOSES CHRONIQUES

## RESUME ANALYTIQUE

## FAITS MARQUANTS

Le LA-AspC a réalisé une enquête nationale flash portant sur 20 CHU/CHG ayant permis d'identifier un recours soutenu à la sérologie aspergillaire, outil incontournable du diagnostic des aspergilloses pulmonaires chroniques (APC). Les modalités de prescription et de rendu des résultats sont variables d'un centre à l'autre. Au total, la sérologie de criblage était positive dans 18,5% [6-31%] des cas, avec une technique de confirmation positive dans 11,8% [4-24%]. En complément des données sur la surveillance prospective de la résistance de l'aspergillose invasive par le CNRMA-IFI, une enquête rétrospective a identifié plus de 500 isolats cliniques d'*A. fumigatus* rendus résistants par méthode E-test à au moins un antifongique azolé (>10 000 tests réalisés par 20 centres, 2018-22), dont 13% résistant à l'itraconazole, 7% au posaconazole, 4% à l'isavuconazole et 2% au voriconazole. Une troisième enquête a ciblé les structures (RCP, cellule locale « Aspergillose/Mycose ») et modalités de gestion des APC existantes en France, **identifiant qu'un tiers** des établissements de santé (27 CHU/CHG) n''ont pas d'accès direct à ces structures et que le nombre de cas pris en charge par an est estimé à 100-200 APC plus 485 ABPA. Ces données apportent des informations originales sur les patients à risque d'APC et la circulation d'isolats d'*A. fumigatus* résistants aux azolés. Elles ouvrent de nombreuses pistes de travail quant à l'homogénéisation des outils et protocoles utilisés en France pour la surveillance de l'APC.

**Sur le plan des activités d'expertise**, le LA-AspC a mis à profit cette 1ère année pour déployer les différentes méthodes de sérologie et d'identification polyphasique, ainsi que pour mettre en place et animer le réseau de partenaires ce qui a conduit à expertiser environ 950 sérologies et à typer une trentaine d'isolats d'*Aspergillus* spp. incluant une dizaine de séquençage du gène *cyp51a,* gène cible des azolés.

## EXECUTIVE SUMMARY

## HIGHLIGHTS

The LA-AspC has performed a national flash survey in 20 university/general hospitals showing that *Aspergillus* serology is widely prescribed in France for the diagnosis of chronic pulmonary aspergillosis (CPA). Modalities of prescription and result presentation vary from one center to another and need standardization. Overall, serological screening for *Aspergillus* was positive in 18.5% [6-31%] of the cases, whereas positivity was 11.8% [4-24%] using confirmatory techniques. In parallel, a survey on the rate of *Aspergillus* azole resistance showed that more than 500 clinical isolates of *A. fumigatus* were resistant to at least one azole, 13% to itraconazole, 7% to posaconazole, 4% to isavuconazole and 2% to voriconazole (>10.000 antifungal gradient strips tests performed in 20 centers, 2018-2022). A third survey focused on structures where multidisciplinary discussion on the management of CPA is performed, showed that 9/27 hospitals have no access to local/regional/national multidisciplinary teams to discuss CPA management whereas it is estimated that the number of cases of CPA and ABPA managed per year is 100-200 and 450-500, respectively.

These surveys bring new data on CPA and azole resistant *A.fumigatus* in France and open new perspectives of research.

During this first year, the LA-AspC consolidated and animated the network of centers, and developed all methods necessary for *Aspergillus* serology, isolate identification and sensitivity testing to antifungals. Expertise was given for about 950 serologies and 30 isolates that were genotyped (identification and/or sequencing of cyp51a gene).

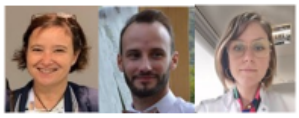
## 3.1 Missions et organisation du CNR

En l'absence d'éléments nouveaux : renvoyer à l'annexe 1.

## ORGANIGRAMME

Depuis 2023, l'organisation du CNR des mycoses invasives et antifongiques a évolué pour intégrer les 3 laboratoires associés dont les 2 LA-AspC

**Figure 1 :** Structuration du CNR des mycoses invasives et antifongiques pour la période 2023-27 cf. 1.1



**Les équipes**

Laurence Delhaes
Sébastien Imbert
*Marion Rodriguez*

Jean-Pierre Gangneux
Hélène Guegan
*Clémence Pommeron*



**Constitution du CS**

- Membres du CNR-AspC
- Responsables de CNR-IFI et INuSuAI
- Président(e) de la SFMM

+ Expertises spécifiques hors CNR:

- Sérologie APC/ABPA
- Résistance aux azolés
- Infectiologie/Pneumologie/Imagerie/ Pharmacologie/Pharmacie

**Conseil Scientifique**

Françoise Botterel
Jean-Philippe Bouchara
Arnaud Fekkar
Christophe Hennequin
Jean Menotti
Laurence Millon
Claire Andrejak
Elodie Blanchard
Mathilde Briard
Cendrine Godet
Romain Guilhaumou
Fanny Lanternier
Thomas Maitre

**Rôle du CS**

- Grandes orientations scientifiques
- Discussions consultatives
- Définition des objectifs d'études spécifiques
- Mise en place et suivi de chaque étude
- Réunions semestrielles

**Figure 2 :** Organigramme fonctionnel du LA des Aspergilloses Chroniques

## MISSION ET ORGANISATION

A partir de 2023 : les missions d'expertises, de conseil, formation et information, de surveillance épidémiologique et contribution à l'alerte ont été enrichies des activités et expertises des 3 LA pour l'ensemble du CNRMA-IFI (Figure 1). Plus précisément pour le LA-AspC, ces missions visent à améliorer la veille et les connaissances épidémiologiques sur les aspergilloses chroniques ainsi que la surveillance de la chimiorésistance aspergillaire. Elles sont mises en œuvre de façon concertée entre les LA-AspC-Sud et LA-AspC-Nord, avec le CNRMA-IFI et le LA-INuSuAI et nécessitent des actions d'évaluation et de standardisation, de formation et d'expertise, qui ont été initiées comme suit :

- Les activités d'expertise et de conseil ont été développées grâce à un effort de communication autour de la création du LA-AspC, de la mise en place de fiches de déclaration de cas d'aspergillose chronique et/ou de demande d'expertise (Cf. partie 3.2) et de participations actives aux RCPs centrées sur les aspergilloses chroniques (Figure 3).

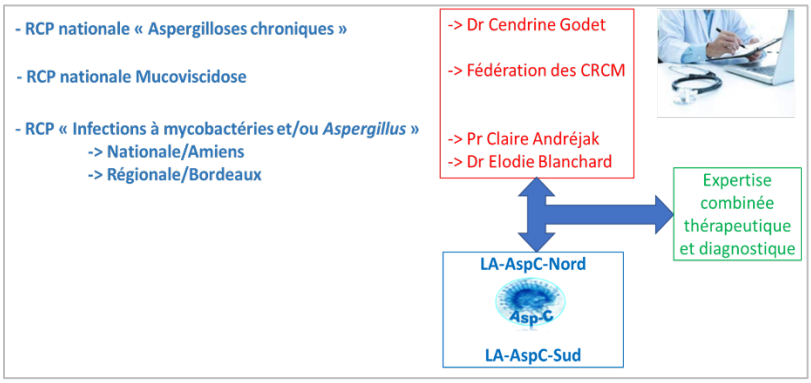



**Figure 3 :** Présentation des activités de conseil du LA-AspC

- Les activités de surveillance ont débuté via les enquêtes flash, qui ont permis de confirmer l'importance du diagnostic et du suivi des tableaux d'aspergilloses chroniques en France (Cf. partie 3).

- Enfin, en cas d'alerte concernant les aspergilloses chroniques déclenchée par SPF ou CNRMA-IFI, les 2 LA-AspC coordonneront les investigations. L'un des 2 LA peut également saisir SPF et le CNRMA-IFI si suspicion d'alerte ou de survenue de cas groupés (Figure 4).

En parallèle, une réunion extraordinaire du comité scientifique (Figure B) pourra être organisée et un groupe de travail spécifique pour chaque alerte pourra être mis en place.

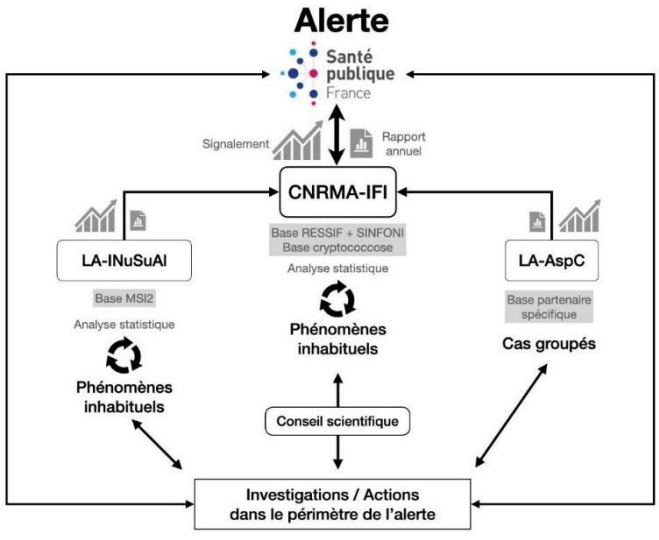



**Figure 4 :** Schéma d'organisation du CNRMA-IFI en cas d'alerte

**L'ensemble de ces missions et organisation du LA des Aspergilloses Chroniques (LA-AspC)** est réparti selon un axe nord-sud délimité par Poitiers et Strasbourg : au-dessus de cette ligne, tous les centres adressent leurs demandes d'expertise au LA de Rennes ; tous les centres au Sud (Poitiers et Strasbourg compris) adressent leurs demandes au LA de Bordeaux. Ainsi, le LA-AspC met à disposition des communautés médicale et institutionnelle son expertise en matière de *(i)* surveillance épidémiologique, de réponse en cas d'alerte et de conseils, *(ii)* d'identification des *Aspergillus* avec suivi longitudinal de la résistance aspergillaire aux ATFs, *(iii)* sérologie aspergillaire et *(iv)* biologie moléculaire incluant les approches de NGS.

Ces missions s'appuient sur :

- Les équipes des 2 laboratoires localisés au sein des services de Parasitologie Mycologie du CHU de Bordeaux (LA-AspC-Sud, co-directrice : Pr L. Delhaes) et du CHU de Rennes (LA-AspC-Nord, co-directeur : Pr. J-P Gangneux) présentées en Tableau 1) et sur

- Les surfaces de travail mises à disposition dans chacun des 2 CHU qui sont de trois ordres : des surfaces dédiées au CNR, des surfaces mutualisées entre la mycologie de routine et le CNR et des surfaces mutualisées entre la microbiologie et le CNR (Cf. Annexe 1.3).

**Tableau 1 :** Composition et implication du personnel dans le LA des Aspergilloses Chroniques

| Nom Prénom | Qualification (ETP) | Appartenance administrative |
|---|---|---|
| **LA-AspC-Sud** | | |
| DELHAES Laurence | PU-PH (0,10) | Université & CHU de Bordeaux |
| IMBERT Sébastien | MCU-PH (0,10) | Université & CHU de Bordeaux |
| Biologistes du service | AHU, MCU-PH ou PH (0,05) | Université & CHU de Bordeaux |
| RODRIGUEZ Marion | Ingénieur de recherche (1,00) | LA-AspC-Sud, CHU de Bordeaux |
| DESSERRE Géraldine | Technicienne de laboratoire, Qualiticienne (0,10) | CHU de Bordeaux |
| **LA-AspC-Nord** | | |
| GANGNEUX Jean-Pierre | PU-PH (0.10) | Université & CHU de Rennes |
| GUEGAN Hélène | MCU-PH (0,05) | Université & CHU de Rennes |
| Biologistes du service | AHU, MCU-PH ou PH (0,10) | Université & CHU de Rennes |
| POMMERON Clémence | Technicienne de laboratoire (1,00) | CHU de Rennes |
| BRAULT Géraldine | Technicienne de laboratoire qualiticienne (0,2)) | CHU de Rennes |

## DEMARCHE QUALITE

**Pour le LA AspC-Sud :** Nos activités de mycologie en relation avec le LA-AspC : Examen direct, ensemencement, culture et identification des levures et champignons filamenteux (en dehors des dermatophytes) avec identification phénotypique (macro- & microscopique) et identification par spectrométrie de masse MALDI-TOF (Bruker) ont été auditées en décembre 2022 et accréditées COFRAC en février 2024 (Tableau 2 ; https://tools.cofrac.fr/annexes/sect8/8-3455.pdf). Les sérologies incluant la sérologie aspergillaire ont été accréditées par extension des dosages de Galactomannane faisant l'objet d'un suivi sur l'audit de décembre 2022.

Pour rappel : les PCR ciblant l'ordre des mucorales et du genre *Aspergillus,* ou ciblant spécifiquement *A. fumigatus* sont des PCR multiplexes et relèvent de la nomenclature RIHN non soumise en 2023 à l'accréditation COFRAC ; néanmoins une validation de méthode ainsi qu'un suivi de CQI et EEQ ont été mis en place.

**Tableau 2 :** Liste des lignes de portées auditées et accréditées du LA-AspC-Sud par le COFRAC en 2023

| | | |
|---|---|---|
| Examen mycologique direct | Sang et dérivés<br>Liquides biologiques<br>Biopsies et tissus | Examen direct après coloration (imprégnation argentique selon Musto) |
| Examen mycologique direct | Biopsies et tissus<br>Liquides biologiques<br>Sang et dérivés | Examen direct après coloration MGG |
| Examen mycologique sur flacon d'hémoculture | Liquides biologiques<br>Sang et dérivés | Détection colorimétrique de croissance |
| Recherche de Pneumocystis jirovecii | Prélèvements respiratoires | PCR en temps réel |
| Recherche et identification de champignons filamenteux (hors dermatophytes) | Biopsies et tissus<br>Sang et dérivés<br>Liquides biologiques | Mise en culture manuel, examen morphologique macro- et microscopique des cultures, identification des champignons filamenteux par spectrométrie de masse |
| Recherche et identification des levures | Biopsies et Tissus<br>Liquides biologiques<br>Sang et dérivés | Mise en culture manuelle, examen direct après culture, identification des levures par spectrométrie de masse |

**Pour le LA AspC-Nord :**

Nos activités de mycologie en relation avec l'activité du CNR comprennent: examen direct, ensemencement, culture et identification des levures et champignons filamenteux avec identification phénotypique (macro- & microscopique), identification par spectrométrie de masse MALDI-TOF (Bruker, bases Bruker et/ou MSI2). Les outils moléculaires déployés dans le laboratoire permettent la détection d'*Aspergillus* par PCR (PCR simplex ou PCR multiplex détectant également des mutations du gène *cyp51a*), ainsi que l'identification par séquençage moléculaire (ITS1-2 et b-tubuline) et séquençage du gène de résistance aux azoles *cyp51a*).

Les activités de sérologie comprennent la détection d'IgG anti-aspergillaire (tests dédiés par ELISA°Biorad ou immunoélectrophorèse maison ; ou bien inclus dans la sérologie poumon de fermier/éleveur d'oiseaux par immunoélectrophorèse maison). Par ailleurs, les techniques de détection d'antigènes (galactomannane et B-D-glucanes déployés pour le diagnostic des aspergilloses invasives peuvent potentiellement servir d'appoint au diagnostic d'aspergillose chronique).

## 3.2 Activités d'expertise

### 3.2.1 Evolution des techniques

En 2023, le LA-AspC-Sud a mis en place :

- L'identification et la caractérisation d'isolats du genre *Aspergillus* par culture sur milieu Sabouraud, avec identification polyphasique combinant la macro- microscopique, la spectrométrie de masse MALDI-TOF sur base MSI2 et le séquençage moléculaire des gènes β-tubuline, ITS1-2 et de la calmoduline
- La détermination de la sensibilité aux ATFs par méthode E-test ; la méthode EUCAST étant en cours de déploiement pour fin avril 2024
- La détection rapide de la mutation environnementale TR34/L98H associées à la résistance aux azolés d'*A. fumigatus* par PCR multiplex via le kit MycoGENIE® *Aspergillus fumigatus* and TR34/L98H (Ademtech)
- Le séquençage du gène cyp51a, codant pour l'enzyme éponyme qui est la cible des antifongiques azolés, et dont les mutations peuvent être associées à une résistance à ces antifongiques. Ce séquençage a été mis en place pour *A. fumigatus*, qui est l'espèce la plus fréquente, grâce à des amorces spécifiques déjà publiées, mais aussi pour d'autres espèces appartenant à cette même section *Fumigati* (espèces cryptiques) ou appartenant à d'autres sections (*Flavi*, *Nigri*, *Nidulantes*, *Usti*), grâce au design de nouvelles amorces dégénérées (Cf. Annexe 2.1)

L'ensemble de ces techniques a été implémenté dans le SIL du laboratoire sous GLIMS au CHU de Bordeaux de façon à générer des comptes rendus personnalisés et adaptés au CNR.

En 2023, le LA-AspC-Nord a mis en place :

- L'identification d'isolats du genre *Aspergillus* par culture sur milieu Sabouraud, avec identification polyphasique combinant la macro- microscopique, la spectrométrie de masse MALDI-TOF sur base MSI2 et le séquençage moléculaire des gènes ITS1-2 et β-tubuline.

- La détermination de la sensibilité aux ATFs par méthode E-test ; la méthode EUCAST sera opérationnelle en fin de premier trimestre 2024.

- La détection rapide de mutations du gène cyp51a associées à la résistance *d'Aspergillus* par PCR a été déployée via le kit Aspergenius° (Pathonostics).

- Le séquençage du gène cyp51a, codant pour la protéine cible des antifongiques azolés (Lanostérol-14-alpha-déméthylase), et dont les mutations peuvent être associées à une résistance à ces antifongiques.

L'ensemble de ces techniques a été implémenté dans le SIL du laboratoire sous TD NexLab au CHU de Rennes de façon à générer des comptes rendus personnalisés et adaptés au CNR.

### 3.2.2 Travaux d'évaluation des techniques, réactifs et trousses

Plusieurs travaux d'évaluation de kits ont été réalisées ou sont en cours de réalisation :

1. Le LA-AspC-Nord a piloté une étude collaborative avec le CHU de Lagos au Nigeria visant à évaluer la détection d'IgG *Aspergillus* par technique rapide immunochromatographique (LFA *Aspergillus*° LDBio) versus la technique ELISA° Bordier (Balogun OJ, Oladele RO, Ajibola OOE, Davies AA, Nwosu AO, Ekeng BE, Fatai S, Gangneux JP. Evaluation of LDBio ICT IgG/IgM lateral flow assay versus Bordier Elisa assay in the diagnosis of Chronic Pulmonary Aspergillosis in Nigeria. Congrès européen TIMM 2023 - Trends in Medical Mycology Athènes - article soumis).

2. Le LA-AspC-Nord a contribué une étude collaborative avec le CHU de Chandigarh en Inde évaluant les performances du test sérologique LFA IgG *Aspergillus* (LD Bio) dans le diagnostic de l'aspergillose broncho-pulmonaire allergique.
(Sehgal IS, Muthu V, Dhooria S, Prasad KT, Rudramurthy SM, Aggarwal AN, Garg M, Gangneux JP, Chakrabarti A, Agarwal R. Sensitivity and specificity of LDBio *Aspergillus* ICT lateral flow assay for diagnosing allergic bronchopulmonary aspergillosis in adult asthmatics. Mycoses. 2024 Feb;67(2):e13700. doi: 10.1111/myc.13700. PMID: 38369615.)

3. Les LA-AspC-Nord et LA-AspC-Sud ont débuté une étude inédite de grande ampleur de détection des IgG anti-aspergillaires chez plus de 2000 sujets sains (donneurs de sang EFS). La technique de dépistage utilisée est la technique Platelia IgG *Aspergillus*° (Bio-Rad) et en cas de détection douteuse ou positive, nous comparerons les 2 techniques de confirmation suivantes : immunoélectrophorèse maison, effectuée au CHU de Rennes, versus Immunoblot *Aspergillus*° (LDBio) effectué au CHU de Bordeaux.

### 3.2.3 Techniques transférées vers d'autres laboratoires

NA

### 3.2.4 Collections de matériel biologique

Les collections de matériel biologique du LA-AspC ont été initiées comme suit :
- Les souches aspergillaires ou sérums adressés pour expertise sont mises en collection dédiée du LA-AspC-Sud comme au LA-AspC-Nord, dans les CRB respectifs : soit le CRB-Plurithématique du CHU de Bordeaux (centre du Tondu sur le Groupe Hospitalier Pellegrin coordonné par Dr I. Pellegrin), soit le CRB plurithématique du CHU de Rennes “Biobanque Pierre Rochcongar” (Hôpital Pontchaillou) coordonné par le Dr C. Ménard.
- Sur chacun des 2 sites, la collection du LA-AspC comprend des souches bien caractérisées appartenant au genre *Aspergillus* et issus de cas d'APC déclarés dans la base de données AspC-DB qui sont conservées sur tubes de cryobilles à -80°C au CRB de chaque CHU, auxquelles s'ajoutent des souches de référence provenant de diverses collections (CBS, ATCC, IP, NRRL) mais qui sont non distribuables.
Les sérums faisant l’objet de demande d’expertise sont également conservés à -80°C au CRB de chaque CHU.
Enfin, une collection d’ADN génomique de tout ou partie des isolats d'*Aspergillus* adressés au LA-AspC a également été initiée.

Ces différentes mises en collection permettent d'envisager de futurs travaux de phénotypage, de comparaison de sensibilité in vitro aux ATFs, de typage moléculaire, d'analyse phylogénétique ou de comparaison de kits par le LA-AspC ou par CNRMA-IFI en cas d’étude comparative.

Par ailleurs, les CRB de Bordeaux et de Rennes disposent de toutes les autorisations nécessaires à l'établissement de la collection :
• Numéro d'autorisation : AC-2014-2166, qui répond à toutes les conditions du Ministère de la Recherche (numéro de déclaration DC-2014-2164) pour le CRB de Bordeaux,
• CRB de Rennes "Biobanque Pierre Rochcongar" certifié selon la norme NF S96-900.

### 3.2.5 Activités d'expertises

Lors de cette 1ère année d'exercice, le LA-AspC a mis en place deux fiches de déclaration de cas d'aspergilloses chroniques et de demandes d'expertise ; ces fiches étant le fruit d'un travail collectif avec le CS et permettront à moyen terme (courant 2024) une déclaration en ligne dans RedCap sous une architecture similaire à celle déployée dans le recueil SINFONI du CNRMA-IFI de façon à faciliter les interrogations et analyses communes/combinées (Cf. Boxe ci-après).

En 2023, **les activités d'expertises du LA-AspC-Sud** ont porté sur :

- Réception de 2 isolats d'*Aspergillus* issus d'aspergillose chronique avec confirmation de l'identification par spectrométrie de masse MALDI-TOF, base de données MSI2 (LA-INuSuAI) et caractérisation moléculaire par séquençage partiel Sanger des régions ITS1-2, et des gènes codants pour la calmoduline et la β-tubuline
- Séquençage du gène *cyp51a* de 7 isolats d'*Aspergillus udagawae* (section *Fumigati*) présentant une résistance *in vitro* aux antifongiques azolés
- Depuis sa création en Mai 2023, notre participation à la RCP « Aspergilloses Chroniques et Infection à mycobactérie atypique » - Dr E. Blanchard, CHU de Bordeaux a amené à interagir sur 26 dossiers dont 13 avec histoires aspergillaires ayant nécessité une sérologie : 13 sérologies aspergillaires par ELISA et 7 analyses par Western Blot.

En 2023, **les activités d'expertises du LA-AspC-Nord** ont porté sur :

- Réception de 31 isolats d'*Aspergillus* pour identification (spectrométrie de masse MALDI-TOF, base de données MSI2 (LA-INuSuAI) et/ou détermination de la sensibilité in vitro aux antifongiques. La caractérisation moléculaire par séquençage partiel Sanger des régions ITS1-2 et des gènes codants pour la β-tubuline ou le gène *cyp51a* ont été réalisés pour 2 isolats
- Une collection de 15 isolats d'*Aspergillus* provenant de Tunisie a également été intégrée dans la base après identification MALDI-TOF et détermination de la sensibilité in vitro aux antifongiques.

L'expertise sérologique du LA-AspC-Nord a été sollicitée sur 922 demandes extérieures de sérologie aspergillaire.

**QUESTIONNAIRE POUR EXPERTISE D'ASPERGILLOSE CHRONIQUE (EXP-ASPC)**

A adresser au : En fonction de la sélection LA-AspC-Sud ou LA-AspC-Nord =>
Affichage de l'Adresse et des contacts Adhoc

Contacts :

**Date de demande d'expertise (jj/mm/aaaa) :** ...../...../.....

**1- Identité du patient**

| Nom | Prénom | Date de naissance (jj/mm/aaaa) | Sexe |
|---|---|---|---|
| | | | |

**Service d'hébergement du patient lors du prélèvement :** ☐ Pneumologie ☐ Maladies infectieuses ☐ Médecine (hors pneumologie et infectiologie) ☐ Chirurgie ☐ Réanimations ☐ Autre :

**Biologiste/Médecin correspondant pour la demande d'expertise-AspC**

- Nom, Prénom :
- Service :
- Etablissement :
- e-mail :

**Si connu : médecin prenant en charge le patient pour son APC :**

- Nom, Prénom :
- Service :
- Etablissement :
- e-mail :

**2- Contexte clinique**

**Type d'aspergillose chronique** Menu déroulant de Q-Asp-C : o Aspergillose pulmonaire chronique (APC) complexe
o Aspergillome
o Nodule aspergillaire
o ABPA
o Non classé/ne sait pas
o Autre (spécifier) :

**Date de diagnostic** (mm/aaaa) : ...../.....

**Traitement antifongique : Episode traité :** ☐ oui ☐ non ☐ ne sait pas

**Si oui :** molécule 1 : .....
Date début et fin de traitement (jj/mm/aaaa).....
molécule 2 : .....
Date début et fin de traitement (jj/mm/aaaa).....
Autre :

**3- Expertise mycologique sur souche d'*Aspergillus***

**Votre référence d'isolat :**

**Date de l'isolement (jj/mm/aaaa) :**

**Localisation/échantillon d'isolement :**

**Résultat de votre identification si réalisée :**

**Préciser l'espèce :** .....

**Préciser la méthode d'identification :** ☐ Macro/Microscopie
☐ Méthode Maldi-tof : base de données ? .....

☐ **Autre :** .....

**Résultats de sensibilité aux antifongiques dans votre laboratoire si réalisée :**

**Antifongigramme réalisé** ☐ **NON** ☐ **OUI** si Oui => Remplir Colonne blanche
du tableau ci-dessous

| | **Vos résultats** | ☐ CMI diffusion en gradient<br>• CMI microplaque commercialisée<br>Sera rempli par CNR | CMI Eucast<br>Sera rempli par CNR |
|---|---|---|---|
| Amphotéricine B | | | |
| Itraconazole | | | |
| Voriconazole | | | |
| Posaconazole | | | |
| Isavuconazole | | | |
| Caspofungine | | | |
| Micafungine | | | |
| Anidulafungine | | | |
| Terbinafine | | | |
| Olorofim | | | |
| Autre : | | | |
| Phénotype inhabituel de résistance | •Oui •Non | | •Oui •Non |

**Demande d'expertise auprès du CNR LA-AspC**

☐ **Identification par méthode Maldi-tof + base MSI2**

☐ **Identification par séquençage moléculaire**

☐ **Antifongigramme d'expertise**

Préciser si besoin de tester des antifongiques en particulier : .....

.....

☐ **Séquençage du gène Cyp51A**

## 4- Expertise sérologique

☐ **Détermination des IgG anti-aspergillaires**

| | Votre référence | Date de prélèvement (jj/mm/aaaa) | Information éventuelle relative à ce sérum (votre résultat labo, …) |
|---|---|---|---|
| Sérum 1 | | | |
| Sérum 2 | | | |
| … | | | |
| | | | |

## 5- Motif de la demande d'expertise

.....

# QUESTIONNAIRE POUR DECLARATION D'ASPERGILLOSE CHRONIQUE (DEC-ASPC)

A adresser au :
Laboratoire de Parasitologie & Mycologie – CNR Aspergilloses chroniques LA-AspC
CHU de Rennes, 2 rue Henri le guilloux
35000 Rennes, France

Contacts :
- Pr Jean-Pierre GANGNEUX
- Dr Hélène GUEGAN
- Mme Clémence POMMERON

**Date de déclaration (jj/mm/aaaa) :** ...../...../.....

## 1- Identité du patient

Nom (3 premières lettres) Prénom (Initiale) Date de naissance (jj/mm/aaaa) Sexe

**Service d'hébergement du patient lors de la déclaration :** ☐ Pneumologie ☐ Maladies infectieuses ☐ Médecine (hors pneumologie et infectiologie) ☐ Chirurgie ☐ Réanimations ☐ Autre :

**Biologiste/Médecin correspondant pour la déclaration d'APC**
- Nom, Prénom :
- Service :
- Etablissement :
- e-mail :

**Médecin prenant en charge le patient pour son APC :**
- Nom, Prénom :
- Service :
- Etablissement :
- e-mail :

## 2- Contexte clinique au moment de la déclaration

**Type d'aspergillose chronique** Menu déroulant de Q-Asp-C
- Aspergillose pulmonaire chronique (APC) complexe
- Aspergillome
- Nodule aspergillaire
- ABPA
- Non classé/ne sait pas
- Autre (spécifier) :

**Si dossier passé en RCP : type d'aspergillose chronique retenu** Menu déroulant de Q-Asp-C
- Aspergillose pulmonaire chronique (APC) cavitaire (APCC)
- Aspergillose pulmonaire chronique fibrosante (APCF)
- Aspergillose pulmonaire chronique nécrosante (APCN)
- Aspergillome
- Nodule aspergillaire
- Forme de chevauchement, si oui préciser :

**Stade de la maladie lors de la déclaration** (choix multiple possible) ☐ diagnostic initial ☐ exacerbation ☐ visite de suivi

**Date de diagnostic initial** (mm/aaaa) : ...../.....

## 3- Histoire clinique

### 3A- Données cliniques

- Antécédents/Facteurs de risque : Menu déroulant de Q-Asp-C
  - DDB
  - Mucoviscidose sous thérapie protéique
  - Mucoviscidose sans thérapie protéique
  - BPCO
  - Asthme
  - Emphysème
  - Tuberculose/ autres mycobactéries
  - Antécédent chirurgie thoracique
  - Maladie systémique, si oui préciser : case libre
  - Sarcoïdose
  - Néoplasie, si oui préciser : case libre
  - Cirrhose
  - Corticoïdes systémiques
  - Corticoïdes inhalés
  - Insuffisance respiratoire chronique
  - Déficit immunitaire primitif
  - Transplantation d'organe solide => si oui préciser l'organe et distinguer greffe bi- et mono-pulmonaire
  - Immunosupresseurs => menu déroulant avec tacro / evero/ cellcept….
  - Autres : case libre
- Notion de voyage prolongé/résidence : ☐ non ☐ ne sait pas ☐ oui : préciser…… ……..
- Poids (en kg) :
- Taille (en cm) :
- Localisation extra-respiratoire (dont les sinus) : oui/non, si oui => site : texte libre
- Symptômes actuels : => à lister et cocher :
  - absence de symptome
  - fièvre
  - asthénie
  - amaigrissement
  - anorexie
  - sueurs
  - dyspnée
  - réveils nocturnes
  - toux
  - expectorations
  - douleur thoracique
  - hémoptysie

  => si oui, préciser la semi-quantification en : ☐ faible ☐ moyenne ☐ grande abondance

  => si oui, préciser si récidives ☐
- **Synthèse histoire clinique si connue : texte libre en quelques lignes** (date de début, évènements majeurs…):

……
……
……
……

- **Traitement antifongique de l'épisode déclaré :** ☐ oui ☐ non ☐ ne sait pas

  **Si oui :** molécule prescrite 1 : …… Durée prescrite (en mois) :

  molécule prescrite 2 : …… Durée prescrite (en mois) :

Autre :

**=> Notion de compliance ? :**

……

**=> Si traitements antérieurs connus :** remplir le tableau « Historique des traitements antifongiques curatifs » en partie 3D

### 3B- Données radiologiques (TDM thorax)

**Dernier TDM thorax :** ☐ **Non réalisé** ☐ **Réalisé** - Date du dernier TDM (jj/mm/aaaa)……/……/…….

- **Lésions constatées** : Menu déroulant de Q-Asp-C
  - Micronodules
  - Nodules
  - Cavités
    - => unique ou multiples
    - => Atteinte uni ou bilatérale
    - => Parois épaissies ou parois fines
    - => épaississement de la plèvre au contact ou non
    - => balle fongique
  - Condensation
  - Bronchectasies
  - Forme de chevauchement
  - Autre : Texte libre

**Localisation :** ☐ Droit : ☐ lobe supérieur ☐ lobe moyen ☐ lobe inférieur

☐ Gauche : ☐ Culmen ☐ Lingula ☐ lobe inférieur

**Synthèse évolution radiologique si connue : texte libre en quelques lignes** (date de début, évènements majeurs…):

……
……
……
……
……
……

### 3C- Données mycologiques

**- Nombre total de prélèvements mycologiques respiratoires faits en contexte d'APC :**

**- Prélèvement respiratoire 1 :** Date de prélèvement (jj/mm/aaaa)……/……/…….

**- Site de prélèvement 1 :** Menu déroulant de Q-Asp-C
- Expectoration
- Aspiration bronchique
- Aspiration trachéale
- LBA
- Liquide pleural
- Biopsie, si oui préciser :
- Autre : case libre

**- Résultats prélèvement mycologique respiratoire**

Anapath : ☐ non faite ☐ négative ☐ positive => si oui, préciser

Examen direct : ☐ non fait ☐ négatif ☐ positif si oui cocher : menu déroulant (sélection multiple possible): levures / pseudo filaments / filaments septés / filaments larges et non septés

Culture : ☐ non faite ☐ négative ☐ positive si oui => Menu déroulant des espèces aspergillaires ; prévoir 1) option autre espèce (non aspergillaire et texte libre pour écrire l'espèce) et 2) la possibilité de cocher plusieurs espèces

PCR diagnostique (PCR panfongique ou PCR *Aspergillus* spp.) ☐ non faite ☐ négative ☐ positive => si oui, préciser cT

PCR diagnostique *Aspergillus fumigatus* ☐ non faite ☐ négative ☐ positive => si oui, préciser cT

PCR diagnostique Mucorales ☐ non faite ☐ négative ☐ positive => si oui, préciser cible :

Antifongigramme :

| Référence isolat 1 :<br>Identification isolat 1 : | **Vos résultats** | ☐ CMI diffusion en gradient<br>☐ CMI microplaque commercialisée<br>Sera rempli par CNR | CMI Eucast<br>Sera rempli par CNR |
|---|---|---|---|
| Amphotéricine B | | | |
| Itraconazole | | | |
| Voriconazole | | | |
| Posaconazole | | | |
| Isavuconazole | | | |
| Caspofungine | | | |
| Micafungine | | | |
| Anidulafungine | | | |
| Terbinafine | | | |
| Olorofim | | | |
| Autre : | | | |
| Phénotype inhabituel de résistance | ☐Oui ☐Non | | ☐Oui ☐Non |

- **Autre Prélèvement mycologique respiratoire ☐ non ☐ oui**

**=> si oui : Générer la même séquence de données pour Prélèvement N°2**

- **Biomarqueurs**

☐ **Sérologie aspergillaire IgG** : ☐ Non réalisée ☐ Réalisée => si réalisée alors générer

Méthode de screening => Date de prélèvement ……/……/……

=> ☐ négatif ou ☐ positif selon votre technique

Méthode sérologique de confirmation ☐ Non réalisée ☐ Réalisée

=> Date ……/……/……

=> ☐ négatif ou ☐ positif selon votre technique

☐ **Ag GM index** ☐ Non réalisé ☐ Réalisé => Date de prélèvement ……/……/…….

=> Type de matrice : ☐ sérum/plasma ☐ LBA ☐ autre : ….

=> ☐ négatif ou ☐ positif selon votre technique

☐ **Ag B-D glucan** ☐ Non réalisé ☐ Réalisé => Date de prélèvement ……/……/……

=> Type de matrice : ☐ sérum/plasma ☐ autre : ….

=> ☐ négatif ou ☐ positif selon votre technique

☐ **PCR *A. fumigatus* sur sérum/plasma** ☐ Non réalisée ☐ Réalisé

=> Date ……/……/……

=> ☐ négatif ou ☐ positif selon votre technique

☐ **PCR Mucorales sur sérum/plasma** ☐ Non réalisée ☐ Réalisé

=> Date ……/……/…….

=> ☐ négatif ou ☐ positif selon votre technique, quelle cible….

- **Recherche de marqueurs allergiques**

☐ Non réalisée ☐ Réalisée => cf tableau ci-dessous

| Date du sérum | Dosage des IgE totales | Dosage des IgE spécifiques anti-aspergillaires | Eosinophilie sanguine |
|---|---|---|---|
| **JJ**/MM/AAAA | Valeur numérique | Valeur numérique | Valeur numérique |
| **JJ**/MM/AAAA | Valeur numérique | Valeur numérique | Valeur numérique |
| **Option ajouter un bilan pour générer d'autre ligne** | | | |

## 3D- Historiques des traitements curatifs antifongiques et préexposition antifongique

**Traitements antifongiques antérieurs :** ☐ oui ☐ non ☐ ne sait pas

**Si oui :** molécule 1 : …… durée de traitement (en mois)……

molécule 2 : …… durée de traitement (en mois)……

Autre :……

…

**Autres traitements :**

- chirurgie (segment/lobe/poumon) ? ☐ oui ☐ non ☐ ne sait pas
- Surveillance simple sans traitement ☐ oui ☐ non ☐ ne sait pas
- Diagnostic possible ne justifiant pas d'un traitement actuellement ☐ oui ☐ non ☐ ne sait pas

**Dosages pharmacologiques dans le cadre du traitement curatif :**

☐ non réalisé : pourquoi ?……

☐ réalisé au moins 1 fois (Prélèvement le plus récent)

=> Date ……/……/……

=> Antifongique dosé :

=> Valeur numérique :

**Adaptation posologique :** ☐ jamais réalisée ☐ réalisée au moins 1 fois

## 4- Suivi après la déclaration

**Devenir du patient à 12 mois :** ☐ vivant ☐ Amélioré ☐ Non amélioré/rechute ☐ perdu de vue ☐ décédé => Date de décès (si connue): ……

**Episodes majeurs : Décrire l'épisode (Hémoptysie, résistance aux ATFs, modification significative de la sérologie ou de l'imagerie)**

=> déclaration d'un évènement de l'histoire clinique ☐ non ☐ oui => pavé 3

**TTT suivis :**

| **Molécules** | **Début** (jj/mm/aaaa) | **Fin** (jj/mm/aaaa) |
|---|---|---|

**Devenir du patient à 24 mois :** ☐ vivant ☐ Amélioré ☐ Non amélioré/rechute
☐ perdu de vue
☐ décédé => Date de décès (si connue):.....

**Episodes majeurs : Décrire l'épisode (Hémoptysie, résistance aux ATFs, modification significative de la sérologie ou de l'imagerie)**
=> déclaration d'un évènement de l'histoire clinique ☐ non ☐ oui => pavé 3

**TTT suivis :**
**Molécules** **Début** (jj/mm/aaaa) **Fin** (jj/mm/aaaa)

**Texte libre sur l'évolution :**
.....
.....
.....

### 3.2.6 Activités de séquençage

En 2023, le LA-AspC-Sud a réalisé :
- 2 séquençages Sanger partiel du gène codant pour la calmoduline (selon Hong et al. 2005)
- 2 séquençages Sanger partiel du gène codant pour la β-tubuline (selon Glass and Donaldson 1995)
- 1 séquençage partiel des régions ITS (selon De Hoog & Gerrits Van Den Ende 1998 ; Masclaux et al. 1995)
- 7 séquençages Sanger du gène complet cyp51a d'*A. udagawae*

Ce travail a permis notamment de mettre en évidence une discordance avec l'identification obtenue par spectrométrie de masse MALDI-TOF avec la base utilisée en routine par le laboratoire demandeur d'expertise mais aussi avec la base MSI2 utilisée par de nombreux centres en France (identification d'*Aspergillus calidoustus* par spectrométrie de masse et *Aspergillus pseudodeflectus* par biologie moléculaire, tous les 2 appartenant à la section *Usti*). L'isolat ainsi que les séquences produites par le LA-AspC-Sud seront partagées avec le LA-INuSuAI pour incrémenter la base MSI2.

En 2023, Le LA-AspC-Nord a déployé les approches de séquençage selon les méthodes standardisées avec le LA-AspC-Sud (mise en place des méthodes et formation du personnel technicien):
- séquençage partiel des régions ITS (selon De Hoog & Gerrits Van Den Ende 1998 ; Masclaux et al. 1995)
- séquençage Sanger partiel du gène codant pour la β-tubuline (selon Glass and Donaldson 1995)
- séquençage Sanger du gène complet cyp51a

Après mise en place et formation du personnel technique, 2 isolats extérieurs ont bénéficié d'un séquençage pour identification (ITS1-2, et β-tubuline) et du gène *cyp51a.*

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

| | |
|---|---|
| ☐ NON | **Si NON ou accès limité, précisez les raisons** |
| ☒ OUI | Externe – Plateforme : PGTB-NGS pour les 2 LA-AspC-Sud et -Nord |
| | Technologies Illumina (MiSeq, Iseq et NextSeq 2000) et ONT (GridION) |

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

| | |
|---|---|
| ☐ NON | **Si NON ou accès limité, précisez les raisons** |
| ☒ OUI | Interne (de niveau élémentaire) et externe (PGTB et cellule de Bioinformatique des 2 CHUs) |
| | Outils open source de type MiniMap2, Blast NCBI, Clustal Omega |

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

| | |
|---|---|
| ☐ NON | **Si NON, est-ce prévu ? A quelle échéance ?** |
| ☒ OUI | Investigation dans le cadre de la surveillance de la résistance aux azolés chez *Aspergillus* spp<br>Aucune analyse réalisée sur cette 1ère année de LA-AspC |

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

- Analyses bioinformatiques réalisées sur données de séquençage Sanger pour caractérisation taxonomique et étude phylogénique (sous Sequencher, MEGAX, BioEdit, ChromasPro)
- Analyses bioinformatiques réalisées sur données de séquençage NGS pour analyse wgMLST en cours, réalisées en complément des autres analyses

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

**Aucune épidémie investiguée**

**Séquençage utilisé à des fins de surveillance :**

- Au LA-Asp-Sud : 2 souches séquencées par méthode Sanger et 11 souches d'Aspergillus prévues en NGS
- Au LA-Asp-Nord : 2 souches séquencées par méthode Sanger et 10 d'Aspergillus prévues en NGS

*Modalités de sélection des souches pour séquençage : aucune sélection (séquençage de toutes les souches reçues), échantillonnage (préciser son type), études répétées,*

Séquençage Sanger de l'ensemble des souches reçues en 2023 et WGS prévu (PGTB) sur ces souches reçues ainsi qu'une sélection d'isolats aspergillaires d'intérêt clinique, notamment résistants in vitro aux antifongiques et/ou issus de différentes formes cliniques d'aspergillose

| Séquençage utilisé par le CNR, où sont déposées les séquences :génômes assemblés ou séquences brutes (fastQ files) ? |
| --- |
| Dans les bases de données fermées : Précisez<br>-Au LA-Asp-Sud : Séquences conservées sur un disque partagé sur le réseau interne du CHU de Bordeaux<br>-Au LA-Asp-Nord : Séquences conservées sur un disque partagé sur le réseau interne du CHU de Rennes |
| Dans des bases de données publiques (European Nucleotide Archive (ENA) par exemple) avec ou sans métadata associées : Précisez |

### 3.2.7 Partage de séquences produites par les CNR

Pas de partage de séquence en cette année d'ouverture du LA-AspC mais il est prévu un partage avec les CNRMA-IFI, et LA-INuSuAL (à noter le partage en cours des séquences correspondant à la discordance avec l'identification obtenue par spectrométrie de masse MALDI-TOF (identification d'Aspergillus calidoustus par spectrométrie de masse et Aspergillus pseudodeflectus par biologie moléculaire).

## 3.3 Activités de surveillance

**Eléments clés de la surveillance des aspergilloses chroniques en 2023** : Grâce aux réseaux des partenaires Réalisation des 2 enquêtes qui ont permis de : (i) confirmer la place de la sérologie anti-aspergillaire dans le diagnostic des APC, (ii) mettre en évidence l'importance de la préssitance aux azolés (13% des isoalts d'A. *fumiagtus* résistant à l'itraconazole), et (iii) de cartographier les structures et modalités de gestion des aspergilloses chroniques en France

### 3.3.1 Description du réseau de partenaires

L'ambition du LA-AspC est de fédérer et faire vivre notre réseau de CHU et de CHG (Figure W) où sont suivis les patients atteints d'aspergilloses chroniques. La mise en réseau des CHU est facile car déjà organisée autour de notre société SFMM et du CNRMA-IFI. Cependant, le suivi des patients atteints d'aspergillose chronique se fait aussi en ville et dans les CHG que nous envisageons d'atteindre via la participation aux RCP régionales et nationales. De même, nous avons d'ores-et-déjà pris des contacts avec des laboratoires de biologie médicale privés du réseau EXALAB pour le suivi des bilans sérologiques et aussi de la surveillance de la résistance d'Aspergillus car un suivi uniquement effectué dans les CHU serait nécessairement parcellaire.
Au cours de cette première année de mandat, nous avons déjà réussi à fédérer 20 établissements ainsi que les réseau ExaLab (cf. résultats enquête de surveillance, chapitre 3.5). De plus, la réalisation de 2 AG en distanciel en décembre 2023 nous a permis de consolider ce 1er cercle de partenaires et d'envisager son agrandissement en 2024.

Le réseau est en cours de constitution avec une répartition Nord-Sud pour l'envoi des expertises soit à Bordeaux, soit à Rennes, selon la carte ci-dessous (Figure 5).

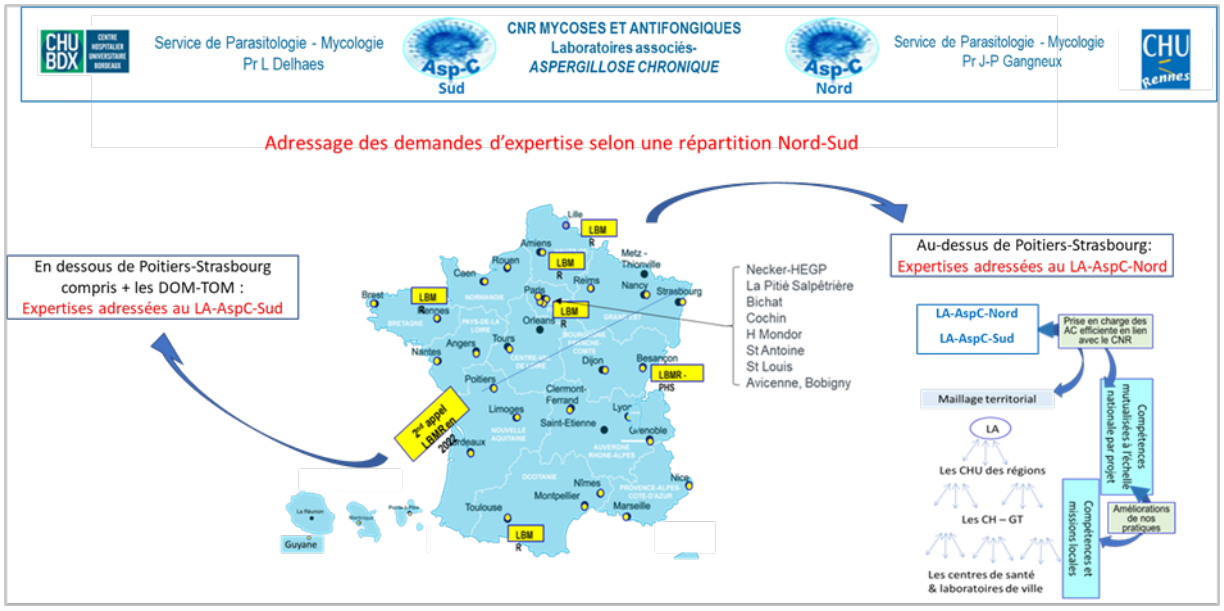



**Figure 5:** Schéma du réseau de partenaires du LA-AspC

*Estimation de la couverture du réseau ou représentativité :* A terme, nous estimons que le maillage du territoire sera assuré via les connexions avec l'ensemble des CHU, la majorité des grands CHG et plusieurs groupements majeurs de la biologie privée tel que ExaLab.

*Evolution du réseau lors de l'année N :* **Non adapté - 1ère année d'exercice**

*Définition éventuelle de l'échantillon de souches reçues de ces partenaires* **: L'échantillonnage reçu des partenaires correspond à plusieurs types d'entités :**

- des isolats d'*Aspergillus* responsables d'aspergillose chronique
- des isolats d'*Aspergillus* pour étude de la sensibilité in vitro

  des sérums pour expertise sérologique aspergillaire

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

**Etant donné que 2023 était l'année d'ouverture du LA-AspC, nous n'avons pas encore de comparatif pour effectuer une surveillance de l'évolution**

### 3.3.3 Surveillance de la résistance des agents pathogènes aux anti-infectieux

Deux approches de la surveillance de la résistance *d'Aspergillus* sont déployés par le CNR LA-AspC:
1. Le suivi prospectif dans le cadre des demandes d'expertise reçues aux LA-AspC-Sud et LA-AspC-Nord. La détermination de la sensibilité in vitro sera alors effectuée par les 2 techniques EUCAST et gradient d'antifongiques sur gélose (E-Test°Biomerieux et gradient strips°Liofilchem). La première année d'exercice essentiellement consacrée à la mise en place des structures et des outils ne nous permet pas d'analyser ni de diffuser des résultats suffisamment consolidés.
2. L'analyse "macroscopique" de la résistance à l'échelle régionale ou nationale via des enquêtes de terrain auprès de notre réseau de correspondants ou partenaires. C'est ce que nous avons réalisé courant 2023 et les résultats sont présentés ci-dessous au chapitre 3.5. Dans cette approche, les données recueillies sont obtenues et interprétées au niveau de chaque laboratoire mais ont permis pour la 1ère fois de disposer de données nationales.

### 3.3.4 Interfaces avec les réseaux de surveillance nationaux ou internationaux

Les données du LA-AspC sont en interface avec les données du CNRMA-IFI et du LA-InuSual afin de consolider une base de données nationales. Une mise en place d'une base de données AspC-DB sous RedCap et avec une architecture superposable à celle du CNRMA-IFI est en cours de création.

Il n'y a pas actuellement de réseau européen ou international de surveillance des aspergilloses chroniques. Toutefois, un réseau d'experts européens regroupés sous le sigle de CPANet (Chronic Pulmonary Aspergillosis network) s'est récemment constitué pour des partages d'expérience et émettre des recommandations de prise en charge. JP Gangneux fait partie de ce réseau et a contribué aux recommandations récemment publiées (Van Braeckel E, Page I, Davidsen JR, Laursen CB, Agarwal R, Alastruey-Izquierdo A, Barac A, Cadranel J, Chakrabarti A, Cornely OA, Denning DW, Flick H, Gangneux JP, Godet C, Hayashi Y, Hennequin C, Hoenigl M, Irfan M, Izumikawa K, Koh WJ, Kosmidis C, Lange C, Lamprecht B, Laurent F, Munteanu O, Oladele R, Patterson TF, Watanabe A, Salzer HJF; CPAnet. Treatment outcome definitions in chronic pulmonary aspergillosis: a CPAnet consensus statement. Eur Respir J. 2022 Jun 9;59(6):2102950. doi: 10.1183/13993003.02950-2021. PMID: 35236726).

### 3.3.5 Enquêtes ou études ponctuelles concourant à la surveillance

Courant 2023, nous avons mené une enquête flash centrée sur la sensibilité d'*A. fumigatus* aux azolés auprès de 20 centres français (18 CHU et 2 CHG), permettant d'exploiter les résultats de plus de 11.000 déterminations de la sensibilité in vitro.
Il s'agit des premières données nationales sur ce sujet qui révèlent que plus de 500 isolats cliniques d'*A. fumigatus* ont été rendus résistants à au moins une molécule azolée entre 2018 et 2022 par méthode de gradient antifongique sur gélose (90% bandelettes E-Test°Biomérieux et 90% gradient strips°Liofilchem). Il est intéressant de noter que le pourcentage d'isolats rendus résistant varie selon l'antifongique : 13% résistant à l'itraconazole versus 7% au posaconazole, 4% à l'isavuconazole, et 2% au voriconazole. Or l'itraconazole est la molécule la plus prescrite dans le contexte d'aspergillose chronique.
Ces données nouvelles, disponibles à l'échelle nationale pour la première fois, apportent des informations originales sur les patients à risque d'aspergillose chronique et la circulation d'isolats d'*A. fumigatus* résistants aux azolés.

- **Une deuxième enquête s'intéresse aux structures et modalités de gestion des aspergilloses chroniques existantes en France**. A ce jour 27 réponses ont été obtenues (20 CHU et 7 CH ; clôture de l'enquête fin mars 2024). Elles montrent que ⅓ (n=9) des établissements n'ont pas d'accès direct à une structure, que la distribution des structures prédomine au nord (Figure 6) et que ce sont majoritairement des cellules "Aspergilloses - Mycoses" locales. Le rythme des réunions dans ces structures évolue entre hebdomadaire à mensuel ; ce dernier étant majoritaire. Le nombre d'aspergilloses chroniques (hors ABPA) discutées est estimé à <5 cas par réunion à l'exception de la RCP nationale coordonnée par le Dr. C. Godet (>10 cas /réunion). En parallèle, le nombre d'ABPA pris en charge par les mêmes équipes est plus important : estimé à 26 (+/- 35) cas /an en moyenne avec une grande disparité allant de 150 à 5 ABPA, pour un nombre total d'environ 485 ABPA suivi annuellement ; les autres types d'aspergillose chronique étant moins nombreuses entre 100 et 200 en estimation de suivi annuel.

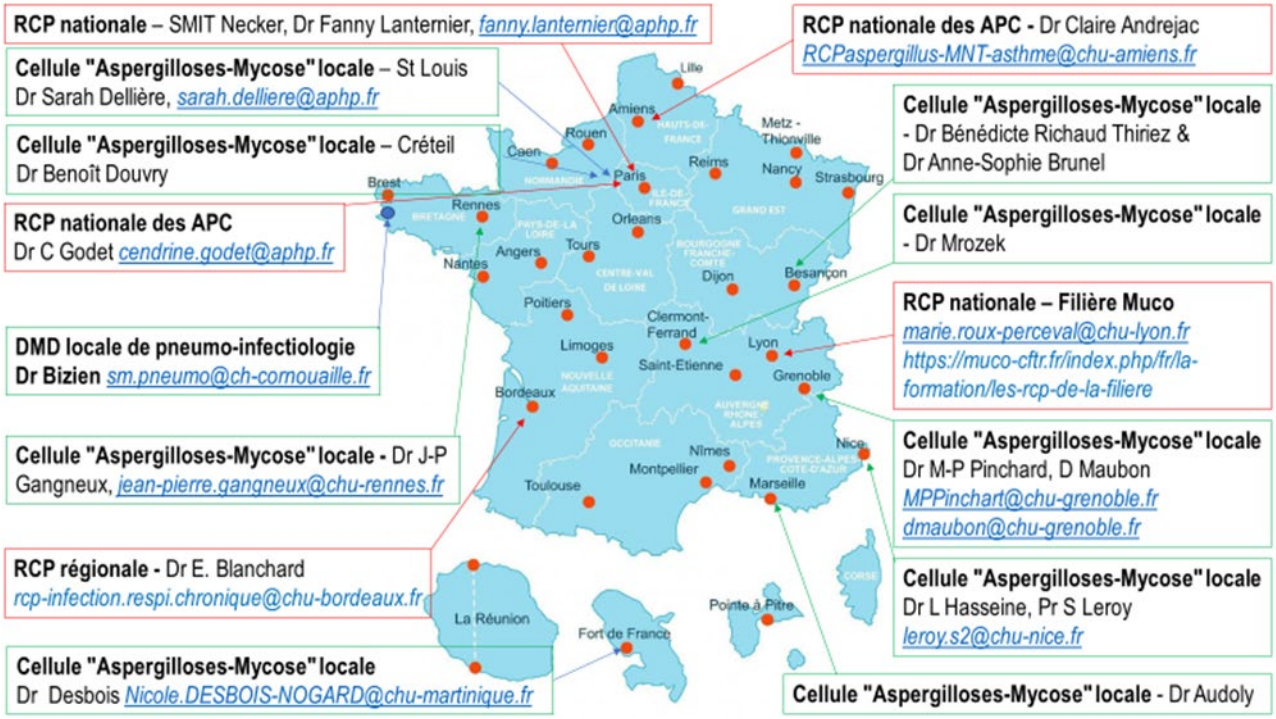



**Figure 6:** Liste et répartition des structures et modalités de gestion des aspergilloses chroniques en France

## 3.4 Alertes

**Aucune alerte en 2023 concernant les aspergilloses chroniques**

## 3.5 Activités de mise à disposition de l'information, de formation et de conseil

### 3.5.1 Conseil et expertise aux professionnels de santé

**Pour le LA-AspC-Sud, participation à :**
-la RCP locale d'infectiologie - Dr C Cazanave - 12 RCP mensuelles, environ 50 dossiers expertisés dont 25 avec de la mycologie
-la RCP régionale " Aspergillose chronique et infection à mycobactérie atypique " - Dr E Blanchard - 6 RCP mensuelles, 26 dossiers expertisés.
-la RCP nationale " Infections dans la mucoviscidose " - Fédération des CRCM- 10 RCP mensuelles, 3 dossiers avec problématique fongique expertisés
-1 dossier expertisé via la RCP nationale " Aspergillose chronique et infection à mycobactérie " - Pr C Andréjak (Figure 3)

**Pour le LA-AspC-Nord participation à :**
-la RCP locale du CHU de Rennes: 1 réunion hebdomadaire, 19 dossiers expertisés
-En 2024, se met en place la participation régulière du LA-AspC à la RCP nationale "Aspergillose chronique" du Dr C Godet (Figure 3)

### 3.5.2 Conseil et expertise aux autorités sanitaires

**Aucune**

### 3.5.3 Conseil et expertise pour d'autres cibles (médias, grand public …)

National
- Participation à la journée "MODALITÉS DES TRAITEMENTS ANTIFONGIQUES CHEZ LES PATIENTS DE PNEUMOLOGIE" co-organisée par la SFMM, SPFL et SFPT le 12/12/2024,
=> Présentation du LA-AspC par JP Gangneux et L. Delhaes
=> Conférence "Aspergillose pulmonaire chronique : le point de vue du mycologue" par JP Gangneux

- Participation aux journées de la Fédération des CRC : Conférence sur "l'évolution de la flore fongique pulmonaire sous modulateur CFTR dans la mucoviscidose, présentation par L. Delhaes, lors des journées de la Fédération des CRCM en mars 2023

International
- Organisation du : European Educational Workshop "Fungal exposome and health issues" sous l'égide de l'ECMM (European Confederation for medical Mycology) par le Pr JP Gangneux à Rennes. 1 session dédiée à l'aspergillose chronique et 1 session dédiée à la résistance d'Aspergillus. Tous les membres du CNR LA-AspC y ont participé.
- Organisation de 2 symposiums au sein du congrès européen TIMM (Trends in Medical Mycology, Athènes, 2023) avec L Delhaes et JP Gangneux comme intervenants : 1 symposium "Epidemiological trends and management of chronic pulmonary aspergillosis (CPA) and allergic bronchopulmonary aspergillosis (ABPA)" et 1 symposium "The respiratory mycobiome".
- Participation au symposium "Updates on the diagnosis of Aspergillus infections : from chronic to invasive diseases" au congrès sud-américain de mycologie médicale (InFocus, Brésil, 2023). Intervention de JP Gangneux sur l'épidémiologie et le diagnostic de l'aspergillose chronique
- Participation de JP Gangneux comme membre expert des recommandations internationales pour la prise en charge des aspergilloses broncho-pulmonaires allergiques à Pune, Inde, 2023.

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

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

Plusieurs projets ont été initiés dès 2023 :
- **Une «Cartographie de moisissures du genre *Aspergillus* et chimiorésistance en Nouvelle Aquitaine**» au sein du PSGAR-MIE de Nouvelle Aquitaine (NA); projet EMERG coordonné par D. Malvy et L. Delhaes, 2023-27.
Brièvement, l'importance des moisissures du genre *Aspergillus* est clairement démontrée en santé humaine comme animale mais l'émergence de résistance aux antifongiques azolés notamment chez Aspergillus fumigatus parfois en lien avec l'utilisation de pesticides est de plus en plus importante, et relève d'une approche one health qui s'intègre parfaitement dans le PSGAR-MIE de NA et rejoint un point central des activités du CNR des Aspergilloses chroniques sur la question de l'émergence de la résistance des *Aspergillus*.
En effet, les données intégrant l'épidémiologie des différentes espèces aspergillaires, leur circulation dans l'environnement, leur résistance et ses mécanismes restent limitées et quasiment inexistantes en Nouvelle Aquitaine, alors que l'évolution phénotypique (dont la résistance aux antifongiques estimée en santé humaine à 5-10%) d'isolats *d'Aspergillus* se fait en réponse aux différentes pressions issues de l'anthropocène.
L'objectif de ce projet est d'établir une cartographie des moisissures du genre Aspergillus et leur résistance aux antifongiques notamment aux azolés en Nouvelle Aquitaine ; les enjeux étant de documenter l'émergence et les liens entre les isolats aspergillaires circulant en Nouvelle Aquitaine chez l'humain, l'animal et le végétal et leur résistance aux antifongiques notamment azolés pour anticiper l'émergence de nouvelles espèces et/ou de nouvelles résistances chez *Aspergillus* et capables de provoquer des aspergilloses chroniques chez l'humain.
Ce projet a été validé et financé par la région NA (1 900 000 d'euros, 2023-27).

- Etude ancillaire du protocole MyCADO (coordonné par S. Imbert, promotion CHU de Bordeaux), visant à caractériser l'exposome fongique des patients asthmatiques sévères traités par biothérapie, grâce au déploiement à leur domicile de collecteurs à poussières au cours des 4 saisons. Au total, 76 patients ont été inclus dans cette étude en régions Nouvelle Aquitaine et Occitanie. Le LA-AspC-Sud collabore en recherchant spécifiquement des espèces d'Aspergillus résistantes aux antifongiques azolés à partir de ces collecteurs à poussière, ce qui représente une opportunité unique de cartographier cette résistance au sein de ces 2 régions.

- Encadrement (S. Imbert) d'une stagiaire de M1 (Sophie Bacquart, interne en infectiologie) pour la mise en place du séquençage Sanger du gène cyp51a d'*A. udagawae*, afin d'investiguer la résistance in vitro aux antifongiques azolés de cette espèce responsable d'infections chroniques (notamment demande d'expertise pour une souche début 2024).

- Le LA-AspC-Nord collabore à 2 PHRC nationaux en cours :
(i) PHRCn ECENVIR : Evaluation de l'intérêt médico-économique des conseillers en environnement intérieur chez les patients asthmatiques. Il s'agit d'évaluer l'intérêt de diminuer l'exposition des patients asthmatiques à différents allergènes dont les allergènes fongiques, à la fois sur le contrôle de l'asthme mais également sur les dépenses de santé. Le recrutement des patients est terminé et les résultats seront bientôt valorisés par une publication (Investigateur principal : JP Gangneux, CHU de Rennes).
(ii) PHRCn CPAAARI : Chronic Pulmonary Aspergillosis and Ambisome Aerosol with Itraconazole (Investigatrice principale: C Godet, CHU Poitiers). Une étude ancillaire au sein du PHC vise à étudier la cinétique des anticorps anti-aspergillaires au cours de l'aspergillose chronique (Investigateur: JP Gangneux, CHU de Rennes).

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

**Publications internationales :**


- Djenontin E, Costa JM, Mousavi B, Nguyen LDN, Guillot J, **Delhaes L**, Botterel F, Dannaoui E. The Molecular Identification and Antifungal Susceptibility of Clinical Isolates of Aspergillus Section Flavi from Three French Hospitals. Microorganisms. 2023 Sep 28;11(10):2429. https://doi.org/10.3390/microorganisms11102429

- Mercier V, Letscher-Bru V, Bougnoux ME, **Delhaes L**, Botterel F, Maubon D, Dalle F, Alanio A, Houzé S, Dannaoui E, Cassagne C, Cassaing S, Durieux MF, Fekkar A, Bouchara JP, **Gangneux JP**, Bonhomme J, Dupont D, Costa D, Sendid B, Chouaki T, Bourgeois N, Huguenin A, Brun S, Mahinc C, Hasseine L, Le Gal S, Bellanger AP, Bailly E, Morio F, Nourrisson C, Desbois-Nogard N, Perraud-Cateau E, Debourgogne A, Yéra H, Lachaud L, Sasso M. Gradient concentration strip- specific epidemiological cut-off values of antifungal drugs in various yeast species and five prevalent Aspergillus species complexes. Clin Microbiol Infect. 2023 May;29(5):652.e9-652.e15. https://doi.org/10.1016/j.cmi.2022.11.030 .

- **Imbert S**, Normand AC, Costa D, Gabriel F, Lachaud L, Schuttler C, Cassaing S, Mahinc C, Hasseine L, Demar M, Brun S, Bonnal C, Moreno-Sabater A, Becker P, Piarroux R, Fekkar A. Multicentric analysis of the species distribution and antifungal susceptibility of clinical isolates from *Aspergillus* section *Circumdati*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2023 Apr 18;67(4):e0146222. https://doi.org/10.1128/aac.01462-22

- **Imbert S,** Portejoie L, Pfister E, Tauzin B, Revers M, Uthurriague J, Hernandez-Grande M, Lafon ME, Jubert C, Issa N, Dumas PY, **Delhaes L**. A Multiplex PCR and DNA-Sequencing Workflow on Serum for the Diagnosis and Species Identification for Invasive Aspergillosis and Mucormycosis. J Clin Microbiol. 2023 Jan 26;61(1):e0140922. doi: 10.1128/jcm.01409-22.

- Blez D, Bronnimann D, Rammaert B, Zeller V, **Delhaes L**, Hustache L, Grenouillet F, Traversier N, Bonhomme J, Chouaki T, Perpoint T, Persat F, Bougnoux ME, Bayle S, Quaesaet L, Nevez G, Boutoille D, Morio F, Pougnet L, Queyrel-Moranne V, Heym BE, Guillemain R, Dannaoui É, Roux A, **Garcia-Hermoso D, Lanternier F.** Invasive bone and joint infections from the French Scedosporiosis/lomentosporiosis Observational Study (SOS) cohort: no mortality with long-term antifungal treatment and surgery. Med Mycol. 2023 Mar 2;61(3):myad023. doi: 10.1093/mmy/myad023.

- Enaud R, Sioniac P, **Imbert S,** Janvier PL, Camino A, Bui HN, Pillet O, Orieux A, Boyer A, Berger P, Gruson D, **Delhaes L**, Prevel R. Lung Mycobiota α-Diversity Is Linked to Severity in Critically Ill Patients with Acute Exacerbation of Chronic Obstructive Pulmonary Disease. Microbiol Spectr. 2023 Mar 28;11(2):e0506222. doi: 10.1128/spectrum.05062-22.

- de Hoog S, Walsh TJ, …, **Gangneux J-P**,…, **Lanternier F**, …. A conceptual framework for nomenclatural stability and validity of medically important fungi: a proposed global consensus guideline for fungal name changes supported by ABP, ASM, CLSI, ECMM, ESCMID-EFISG, EUCAST-AFST, FDLC, IDSA, ISHAM, MMSA, and MSGERC. J Clin Microbiol. 2023 Nov 21;61(11):e0087323. doi:10.1128/jcm.00873-23

- **Gangneux JP**, Rhodes JL, Papon N. Airway microbiome: environmental exposure-respiratory health nexus. Trends Mol Med. 2023 Nov;29(11):875-877. doi:10.1016/j.molmed.2023.08.011.

- Galmiche S, …, **Gangneux JP**, **Guegan H**, … ,**Lanternier F**,…; French Mycoses Study Group. Invasive fungal diseases in patients with autoimmune diseases: a case series from the French RESSIF network. RMD Open. 2023 Aug;9(3):e003281.doi: 10.1136/rmdopen-2023-00328

- Boglione-Kerrien C, Zerrouki S, Le Bot A, Camus C, Marchand T, Bellissant E, Tron C, Verdier MC, **Gangneux JP**, Lemaitre F. Can we predict the influence of inflammation on voriconazole exposure? An overview. J Antimicrob Chemother. 2023 Nov 6;78(11):2630-2636.doi: 10.1093/jac/dkad293

- Reizine F, **Gangneux JP**. Antifungal management in ICU: careful follow-up of voriconazole prescription needed! Crit Care. 2023 Feb 23;27(1):71. doi: 10.1186/s13054-023-04362-4

- **Gangneux JP**, Hoenigl M, Papon N. How to lose resistance to *Aspergillus* infections. Trends Microbiol. 2023 Mar;31(3):222-224. doi:10.1016/j.tim.2023.01.008

- Boglione-Kerrien C, Morcet J, Scailteux LM, Bénézit F, Camus C, Mear JB, **Gangneux JP**, Bellissant E, Tron C, Verdier MC, Lemaitre F. Contribution of voriconazole N-oxide plasma concentration measurements to voriconazole therapeutic drug monitoring in patients with invasive fungal infection. Mycoses. 2023 May;66(5):396-404. doi: 10.1111/myc.13570

- Salmanton-García J, Hoenigl M, **Gangneux J**P, Segal E, Alastruey-Izquierdo A, Arikan Akdagli S, Lagrou K,

Özenci V, Vena A, Cornely OA. The current state of laboratory mycology and access to antifungal treatment in Europe: a European Confederation of Medical Mycology survey. Lancet Microbe. 2023 Jan;4(1):e47-e56. doi: 10.1016/S2666-5247(22)00261-0

- Cogliati M, …, **Gangneux JP**, …, **Guegan H**, …J. Environmental and bioclimatic factors influencing yeasts and molds distribution along European shores. Sci Total Environ. 2023 Feb 10;859(Pt 1):160132. doi: 10.1016/j.scitotenv.2022.160132

**Communications Nationales**

- F. Mialon-Geymet, R. Enaud, S. Bui, J. Macey, E. Blanchard, **S. Imbert**, **L. Delhaes**. "Le diagnostic mycologique à l'ère des modulateurs du cftr", Communication affichée au congrès de la SFMM – Mai 2023, Marrakech, Maroc.

- **S. Imbert**, X. Brousse, E. Pfister, N. Issa, P-Y. Dumas, E. Blanchard, **L. Delhaes**. "Apports de la PCR duplex *Aspergillus spp.* / Mucorales pour le diagnostic des co-infections fongiques" Communication orale lors du 18e congrès de la SFM, Octobre 2023, Rennes, France.

- **JP Gangneux** et al. « Impact des conseillers en environnement intérieur sur le controle clinique de l'asthme: l'etude multicentrique et randomisée ECENVIR ». Communication affichée au congrès de la SFMM – Mai 2023, Marrakech, Maroc

- F Harel, **H Guegan, JP Gangneux. «** Risque environnemental aspergillaire en periode de pandemie covid19 : quel impact des chambres en pression negatives ? » Communication orale au congrès de la SFMM – Mai 2023, Marrakech, Maroc

- **JP Gangneux**. "Les antifongiques systémiques: le nouvel arsenal thérapeutique". Communication orale au congrès de la Société Française de Réanimation Médicale - Juin 2023, Paris.

**Communications Internationales**

**- L. Delhaes**. "The lung microbiome: Recent concept with novel functions in Health and Disease". Conférence lors du TIMM, Octobre 2023, Athènes, Grèce

**Conférences par invitation**

**- L. Delhaes:** "le diagnostic microbiologique à l'ère des modulateurs: évolution de la flore fongique" Conférence lors des journées nationales de la filière mucoviscidose, Mars 2023, Paris

**- L. Delhaes**. "The lung microbiome: Recent concept with novel functions in Health and Disease". Conférence lors du TIMM, Octobre 2023, Athènes, Grèce

**- JP. Gangneux**. "Fungal infections in cystic fibrosis patients: The lung microbiome: Recent concept with novel functions in Health and Disease". Conférence lors de l'Austrian Society for Medical Mycology workshop du TIMM, Octobre 2023, online.Athènes, Grèce

**- JP. Gangneux**. "Epidemiology and mycological tools for chronic pulmonary aspergillosis". Conférence lors du TIMM, Octobre 2023, Athènes, Grèce

**- JP. Gangneux**. "Management of chronic aspergillosis : Diagnosis, treatment and preventive measures". Conférence lors du congrès Infocus, Brésil, novembre 2023.

**Encadrements de master et/ou PhD:**

**- Encadrement (S. Imbert) d'une stagiaire de M1 (Sophie Bacquart, interne en infectiologie)** pour la mise en place du séquençage Sanger du gène *cyp51a* d'*A. udagawae*, afin d'investiguer la résistance *in vitro* aux antifongiques azolés de cette espèce responsable d'infections chroniques (notamment demande d'expertise pour une souche début 2024).

## 3.7 Coopération avec les laboratoires de santé animale, de sécurité sanitaire des aliments, environnementaux

-A travers le programme PSGAR-MIE de Nouvelle Aquitaine (projet EMERG, L. Delhaes & D. Malvy), une coopération avec l'ANSES (LNR), l'INRAE, les écoles de vétérinaire de Maison Alfort et Toulouse et les écologues de l'université de La Rochelle a été initiée fin 2023.
- Le CNR LA-AspC-Nord collabora via le PHRCn ECENVIR (IP: JP Gangneux) avec l'Ecole des Hautes Etudes en Santé Publique (EHESP, Rennes) et son laboratoire d'analyses environnementales (LERES; Dr P Le Cann

## 3.8 Programme d'activité pour les années suivantes

**Pour le LA Asp-C :**

- Déployer l'ensemble des techniques adaptées aux objectifs de surveillance demandée par SPF avec montée en puissance de la base de données des cas d'aspergilloses chroniques et de la surveillance de la sensibilité aux ATFs des isolats aspergillaires recensés et testés

- Poursuivre les enquêtes épidémiologiques de prévalence des aspergilloses chroniques et de la sensibilité in vitro d'*Aspergillus* dans ce contexte

- Développer l'approche One Health de l'exposome fongique à travers notamment les projets financés MyCADO (2022-24) et PSGAR-MIE « EMERG » (2023-27) en région Nouvelle Aquitaine, en finalisant notamment l'étude ancillaire du programme MyCADO

- Finaliser l'étude ancillaire du PHRCn CPAAARI (IP: C Godet) sur la cinétique des anticorps anti-aspergillaires chez les patients présentant une aspergillose pulmonaire chronique sous traitement antifongique. Cette étude permet également de comparer les performances de différentes techniques de détection d'anticorps et d'antigènes aspergillaires.

- Poursuivre l'étude de la séroprévalence des IgG anti-aspergillaires chez les patients sains donneurs de sang. Aucune étude de ce type et de cette ampleur ( 2 000 donneurs) n'a été réalisée et permettra d'analyser, compléter quelle valeur nous pouvons donner à une sérologie aspergillaire positive à un patient.

- Le LA-AspC-Nord a débuté fin 2023 le suivi d'une cohorte de patients atteints de fibrose pulmonaire idiopathique (en collaboration avec le service de pneumologie du CHU de Rennes, centre de référence pour les fibroses pulmonaires idiopathiques). Notre objectif est d'analyser le taux de patients colonisés/infectés chroniquement par *Aspergillus* et la séroprévalence des anticorps anti-aspergillaires dans cette pathologie pulmonaire chronique.

## 3.9 Annexe 1 : Missions & organisation du CNR

### 3.9.1 Missions du CNR et de ses éventuels laboratoires associés

**Cf. corps de texte**

### 3.9.2 Organisation du CNR et de ses éventuels laboratoires associés

**Cf . corps de texte**

### 3.9.3 Locaux et équipements

Les surfaces de travail mises à disposition du LA-AspC dans chacun des 2 CHU sont de trois ordres : des surfaces dédiées au CNR, des surfaces mutualisées entre la mycologie de routine et le CNR et des surfaces mutualisées entre la microbiologie et le CNR (Figures 7 et 8).

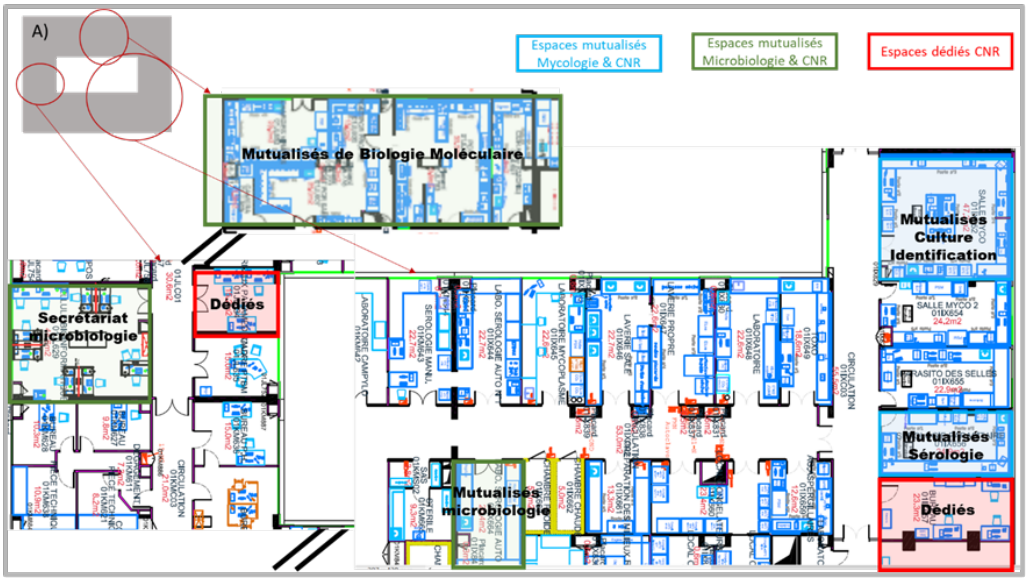



**Figure 7 :** Présentation des locaux du laboratoire de Parasitologie-Mycologie du CHU de Bordeaux



### 3.9.4 Collections de matériel biologique

**Les collections de matériel biologique du LA-AspC** ont été initiées comme suit :
- Les souches aspergillaires ou sérums adressés pour expertise sont mises en collection dédiée du LA-AspC-Sud comme au LA-AspC-Nord, dans les CRB respectifs : soit le CRB-Plurithématique du CHU de Bordeaux (centre du Tondu sur le Groupe Hospitalier Pellegrin coordonné par Dr I. Pellegrin), soit le CRB plurithématique du CHU de Rennes “Biobanque Pierre Rochcongar” (Hôpital Pontchaillou) coordonné par le Dr C. Ménard.
- Sur chacun des 2 sites, la collection du LA-AspC comprend des souches bien caractérisées appartenant au genre Aspergillus et issus de cas d'APC déclarés dans la base de données AspC-DB qui sont conservées sur tubes de cryobilles à -80°C au CRB de chaque CHU, auxquelles s'ajoutent des souches de référence provenant de diverses collections (CBS, ATCC, IP, NRRL) mais qui sont non distribuables.
Les sérums faisant l’objet de demande d’expertise sont également conservés à -80°C au CRB de chaque CHU.
Enfin, une collection d’ADN génomique de tout ou partie des isolats d'Aspergillus adressés au LA-AspC a également été initiée.

Ces différentes mises en collection permettent d'envisager de futurs travaux de phénotypage, de comparaison de sensibilité in vitro aux ATFs, de typage moléculaire, d'analyse phylogénétique ou de comparaison de kits par le LA-AspC ou par CNRMA-IFI en cas d’étude comparative.

Par ailleurs, les CRB de Bordeaux et de Rennes disposent de toutes les autorisations nécessaires à l'établissement de la collection :
• Numéro d'autorisation : AC-2014-2166, qui répond à toutes les conditions du Ministère de la Recherche (numéro de déclaration DC-2014-2164) pour le CRB de Bordeaux,
• CRB de Rennes "Biobanque Pierre Rochcongar" certifié selon la norme NF S96-900.

### 3.9.5 Démarche qualité du laboratoire

**Pour le LA AspC-Sud** : les activités de mycologie : Examen direct, ensemencement, culture et identification des levures et champignons filamenteux (en dehors des dermatophytes) avec identification phénotypique (macro- & microscopique) et identification par spectrométrie de masse MALDI-TOF (Bruker) sont accréditées COFRAC (https://tools.cofrac.fr/annexes/sect8/8-3455.pdf) (Tableau 2).
Par ailleurs, les techniques de détection d’antigènes (galactomannane et B-D-glucanes déployés pour le diagnostic des aspergilloses invasives peuvent potentiellement servir d’appoint au diagnostic d’aspergillose chronique).
Les sérologies incluant la sérologie aspergillaire ont été accréditées par extension des dosages de Galactomannane faisant l’objet d’un suivi sur l’audit de décembre 2022. Un dossier de validation de méthode est en cours de réalisation pour la technique du Western Blot aspergillaire.
De même, les techniques de génotypage par séquençage Sanger font l’objet d’une validation de méthode en cours.
La grande majorité de nos analyses bénéficie d’un programme de CQI et EEQ (Tableau 4).

**Tableau 2 :** Liste des lignes de portées auditées et accréditées du LA-AspC-Sud par le COFRAC en 2023

| | | |
|---|---|---|
| Examen mycologique direct | Sang et dérivés | Examen direct après coloration (imprégnation argentique selon Musto) |
| | Liquides biologiques | |
| | Biopsies et tissus | |
| Examen mycologique direct | Biopsies et tissus | Examen direct après coloration MGG |
| | Liquides biologiques | |
| | Sang et dérivés | |
| Examen mycologique sur flacon d'hémoculture | Liquides biologiques | Détection colorimétrique de croissance |
| | Sang et dérivés | |
| Recherche de Pneumocystis jirovecii | Prélèvements respiratoires | PCR en temps réel |
| Recherche et identification de champignons filamenteux (hors dermatophytes) | Biopsies et tissus | Mise en culture manuel, examen morphologique macro- et microscopique des cultures, identification des champignons filamenteux par spectrométrie de masse |
| | Sang et dérivés | |
| | Liquides biologiques | |
| Recherche et identification des levures | Biopsies et Tissus | Mise en culture manuelle, examen direct après culture, identification des levures par spectrométrie de masse |
| | Liquides biologiques | |
| | Sang et dérivés | |

**Pour le LA AspC-Nord** *:* Nos activités de mycologie en relation avec l'activité du CNR comprennent: examen direct, ensemencement, culture et identification des levures et champignons filamenteux avec identification phénotypique (macro- & microscopique), identification par spectrométrie de masse MALDI-TOF (Bruker, bases Bruker et/ou MSI2)(Tableau 3). Les outils moléculaires déployés dans le laboratoire permettent la détection d'*Aspergillus* par PCR (PCR simplex ou PCR multiplex détectant également des mutations du gène *cyp51a*), ainsi que l'identification par séquençage moléculaire (ITS1-2 et b-tubuline) et séquençage du gène de résistance aux azolés *cyp51a*).

Les activités de sérologie comprennent la détection d'IgG anti-aspergillaire (tests dédiés par ELISA°Biorad ou immunoélectrophorèse maison ; ou bien inclus dans la sérologie poumon de fermier/éleveur d'oiseaux par immunoélectrophorèse maison). Par ailleurs, les techniques de détection d'antigènes (galactomannane et B-D-glucanes déployés pour le diagnostic des aspergilloses invasives peuvent potentiellement servir d'appoint au diagnostic d'aspergillose chronique).

La grande majorité de nos analyses bénéficie d'un programme de CQI et EEQ (Tableau 4).

**Tableau 3 :** Liste des lignes de portées auditées et accréditées du LA-AspC-Nord par le COFRAC.

| Ligne de portée | Examen/ analyse | Principe de la méthode | Référence de la méthode | Evolution (ajout, changement affectant les performances de la méthode, ...) |
|---|---|---|---|---|
| MG01 | Aspergillus-Anticorps | EIA microplaques Automatisé et Immunoélectrophorèse Manuel | LBM EN 002640 : Matrice d'évaluation des risques : Dosage des anticorps anti-Aspergillus par ELISA<br>LBM EN 002856 : Matrice d'évaluation des risques : Détection d'anticorps parasitaires et fongiques par immuno-électrophorèse<br>LBM EN 002976 : Dossier de vérification de méthode : détection des anticorps anti Aspergillus | Date initiale d'accréditation (ajout) : 05/10/2018<br><br>Changem.ent d'appareil : Evolis en février 2020<br><br>Changement de réactif : antigènes aspergillaires pour l'immunoélectrophorèse le 03/03/2023 (GPF21-2023-0015) |
| PM07 | Poumon de Fermier-Eleveur d'oiseaux-Anticorps (aviaires, Micropolyspora feani, Aspergillus) | Double Diffusion (Ouchterlony) Manuel | LBM EN 003119 : Dossier de validation de méthode : détection des anticorps Poumon de fermier-Eleveur d'oiseaux (Ouchterlony)<br>LBM EN 003118 : Matrice d'évaluation des risques : Détection d'anticorps Poumon de fermier-Eleveur d'oiseaux par double diffusion (Ouchterlony) | Date initiale d'accréditation (extension) : 22/11/2019<br><br>Changement de réactif : fin janvier 2022 : GPF21-2022-0031 |
| MG01 | Aspergillus-Antigènes | EIA microplaques Automatisé | LBM EN 003619 : Dossier de vérification de méthode : dosage des antigène aspergillaires<br>LBM EN 003557 : Matrice d'évaluation des risques : Dosage des Antigènes aspergillaires sur Evolis (BioRad) | Date initiale d'accréditation (31/12/2020) : 31/12/2020 |
| PM01 | Recherche de levures et Filamenteux (moisissures et dermatophytes) par examen direct-Mise en culture | Examen direct et ensemencements | LBM EN 002988 : Matrice d'évaluation des risques : Mycologie des prélèvements cutanés Examen direct-Ensemencement<br><br>LBM EN 002987 : Vérification de méthode - Mycologie des prélèvements cutanés Examen direct-Ensemencement | Date initiale d'accréditation (extension) : 05/10/2018 |
| PM02 | Aspergillus fumigatus, champignons filamenteux et mucorales- Détection d'acide nucleiques par PCR | Détection d'acide nucleiques après extraction, par PCR Manuel et Automatisé | LBM EN 004039 : Dossier de validation de méthode: Détection d'ADN d'Aspergillus, champignons filamenteux et mucorales par PCR en temps réel<br>LBM EN 002855 Matrice de risque : Détecter l'ADN parasitaire ou fongique par PCR | Date initiale d'accréditation (ajout) : 31/12/2021<br><br>Changement d'automate : Changement d'automate de qPCR (StepOne vers QS5) le 06/09/2022(GPF21-2022-0024) |

**Tableau 4 :** Liste des analyse et techniques du LA-AspC bénéficiant d'un programme de CQI et/ou EEQ

| **Analyses et Techniques** | **CQI / EEQ** |
|---|---|
| ED, coloration, cultures et identification MALDI-TOF | Bordeaux : Kalidiv, CTCB<br>Rennes : Biologie prospective |
| Antifongigramme | Bordeaux : Aglae<br>Rennes : Aglae |
| PCR *Aspergillus* et *A. fumigatus* | Bordeaux : QCMD<br>Rennes : QCMD |
| Galactomannane (dosage dans le surnageant des prélèvements respiratoires) | Bordeaux : Probioqual<br>Rennes : Probioqual |
| Sérologie aspergillaire : Screening en ELISA (BioRad) | Bordeaux : Probioqual<br>Rennes : Probioqual |
| Sérologie aspergillaire : Confirmation en Western Blot (WB,LDBio / immunoélectrophorèse) | Bordeaux: Probioqual<br>Rennes : Probioqual |
| Séquençage fongique | Bordeaux CIQ<br>Rennes : CIL |

## 3.10 Annexe 2 : Capacités techniques du CNR

### 3.10.1 Liste des techniques de référence

**Le LA des Aspergilloses Chroniques** dispose de différentes techniques complémentaires entre les laboratoires de Bordeaux et Rennes, dont beaucoup sont accréditées COFRAC en 2023, comme listées dans le tableau 5 ci-après. De plus, le LA-AspC-Sud développe une approche de séquençage ciblant les gènes cyp51a des différentes espèces et sections d'Aspergillus par méthode Sanger, afin d'étudier la résistance moléculaire aux antifongiques azolés. Ceci a fait l'objet d'un encadrement de stage de M1 (cf supra) et d'un design de nouvelles amorces par le LA-AspC. Ces amorces sont listées en tableau 6. Une fois l'ensemble des protocoles validés, ils seront partagés et transférés au LA-AspC-Nord. Le LA-AspC-Sud investit également le champ du NGS avec différents protocoles notamment de WGS d'isolats du genre *Aspergillus* (en cours).
En parallèle, le LA-ApsC-Nord déploie les activités de séquençage par méthode Sanger et par NGS, avec la participation à un nouveau CIL pour le séquençage des champignons. Nous réalisons également une validation de méthode pour la détection rapide de mutations du gène cyp51a conférant une résistance d'*Aspergillus* aux azolés (technique Aspergenius°Pathonostics. Enfin, des travaux sur le mycobiote respiratoire et digestif des patients atteints de mucoviscidose est en cours.

**Tableau 5 :** Listes des techniques disponibles au sein du LA-AspC et état de leur accréditation à échéance de l'année 2023

| **Analyses et Techniques** | **Bordeaux / Accréditation** | **Rennes / Accréditation** | **Commentaires** |
|---|---|---|---|
| ED, coloration et cultures | OUI / OUI | OUI | Activités quotidiennes |
| Identification par MALDI-ToF | OUI / OUI | OUI / En cours | Activités quotidiennes |
| Antifongigramme | OUI | OUI / En cours | Méthode Etest® en routine<br>Méthode EUCAST en cours d'homogénéisation avec le CNRMA |
| | | | |
| PCR multiplexe ciblant *Aspergillus* et les mucorales | OUI (PCR multiplexe) | OUI (plusieurs PCR simplexes) | Activités trihebdomadaires |
| PCR ciblant *A. fumigatus* | OUI | OUI | Activités trihebdomadaires |
| Identification moléculaire par séquençage de gènes d'intérêt : ITS, beta-tubuline, calmoduline, elongation factor, 28S, Cyp51s... | OUI | OUI | Au cas par cas |
| Galactomannane (dosage dans le surnageant des prélèvements respiratoires) | OUI / OUI | OUI | Intérêt à déterminer dans les APC |
| Sérologie aspergillaire : Screening en ELISA (BioRad) | OUI / OUI | OUI | Activités hebdomadaires<br>Spécifique du genre |
| Sérologie aspergillaire : Confirmation en Western Blot (WB,LDBio) | OUI / OUI | NON | Spécifique d'*A. fumigatus* |
| | | | Méthode maison, non spécifique d'*A fumigatus* |

| | | | |
|---|---|---|---|
| Sérologie aspergillaire : Confirmation en Immuno-électrophorèse avec détection de l'activité catalasique (IEP) | NON | OUI | donc permettant de couvrir non seulement les réponses sérologiques des APC et complémentaire de celles par WB |
| NGS | OUI | En cours | Activité réalisable au cas par cas |

**Tableau 6 :** Liste des amorces sélectionnées pour le séquençage du gène CYP51A d'espèces des sections Fumigati, Nigri, Flavi et du sous-genre nidulantes

| | Amorces | 5' → 3' | Source |
|---|---|---|---|
| **Sous-genre nidulantes** | Nid F1 | ATCACCRTGGCCRGATTA | LA-ASPc-Sud |
| | Nid F2 | GYTCATGGAGCAGAAGAARTT | LA-ASPc-Sud |
| | Nid F3 | TCGCGTTGGGRAAGTAYTCKTCRCT | LA-ASPc-Sud |
| | Nid R1 | ATYGTAAGYTCRGCCATGGC | LA-ASPc-Sud |
| | Nid R2 | TCGCGTTGGGRAAGTAYTC | LA-ASPc-Sud |
| | R3 nidulans | TAACGGGATCTTGAAATCAGG | LA-ASPc-Sud |
| | R3 usti | GCCGTTGCCGATGATATAGG | LA-ASPc-Sud |
| | R3 sydowii | CTTCTATAACAACAAGCATGT | LA-ASPc-Sud |
| **Section Nigri** | Nig 1F | TKTYYCTGCCTACRGTCGCTT | Adapté de Howard 2011 |
| | Ancyp51A2F | GTCCGAYGTTGTGTACGACTG | Howard 2011 |
| | Ancyp51A3F | GGACAAAGAGATTGCYCACATGATG | Howard 2011 |
| | Nig 4F | GGAGAGATGGTSGACTACGG | Adapté de Howard 2011 |
| | Ancyp51A5R | GATGCTTATTACAAGGTACTAG | Howard 2011 |
| | Ancyp51A6R | CCTGGTGAGGCGAGTAGAAC | Howard 2011 |
| | Ancyp51A7R | CTTMTCCTCGTCTGGGTTCTTG | Howard 2011 |
| | Ancyp51A8R | CTGTAGACCTCTTCCGCGCT | Howard 2011 |
| | Wel R | CTTCAAACCAGCTCAGGTAC | LA-ASPc-Sud |
| **Section Flavi** | A2F | CTTCTGGGTCTTCGCACTTC | Djenontin 2024 |
| | A3F | GCTCACCACGCCAGTCTT | Djenontin 2024 |
| | A4F | TCGGACATGATCTGGAACCT | Djenontin 2024 |
| | A2R | CCAGTGCCGCCTGAGTAA | Djenontin 2024 |
| | A3R | GCAGAGGCTGTCCATTCTTG | Djenontin 2024 |
| | Rev | CGCTAACTATGGTTGACTCTA | Nagresi 2021 |
| **Section Fumigati** | GATI1-F | CTCGAAATGGTGYCGATGCTAT | LA-ASPc-Sud |
| | GATI1-R | AAAATGGTAATCTCAGCCAT | LA-ASPc-Sud |
| | GATI2-F | AAGTTCATCAAGTACGGCTTGA | LA-ASPc-Sud |
| | GATI2-R | CAGCATAATCCAGGCGC | LA-ASPc-Sud |
| | GATI3-F | CACATGATGATAACCCTGTT | LA-ASPc-Sud |
| | CYP4-R_uda | GATCGCACCGTGTCCTTTG | Talbot 2019 |
| | CYP4-R2 | CCYATTYCGATCACAMCAA | LA-ASPc-Sud |

### 3.10.2 Liste des techniques recommandées par le CNR

**Le LA-AspC recommande les techniques suivantes**:

- Examen direct et culture pour l'obtention d'*Aspergillus* : ED entre lame et lamelles ou après coloration par MGG ou Gomori-Grocott - deux cultures sur milieu Sabouraud incubées à 30+2°C et à 35+2°C) pendant 15 jours.
- Identification des cultures par analyse macroscopique et microscopique, associée à une identification par spectrométrie de masse MALDI-TOF (en utilisant préférentiellement la base de données académiques MSI-2).

- Séquençage moléculaire pour identification d'*Aspergillus* au rang d'espèce (ITS1-2 + b-tubuline et/ou calmoduline) ou pour caractériser le gène cyp51a porteur de mutations éventuellement associées à la résistance in vitro d'Aspergillus aux azolés.
- Détermination de la sensibilité d'Aspergillus aux antifongiques par la méthode de bandelette de gradient antifongique sur gélose (en routine) ou selon la méthode EUCAST (en expertise)
- Sérologie aspergillaire : dépistage des IgG par technique ELISA ; technique de confirmation des IgG par immunoélectrophorèse ou par western blot