

Université de Lille
Année Universitaire 2019/2020
Faculté de Pharmacie de Lille

**MEMOIRE
POUR LE DIPLOME D'ETUDES SPECIALISEES
DE BIOLOGIE MEDICALE**

Soutenu publiquement le 29 juin 2020

Par Mme Vicky LÊ

**conformément aux dispositions réglementaires en vigueur
tient lieu de**

THESE EN VUE DU DIPLÔME D'ETAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE

**Sensibilité des levures aux principaux antifongiques systémiques :
intérêt du système Sensititre™YeastOne™ et détermination des ECOFF**

Membres du jury :

Président : Pr Delphine ALLORGE, PU-PH, CHU de Lille

Assesseurs : Pr Boualem SENDID, PU-PH, CHU de Lille

Dr Éric Dannaoui, MCU-PH, HEGP à Paris

Dr Séverine LORIDANT, PH, CHU de Lille

Université de Lille

Président :	Jean-Christophe CAMART
Premier Vice-président:	Nicolas POSTEL
Vice-présidente formation :	Lynne FRANJIÉ
Vice-président recherche :	Lionel MONTAGNE
Vice-président relations internationales :	François-Olivier SEYS
Vice-président stratégie et prospective	Régis BORDET
Vice-présidente ressources	Georgette DAL

Directeur Général des Services:	Pierre-Marie ROBERT
Directrice Générale des Services Adjointe :	Marie-Dominique SAVINA

Faculté de Pharmacie

Doyen :	Bertrand DÉCAUDIN
Vice-doyen et Assesseur à la recherche :	Patricia MELNYK
Assesseur aux relations internationales :	Philippe CHAVATTE
Assesseur aux relations avec le monde professionnel :	Thomas MORGENROTH
Assesseur à la vie de la Faculté :	Claire PINÇON
Assesseur à la pédagogie :	Benjamin BERTIN
Responsable des Services :	Cyrille PORTA
Représentant étudiant :	Victoire LONG

Liste des Professeurs des Universités - Praticiens Hospitaliers

Civ.	NOM	Prénom	Laboratoire
Mme	ALLORGE	Delphine	Toxicologie
M.	BROUSSEAU	Thierry	Biochimie
M.	DÉCAUDIN	Bertrand	Pharmacie Galénique
M.	DEPREUX	Patrick	ICPAL
M.	DINE	Thierry	Pharmacie clinique
Mme	DUPONT-PRADO	Annabelle	Hématologie
M.	GRESSIER	Bernard	Pharmacologie
M.	LUYCKX	Michel	Pharmacie clinique

M.	ODOU	Pascal	Pharmacie Galénique
M.	STAELS	Bart	Biologie Cellulaire

Liste des Professeurs des Universités

Civ.	NOM	Prénom	Laboratoire
M.	ALIOUAT	EI Moukhtar	Parasitologie
Mme	AZAROUAL	Nathalie	Physique
M.	BERTHELOT	Pascal	Onco et Neurochimie
M.	CAZIN	Jean-Louis	Pharmacologie – Pharmacie clinique
M.	CHAVATTE	Philippe	ICPAL
M.	COURTECUISSÉ	Régis	Sciences végétales et fongiques
M.	CUNY	Damien	Sciences végétales et fongiques
Mme	DELBAERE	Stéphanie	Physique
M.	DEPREZ	Benoît	Lab. de Médicaments et Molécules
Mme	DEPREZ	Rebecca	Lab. de Médicaments et Molécules
M.	DUPONT	Frédéric	Sciences végétales et fongiques
M.	DURIEZ	Patrick	Physiologie
M.	FOLIGNE	Benoît	Bactériologie
M.	GARÇON	Guillaume	Toxicologie
Mme	GAYOT	Anne	Pharmacotechnie Industrielle
M.	GOOSSENS	Jean François	Chimie Analytique
M.	HENNEBELLE	Thierry	Pharmacognosie
M.	LEMDANI	Mohamed	Biomathématiques
Mme	LESTAVEL	Sophie	Biologie Cellulaire
M.	LUC	Gerald	Physiologie
Mme	MELNYK	Patricia	Onco et Neurochimie
M.	MILLET	Régis	ICPAL
Mme	MUHR – TAILLEUX	Anne	Biochimie
Mme	PAUMELLE-LESTRELIN	Réjane	Biologie Cellulaire
Mme	PERROY	Anne Catherine	Législation
Mme	ROMOND	Marie Bénédicte	Bactériologie
Mme	SAHPAZ	Sevser	Pharmacognosie
M.	SERGHÉRAERT	Eric	Législation
Mme	SIEPMANN	Florence	Pharmacotechnie Industrielle
M.	SIEPMANN	Juergen	Pharmacotechnie Industrielle
M.	WILLAND	Nicolas	Lab. de Médicaments et Molécules

Liste des Maîtres de Conférences - Praticiens Hospitaliers

Civ.	NOM	Prénom	Laboratoire
Mme	BALDUYCK	Malika	Biochimie
Mme	GARAT	Anne	Toxicologie
Mme	GOFFARD	Anne	Bactériologie
M.	LANNOY	Damien	Pharmacie Galénique
Mme	ODOU	Marie Françoise	Bactériologie
M.	SIMON	Nicolas	Pharmacie Galénique

Liste des Maîtres de Conférences

Civ.	NOM	Prénom	Laboratoire
Mme	ALIOUAT	Cécile Marie	Parasitologie
M.	ANTHERIEU	Sébastien	Toxicologie
Mme	AUMERCIER	Pierrette	Biochimie
Mme	BANTUBUNGI	Kadiombo	Biologie cellulaire
Mme	BARTHELEMY	Christine	Pharmacie Galénique

Mme	BEHRA	Josette	Bactériologie
M	BELARBI	Karim	Pharmacologie
M.	BERTHET	Jérôme	Physique
M.	BERTIN	Benjamin	Immunologie
M.	BLANCHEMAIN	Nicolas	Pharmacotechnie industrielle
M.	BOCHU	Christophe	Physique
M.	BORDAGE	Simon	Pharmacognosie
M.	BOSC	Damien	Lab. de Médicaments et Molécules
M.	BRIAND	Olivier	Biochimie
M.	CARNOY	Christophe	Immunologie
Mme	CARON	Sandrine	Biologie cellulaire
Mme	CHABÉ	Magali	Parasitologie
Mme	CHARTON	Julie	Lab. de Médicaments et Molécules
M	CHEVALIER	Dany	Toxicologie
M.	COCHELARD	Dominique	Biomathématiques
Mme	DANEL	Cécile	Chimie Analytique
Mme	DEMANCHE	Christine	Parasitologie
Mme	DEMARQUILLY	Catherine	Biomathématiques
M.	DHIFLI	Wajdi	Biomathématiques
Mme	DUMONT	Julie	Biologie cellulaire
Mme	DUTOUT-AGOURIDAS	Laurence	Onco et Neurochimie
M.	EL BAKALI	Jamal	Onco et Neurochimie
M.	FARCE	Amaury	ICPAL
Mme	FLIPO	Marion	Lab. de Médicaments et Molécules
Mme	FOULON	Catherine	Chimie Analytique
M.	FURMAN	Christophe	ICPAL
Mme	GENAY	Stéphanie	Pharmacie Galénique
M.	GERVOIS	Philippe	Biochimie
Mme	GOOSSENS	Laurence	ICPAL
Mme	GRAVE	Béatrice	Toxicologie
Mme	GROSS	Barbara	Biochimie
M.	HAMONIER	Julien	Biomathématiques
Mme	HAMOUDI	Chérifa Mounira	Pharmacotechnie industrielle
Mme	HANNOTHIAUX	Marie-Hélène	Toxicologie
Mme	HELLEBOID	Audrey	Physiologie
M.	HERMANN	Emmanuel	Immunologie
M.	KAMBIA	Kpakpaga Nicolas	Pharmacologie
M.	KARROUT	Youness	Pharmacotechnie Industrielle
Mme	LALLOYER	Fanny	Biochimie
M.	LEBEGUE	Nicolas	Onco et Neurochimie
Mme	LECOEUR	Marie	Chimie Analytique
Mme	LEHMANN	Hélène	Législation
Mme	LELEU-CHAVAIN	Natascha	ICPAL
Mme	LIPKA	Emmanuelle	Chimie Analytique
Mme	MARTIN	Françoise	Physiologie
M.	MOREAU	Pierre Arthur	Sciences végétales et fongiques
M.	MORGENROTH	Thomas	Législation
Mme	MUSCHERT	Susanne	Pharmacotechnie industrielle
Mme	NIKASINOVIC	Lydia	Toxicologie
Mme	PINÇON	Claire	Biomathématiques
M.	PIVA	Frank	Biochimie
Mme	PLATEL	Anne	Toxicologie
M.	POURCET	Benôît	Biochimie
M.	RAVAUX	Pierre	Biomathématiques

Mme	RAVEZ	Séverine	Onco et Neurochimie
Mme	RIVIERE	Céline	Pharmacognosie
Mme	ROGER	Nadine	Immunologie
M.	ROUMY	Vincent	Pharmacognosie
Mme	SEBTI	Yasmine	Biochimie
Mme	SINGER	Elisabeth	Bactériologie
Mme	STANDAERT	Annie	Parasitologie
M.	TAGZIRT	Madjid	Hématologie
M.	VILLEMAGNE	Baptiste	Lab. de Médicaments et Molécules
M.	WELTI	Stéphane	Sciences végétales et fongiques
M.	YOUS	Saïd	Onco et Neurochimie
M.	ZITOUNI	Djamel	Biomathématiques

Professeurs Certifiés

Civ.	NOM	Prénom	Laboratoire
M.	HUGES	Dominique	Anglais
Mlle	FAUQUANT	Soline	Anglais
M.	OSTYN	Gaël	Anglais

Professeur Associé - mi-temps

Civ.	NOM	Prénom	Laboratoire
M.	DAO PHAN	Hai Pascal	Lab. Médicaments et Molécules
M.	DHANANI	Alban	Droit et Economie Pharmaceutique

Maîtres de Conférences ASSOCIES - mi-temps

Civ.	NOM	Prénom	Laboratoire
M.	BRICOTEAU	Didier	Biomathématiques
Mme	CUCCHI	Malgorzata	Biomathématiques
M.	FRIMAT	Bruno	Pharmacie Clinique
M.	GILLOT	François	Droit et Economie pharmaceutique
M.	MASCAUT	Daniel	Pharmacie Clinique
M.	ZANETTI	Sébastien	Biomathématiques
M.	BRICOTEAU	Didier	Biomathématiques

AHU

Civ.	NOM	Prénom	Laboratoire
Mme	DEMARET	Julie	Immunologie
Mme	HENRY	Héloïse	Biopharmacie
Mme	MASSE	Morgane	Biopharmacie

3, rue du Professeur Laguesse - B.P. 83 - 59006 LILLE CEDEX

☎ 03.20.96.40.40 - 📠 : 03.20.96.43.64

<http://pharmacie.univ-lille2.fr>

L'Université n'entend donner aucune approbation aux opinions émises dans les thèses ; celles-ci sont propres à leurs auteurs.

A ma présidente de jury,

Madame le Professeur Delphine ALLORGE,

Professeur des Universités – Praticien Hospitalier
Laboratoire de Toxicologie
Centre Hospitalier Régional Universitaire de Lille

Je vous remercie de me faire l'honneur de présider le jury de cette thèse et d'évaluer mon travail.

Soyez assurée de mon profond respect et de toute ma reconnaissance.

A ma directrice de thèse,

Madame le Docteur Séverine LORIDANT,

Praticien Hospitalier
Laboratoire de Parasitologie-Mycologie
Centre Hospitalier Régional Universitaire de Lille

Tu m'as fait l'honneur de me confier ce premier projet de thèse.

Je te remercie pour ce travail qui est avant tout un travail commun et qui est le fruit de ton encadrement, ta disponibilité et tes précieux conseils pour le mener à bien. J'espère qu'il est à la hauteur de tes espérances et je te remercie pour ton soutien constant.

A mes juges,

Monsieur le Professeur Boualem SENDID,

Professeur des Universités – Praticien Hospitalier
Laboratoire de Parasitologie-Mycologie,
Centre Hospitalier Régional Universitaire de Lille
Directeur Inserm U1285 – Glycobiologie de Pathogénèse Fongique & Applications cliniques

Je suis honorée que vous ayez accepté de juger cette thèse en tant que membre du jury.

Je vous remercie pour votre disponibilité, vos conseils, vos directives et les relectures de mon manuscrit dans le cadre de ce travail de thèse.

Veillez trouver ici l'expression de mes remerciements les plus sincères et de mon grand respect.

A mes juges,

Monsieur le Docteur Éric DANNAOUI,

Maître de Conférences des Universités – Praticien Hospitalier
Laboratoire de Parasitologie-Mycologie,
Hôpital Européen George Pompidou

Je suis honorée que vous ayez accepté de juger cette thèse en tant que membre du jury.

Je vous remercie de m'avoir donné l'opportunité de profiter de vos enseignements pendant tout un semestre à Paris. Merci pour votre disponibilité constante, vos précieux conseils, votre expertise et votre encadrement rigoureux lors des manipulations de la thèse mais aussi au quotidien en stage au laboratoire.

Soyez assuré de mon profond respect et de toute ma reconnaissance.

Sommaire

Sommaire	11
Liste des abréviations.....	13
Liste des figures	15
Liste des tableaux.....	17
Introduction.....	18
1 Généralités.....	20
1.1 Les candidoses invasives (CI).....	20
1.1.1 Définitions	20
1.1.2 Epidémiologie des candidoses invasives	20
1.1.3 Physiopathologie.....	27
1.1.4 Les facteurs de risque.....	28
1.2 Diagnostic biologique des candidoses invasives.....	30
1.2.1 Les prélèvements.....	30
1.2.2 Les algorithmes de prédiction de CI	30
1.2.3 Critères EORTC.....	31
1.2.4 Les méthodes conventionnelles	32
1.2.5 Les biomarqueurs fongiques.....	34
1.3 Stratégies thérapeutiques des candidoses invasives	36
1.4 Antifongiques.....	37
1.4.1 Les molécules disponibles	37
1.4.2 Résistances des <i>Candida</i> spp aux antifongiques.....	39
1.5 Les tests de sensibilité aux antifongiques	42
1.5.1 Tests phénotypiques de détection de sensibilité aux antifongiques	43
1.5.2 Méthodes moléculaires	49
1.6 Objectifs de l'étude.....	49
2 Matériels et méthodes	50
2.1 Etude épidémiologique et détermination des ECOFF	50
2.2 Etude de la sensibilité aux antifongiques	52
2.2.1 Détermination de la sensibilité aux antifongiques par la méthode SYO	52
2.2.2 Méthode de référence EUCAST.....	54
2.2.3 Interprétation des tests de sensibilité	57
3 Résultats	60
3.1 Population de levures étudiée	60

3.1.1	Répartition des espèces.....	60
3.1.2	Répartition des souches par service	61
3.1.3	Répartition des espèces dans les services à risque d'IFI.....	62
3.1.4	Répartition globale des souches par type de prélèvement.....	65
3.1.5	Candidémies	66
3.2	ECOFF	71
3.2.1	Détermination des ECOFF par la méthode GraphPad Prism.....	71
3.2.2	Evolution des ECOFF par année	81
3.2.3	Détermination des ECOFF par la méthode ECOFFinder	81
3.2.4	Comparaison des ECOFF GraphPad Prism aux ECOFF CLSI.....	82
3.3	Epidémiologie des résistances des levures aux antifongiques évaluée par la méthode SYO	83
3.3.1	Identification des souches résistantes.....	83
3.3.2	Répartition des souches résistantes en fonction du type de prélèvement 87	
3.3.3	Evolution des résistances aux azolés et aux échinocandines entre 2009 et 2017 88	
3.4	Vérification par la méthode de référence EUCAST	93
	Discussion	99
	Conclusion.....	105
	Annexes.....	107
	Bibliographie.....	124

Liste des abréviations

5FC : 5-fluorocytosine

AmarCand : Analyse du Management en Anesthésie et Réanimation des Candidoses invasives

AMB : Amphotéricine B

ANI : Anidulafungine

BDG : β -D-1,3-glucane

CA : Categorical Agreement

CAGTA : Candida albicans germ tube antibodies

CAS : Caspofungine

CI : Candidoses Invasives

CLSI : Clinical and Laboratory Standards Institute

CMI : Concentration minimale inhibitrice

CNRMA : Centre National de Référence des Mycoses et des Antifongiques

DMSO : Diméthylsulfoxyde

EA : Essential Agreement

ECMM : European Confederation of Medical Mycology

ECOFF : Cut Off Epidémiologiques

EORTC : European Organisation for Research and Treatment of Cancer

ESCMID : European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases

EUCAST : EUropean Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing

FCZ : Fluconazole

FDA : Food and Drug Administration

HAS : Haute Autorité de Santé

IDSA : Infectious Diseases Society of America

IFI : Infection Fongique Invasive

ITZ : Itraconazole

MALDI-TOF : Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization time-of-flight

MIC : Micafungine

POS : Posaconazole

RPMI : Roswell Park Memorial Institute medium

SSC : Seuils de Sensibilité Clinique ("breakpoints")

SYO : Sensititre™YeastOne™

UFC : Unité Formant Colonie

USI : Unité de Soins Intensifs

VRZ : Voriconazole

Liste des figures

Figure 1 : Variations géographiques de la répartition des espèces de <i>Candida</i> spp (19)	21
Figure 2 : Pays ayant signalé des cas de <i>C. auris</i> au 31 mars 2020 (31).....	22
Figure 3 : Surveillance de l'ECMM : répartition par pays des espèces de <i>Candida</i> responsables de candidémies en Europe (36)	23
Figure 4 : Surveillance de l'ECMM : Distribution des 4 principales espèces de <i>Candida</i> selon le service clinique (36)	23
Figure 5 : Répartition des espèces de <i>Candida</i> (n=807) chez les patients chirurgicaux des USI (37) (SOT : transplantation)	24
Figure 6 : Distribution des espèces de <i>Candida</i> dans les candidoses invasives dans différentes études françaises (Martin et al. 2005, Honderlick et al. 2007, Leroy et al. 2009, Talarmin et al. 2009, Thierry et al. 2011)	25
Figure 7: Morbidité/mortalité et coûts économiques des CI (8).....	26
Figure 8 : Physiopathologie des CI (1).....	28
Figure 9 : Observation de levures à l'état frais au microscope au contraste de phase (A)(6), phagocytées par des monocytes au MGG (B)(63), au bleu de toluidine (C)(6), au Gomori-Grocott (D)(64) et au Gram (E)(65).....	33
Figure 10 : Aspect des colonies de levures sur milieu Sabouraud additionné de gentamicine et chloramphénicol (à gauche) et sur milieu Chromagar (à droite) (73)(74).....	34
Figure 11 : Mécanismes d'actions des antifongiques systémiques (89)	38
Figure 12 : Mécanismes moléculaires de résistance aux antifongiques (89).....	41
Figure 13 : Mode opératoire de la technique de bandelettes à gradient de concentration (116).....	44
Figure 14 : Lecture des CMI des azolés (lecture à 80% d'inhibition) et de l'amphotéricine B (lecture à 100% d'inhibition) (117).....	45
Figure 15 : Effet paradoxal (à gauche) et effet de traîne (à droite). Les flèches noires indiquent la CMI qui doit être lue (119).....	46
Figure 16 : Plaque YO10 du système SYO (117)	47
Figure 17 : Détermination des ECOFF sur GraphPad Prism par la méthode « eye-ball »	51
Figure 18 : Exemple de détermination de l'ECOFF <i>C. albicans</i> /fluconazole avec le fichier Excel ECOFF Finder (Raw count : distribution des isolats, fitted : analyse statistique de la courbe pour déterminer l'ECOFF).....	52
Figure 19 : Etapes de l'inoculation (CHU de Lille)	53
Figure 20 : Etapes de la répartition de l'inoculum (CHU de Lille)	53
Figure 21 : Etapes de la lecture des CMI (CHU de Lille)	53
Figure 22 : Lecture de la CMI de l'amphotéricine B en système SYO	58
Figure 23 : Phénomène de « trailing » des azolés et de la 5-fluorocytosine.....	58
Figure 24 : Phénomène « Eagle » de l'itraconazole	58
Figure 25 : Lecture de la CMI des échinocandines.....	58
Figure 26 : Nombre de souches de levures isolées au CHU de Lille entre 2009 et 2017.....	60

Figure 27 : Répartition par espèce des souches de Candida spp ayant fait l'objet d'un antifongogramme en SYO entre 2009 et 2017	61
Figure 28 : Répartition des souches de levures dans les services cliniques (n=7314)	62
<i>Figure 29 : Répartition en pourcentage des espèces dans les principaux services à risque d'IFI.....</i>	<i>64</i>
Figure 30: Répartition des souches en fonction de la nature du prélèvement d'origine	65
Figure 31 : Incidence des candidémies en nombre absolu sur la période 2009-2017 (n=1036)	66
Figure 32 : Répartition en pourcentage des espèces de Candida isolées dans les hémocultures de 2009 à 2017 (n=1036).....	67
Figure 33 : Répartition en pourcentage des espèces isolées dans les hémocultures dans les principaux services à risque d'IFI	70
Figure 34: Distribution des isolats de C. glabrata par antifongique en utilisant le logiciel GraphPad Prism	72
Figure 35 : Distribution des isolats de C. glabrata par antifongique en utilisant le logiciel GraphPad Prism	73
Figure 38 : Distribution des isolats chez les 5 principales espèces pour le fluconazole et le voriconazole en utilisant le logiciel GraphPad Prism.....	74
Figure 37 : Distribution des isolats chez les 5 principales espèces pour le fluconazole et le voriconazole en utilisant le logiciel GraphPad Prism.....	75
Figure 38 : Distribution des isolats chez les 5 principales espèces pour les échinocandines en utilisant le logiciel GraphPad Prism.....	76
Figure 39 : Cas particuliers des ECOFF pour la flucytosine chez C. tropicalis, C. kefyr, et C. lusitaniae	80
Figure 40 : Répartition des résistances aux antifongiques identifiées en SYO chez les principales espèces de levure	86
Figure 41 : Répartition des souches résistantes en fonction du type de prélèvement	87
Figure 42 : Evolution des résistances aux azolés et aux échinocandines sur la période 2009-2017 pour les principales espèces de levures	90
Figure 43 : CA par antifongique (n total = 89).....	95
Figure 44 : Distribution des isolats discordants (sur l'EA ou le CA) par antifongique, en utilisant le SYO ou l'EUCAST	98

Liste des tableaux

Tableau 1 : Critères d'hôte, cliniques et mycologiques EORTC des CI probables (62)	32
Tableau 2 : Méthodes de diagnostic non basées sur la culture (86).....	36
Tableau 3 : Différences des modes opératoires des méthodes de référence CLSI et EUCAST (112).....	43
Tableau 4: Répartition des souches de <i>C. albicans</i> de 2009 à 2017 au CHU de Lille par CMI et par antifongique	51
Tableau 5 : Préparation des séries de dilutions d'antifongiques autres que le FCZ et la 5FC.....	55
Tableau 6 : Préparation des séries de dilutions du FCZ et de la 5FC	56
Tableau 7 : Lecture des CMI amphotéricine B et caspofungine	57
Tableau 8 : Interprétation des résultats obtenus en SYO (131).....	57
Tableau 9 : ECOFF déterminés par la méthode « eye-ball » sur GraphPad Prism ..	78
Tableau 10 : Évolution des ECOFF entre 2009 et 2017 chez <i>C. albicans</i> (n=4646). 81	
Tableau 11 : Évolution des ECOFF entre 2009 et 2017 chez <i>C. glabrata</i> (n=821)... 81	
Tableau 12 : Comparaison des ECOFF Lille et CLSI pour l'amphotéricine B, les échinocandines et les azolés.....	82
Tableau 13 : Pourcentages de résistances des levures étudiées en SYO par espèce et par antifongique.....	85
Tableau 14 : Résistances croisées intra-classes au sein des azolés, des échinocandines et résistances croisées inter-classes	91
Tableau 15 : Résistances croisées chez les souches de <i>C. albicans</i> , <i>C. glabrata</i> , <i>C. parapsilosis</i> , <i>C. krusei</i> , <i>C. tropicalis</i> et <i>C. guilliermondii</i>	92
Tableau 16: EA calculés par antifongique pour toutes les espèces confondues et par espèce pour <i>C. glabrata</i> , <i>C. tropicalis</i> et <i>C. parapsilosis</i>	93
Tableau 17 : CA, VME, MAE et MIE calculés par antifongique pour toutes les espèces confondues et par espèce pour <i>C. glabrata</i> , <i>C. tropicalis</i> et <i>C. parapsilosis</i>	94
Tableau 18 : Pourcentages de souches classées résistantes en SYO classées résistantes en EUCAST.....	95
Tableau 19 : SSC utilisés pour l'interprétation des CMI en SYO (valeurs encadrées) et détermination des ECOFF pour les souches sans SSC CLSI	107

Introduction

Les candidoses invasives (CI) sont un problème de santé publique majeur dans le monde entier. Il s'agit des infections fongiques invasives (IFI) les plus fréquentes chez les patients hospitalisés dans les pays développés, particulièrement dans les services cliniques tels que les unités de soins intensifs, l'onco-hématologie, la chirurgie, la transplantation et la néonatalogie (1)(2)(3)(4).

Ce sont des pathologies graves associées à une morbidité et une mortalité élevées, pour lesquelles la précocité de la mise en place d'un traitement antifongique adapté conditionne le pronostic des patients (5).

Le diagnostic des CI est difficile. Il est fondé sur des arguments cliniques, radiologiques et biologiques. En clinique, seules les atteintes oculaires comme les chorioretinites et les endophtalmies, à rechercher systématiquement en cas de candidémie, présentent un aspect typique au fond d'œil (6). Au laboratoire, l'hémoculture, considérée comme l'examen de référence pour le diagnostic de candidémie, est peu sensible (50 à 75 %), en raison d'une circulation sanguine transitoire des levures (7). Les autres outils biologiques disponibles manquent également de sensibilité et le délai de rendu de résultat est souvent long (8).

Par conséquent, le clinicien ne doit pas attendre les résultats de l'hémoculture avant d'initier un traitement antifongique, surtout si le patient présente des facteurs de risques de développer une IFI (9)(10). Un traitement préemptif ou empirique est souvent instauré. Selon les recommandations actualisées de 2019 de l'IDSA (Infectious Diseases Society of America) et de 2012 de l'ESCMID (European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases), le traitement de première intention des CI est la famille des échinocandines (11)(12). Cependant, il s'agit de molécules coûteuses, c'est pourquoi un traitement par azolés est souvent initié. Ainsi, en France, l'agent antifongique le plus prescrit est le fluconazole (13).

L'adaptation du traitement antifongique et une éventuelle désescalade thérapeutique sont recommandées en fonction de l'identification du pathogène en cause et de la détermination de sa sensibilité aux antifongiques (11)(12). Dans un premier temps, l'identification de l'agent pathogène responsable permet d'avoir une première idée de son profil de résistance intrinsèque. Cependant, les résistances acquises aux antifongiques existent également, d'où l'importance de l'antifongogramme pour définir la sensibilité des souches de levures.

En effet, les tests de sensibilité aux antifongiques permettent de définir des concentrations minimales inhibitrices (CMI) des antifongiques vis-à-vis de la souche d'intérêt. Ces CMI sont à interpréter à l'aide de seuils de sensibilité clinique (SSC) définis par les sociétés savantes que sont l'EUCAST (European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing) et le CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute). L'application de ces SSC permet de catégoriser chaque souche en « sensible », « intermédiaire » ou « résistante » vis-à-vis de l'antifongique testé. Actuellement, en mycologie médicale, les SSC ne sont définis que pour les principales espèces de *Candida* et pour quelques espèces d'*Aspergillus*. Récemment, une autre méthode d'interprétation des CMI utilisant les seuils

épidémiologiques (ECOFF) a été décrite afin de classer les souches dans des catégories « sauvage » ou « non sauvage ».

1 Généralités

1.1 Les candidoses invasives (CI)

1.1.1 Définitions

Les **candidoses invasives (CI)** sont des infections fongiques invasives (IFI) liées au passage systémique dans le sang d'une levure du genre *Candida*. Les CI regroupent à la fois les candidémies et les candidoses des sites anatomiques profonds, même si la majorité des CI sont des candidémies (1). Les CI affectent particulièrement les patients de réanimation et/ou immunodéprimés.

Les **candidémies** correspondent à une infection hématogène, définie par la positivité d'une hémoculture à *Candida*. La candidémie peut être isolée, révélatrice d'un foyer profond ou encore à l'origine de localisations secondaires (12).

Les **candidoses profondes** sont des candidoses d'autres sites anatomiques normalement stériles comme le foie, la rate, les reins, les valves cardiaques lors d'endocardites ou encore responsables d'atteintes oculaires, méningées ou ostéoarticulaires (6).

1.1.2 Epidémiologie des candidoses invasives

Répartition mondiale

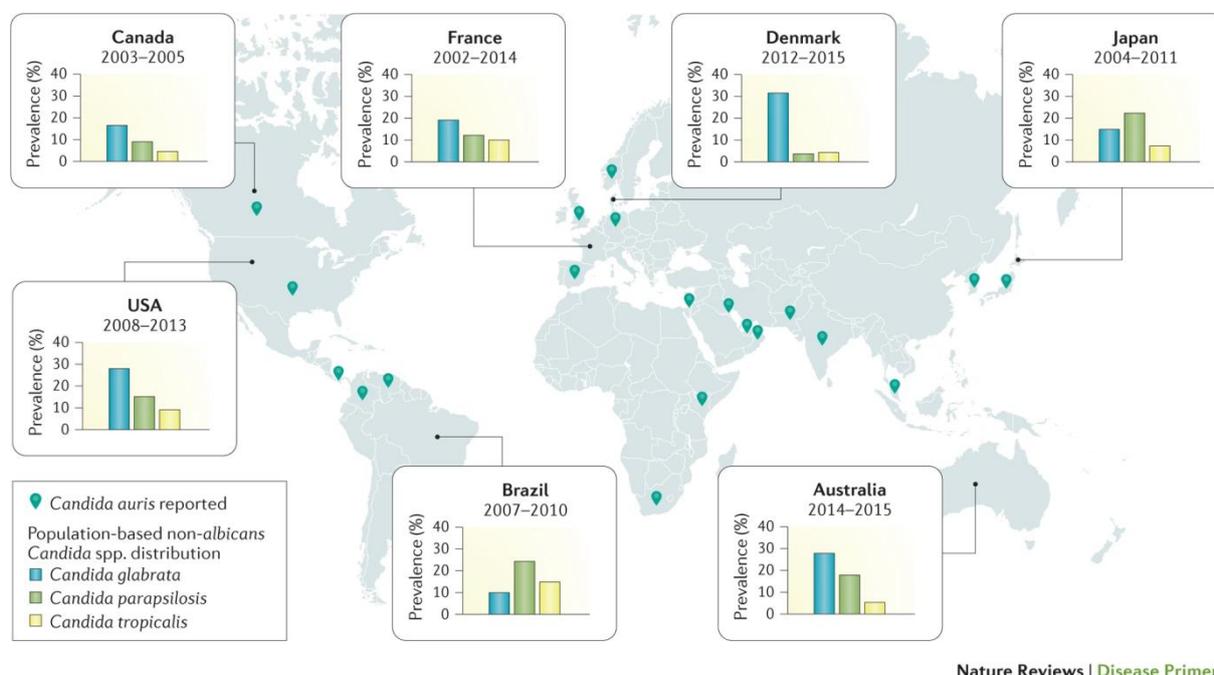
Les CI affectent 250 000 personnes dans le monde chaque année et sont responsables de 50 000 décès. Ainsi, la mortalité est très élevée et cela même lorsqu'un traitement antifongique a été administré (1). Les taux d'incidence annuelle de candidémie sont de 2 à 14 cas pour 100 000 personnes, ce taux est plus élevé aux Etats-Unis qu'en Europe (14)(15)(16)(17). Elles sont souvent présentées comme la 4^e cause de septicémie dans les unités de soins intensifs (18).

Les données épidémiologiques issues du programme international de surveillance des antifongiques SENTRY, créé en 1997, montrent que l'agent le plus fréquemment impliquée dans les CI est *C. albicans* (14)(19)(Fig.1). C'est également l'espèce la plus fréquemment isolée chez les patients immunodéprimés (20). Cependant, la proportion de *C. albicans* impliquée dans les CI a diminué de 57,4% à 46,4% au cours de la période de surveillance de 20 ans (21). A l'inverse, on observe une augmentation des isolats non-*albicans* comme *C. glabrata* et *C. parapsilosis* (21), mais aussi *C. tropicalis*, *C. krusei* ou encore *C. auris* (19)(22)(23)(24). Cette modification de la répartition des espèces serait notamment liée à la pression de sélection des antifongiques, en particulier le fluconazole et les échinocandines, très efficaces sur *C. albicans* (1)(25).

A l'échelle internationale, *C. glabrata* est la 2^e espèce la plus fréquente après *C. albicans*, à l'exception de l'Amérique latine, où *C. parapsilosis* et *C. tropicalis* sont les

espèces majoritaires après *C. albicans*. Actuellement, aux Etats-Unis, plus de 30% des candidémies sont causées par *C. glabrata*, cette levure présentant concomitamment des taux accrus de résistance aux antifongiques (26).

C. parapsilosis est responsable de 15% des candidémies aux Etats-Unis et 20% en Russie. Cette espèce prédomine également en Amérique du sud, dans le sud de l'Europe et en Asie (1) et est en émergence en Afrique du Sud (26)(27)(28).



Nature Reviews | Disease Primers

Figure 1 : Variations géographiques de la répartition des espèces de *Candida* spp (19)

Contrairement à l'étude Pfaller *et al.* publiée en 2011 qui ne montre que des différences mineures de répartition des espèces entre les différents services cliniques, d'autres études ont mis en évidence des disparités. Ainsi *C. glabrata* est davantage isolé en gériatrie et *C. parapsilosis* en néonatalogie (14)(15)(25) et une plus forte proportion de *C. parapsilosis*, *C. tropicalis* ou encore de *C. glabrata* est isolée en USI. L'explication de ces différences est inconnue mais pourrait résider dans l'utilisation des azolés différente d'un pays à l'autre (29)(30).

Emergence de *C. auris*

Les CI sont de plus en plus causées par des espèces de *Candida non-albicans* dont *C. auris* fait partie. *C. auris* a été décrit pour la première fois au Japon en 2009, puis ensuite signalé dans 32 pays répartis sur les 6 continents (31)(Fig.2). Il n'a été rapporté qu'une minorité de cas de candidémies dues à ce pathogène. Cependant, ce qui en fait une levure d'importance médicale est notamment son émergence au niveau mondial et la forte mortalité qui y est associée. Elle est rapportée à 60% dans certaines études (31).

Compte tenu de son caractère résistant à la fois aux antifongiques et aux désinfectants, *C. auris* fait l'objet d'une surveillance renforcée en milieu hospitalier notamment pour limiter sa propagation (32)(33). La plupart des isolats étudiés ont des CMI élevées au fluconazole (>64 mg/L) et presque 30% des isolats ont montré une sensibilité réduite à l'amphotéricine B. De plus, 5% des isolats peuvent être résistants aux échinocandines, traitement de première intention des CI (34)(35).

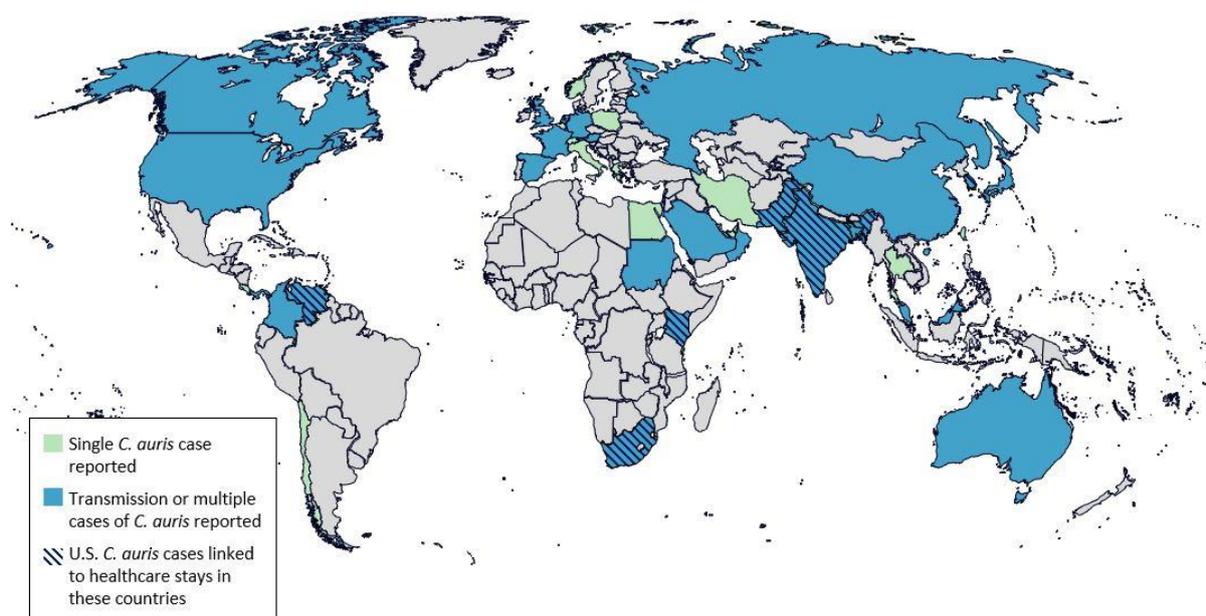


Figure 2 : Pays ayant signalé des cas de *C. auris* au 31 mars 2020 (31)

Répartition européenne

Comme à l'échelle mondiale, *C. albicans* est l'espèce majoritairement isolée. Le réseau de surveillance épidémiologique européen soit l'European Confederation of Medical Mycology (ECMM) a mis en évidence des disparités géographiques de la répartition des espèces de levures au sein de l'Europe avec notamment, une proportion plus importante de *C. albicans* en Allemagne et en Suède et comme en Amérique du Sud, une proportion plus importante de *C. parapsilosis* en Espagne (Fig.3) (36).

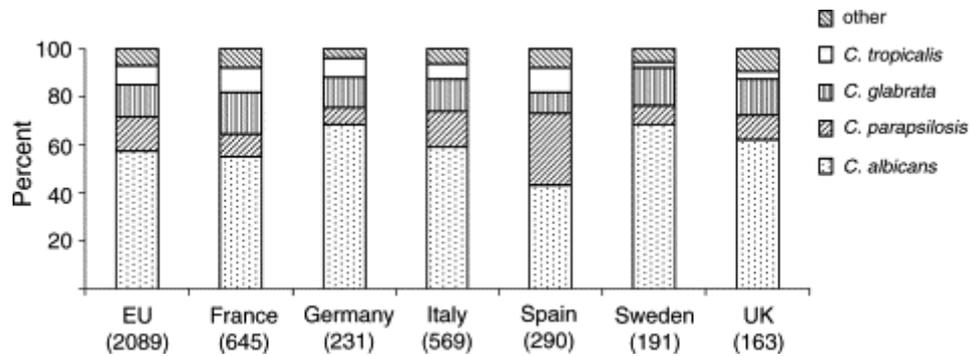


Figure 3 : Surveillance de l'ECMM : répartition par pays des espèces de *Candida* responsables de candidémies en Europe (36)

Comme au niveau international, plusieurs études montrent également, des disparités dans la répartition des espèces de *Candida* en fonction des services cliniques. Ainsi, on constate une proportion très élevée des espèces non *albicans* en hématologie, de *C. parapsilosis* en néonatalogie (Fig.4) (36), en neurochirurgie, en transplantation et en traumatologie ainsi que chez les enfants de moins d'un an (38,5%) et de *C. glabrata* en chirurgie digestive chez des patients de plus de 60 ans (37)(Fig.5).

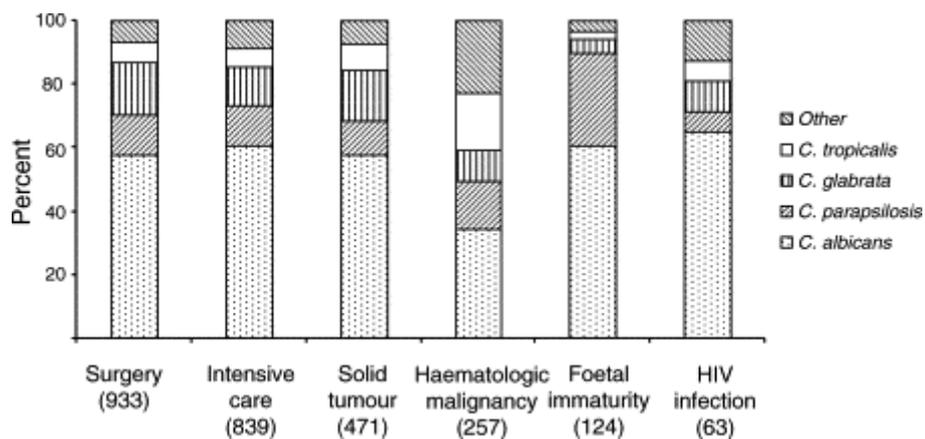


Figure 4 : Surveillance de l'ECMM : Distribution des 4 principales espèces de *Candida* selon le service clinique (36)

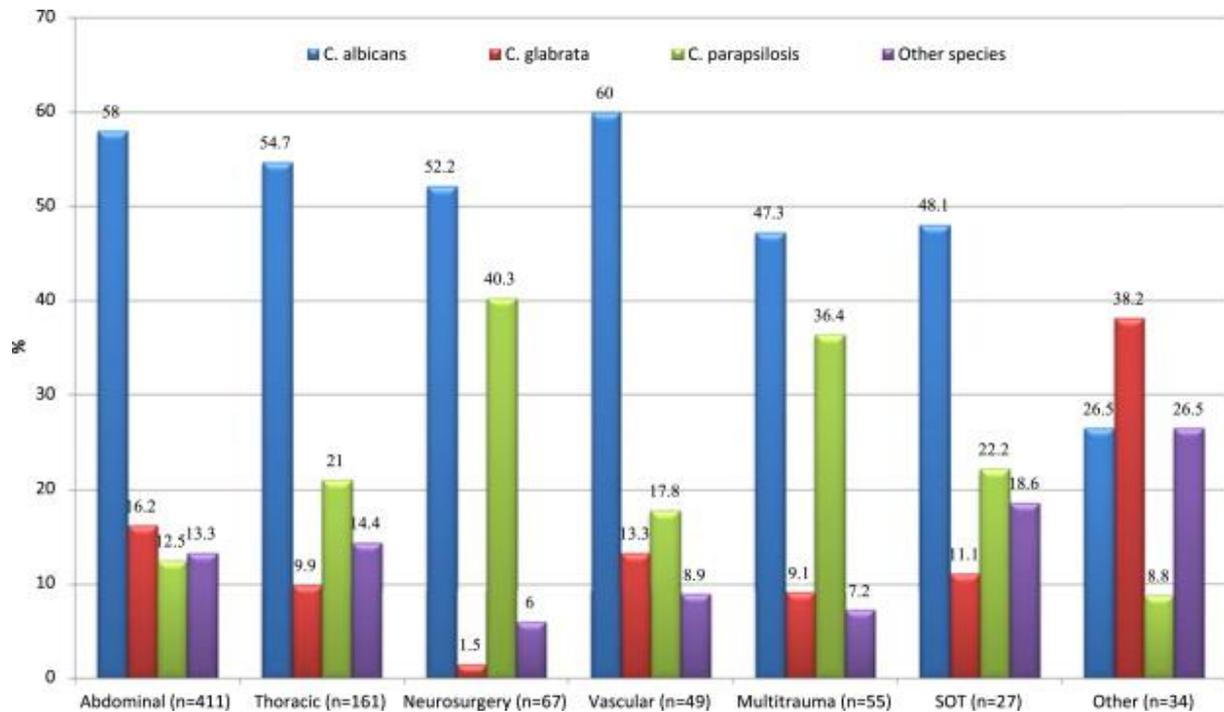


Figure 5 : Répartition des espèces de *Candida* (n=807) chez les patients chirurgicaux des USI (37) (SOT : transplantation)

Répartition nationale

En France, il n'existe que peu d'études portant sur l'épidémiologie des levures et la plupart sont, comme notre étude, rétrospectives et monocentriques.

En région parisienne, l'incidence moyenne des candidémies est de 6,7/1000 admissions en USI où *Candida* est le 3^e agent responsable de septicémies nosocomiales (38). Dans cette même étude, la répartition des espèces de *Candida* dans les USI montre la prédominance de *C. albicans* (54.2%) puis *C. glabrata* (17%), *C. parapsilosis* (13.5%), *C. tropicalis* (8.5%) et *C. krusei* (3.5%). Une autre étude en région parisienne de Lortholary et *al.* a montré des résultats similaires en terme d'incidence des candidémies et de répartition des espèces de *Candida* en réanimation de 2002 à 2010 (39).

A Lyon, une étude rétrospective de Martin et *al.* menée sur les candidémies sur une période de 1998 à 2001 montre une incidence moyenne annuelle plus faible de 0,28 pour 1000 admissions. La répartition des candidémies au sein des services était la suivante : 23% en hématologie, 23% en chirurgie, 22% en USI, 7% en pneumologie, 4% en hépato-gastrologie et 3% en pédiatrie. L'épidémiologie des espèces était similaire aux études parisiennes avec tout de même une prédominance de *C. krusei* (34%) dans le service d'onco-hématologie devant *C. albicans* (19%) (40).

A Lille, l'étude de Sendid et *al.* publiée en 2006, a montré une diminution de moitié de l'incidence des candidémies sur la période 1993-2003, néanmoins associée à un changement épidémiologique notable avec l'augmentation des isolats de *C. glabrata*. Sur la période 1993-2003, les candidémies se répartissaient à 36% dans les USI, 20% en chirurgie, 6% en hématologie et 5% en pédiatrie. Entre 1995 et 2001, *C. albicans* était l'espèce majoritaire et représentait 60% des isolats sauf en onco-

hématologie (32%). Aucune souche de *C. glabrata* ni de *C. krusei* n'a été isolée en pédiatrie (41).

A Nantes, l'étude de Thierry et *al.* de 2011, a été menée entre 2004 et 2009, *C. albicans* était la levure majoritairement responsable de candidémies (54,1%), puis *C. parapsilosis* (14,8%), *C. tropicalis* (9,8%), *C. glabrata* (9,3%) et *C. krusei* (3,8%). *C. parapsilosis* représentait 31% des isolats en pédiatrie (42) (Fig.6).

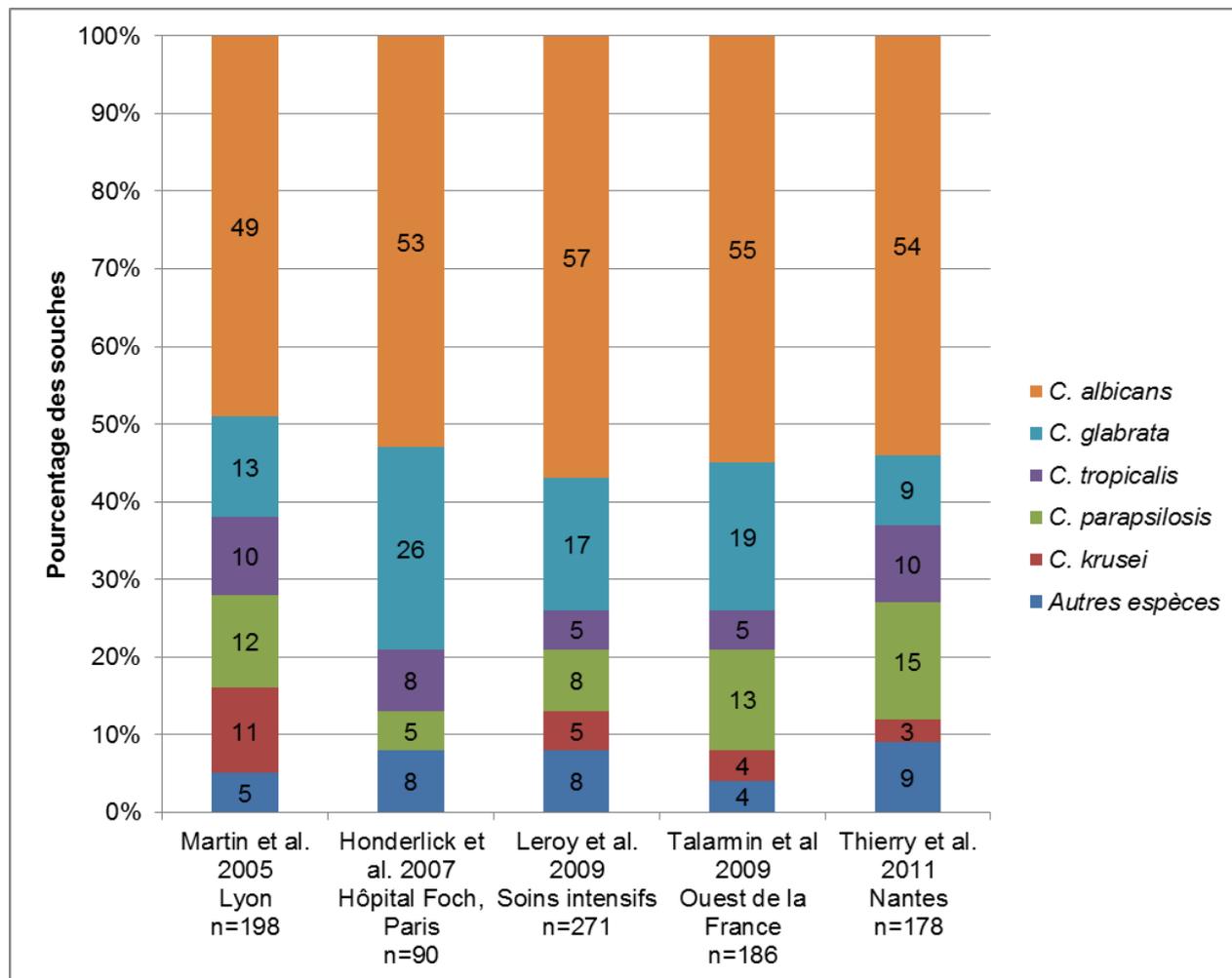


Figure 6 : Distribution des espèces de *Candida* dans les candidoses invasives dans différentes études françaises (Martin et al. 2005, Honderlick et al. 2007, Leroy et al. 2009, Talarmin et al. 2009, Thierry et al. 2011)

Une étude de Leroy et *al.* de 2009 nommée « AmarCand » (Analyse du Management en Anesthésie et Réanimation des Candidoses invasives) a été menée pour évaluer l'épidémiologie des levures dans 180 USI en France entre 2005 et 2006. *C. albicans* représentait 57,0% des isolats, suivi de *C. glabrata* (16,7%), *C. parapsilosis* (7,5%), *C. krusei* (5,2%) et *C. tropicalis* (4,9%) (43).

Morbidité, mortalité et coûts économiques

Au sein des septicémies, les candidémies sont associées à des taux de mortalité plus élevés comparativement aux septicémies bactériennes (44).

La mortalité est comprise entre 40 et 60% en France. Ainsi, la mortalité est très élevée et cela même lorsqu'un traitement antifongique a été administré (1)(45).

En effet, plusieurs études ont montré l'impact significatif du délai d'introduction d'un traitement antifongique approprié sur le pronostic. Chaque jour sans traitement augmente le risque de mortalité de 50% et est associé à un coût économique pour le système de santé de 5000 dollars (14)(30) (Fig.7).

Une étude américaine rapporte le lien de causalité entre l'espèce responsable de l'infection et le taux de mortalité. A titre d'exemple, la mortalité est de l'ordre de 37% en cas d'infection par *C. albicans* et 59% en cas de candidémie à *C. krusei* (18).

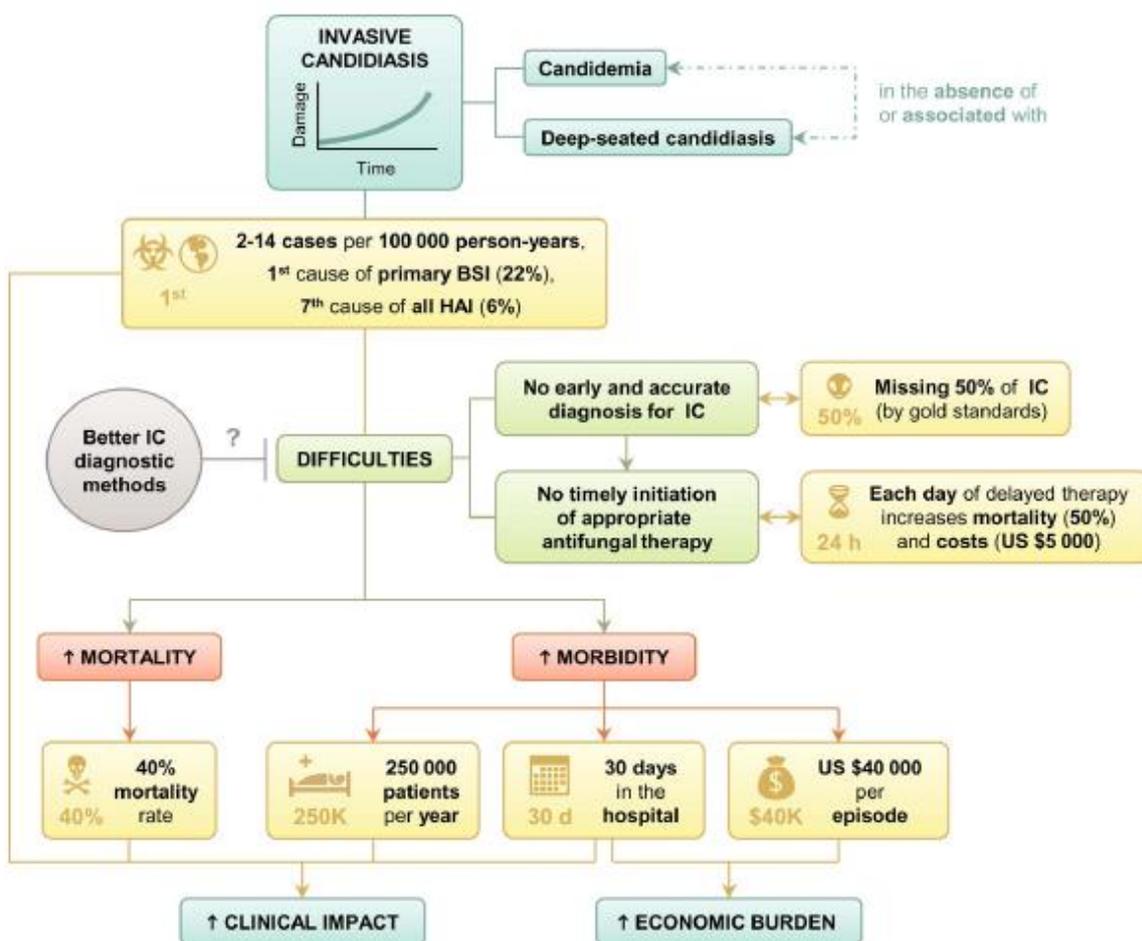


Figure 7: Morbidité/mortalité et coûts économiques des CI (8)

Ainsi, les taux de mortalité élevés, les hospitalisations de longue durée, les coûts économiques et sociétaux pourraient être considérablement diminués par l'instauration précoce d'un traitement antifongique approprié (14).

1.1.3 Physiopathologie

Les *Candida* spp. sont des pathogènes opportunistes. Il s'agit de commensaux naturels du microbiote humain au sein des muqueuses oro-pharyngée, génitale, digestive ainsi que sur la peau (46)(47)(48).

Le passage dans le sang survient lors de l'altération d'une barrière ou lors d'un affaiblissement du système immunitaire. Ainsi, la prolifération massive des levures dans le tube digestif peut aboutir à leur translocation au niveau hématogène. Le mécanisme de translocation est encore mal connu mais fait intervenir des processus d'endocytose ou de dissémination après germination des levures.

Chez les patients porteurs de cathéters, les levures présentes sur la peau peuvent coloniser ce matériel pour y former un biofilm. C'est par ce biofilm, que les levures vont être essaimées dans la circulation sanguine pour atteindre différents sites anatomiques préférentiels tels que le foie, la rate, les reins, les os, les yeux ou les poumons. Ces infections des sites profonds peuvent rester cryptiques ou être à l'origine de candidémies secondaires.

La candidurie peut faire suite à une candidémie ou être le résultat d'une infection ascendante du tractus urinaire (Fig.8).

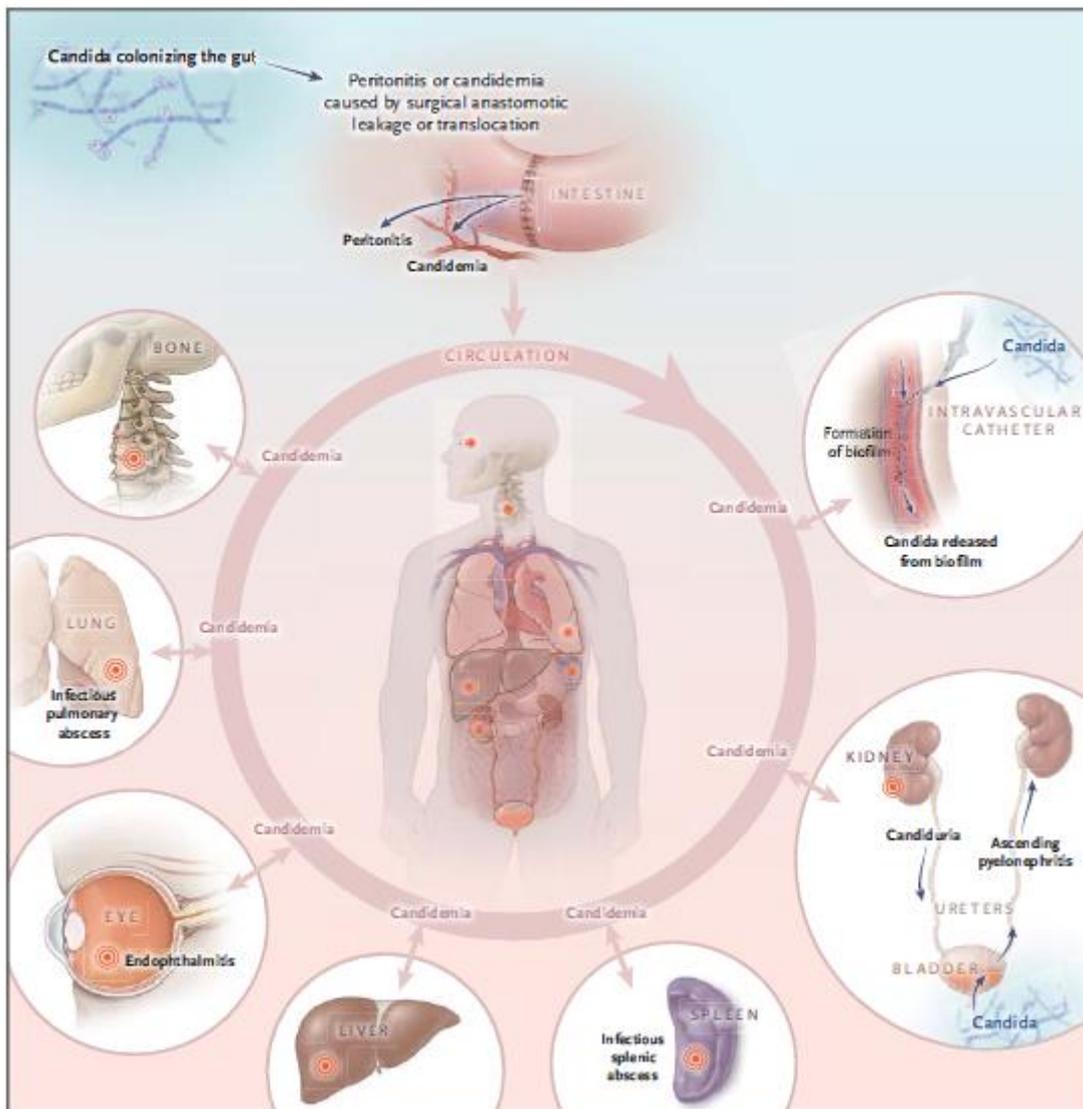


Figure 8 : Physiopathologie des CI (1)

Les *Candida* spp. peuvent être classés en différents groupes en fonction de leur virulence, dans l'ordre décroissant : I. *C. albicans* et *C. tropicalis*, II. *C. glabrata*, *C. lusitaniae* et *C. kefyr*, III. *C. krusei*, *C. parapsilosis* et *C. guilliermondii*. Cette notion est importante et permet en partie d'expliquer l'épidémiologie des CI : par exemple, *C. albicans* est le pathogène prédominant dans les CI (49).

1.1.4 Les facteurs de risque

Les facteurs de risque de CI sont nombreux (9)(39)(50) et comprennent:

- Des facteurs liés au patient :
 - ❖ L'âge : l'incidence des candidémies est plus élevée chez les personnes âgées et les enfants, en particulier les nouveaux-nés (et *a fortiori* les prématurés), dont le poids de naissance est un marqueur important,

- ❖ L'immunodépression : neutropénie et sa profondeur, hémopathies malignes, transplantations ou tumeurs d'organes solides, usage de corticoïdes, traitement par chimiothérapie
- ❖ Comorbidités : pathologie grave sous-jacente, pancréatite aigüe nécrosante, colonisation à *Candida* (en particulier en réanimation chirurgicale)
- Des situations à risque : chirurgie digestive, cathéters centraux ou nutrition parentérale, hémodialyse, utilisation d'antibiotiques à large spectre.

Même s'il est possible d'acquérir ces infections par voie exogène *via* les mains des soignants ou par des solutions ou greffons contaminés, la plupart des contaminations se font par voie endogène par le microbiote du patient (3)(14).

D'après les données du rapport d'activité du CNRMA (Centre National de Référence Mycoses invasives et Antifongiques) de 2018 et l'étude de Lorthorlary et *al.* de 2017, les principaux facteurs de risque de candidémie étaient un cancer solide (34%, du tractus digestif dans 46% des cas) ou une hémopathie (17%, essentiellement lymphome et leucémie aigüe). Les patients d'onco-hématologie étaient plus jeunes, plus souvent pré-exposés aux antifongiques, plus souvent traités par échinocandines et plus souvent infectés par *C. tropicalis*, *C. krusei* et *C. kefyr*. Les patients en réanimation étaient moins infectés par *C. parapsilosis*, avaient plus souvent une chirurgie récente et une plus grande mortalité globale. Ces résultats suggèrent que la prise en compte du contexte (réanimation, pathologie sous-jacente, etc.) avant même l'identification de l'espèce causale, pourrait améliorer la prise en charge des candidémies (51)(52).

L'étude de Poissy et *al.* de 2020, sur des hôpitaux français et suisses, montre que les facteurs de risques de développer une candidémie en USI sont la nutrition parentérale, une lésion rénale aiguë, une maladie cardiaque, un choc septique et une exposition aux aminoglycosides. Les facteurs de risque de candidémie dans la population non réanimée comprenaient les cathéters veineux centraux, la nutrition parentérale totale, l'exposition aux glycopeptides et l'administration de nitroimidazolés (53).

1.2 Diagnostic biologique des candidoses invasives

Le diagnostic de CI sur des arguments cliniques et radiologiques reste difficile et impose le recours à des arguments biologiques. Au laboratoire, plusieurs techniques peuvent être mises en œuvre afin d'augmenter la sensibilité diagnostique. Ainsi, la recherche de *Candida* par méthodes conventionnelles peut être couplée à la recherche de biomarqueurs ainsi qu'à des techniques de biologie moléculaire.

1.2.1 Les prélèvements

L'un des éléments majeurs conditionnant le diagnostic biologique des CI est le prélèvement. Malgré leur manque de sensibilité, les hémocultures restent le prélèvement de référence. Cependant, elles sont négatives dans un tiers voire la moitié des cas de CI prouvées (43).

Des biopsies ou liquides de ponction de sites stériles ainsi que d'autres prélèvements en fonction des portes d'entrée suspectées comme un cathéter veineux central ou des lésions cutanées peuvent également être réalisés(6). Ces prélèvements doivent être effectués idéalement en l'absence de traitement antifongique dans les 10-15 jours précédents (7).

1.2.2 Les algorithmes de prédiction de CI

Des algorithmes de prédiction clinique permettent d'identifier des patients à risque de développer une CI et nécessitant une prise en charge thérapeutique précoce (54)(55)(56)(57).

Il existe le score *Candida*, l'index de colonisation corrigé, le score de péritonite, le score de risque de candidémie pour ne citer que ceux-là (55)(56)(54)(58).

Le score *Candida* combine 4 facteurs de risque indépendants de développer une CI : la colonisation, la chirurgie après une admission dans une USI, le sepsis sévère et la nutrition parentérale.

L'index de colonisation est défini comme le rapport du nombre de sites colonisés par *Candida* spp divisé par le nombre total de sites testés.

La valeur prédictive négative (VPN) de ces algorithmes est haute mais la valeur prédictive positive (VPP) est relativement basse (14)(55)(59). Par conséquent, ces algorithmes sont plutôt utiles pour exclure le diagnostic de CI et arrêter un traitement empirique. L'association de ces algorithmes au dosage des biomarqueurs permet d'augmenter la fiabilité du diagnostic de CI (60)(61).

1.2.3 Critères EORTC

Les critères EORTC (European Organisation for Research and Treatment of Cancer) (62) qui permettent de conclure à une **CI prouvée**, chez un patient immunodéprimé ou non, sont :

- Un examen direct d'un échantillon normalement stérile montrant des levures,
- Un isolement en culture d'une levure d'un échantillon normalement stérile à partir d'un site normalement stérile, en présence de signes cliniques ou radiologiques compatibles avec un processus infectieux,
- Une hémoculture positive à levures,
- Eventuellement, une amplification de l'ADN fongique par PCR combinée avec le séquençage de l'ADN pour les échantillons enrobés de paraffine.

Les **CI probables** nécessitent la présence d'au moins un facteur hôte, une caractéristique clinique et des preuves mycologiques, chez des patients immunodéprimés. Les cas recoupant un facteur hôte et une caractéristique clinique mais pour lesquels aucune preuve mycologique n'a été trouvée, sont considérés comme des **CI possibles** (Tab.1).

Tableau 1 : Critères d'hôte, cliniques et mycologiques EORTC des CI probables (62)

Candidiasis
<i>Host factors</i>
Recent history of neutropenia $<0.5 \times 10^9$ neutrophils/L (<500 neutrophils/ mm^3 for >10 days) temporally related to the onset of invasive fungal disease
Hematologic malignancy
Receipt of an allogeneic stem cell transplant
Solid organ transplant recipient
Prolonged use of corticosteroids (excluding among patients with allergic bronchopulmonary aspergillosis) at a therapeutic dose of ≥ 0.3 mg/kg corticosteroids for ≥ 3 weeks in the past 60 days
Treatment with other recognized T-cell immunosuppressants, such as calcineurin inhibitors, tumor necrosis factor- α blockers, lymphocyte-specific monoclonal antibodies, immunosuppressive nucleoside analogues during the past 90 days
Inherited severe immunodeficiency (such as chronic granulomatous disease, STAT 3 deficiency, CARD9 deficiency, STAT1 gain of function, or severe combined immunodeficiency)
Acute graft-versus-host disease grade III or IV involving the gut, lungs, or liver that is refractory to first-line treatment with steroids
<i>Clinical features</i>
At least 1 of the following 2 entities after an episode of candidemia within the previous 2 weeks:
Small, target-like abscesses in liver or spleen (bull's-eye lesions) or in the brain, or, meningeal enhancement
Progressive retinal exudates or vitreal opacities on ophthalmologic examination
<i>Mycological evidence</i>
β -D-glucan (Fungitell) ≥ 80 ng/L (pg/mL) detected in at least 2 consecutive serum samples provided that other etiologies have been excluded
Positive T2Candida ^a

1.2.4 Les méthodes conventionnelles

Au laboratoire, la première étape de l'analyse conventionnelle des prélèvements consiste en la réalisation d'un examen direct au microscope permettant d'orienter rapidement le diagnostic. Les levures ont pour caractéristiques : une taille comprise entre 4 et 8 μm , une forme arrondie ou ovale, possiblement bourgeonnantes, parfois filamenteuses (*C. albicans*, *C. dubliniensis*, *C. parapsilosis*, *C. krusei*, *C. tropicalis*) (6).

Elles peuvent être observées à l'état frais entre lame et lamelle, ou après coloration au MGG (May-Grünwald Giemsa), bleu de toluidine, Gomori-Grocott ou au Gram (Fig.9).

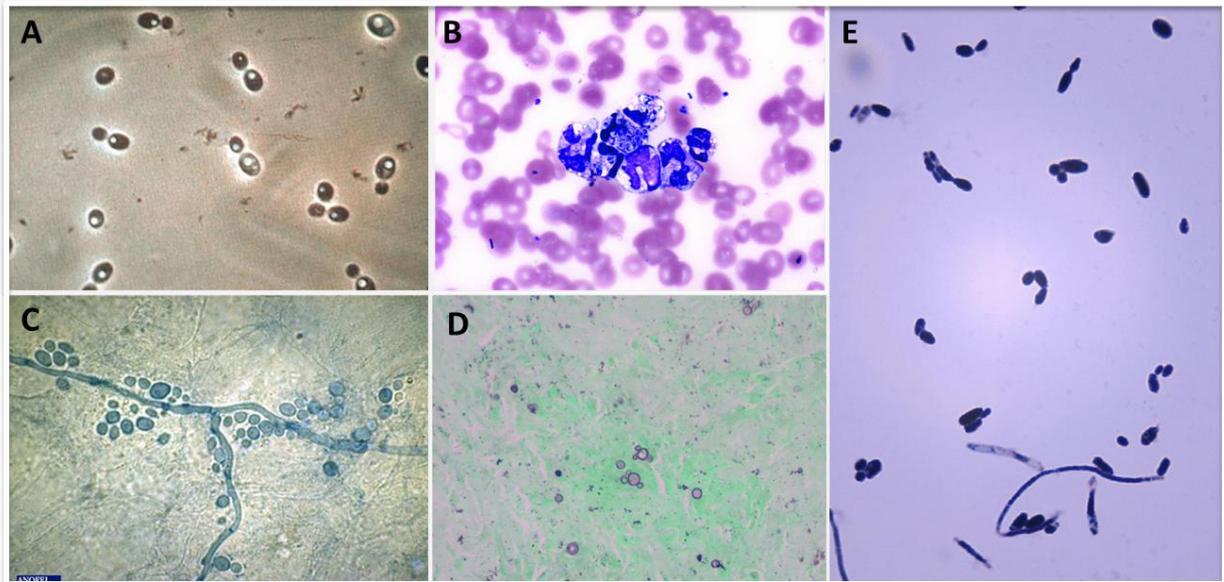


Figure 9 : Observation de levures à l'état frais au microscope au contraste de phase (A)(6), phagocytées par des monocytes au MGG (B)(63), au bleu de toluidine (C)(6), au Gomori-Grocott (D)(64) et au Gram (E)(65)

En parallèle de l'examen direct, une culture est réalisée sur différents milieux. Le milieu le plus adapté aux levures du genre *Candida* spp est le milieu de Sabouraud additionné d'antibiotiques (chloramphénicol et/ou gentamicine), pour inhiber la pousse des bactéries. Après 48h d'incubation à 37°C de ce milieu, les colonies sont blanc crème (6)(Fig.10).

La culture peut également être réalisée sur des milieux chromogènes tels que CandiSELECT4 (Biorad®) ou Chromagar (BD) permettant une identification présomptive et donc à la fois une orientation rapide sur l'espèce et une mise en évidence des mélanges d'espèces en fonction des couleurs des colonies (66)(67).

Cette étape de culture fongique, indispensable à l'isolement de la souche de levure en cause, présente une sensibilité faible (21-71%) et un délai de rendu qui peut être long (entre 2 et 5 jours) (8).

Après obtention d'une culture de levures, l'identification de l'espèce est alors possible. Différentes méthodes d'identification phénotypiques existent avec des performances, des coûts et des délais de réponse variables. Il existe des méthodes traditionnelles non commerciales comme le test de blastèse, des méthodes rapides comme les tests enzymatiques et fluorogéniques, des méthodes automatisées comme le Vitek 2 (68). L'une des méthodes les plus récentes ayant révolutionné la microbiologie est la spectrométrie de masse de type MALDI-TOF (Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-Of-Flight). Elle permet une identification précise et rapide de l'espèce (10-30 min) (69). L'application de cette méthode d'identification s'étend de plus en plus en mycologie (70)(71)(72).



Figure 10 : Aspect des colonies de levures sur milieu Sabouraud additionné de gentamicine et chloramphénicol (à gauche) et sur milieu Chromagar (à droite) (73)(74)

L'histopathologie est la deuxième méthode de référence après l'hémoculture. La mise en évidence d'éléments fongiques sur des biopsies de sites anatomiques stériles permet de confirmer le caractère invasif de l'infection fongique et de caractériser l'inflammation associée (19)(75). Cependant, des prélèvements invasifs ne sont pas toujours réalisables chez ces patients cliniquement instables (8)(76)(77).

1.2.5 Les biomarqueurs fongiques

Les techniques conventionnelles donnent des résultats trop tardifs pour permettre la rapidité thérapeutique, voire sont mises à défaut : 50 % des CI s'accompagnent ainsi d'hémocultures négatives. Il est donc nécessaire d'appuyer les stratégies de traitement précoce sur l'utilisation de nouveaux outils, dont les biomarqueurs. Les biomarqueurs les plus utilisés en clinique sont des composants polysaccharidiques de la paroi des champignons. Quelques travaux concernent les protéines structurales ou enzymatiques. Les anticorps dirigés contre ces molécules peuvent aussi être utilisés. Ainsi, les β -D-1,3-glucanes (BDG), les mannanes et les anticorps anti-mannanes peuvent être utilisés (78).

Le β -D-1,3-glucane

Il s'agit d'un antigène polysaccharidique de la paroi. Plusieurs tests ont été développés pour la détection des BDG comme les tests Fungitell® et Fungitec®. Le test Fungitell® est le seul à avoir été approuvé par la FDA (Food and Drug Administration). Il est également recommandé par l'ESCMID et l'IDSA comme test d'appoint pour le diagnostic des CI (11)(12).

Cependant, ces tests ont certains inconvénients. En effet, les BDG sont des composants de la paroi fongique de beaucoup de champignons d'importance médicale, c'est un biomarqueur panfongique d'IFI (2)(19)(79). Les faux positifs sont nombreux, notamment les produits dérivés du sang comme les facteurs de la coagulation, les immunoglobulines et l'albumine; l'hémodialyse; les triglycérides à taux élevés; l'utilisation de compresses chirurgicales ou autre matériel contenant des

glucanes; une manipulation excessive de l'échantillon; certains antibiotiques et certaines bactériémies (19)(80)(81)(82).

L'antigène mannane et l'anticorps anti-mannane

Le mannane est également un antigène polysaccharidique de la paroi. Il existe différentes techniques pour détecter le mannane : l'agglutination au latex (Pastorex *Candida*, Bio-Rad) et l'ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay, Platelia *Candida* Ag Plus, Bio-Rad ; Serion ELISA Antigen, Serion Diagnostics).

Quoi qu'il en soit, le test utilisable en routine peut détecter les mannanes issus des espèces *C. albicans*, *C. glabrata* etc. *tropicalis*, mais est moins performant pour *C. parapsilosis* et *C. kefyr* (78).

Les anticorps antimannanes peuvent être détectés par des méthodes immunologiques ou ELISA (78). Les anticorps circulants anti-mannanes peuvent être quantifiés par un test commercial utilisant un ELISA indirect : Platelia™ *Candida* Ab plus, Biorad (83).

Interprétation

Le BDG semble précoce, sensible, mais peu spécifique pour les patients de réanimation. Aucune corrélation évidente n'a été trouvée entre le BDG et la colonisation, mais une tendance existait entre une forte colonisation et un BDG élevé (84).

La détection du mannane était plus spécifique mais peu sensible et moins précoce. L'usage combiné du mannane et de l'anticorps anti-mannane pour la détection des candidémies et des candidoses chroniques disséminées a été suggéré. Il avait ainsi été montré que la sensibilité et la spécificité pour le diagnostic de la CI étaient pour les mannanes seuls respectivement de 40 et 98 %, pour les anticorps antimannanes seuls de 53 et 94 % et pour l'association des deux tests de 80 et 93 % (78)(Tab.2). Ainsi, l'usage combiné mannanes/anticorps anti-mannanes est recommandé par l'ESCMID (85).

Une combinaison de tests mannane et BDG pourrait également être utilisée pour guider les décisions thérapeutiques préventives chez les patients en USI.

Tableau 2 : Méthodes de diagnostic non basées sur la culture (86)

Method or marker	Sensitivity/specificity	Potential advantages	Potential limitations
Assays before identification and susceptibility results			
<i>Candida</i> PCR	95%/92% (suspected); 85%/38% (probable)	<ul style="list-style-type: none"> • shorter time to diagnosis • species identification • detection of resistance markers • detection of deep-seated candidiasis 	<ul style="list-style-type: none"> • cost, inconvenience • lack of universally standardized methods (e.g. specimen type) or performance validation
Mannan-Ag and anti-mannan Ab	58%/93% (mannan-Ag); 59%/83% (anti-mannan Ig); 83%/86% (combined)	<ul style="list-style-type: none"> • best when used together and for detecting <i>C. albicans</i>, <i>C. glabrata</i> or <i>C. tropicalis</i> 	<ul style="list-style-type: none"> • limited sensitivity/specificity when used individually and for detecting <i>C. parapsilosis</i> and <i>C. guilliermondii</i> • uncertain reliability in immunocompromised hosts, uncertain utility for deep-seated candidiasis
BDG	75%–80%/80%	<ul style="list-style-type: none"> • pan-fungal marker for patients at risk for other systemic infections (e.g. with <i>Aspergillus</i> spp. or <i>Pneumocystis jirovecii</i>, in HSCT recipients) • detection of deep-seated candidiasis • high negative predictive value • can detect infection days or weeks in advance of culture-based diagnosis 	<ul style="list-style-type: none"> • prophylactic or empirical antifungal treatment may impact test performance • lower sensitivity for <i>C. parapsilosis</i> • false-positive results higher for patients in ICU, with colonization, other systemic infections, multiple therapeutic interventions; may require more than one consecutive positive result
CAGTA	77%–89%/91%–100%	<ul style="list-style-type: none"> • high negative predictive value (93.9%) • unaffected by colonization or antifungal use 	<ul style="list-style-type: none"> • limited experience/data
T2MR	91.1%/99.4% per assay	<ul style="list-style-type: none"> • shorter time to diagnosis • high specificity • low limit of detection 	<ul style="list-style-type: none"> • limited experience/data
Assays after identification and susceptibility results			
MALDI-TOF	>90%	<ul style="list-style-type: none"> • rapid results (within minutes) • ability to identify genus, species, strain and potential resistance patterns 	<ul style="list-style-type: none"> • lack of experience/data

1.3 Stratégies thérapeutiques des candidoses invasives

Différentes stratégies thérapeutiques des CI sont décrites dans la littérature :

- ❖ Le **traitement prophylactique** prévenant la survenue de CI chez des patients présentant des facteurs de risque. Cette stratégie est recommandée chez les patients à haut risque comme les transplantés d'organes solides (foie, pancréas, intestin grêle) ou greffés de cellules souches hématopoïétiques, les patients de néonatalogie ou encore chez les patients non neutropéniques qui ont subi une chirurgie abdominale avec des perforations gastro-intestinales ou avec des fuites anastomotiques (12). La prophylaxie peut également être justifiée pour les patients présentant des facteurs de risque de développer une CI en USI (87).
- ❖ Le **traitement préemptif**, défini comme un traitement antifongique précoce instauré chez des patients présentant des facteurs de risque et pour lesquels des biomarqueurs sont positifs (77). En ce qui concerne le traitement préemptif, l'isolement de *Candida* en culture doit être interprété comme une colonisation. En cas de positivité des BDG, un traitement par antifongique est parfois mis en place (11).

- ❖ Le **traitement empirique**, basé sur le risque de développer une CI en se basant sur son expérience médicale chez les patients présentant de la fièvre et à risque de développer une CI, permet d'améliorer la survie de ces patients. Cependant, il est difficile de savoir à quel moment l'instaurer (11). Ainsi, aucune recommandation spécifique de traitement face à un patient ayant de la fièvre ne peut être donnée.

- ❖ Le **traitement curatif ou ciblé**, thérapeutique lorsque la CI est documenté/prouvée selon les recommandations de l'ESCMID 2012 (11), IDSA 2016 (12) et ECIL-6 2017 (88).

1.4 Antifongiques

1.4.1 Les molécules disponibles

Quatre classes d'antifongiques systémiques sont recommandées dans la prise en charge des CI. Il s'agit des polyènes avec l'amphotéricine B ; la flucytosine ou 5-fluorocytosine ; les azolés avec le fluconazole, l'itraconazole, le voriconazole, le posaconazole et l'isavuconazole ; et les échinocandines avec la caspofungine, la micafungine et l'anidulafungine. Pour le traitement, il existe les recommandations de l'ESCMID 2012 (11), de l'IDSA2016 (12) et l'ECIL-6 2017 (88).

En dehors de la néonatalogie où l'amphotéricine B et le fluconazole sont préconisés, les échinocandines sont les antifongiques de première ligne dans les CI avant l'identification de l'agent en cause.

L'amphotéricine B a également sa place en première ligne en cas de contre-indication aux échinocandines et lors des atteintes neuro-méningées.

Les azolés (fluconazole et voriconazole) sont des alternatives de première ligne en dehors des infections graves ou de préexpositions à cette famille de molécules.

Enfin, la flucytosine a sa place dans le traitement des CI avec des grades différents de recommandations, mais toujours en association, le plus souvent avec l'amphotéricine B, dans les endocardites, les atteintes neuroméningées, oculaires, osseuses ou encore dans les cystites et pyélonéphrites à *Candida* spp.

La durée du traitement doit être au minimum de 14 jours après la dernière hémoculture positive. Chez les patients stables cliniquement pour lesquels des espèces habituellement sensibles ont été isolées, le passage à un traitement par voie orale après 10 jours de traitement par voie intraveineuse est possible.

Ces familles d'antifongiques diffèrent notamment par leur mécanisme d'action. Les mécanismes d'action sont résumés sur la figure suivante (Fig.11) (89):

- Les azolés, après avoir été transportés par diffusion facilitée dans le cytoplasme, inhibent la lanostérol 14- α -déméthylase entraînant ainsi l'inhibition de la formation d'ergostérol membranaire nécessaire à la synthèse de la membrane cellulaire fongique,
- Les échinocandines agissent par inhibition non compétitive de la β -D-glucane synthase (codée par les gènes FKS) et donc par inhibition de la formation de BDG qui sont des composants essentiels de la paroi cellulaire,
- L'amphotéricine B entraîne une instabilité membranaire avec formation de canaux ioniques déstabilisants,
- La flucytosine est une prodrogue transportée dans la cellule fongique par la purine-cytosine perméase (gène FCY2) puis convertie en composés qui inhibent la synthèse d'ARN et d'ADN.

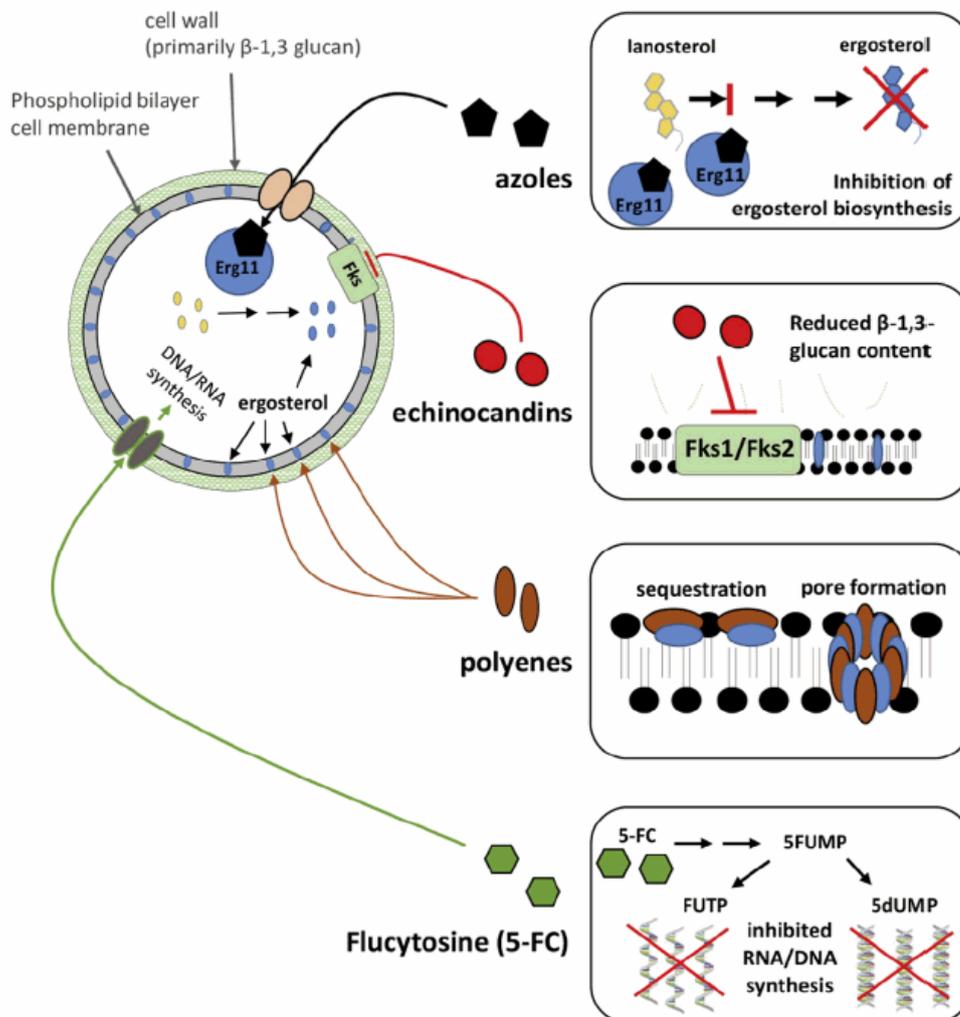


Figure 11 : Mécanismes d'actions des antifongiques systémiques (89)

1.4.2 Résistances des *Candida* spp aux antifongiques

Les levures du genre *Candida* spp peuvent présenter des résistances aux antifongiques. Ces résistances peuvent être :

- Cliniques, c'est-à-dire qu'une infection documentée à *Candida* spp persiste ou progresse malgré un traitement antifongique,
- Microbiologiques, c'est-à-dire que la détermination de la CMI de la levure la classe dans la catégorie « résistante » *in vitro* par rapport aux SSC définis par les sociétés savantes (89)(90)(91).

De même, il faut distinguer :

- La résistance primaire ou intrinsèque observée pour des levures non exposées aux antifongiques antérieurement, comme par exemple *C. krusei* vis-à-vis du fluconazole (91). Cette résistance est une caractéristique d'espèce et est prédictive de l'échec clinique.
- De la résistance secondaire ou acquise qui apparaît uniquement après exposition du champignon aux antifongiques utilisés en pratique ou présents dans l'environnement après épandage de produits phytosanitaires.

Les résistances acquises peuvent apparaître en réponse à une pression de sélection ou à un sous-dosage d'une molécule antifongique (azolé par exemple) au niveau du site infectieux (diffusion faible, biofilm) et ceci par l'induction d'une résistance d'une espèce auparavant sensible ou par la sélection d'une espèce intrinsèquement résistante. Plus rarement, une transmission horizontale de souches résistantes entre patients peut être à l'origine de cette acquisition (91).

Mécanismes de résistance

Il existe 4 grands mécanismes de résistance aux antifongiques (92) :

- L'altération du transport des molécules antifongiques,
- La modification moléculaire de la cible des antifongiques,
- L'utilisation de voies métaboliques compensatrices,
- La formation de structures multicellulaires complexes (biofilms).

Ces mécanismes généraux se déclinent sur des cibles spécifiques de chaque classe d'antifongique en fonction de leur mode d'action (Fig.12).

Résistance aux azolés

La résistance acquise aux azolés est complexe et plusieurs mécanismes sont décrits dans la littérature.

1. Le premier affecte le transport des antifongiques avec un efflux actif médié par les transporteurs multidrogues qui empêche l'accumulation intracellulaire de l'antifongique. Il existe 2 classes de super familles de transporteurs impliqués dans la résistance aux azolés : ATP-binding cassette (ABC) et Major Facilitator (MFS) qui sont codés respectivement par les gènes CDR et MDR (92). Différentes mutations de ces cibles sont décrites dans la littérature en fonction des espèces. Les mutations de CDR confèrent une résistance croisée de *Candida* spp aux azolés alors que les mutations décrites de MDR confèrent une résistance sélective au fluconazole (93)(94)(95)(96)(97).
2. Une autre cible majeure est le gène codant pour la lanostérol 14- α -déméthylase qui est une enzyme essentielle à la synthèse des stérols membranaires. Il s'agit du gène ERG11 chez *C. albicans*. Les mutations se situent soit autour du site actif, soit autour du canal d'accès (98). Ainsi, il y a une diminution de l'affinité de la cible pour les azolés.
3. L'enzyme lanostérol 14- α -déméthylase peut être surexprimée. En effet, il peut exister une régulation positive de la cible grâce à une transcription accrue du gène (mutations GOF dans UPC2) ou grâce à des copies supplémentaires du gène ERG11 (plasticité du génome) (99).
4. La voie de la biosynthèse de l'ergostérol peut être altérée. Il peut exister un shunt de la voie de l'ergostérol entraînant la formation de stérols alternatifs indépendants d'ERG11. Ainsi, la teneur en ergostérol de la membrane est réduite et il y a accumulation d'intermédiaires de stérols. Ce mécanisme entraîne des résistances croisées à l'amphotéricine B (CMI plus élevées) (100).
5. La résistance peut aussi être due à la plasticité du génome, c'est une caractéristique du genre *Candida*. En effet, l'aneuploïdie (nombre anormal de chromosomes) est rare dans les conditions physiologiques mais possible en cas de stress, notamment l'exposition à un antifongique. C'est un phénomène réversible. L'aneuploïdie la plus fréquente est constituée de 2 copies supplémentaires du chromosome 5L. Il peut également y avoir des événements de perte d'hétérozygotie (101).

Résistance aux échinocandines

Les résistances aux échinocandines sont dues à des variations naturelles ou à des mutations dans les régions de points chauds conservés de la protéine codée par FKS (FKS 1 pour *C. parapsilosis* ou FKS 2 pour *C. glabrata*) (102).

Ces résistances acquises aux échinocandines sont en augmentation (102). Ce phénomène de résistance qui émerge rapidement peut être expliqué par le fait

qu'une seule mutation peut rendre la souche résistante (en particulier chez les espèces haploïdes) et car les gènes de réparation de mésappariement peuvent être mutés. De plus, les concentrations sub-thérapeutiques ne sont pas rares dans les biofilms, les dispositifs médicaux (valves cardiaques par exemple), les muqueuses et les foyers profonds et les expositions sur de courtes périodes aux échinocandines favorisent l'émergence de la résistance (89).

Résistance à l'amphotéricine B

Les mécanismes moléculaires de résistance à l'amphotéricine B sont en lien avec la modification de la biosynthèse de l'ergostérol entraînant l'accumulation de stérols alternatifs (103).

Une sensibilité réduite à l'amphotéricine B peut aussi être observée chez *C. albicans* avec des mutations sur ERG2, ERG3, ERG5 et ERG11 et *C. glabrata* en cas de mutations sur ERG2 et ERG6. A l'exception de la mutation sur ERG6, toutes ces mutations sont susceptibles d'entraîner une résistance croisée aux azolés (89).

Résistance à la flucytosine

La résistance à la flucytosine est due à la modification de l'absorption (Fcy2) ou du métabolisme (Fcy1 ou Fur1) du médicament (104).

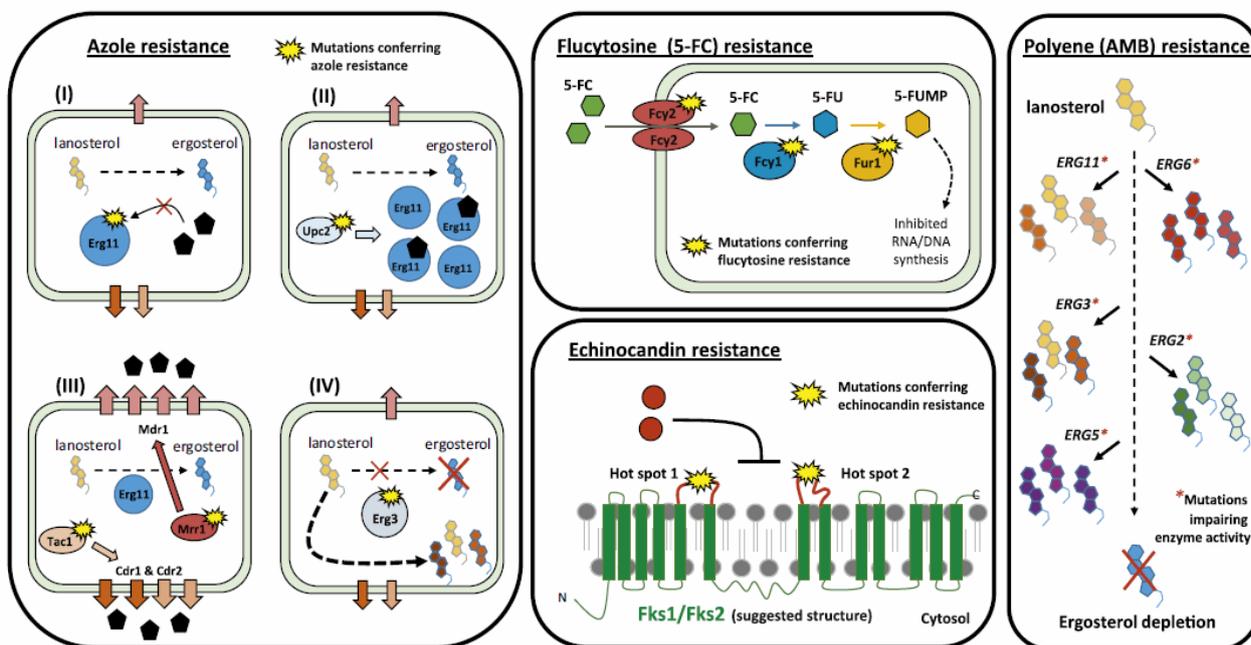


Figure 12 : Mécanismes moléculaires de résistance aux antifongiques (89)

Multirésistance

La multirésistance (« multidrug resistance » ou MDR) est un phénomène rare chez les levures par rapport aux bactéries mais en émergence (91). Elle est définie comme la non-susceptibilité à au moins un antifongique dans au moins 2 classes différentes d'antifongiques. La multirésistance peut être observée chez *C. glabrata* et

peut rarement être intrinsèque mais est observée chez *C. auris* dont certaines souches sont résistantes au fluconazole, à l'amphotéricine B ou aux échinocandines (91).

Prévalence de la résistance

Au niveau mondial, d'après le programme de surveillance SENTRY, les taux les plus élevés d'isolats résistants au fluconazole ont été observés chez *C. parapsilosis* en Afrique du Sud (60%), *C. glabrata* en Amérique du Nord (10,6%) et chez *C. tropicalis* en Asie orientale (9,2%) (21).

Par ailleurs, 3,5% des isolats de *C. glabrata* sont résistants aux échinocandines, 0,1% des isolats de *C. albicans* et 0,1% des isolats de *C. parapsilosis*(21). De plus, jusqu'à 10% des isolats de *C. glabrata* sont résistants aux échinocandines à cause de mutations au niveau de la séquence « point chaud » du gène FKS1. Au sein de ces isolats résistants aux échinocandines, 20% des souches présentent en plus une résistance croisée aux azolés (105). Au Royaume-Uni, les isolats de *C. glabrata* sont rarement résistants aux échinocandines (0,55%) (106).

En France, d'après le Centre National de Référence des Mycoses et des Antifongiques (CNRMA) (107), sur les 10 dernières années, on constate :

- Une très bonne activité du fluconazole et du voriconazole sur les isolats de *C. albicans* ($\leq 2\%$ d'isolats avec une sensibilité diminuée),
- Une apparition d'isolats de *C. parapsilosis* résistants au fluconazole (19% en 2007, 2 à 14% entre 2008 et 2014) sans que l'on puisse toutefois relier ce phénomène à des épidémies localisées,
- une résistance à la caspofungine toujours rare (0-1% des isolats de *C. albicans*, 0-5% chez de *C. glabrata*, 0-3% chez *C. tropicalis*) voire absente (0% chez *C. krusei*).

1.5 Les tests de sensibilité aux antifongiques

Malgré la disponibilité sur le marché d'un nombre croissant de molécules depuis les années 50 (108), le nombre de cibles reste limité avec en parallèle l'émergence de souches résistantes aux antifongiques. Dans ce contexte, l'étude de la sensibilité *in vitro* des souches responsables de CI se justifie de plus en plus en vue d'optimiser le traitement et de mettre en évidence ces résistances.

La recherche de ces résistances est le plus souvent effectuée par des méthodes phénotypiques permettant de déterminer une CMI et de catégoriser la souche en « sensible », « intermédiaire » ou « résistante » vis-à-vis de l'antifongique testé. De nouvelles approches de détection moléculaires ou encore par spectrométrie de masse sont prometteuses mais relèvent le plus souvent de centres experts ou sont encore au stade de développement (109).

1.5.1 Tests phénotypiques de détection de sensibilité aux antifongiques

1.5.1.1 Les méthodes de référence

Il existe actuellement deux méthodes de référence de microdilution en milieu liquide pour les tests de sensibilité aux antifongiques : EUCAST, établie par un comité dépendant de l'European Society of Clinical Microbiology and Infectious Disease (ESCMID) (110) et CLSI, établie par le Clinical Laboratory Standards Institute aux Etats-Unis (111). Ces méthodes sont réalisées à partir d'une suspension de levure standardisée en milieu RPMI 1640 qui est distribuée dans des puits de concentration croissante d'antifongique. Après incubation, la croissance dans chaque puits est comparée à un témoin et la CMI peut être déterminée. Les différentes étapes de ces deux méthodes sont similaires avec également un même milieu de culture (RPMI) et une lecture de la CMI à 50% d'inhibition pour les azolés, les échinocandines et la flucytosine. Cependant elles présentent chacune des spécificités comme les concentrations de l'inoculum et du glucose dans le RPMI, les durées d'incubation et la lecture de la CMI à 100% d'inhibition pour l'amphotéricine B (fongicide) avec la méthode CLSI et $\geq 90\%$ d'inhibition avec la méthode EUCAST (Tab.3) (112).

Tableau 3 : Différences des modes opératoires des méthodes de référence CLSI et EUCAST (112)

Parameter	CLSI M27-A4	EUCAST E.DEF 7.3.1
Glucose content of RPMI medium	0.2% glucose	2% glucose
Preparation of antifungal agent	Prepare stock concentration of at least 1,280 $\mu\text{g/ml}$ or 10 times the highest concentration to be tested, whichever is greater	Prepare at concentrations at least 200 times higher than the highest concentration to be tested in the plate
Preparation of organism	Subculture yeast at least twice	The number of subcultures is not defined
Microdilution plate	Plates with U-shaped wells	Tissue-treated plates with flat-bottomed wells
Inoculum size	Yeasts, 0.5×10^3 to 2.5×10^3 cells/ml; filamentous fungi (nondermatophyte), 0.4×10^4 to 5×10^4 cells/ml; filamentous fungi (dermatophyte), 1×10^3 to 3×10^3 cells/ml	Yeasts, 1×10^5 to 5×10^5 cells/ml; filamentous fungi, 2×10^5 to 5×10^5 cells/ml
Reading method	Visual	Spectrophotometric
<i>Cryptococcus</i> spp.	Read at 72 h of incubation	Read at 48 h of incubation
Amphotericin B reading	100% decrease in growth, or the first optically clear well	$\geq 90\%$ decrease in growth
Miscellaneous		Recommends against the use of low-evaporation lids

Malgré ces différences de méthodologie, plusieurs études montrent que l'EUCAST et le CLSI donnent des résultats de CMI comparables pour les différentes classes d'antifongiques vis-à-vis des espèces de *Candida* spp les plus courantes (113)(114)(115). Une corrélation moindre est tout de même décrite pour *C. glabrata* avec l'amphotéricine B, l'anidulafungine et l'isavuconazole ; *C. parapsilosis*, *C. tropicalis* et *C. krusei* et caspofungine ainsi que itraconazole et posaconazole vis-à-

vis de la plupart des espèces (115).

1.5.1.2 Les méthodes commerciales : Bandelettes à gradient de concentration, Vitek 2, SYO

Les méthodes de référence sont fastidieuses et peu adaptées lorsqu'un grand nombre de souches doit être testé. Ainsi la sensibilité des souches aux antifongiques est souvent réalisée au moyen de tests commerciaux, plus faciles à mettre en œuvre en pratique clinique.

Ces tests commerciaux sont fondés sur différentes méthodes :

Bandelettes à gradient de concentration

Les bandelettes à gradient de concentration sont une méthode de diffusion sur gélose utilisant une bandelette contenant un gradient prédéfini et continu de 15 concentrations d'antifongique permettant de déterminer directement une CMI. La bandelette est déposée sur une gélose préalablementensemencée avec une suspension standardisée de levures (Fig.13). Après incubation, la CMI (en mg/L) correspond à la valeur visualisée à l'intersection entre l'ellipse d'inhibition et la bandelette (116).



Figure 13 : Mode opératoire de la technique de bandelettes à gradient de concentration (116)

La lecture des CMI se fait à 100% d'inhibition pour l'amphotéricine B, à 90% pour la flucytosine et à 80% pour les azolés et les échinocandines (Fig.14).

Azoles & Echinocandins: first sig. decrease in colony density.
Microcolonies permitted within ellipse.

Amphotericin B: 100% inhibition. No
colonies permitted within ellipse.

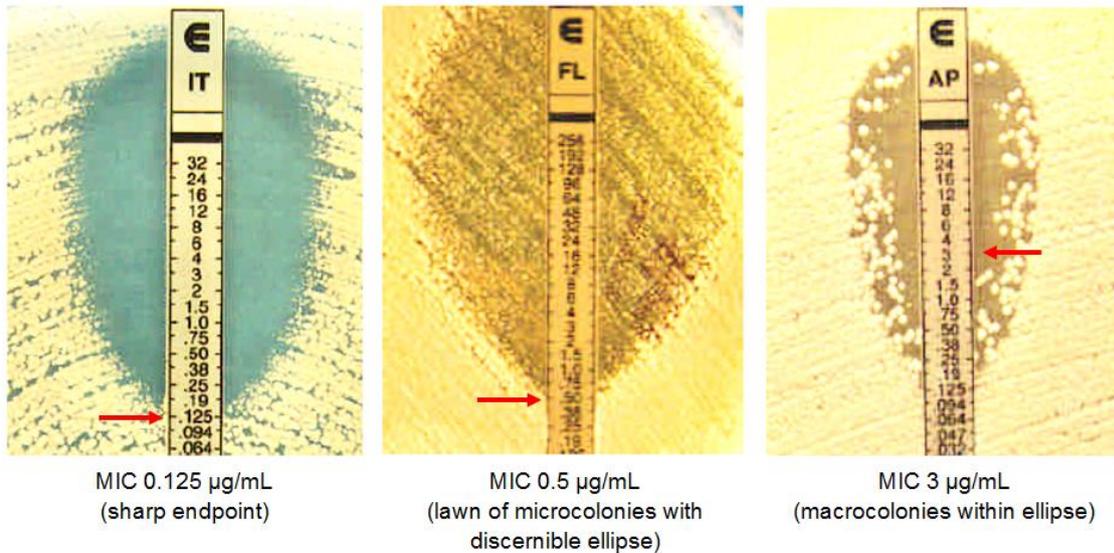


Figure 14 : Lecture des CMI des azolés (lecture à 80% d'inhibition) et de l'amphotéricine B (lecture à 100% d'inhibition) (117)

La méthode de bandelettes à gradient de concentration est simple d'utilisation. Cependant, la lecture peut s'avérer difficile notamment en cas d'effet de traîne (« Trailing effect ») pour certaines souches, pouvant conduire à une surestimation de la CMI ou encore à cause d'une croissance paradoxale de la souche (« Eagle effect ») (Fig.15).

L'effet de traîne concerne notamment les azolés qui inhibent partiellement la croissance des levures. Ainsi, il existe une croissance de microcolonies à l'intérieur de l'ellipse d'inhibition dont il ne faut pas tenir compte lors de la lecture de la CMI. Cet effet de traîne peut également exister avec la flucytosine et les échinocandines (118).

La croissance paradoxale est définie comme la croissance de la levure à des concentrations élevées, supérieures à la CMI réelle, dont il ne faut également pas tenir compte (118).

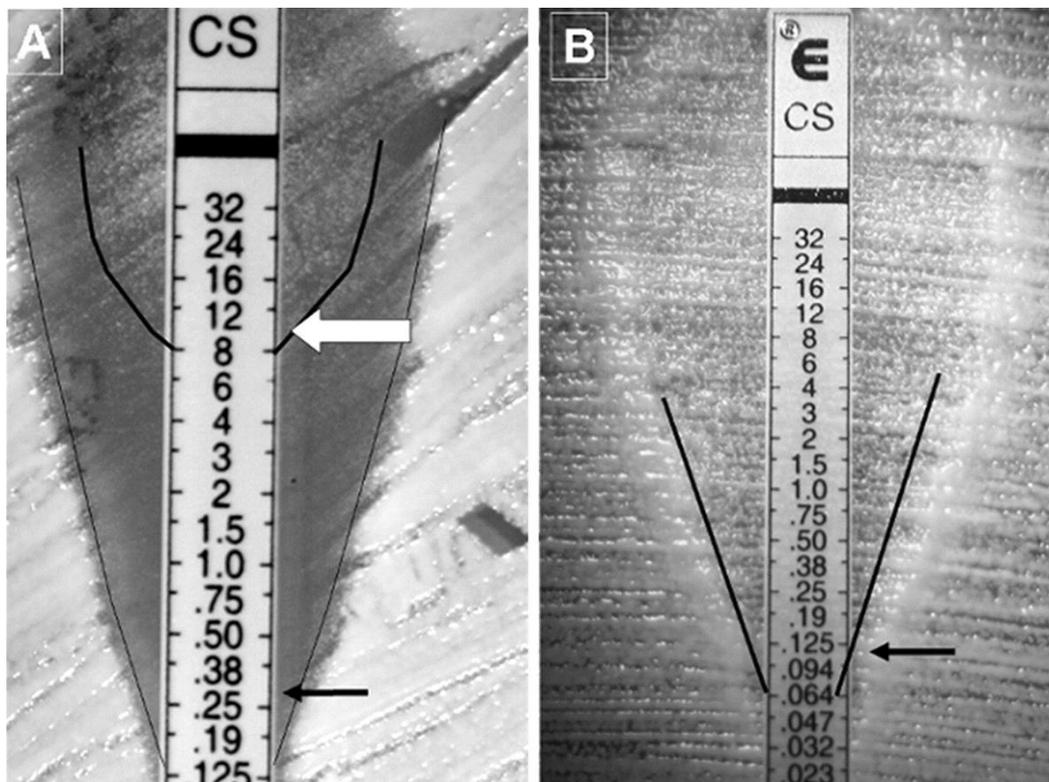


Figure 15 : Effet paradoxal (à gauche) et effet de traîne (à droite). Les flèches noires indiquent la CMI qui doit être lue (119)

Les avantages de la méthode en gradient de diffusion sont notamment le coût peu élevé, l'obtention d'une valeur de la CMI, l'utilisation possible pour les champignons filamenteux et les levures. En revanche, l'interprétation est subjective et les bandelettes ne sont pas disponibles pour tous les antifongiques en développement (112). Il existe une bonne corrélation entre les bandelettes à gradient de concentration et les méthodes de référence CLSI et EUCAST (EA : Essential Agreement, ici >95%) (120)(121).

Vitek 2

Le Vitek2 (bioMérieux) est un système automatisé permettant l'identification et la détermination de la sensibilité des levures aux antifongiques en 14 à 18h. Cette technique est réalisée à l'aide de carte, contenant les microdilutions des antifongiques auxquelles on ajoute la suspension de levure. Ces cartes sont ensuite insérées dans l'automate et la lecture de la CMI se fait par spectrophotométrie, rendant la lecture plus objective (112).

Sept antifongiques peuvent être testés. Cependant, seuls le fluconazole, le voriconazole et la caspofungine ont été approuvés par la FDA dans cette méthode (122).

Les avantages de cette méthode est l'objectivité de l'interprétation, la facilité d'utilisation, l'usage double dans les laboratoires utilisant déjà ce système pour l'identification. En revanche, les inconvénients sont l'investissement financier initial

coûteux, l'utilisation impossible pour les champignons filamenteux, le nombre limité d'antifongiques disponibles (112).

Des études ont démontré une bonne corrélation entre le Vitek 2 et les méthodes CLSI/EUCAST (EA=88-98%) (122)(123)(124)(125).

Le système Sensititre® YeastOne™ (SYO)

Le SYO est fabriqué par TREK et fourni en France par Thermofisher Scientific. Il s'agit d'une méthode colorimétrique en plaque de microtitration (plaque YO10) permettant de tester 9 antifongiques systémiques sur les 10 existant actuellement, soit l'amphotéricine B, la 5-fluorocytosine, le fluconazole, l'itraconazole, le posaconazole, le voriconazole, la micafungine, la caspofungine et l'anidulafungine.

Elle contient les différentes dilutions d'antifongiques ainsi que du bleu Alamar dans chaque cupule qui est un indicateur coloré variant du bleu au rose, permettant la détermination des CMI (Fig.16).

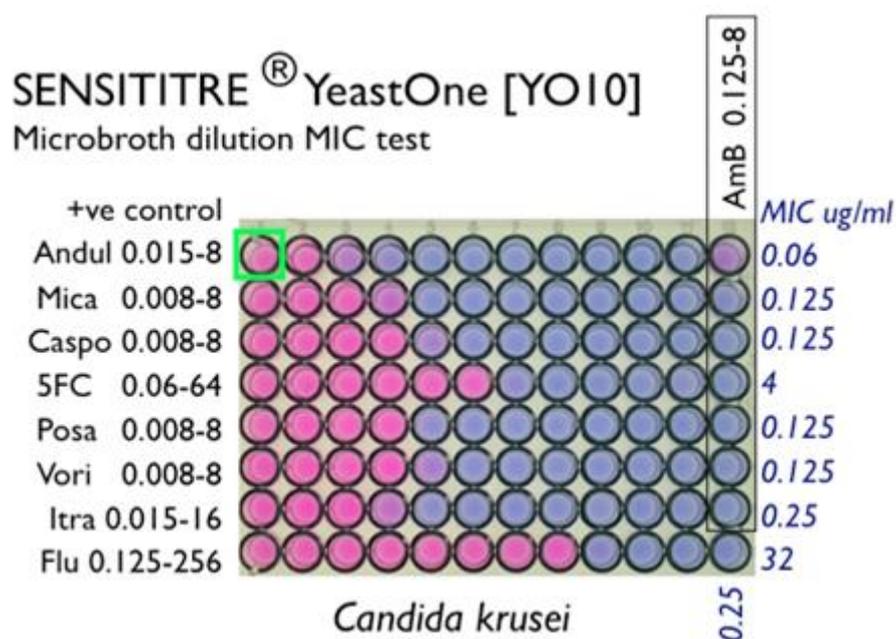


Figure 16 : Plaque YO10 du système SYO (117)

Le système SYO n'est pas adapté pour les levures à croissance lente. Cependant, il s'agit d'un système robuste et reproductible, facile à configurer et ayant une longue durée de vie (117).

Les avantages de cette méthode sont la lecture plus facile des plaques que celles des méthodes CLSI et EUCAST, une conservation longue des plaques séchées qui n'ont pas besoin d'être réfrigérées, une formation facilitée des techniciens de laboratoire à cette méthode plutôt qu'aux méthodes de référence.

En revanche, les phénomènes de « trailing » peuvent poser des problèmes de lecture, l'utilisation n'est pas prévue pour les champignons filamenteux. Il s'agit d'une méthode en microdilutions mais elle ne suit pas les règles d'interprétation des méthodes de référence (112).

Des comparaisons du SYO aux méthodes de référence ont été effectuées. Le mode opératoire ainsi que les performances ont été jugés équivalents à ceux de la méthode CLSI (EA>90%) (120)(122)(126). L'interprétation des CMI doit se faire en fonction des SSC du CLSI.

Les méthodes SYO et EUCAST sont également très bien corrélées avec un EA>95% (120).

Interprétation des résultats

La valeur de la CMI est une mesure *in vitro*, mais n'est pas prédictive du succès thérapeutique clinique (112). L'EUCAST et le CLSI ont défini des seuils de sensibilité clinique (SSC, ou « breakpoints » en anglais) qui permettent de classer les souches en sensibles/intermédiaires/résistantes en fonction de leur CMI.

En raison des différences méthodologiques entre le CLSI et l'EUCAST, les SSC EUCAST doivent être utilisés pour interpréter les résultats de CMI en EUCAST, et il en est de même pour le CLSI.

Afin d'interpréter les CMI, le CLSI et l'EUCAST ont défini des SSC lus par les différentes méthodes.

Les SSC sont le meilleur indicateur de la réponse du patient au traitement antifongique. Ils sont utilisés pour indiquer si les isolats sont sensibles ou résistants au traitement, s'il est bien administré et en concentration suffisante.

Ils sont le résultat de (127):

- La distribution des Concentrations Minimales Inhibitrices (CMI) et des Concentrations Minimales Effectives (CME),
- *In vitro*, des relations de pharmacocinétique/pharmacodynamique chez des modèles animaux,
- De données cliniques et microbiologiques.

Lorsqu'aucun SSC n'a été défini par les sociétés savantes, la classification de la sensibilité de la souche aux antifongiques n'est pas aisée. En conséquence, les Cut-Off Epidémiologiques (ECOFF) constituent une aide au choix thérapeutique.

Il s'agit de la valeur de la CMI qui identifie la limite supérieure d'une population de souches sauvages. Cette valeur englobe les CMI de 95% des isolats d'une espèce (128).

Les ECOFF peuvent aider à différencier les souches non sauvages des souches sauvages et est un indicateur intéressant de l'émergence de souches de sensibilité réduite à un agent antifongique (127).

En revanche, ils ne permettent pas de catégoriser une souche en sensible/intermédiaire/résistante comme avec les SSC, car la pharmacologie de

l'agent antifongique n'a pas été étudiée et les études cliniques n'ont pas été menées (127).

1.5.2 Méthodes moléculaires

La détection des mutations pertinentes dans les gènes associés à des résistances (gène FKS, gène ERG11) peuvent être faites par des techniques de biologie moléculaire telles que le séquençage par Sanger, le pyroséquençage ou encore la PCR en temps réel (129).

1.6 Objectifs de l'étude

Les objectifs de l'étude sont de :

- ✓ Déterminer **l'épidémiologie des levures au CHU de Lille entre 2009 et 2017** soit la répartition des espèces entre elles, des souches dans les services notamment ceux à risque d'IFI, la répartition des souches responsables de candidémies,
- ✓ Déterminer les valeurs des **Cut Off Epidémiologiques (ECOFF)** en cas d'absence de SSC défini afin de disposer de seuils d'interprétation de la susceptibilité des levures aux antifongiques, adaptés à l'écologie de notre centre,
- ✓ Déterminer **l'épidémiologie des résistances** des souches de levures isolées à l'aide du système Sensititre® Yeast One® (SYO) au CHU de Lille,
- ✓ **Comparer les résistances** aux antifongiques mises en évidence **en SYO à la méthode de référence EUCAST**, afin de savoir si les CMI obtenues avec ces deux méthodes pour les souches étudiées sont corrélées ou non.

2 Matériels et méthodes

2.1 Etude épidémiologique et détermination des ECOFF

Population étudiée

L'étude épidémiologique ainsi que la détermination des ECOFF ont été effectuées sur l'ensemble des souches isolées au laboratoire de Parasitologie-Mycologie du CHU de Lille entre 2009 et 2017 pour lesquelles un antifongigramme a été réalisé par méthode SYO.

Les souches sont toutes issues de prélèvements de patients hospitalisés au CHU de Lille ou pris en charge dans des centres hospitaliers périphériques pour lesquels le CHU de Lille est centre de recours. Leurs origines sont en conséquence variées et comprennent aussi bien des prélèvements profonds (hémocultures, abcès, liquides de ponction...) que superficiels (crachats, prélèvements cutanés...).

Recueil des données

Les données recueillies pour l'étude ont été les suivantes : l'âge et le sexe du patient, la nature du prélèvement, l'espèce isolée, le service d'hospitalisation, la date de réalisation de l'antifongigramme et les CMI des antifongiques testés en SYO. L'ensemble de ces données a été extrait du Sensititre Vizion® puis analysé par Microsoft Excel.

Détermination des ECOFF

Afin de déterminer les ECOFF sur la population définie précédemment, les données recueillies ont été analysées par la méthode du " Eye-ball ". Pour chaque espèce, le nombre de souches présentant une CMI donnée vis-à-vis d'un antifongique donné a été reporté dans un tableau Excel (Tab.4).

Tableau 4: Répartition des souches de *C. albicans* de 2009 à 2017 au CHU de Lille par CMI et par antifongique

C albicans 4646

	0,008	0,015	0,03	0,06	0,125	0,25	0,5	1	2	4	8	16	32	64	128	256
5 Fluorocytosine				3102	794	321	296	53	17	13	10	1	1	38		
Fluconazole					199	1308	2192	740	112	35	29	11	3	4	8	5
Itraconazole		235	938	2055	1243	114	36	10				15				
Posaconazole	300	1567	1645	876	139	46	26	27	5		15					
Voriconazole	2960	1014	396	170	56	20	9	4	1	2	14					
Caspofungine	15	335	1763	1761	615	124	18	4	3	2	6					
Anidulafungine		1707	1503	950	440	26	8	9	2		1					
Micafungine	2222	1926	356	50	12	28	33	9	5	4	1					
Amphotéricine					235	1934	2370	106	1							

Les données de chaque tableau ont été ensuite étudiées dans le logiciel GraphPad Prism afin de réaliser pour chaque couple espèce/antifongique un histogramme du nombre de souches en fonction de leur CMI (en µg/mL) permettant d'apprécier la répartition des souches. Les ECOFF ont été déterminés sur ces histogrammes de façon visuelle (méthode du « eye-ball ») : le ECOFF correspondant à la valeur de CMI qui englobe 95% des souches de la population étudiée (Fig.17).

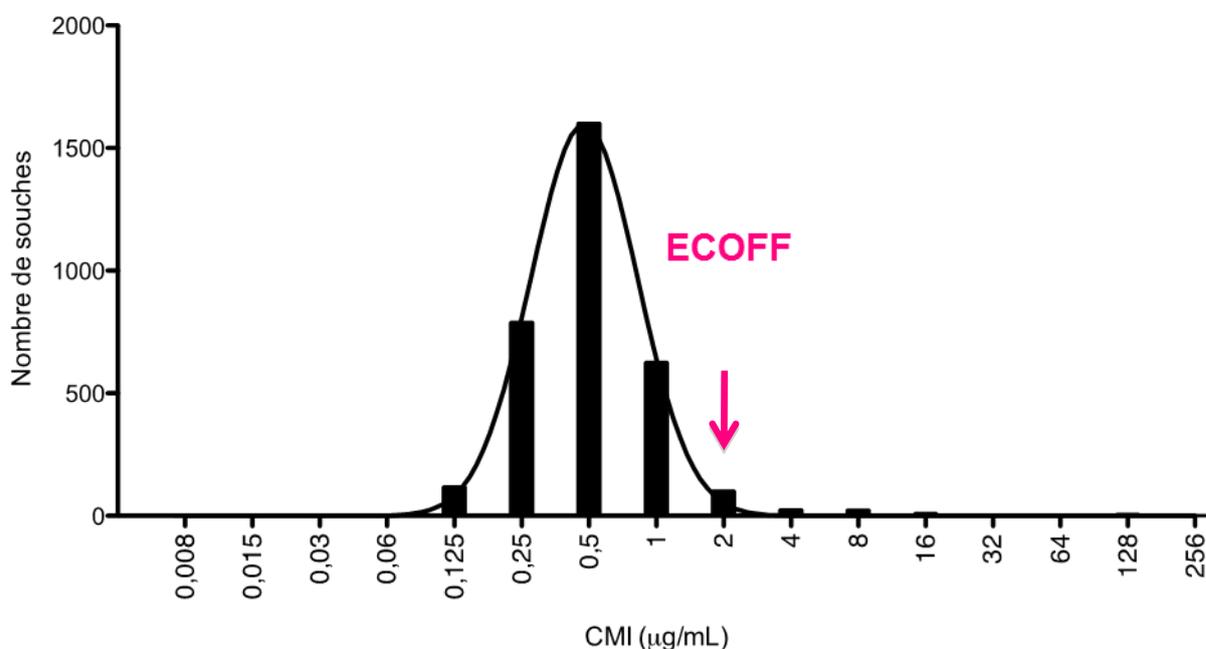


Figure 17 : Détermination des ECOFF sur GraphPad Prism par la méthode « eye-ball »

Les ECOFF ont été déterminés, dans un second temps, à l'aide du fichier Microsoft Excel ECOFFfinder(130). Comme précédemment, les données sont répertoriées dans un tableau Excel en fonction de leur CMI pour chaque espèce et chaque

antifongique. On obtient une courbe de répartition des souches par CMI (Fig.18). L'analyse statistique est réalisée automatiquement et donne la valeur numérique de l'ECOFF correspondant ici à la valeur de CMI qui englobe 97,5% des souches de la population étudiée.

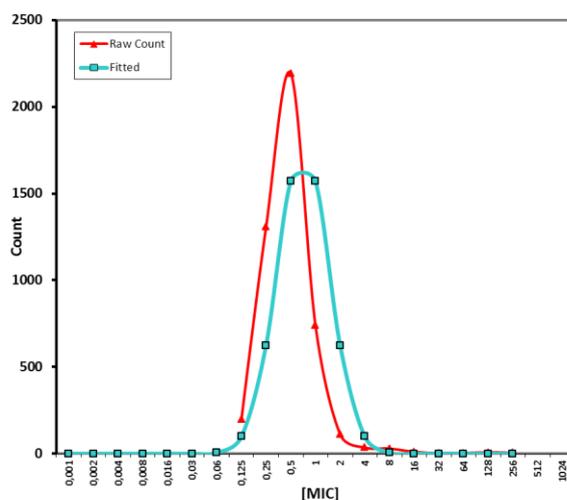


Figure 18 : Exemple de détermination de l'ECOFF *C. albicans*/fluconazole avec le fichier Excel ECOFF Finder (Raw count : distribution des isolats, fitted : analyse statistique de la courbe pour déterminer l'ECOFF)

2.2 Etude de la sensibilité aux antifongiques

2.2.1 Détermination de la sensibilité aux antifongiques par la méthode SYO

Préparation des souches

Les souches de levures ont été isolées par culture des prélèvements reçus au laboratoire de Parasitologie-Mycologie du CHU de Lille sur milieu de Sabouraud ou milieu chromogénique (CandiSELECT4, Biorad®; CHROMagar™ Candida, Becton Dickinson) incubés à 24 ou 35°C. Les colonies de levures ainsi obtenues ont été identifiées par spectrométrie de masse de type MALDI-TOF (Microflex LT MALDI-TOF; Biotyper V2.0/V3.0 Bruker Daltonics®).

Réalisation des tests de sensibilité

Un antifongigramme a été réalisé à l'aide du système SYO selon les recommandations du fournisseur.

Le mode opératoire est représenté sur les figures 19 à 21.

Une suspension de levures calibrée au densitomètre (0,5 McFarland) est réalisée dans de l'eau stérile, puis inoculée à un milieu de culture, le RPMI.

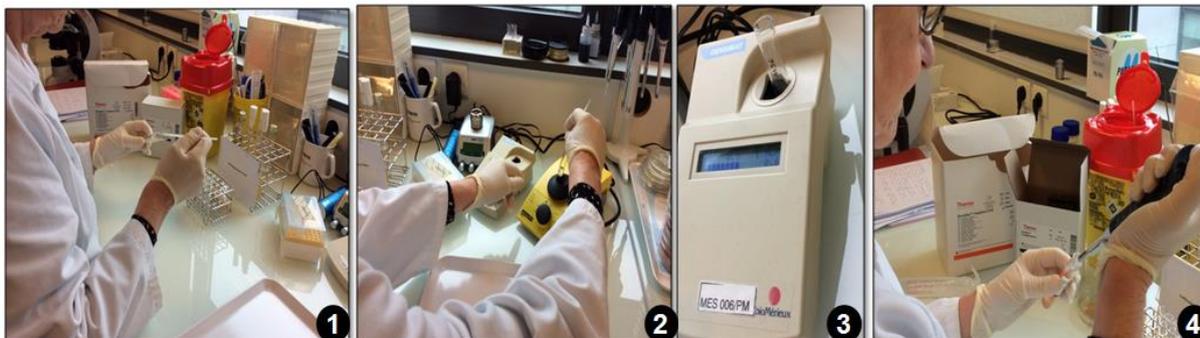


Figure 19 : Etapes de l'inoculation (CHU de Lille)

Cet inoculum va ensuite être réparti dans la plaque à l'aide du système Sensititre AIM, puis la plaque va être recouverte d'un film pour éviter l'évaporation lors de l'incubation à 35°C pendant 24h.



Figure 20 : Etapes de la répartition de l'inoculum (CHU de Lille)

Après incubation, les CMI sont lues et enregistrées à l'aide du Sensititre Vizion® après confirmation de la pousse du témoin positif (rose). La CMI correspond à la plus petite concentration en antifongique qui inhibe la croissance de la levure soit le premier puits bleu.



Figure 21 : Etapes de la lecture des CMI (CHU de Lille)

2.2.2 Méthode de référence EUCAST

Population étudiée

Les souches de levures catégorisées résistantes à au moins un antifongique par la méthode SYO et l'application des SSC définis ci-dessus ont été sélectionnées afin d'être étudiées par la méthode de référence EUCAST. Seules les souches isolées d'hémocultures sont conservées dans la mycothèque du laboratoire de Lille. Ainsi, les souches testées par la méthode EUCAST proviennent uniquement d'hémocultures.

Préparation des souches

Les souches de la mycothèque conservées à -80°C sur cryobilles ont été ensemencées sur milieu Sabouraud puis incubées 24-48h à 37°C. L'identification a été vérifiée par spectrométrie de masse de type MALDI-TOF. Les souches ont ensuite été repiquées sur gélose chromogène CHROMagar, incubées à 37°C pendant 48h afin de vérifier une dernière fois leur pureté. Un repiquage double des souches sur le milieu de Sabouraud en tube a été réalisé en vue de tester leur sensibilité aux antifongiques par la méthode de référence EUCAST. A noter, le dernier repiquage doit avoir moins de 24h afin de disposer d'une souche en croissance pour la technique.

Préparation du matériel et des réactifs

Milieu Roswell Park Memorial Institute medium (RPMI)

Les dilutions d'antifongiques sont réalisées dans un milieu RPMI, 2% glucose avec une concentration 2C, préparé selon la table 2 en annexe du protocole EUCAST (110). Ce milieu se compose de :

- 20,8g de milieu RPMI 1640 contenant du rouge de phénol,
- 800mL d'eau distillée,
- 69,06g de tampon MOPS (acide 3-morpholino-1-propanesulfonique),
- 36g de glucose

Le rouge de phénol est un indicateur de pH (jaune pour les pH acides et violet pour les pH basiques). L'ensemble est ensuite stérilisé puis stocké au réfrigérateur à +4°C.

Solutions "stocks" d'antifongiques

Des solutions « stocks » d'antifongiques, c'est-à-dire des solutions mères, ont été préalablement préparées à une concentration de 1600µg/mL pour l'ensemble des antifongiques testés excepté pour le fluconazole et la 5-fluorocytosine pour lesquels la concentration des solutions mères était de 12 800µg/mL. Les poudres ont été

solubilisées dans de l'eau stérile à l'exception du fluconazole qui a été dilué dans du diméthylsulfoxyde (DMSO), en raison de la solubilité propre de cette molécule antifongique. Des aliquotes (1mL) ont ensuite été stockés à -80°C.

Plaques de microdilution d'antifongiques

Les plaques de microdilution d'antifongiques ont été préparées selon les modalités de la méthode de référence EUCAST décrite dans la version 7.3.1 de janvier 2017 (120). Brièvement, chaque plaque de microdilution permet de tester la sensibilité d'une souche vis-à-vis de 2 antifongiques (amphotérine B / caspofungine ; anidulafungine / micafungine ; fluconazole / 5-fluorocytosine ; posaconazole / isavuconazole ; voriconazole / itraconazole). Ces plaques comprennent un témoin positif qui est un témoin de croissance servant de référence avec 100% de pousse ainsi qu'un témoin négatif qui correspond au blanc de chaque ligne de puits et qui ne doit contenir aucune pousse. Le schéma des plaques est présenté en annexe (Fig.A1).

Pour les antifongiques autres que le fluconazole et la 5-fluorocytosine (soit amphotérine B, caspofungine ; anidulafungine, micafungine, posaconazole, isavuconazole, voriconazole, itraconazole), un aliquot (1mL) de chaque antifongique a été décongelé puis dilué au demi dans du DMSO (1mL).

Différentes étapes de dilutions sont ensuite réalisées selon les modalités décrites dans le tableau 5. On obtient ainsi les solutions d'antifongiques ayant une concentration intermédiaire (200C).

Tableau 5 : Préparation des séries de dilutions d'antifongiques autres que le FCZ et la 5FC

Etape	Concentration (µg/ml)	Source	Volume (ml)	DMSO (ml)	Concentration intermédiaire (200C)	Concentration finale (2C)
1	800	stock	1	0	800	8
2	800	tube 1	0.5	0.5	400	4
3	800	tube 1	0.5	1.5	200	2
4	800	tube 1	0.5	3.5	100	1
5	100	tube 4	0.5	0.5	50	0.5
6	100	tube 4	0.5	1.5	25	0.25
7	100	tube 4	0.5	3.5	12.5	0.125
8	12.5	tube 7	0.5	0.5	6.25	0.06
9	12.5	tube 7	0.5	1.5	3.12	0.03
10	12.5	tube 7	0.5	3.5	1.56	0.016

Chacune de ces solutions antifongiques 200C sont diluées au 1/100 dans du RPMI (150µL de chaque concentration/14,85mL de milieu RPMI) afin d'obtenir les solutions d'antifongique 2C.

100 µL de la solution 2C sont ensuite répartis dans les puits de la plaque. Les 4 premières lignes sont utilisées pour l'antifongique 1 et les 4 dernières pour

l'antifongique 2. Les plaques sont ensuite stockées à -80°C en attente de la réalisation des tests.

Pour le fluconazole et la 5-fluorocytosine, le même mode opératoire est appliqué mais avec des concentrations différentes d'antifongiques (Tab.6). De plus, pour la 5-fluorocytosine, le DMSO est remplacé par de l'eau car la solubilité est meilleure dans ce solvant.

Tableau 6 : Préparation des séries de dilutions du FCZ et de la 5FC

Etape	Concentration (µg/ml)	Source	Volume (ml)	DMSO/Eau (ml)	Concentration intermédiaire (200C)	Concentration finale (2C)
1	12800	stock	1	0	12800	128
2	12800	tube 1	0.5	0.5	6400	64
3	12800	tube 1	0.5	1.5	3200	32
4	12800	tube 1	0.5	3.5	1600	16
5	1600	tube 4	0.5	0.5	800	8
6	1600	tube 4	0.5	1.5	400	4
7	1600	tube 4	0.5	3.5	200	2
8	200	tube 7	0.5	0.5	100	1
9	200	tube 7	0.5	1.5	50	0.5
10	200	tube 7	0.5	3.5	25	0.25

Réalisation des tests de sensibilité

Inoculation et incubation des plaques

Les souches préalablement préparées ont été inoculées dans les plaques de microdilution.

Une suspension de levures à 0,5 McFarland a été préparée dans de l'eau stérile à l'aide d'un densitomètre. Cela correspond à un inoculum de $1 \text{ à } 5 \cdot 10^6$ UFC/mL.

Une dilution au $1/10^e$ a ensuite été réalisée dans de l'eau stérile (1,3mL de suspension dans 11,7mL d'eau stérile) permettant l'obtention d'un inoculum de $1 \text{ à } 5 \cdot 10^5$ UFC/mL. 100µL de la suspension de levures ont été inoculées dans les puits tests. Après inoculation, l'inoculum final est de $0,5 \text{ à } 2,5 \cdot 10^5$ UFC/mL. 100 µL d'eau stérile sont ajoutés dans les puits témoin.

Les plaques ont été incubées pendant 24h à 37°C.

Lecture des plaques de microdilution d'antifongiques et calculs des CMI

Une première lecture visuelle rapide est effectuée après les 24h d'incubation des plaques à 37°C. Les puits témoins positifs doivent présenter une turbidité contrairement aux témoins négatifs. La décroissance de la pousse pour chaque ligne doit être régulière sans puits sauté. Une deuxième lecture plus précise est réalisée au spectrophotomètre à la longueur d'onde de 530 nm, après agitation des plaques pendant 1 min. L'absorbance du témoin de croissance doit être supérieure à 0,2.

Les résultats du spectrophotomètre sont intégrés et analysés par le logiciel informatique « Revel ». Ce logiciel recueille les valeurs brutes d'absorbance ainsi

que les valeurs corrigées (soustraction du blanc). Puis le logiciel calcule les pourcentages de croissance à l'aide de la formule suivante : $100 \times (\text{DO corrigée « puits patient »} / \text{DO corrigée « témoin positif »})$.

Les CMI sont lues à >90% d'inhibition pour l'amphotéricine B et >50% d'inhibition pour les autres antifongiques. Ici, est prise pour exemple une plaque d'amphotéricine B/caspofungine : les CMI sont donc lues à >90% d'inhibition pour les 4 premières lignes et >50% d'inhibition pour les 4 dernières lignes (Tab.7).

Tableau 7 : Lecture des CMI amphotéricine B et caspofungine

4	2	1	0,5	0,25	0,125	0,06	0,03	0,015	0,008	T+	rang	CMI
0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	4	0,5
0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	5	0,25
0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	5	0,25
0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	6	0,125
0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	4	0,5
0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	4	0,5
0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	4	0,5
0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	3	1

2.2.3 Interprétation des tests de sensibilité

2.2.3.1 Catégorisation des souches de levures testées en SYO

La lecture des CMI peut s'avérer difficile si la décroissance des puits n'est pas régulière, par exemple s'il y a des puits sans pousse au milieu d'une série de puits avec pousse. Il s'agit du phénomène de « puits sauté ».

Le tableau 8 suivant peut aider à l'interprétation des CMI.

Tableau 8 : Interprétation des résultats obtenus en SYO (131)

Concentration par puits en antifongique ($\mu\text{g/mL}$)

	1	2	4	8	16	32	
Situation A	R	R	R	B	B	B	Croissance caractéristique : CMI = 8 $\mu\text{g/mL}$
Situation B	R	R	R	R	R	R	Croissance dans tous les puits : CMI > 32 $\mu\text{g/mL}$
Situation C	B	B	B	B	B	B	Absence de croissance dans les puits : CMI \leq 1 $\mu\text{g/mL}$
Situation D	R	R	R	B	R	R	"Puits sauté" : CMI > 32 $\mu\text{g/mL}$. Ne pas tenir compte du puits sauté s'il y a une croissance dans les puits de chaque côté.
Situation E	R	R	B	B	R	R	Double "puits sauté" : refaire le test.

R = croissance positive

B = croissance inhibée

Les interprétations des CMI doivent également tenir compte de l'antifongique testé :

- **Amphotéricine B :**

La CMI correspond au premier puits avec un changement de couleur distinct, comparé au témoin positif de croissance. Le changement de couleur est habituellement net d'un puits à l'autre et il n'existe pas de phénomène de traîne, c'est-à-dire un changement de couleur plus flou (Fig.22).



Figure 22 : Lecture de la CMI de l'amphotéricine B en système SYO

- **5-fluorocytosine et azolés :**

En cas de phénomène de traîne, la CMI correspond au premier puits avec une couleur rose moins intense que le témoin positif de croissance (Fig.23).

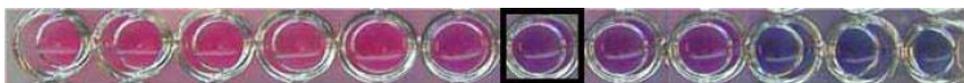


Figure 23 : Phénomène de « trailing » des azolés et de la 5-fluorocytosine

- **Cas particulier de l'itraconazole**

Une croissance paradoxale peut apparaître dans les puits correspondants à une concentration $\geq 4\mu\text{g/mL}$ ("Eagle effect"). Une explication possible est que la concentration en antifongique est trop forte et que la molécule s'antagonise elle-même pour la liaison au récepteur. Ainsi, il ne faut pas tenir compte de cette repousse paradoxale et lire la CMI comme habituellement (Fig.24).



Figure 24 : Phénomène « Eagle » de l'itraconazole

- **Echinocandines**

La CMI correspond au premier puits avec une couleur rouge moins intense que le témoin positif de croissance (Fig.25).



Figure 25 : Lecture de la CMI des échinocandines

Les levures dont les CMI ont été déterminées par la méthode SYO ont été catégorisées en sensible/intermédiaire/résistante en utilisant les SSC définis par le CLSI (version 2008) à l'espèce, sinon au genre. En l'absence de SSC définis par le CLSI, les ECOFF définis dans notre étude ont été appliqués (Annexe, Tab.A1).

2.2.3.2 Interprétation des tests de sensibilité EUCAST

Les CMI des levures dont la sensibilité aux antifongiques a été déterminée par la méthode de référence EUCAST ont été interprétées en utilisant les SSC de l'EUCAST 2018. En l'absence de SSC définis par l'EUCAST, les ECOFF de l'EUCAST disponibles sur le site : [http://www.eucast.org/mic_distributions_and_ECOFF/\(132\)](http://www.eucast.org/mic_distributions_and_ECOFF/(132)) ont été utilisés.

En l'absence de SSC et d'ECOFF, la catégorisation des souches n'a pas pu être déterminée.

Les valeurs utilisées sont celles du tableau A4 en annexe.

Paramètres statistiques EUCAST

La vérification de méthode a pu être évaluée au travers de deux paramètres : le pourcentage de « similitude sur la valeur » de la CMI à deux dilutions près (EA : Essential Agreement) et les pourcentages de « concordance de catégorie » (CA : Categorical Agreement). Ils ont été calculés pour les antifongiques testés en méthode EUCAST et SYO.

L'EA correspond au pourcentage d'isolats avec une CMI en SYO à deux dilutions près de la CMI en EUCAST.

Le CA correspond au pourcentage d'isolats classés dans la même catégorie (sensible/intermédiaire/résistante) en EUCAST et en SYO. Le CA peut être lui-même divisé en « Very Major Errors » (VME), « Major Errors » (MAE), « Minor Errors » (MIE). Les "very major errors" (VME) correspondent au nombre de souches sensibles en SYO mais résistantes avec la méthode de référence EUCAST. Les "major errors" (MAE) correspondent au nombre de souches résistantes en SYO mais sensibles avec la méthode de référence EUCAST. Les "minor errors" (MIE) correspondent au nombre de souches classées intermédiaires par une méthode et sensibles ou résistantes par l'autre méthode (133).

3 Résultats

3.1 Population de levures étudiée

3.1.1 Répartition des espèces

Au total, 52736 souches de levures ont été isolées entre 2009 et 2017 au CHU de Lille, soit en moyenne 5860 souches par an (Fig.26).

Sur ce nombre important de souches, 7334 souches de levures ont fait l'objet d'un antifongogramme par la méthode SYO, dont 6839 souches provenant du CHU de Lille lui-même et 495 souches provenant des hôpitaux et laboratoires extérieurs.

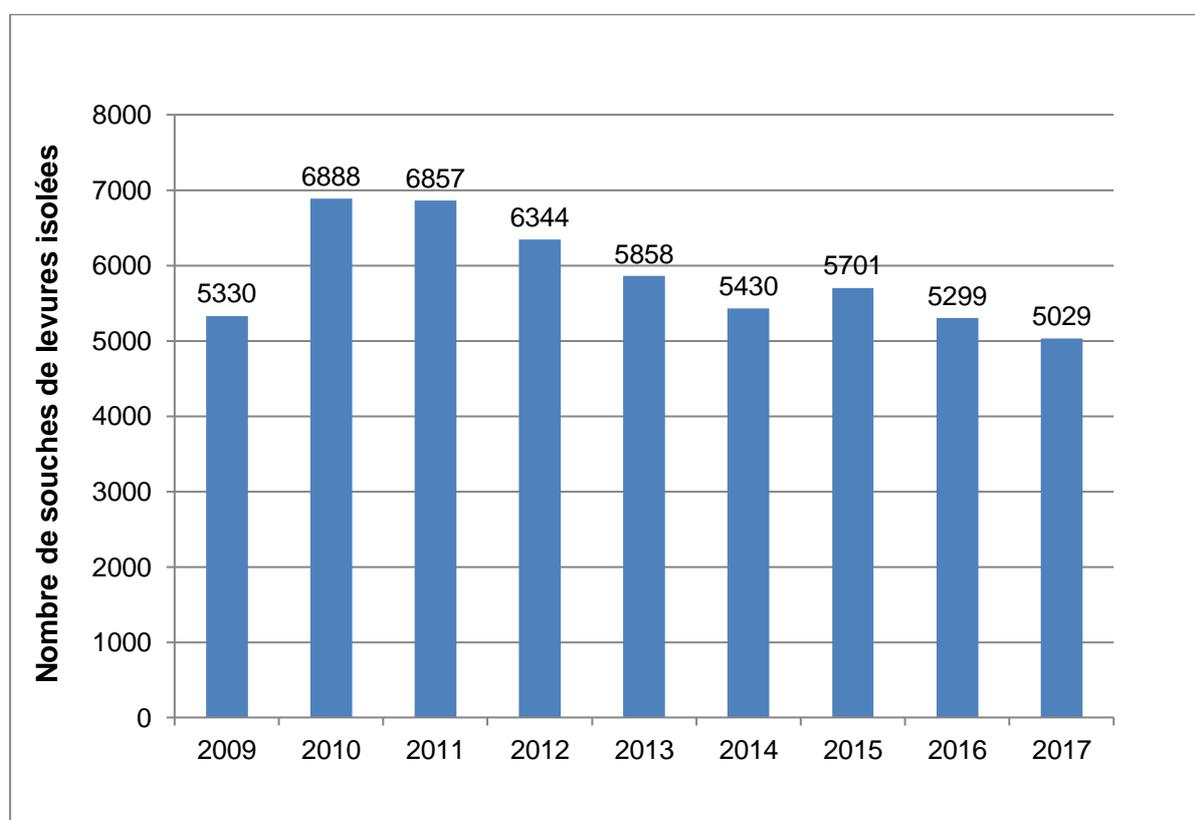


Figure 26 : Nombre de souches de levures isolées au CHU de Lille entre 2009 et 2017

Les levures isolées sont majoritairement du genre *Candida* (n=7250).

Les 5 espèces de *Candida* les plus fréquentes sont dans l'ordre décroissant : *C. albicans* (n=4633), *C. glabrata* (n=819), *C. tropicalis* (n=570), *C. parapsilosis* (n=512) et *C. krusei* (n=229). D'autres espèces de *Candida* ont été également isolées moins fréquemment : *C. kefyr* (n=147), *C. lusitaniae* (n=95), *C. dubliniensis* (n=86) et *C. guilliermondii* (n=49), certaines ont été rarement isolées: *C. palmiophila* (n=6), *C. utilis* (n=4), *C. robusta* (n=3), *C. lipolytica* (n=2), *C. fermentati* (n=2), *C. metapsilosis* (n=2) et un isolat des espèces suivantes a également été isolé : *C. orthopsilosis* , *C.*

pelliculosa, *C. pararugosa*, *C. pulcherrina*, *C. pseudohaemulonii*, *C. haemulonii*, *C. magnioliiae*, *C. catenulata*, *C. ciferrii* et *C. fabianii* (Fig.27).

D'autres genres et espèces de levures ont été identifiés en plus petit nombre : *Geotrichum sp.* ($n=16$) ainsi que *G. capitatum* ($n=9$) et *G. candidum* ($n=1$), *Cryptococcus neoformans* ($n=4$), *Cryptococcus albidus* ($n=1$), *Trichosporon sp.* ($n=4$) ainsi que *T. mucoides* ($n=1$) et *T. asahii* ($n=1$), *Rhodotorula sp.* ($n=5$) ainsi que *Rhodotorula rubra* ($n=1$), *Exophiala sp* ($n=2$) ainsi que *E. dermatitidis* ($n=1$) et *Saccharomyces telluris* ($n=1$).

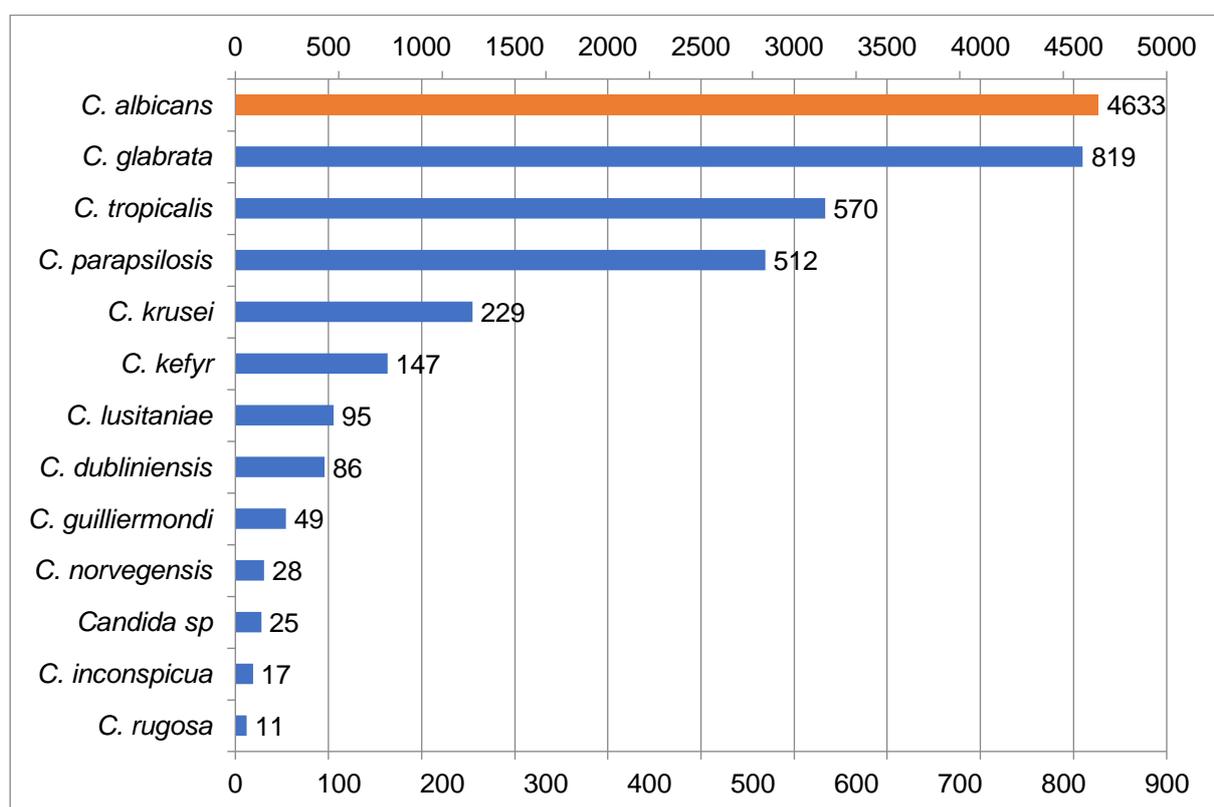


Figure 27 : Répartition par espèce des souches de *Candida spp* ayant fait l'objet d'un antifongogramme en SYO entre 2009 et 2017

3.1.2 Répartition des souches par service

La provenance a été renseignée pour 7314/7334 souches étudiées (Fig. 28). Les souches ont été majoritairement isolées chez des patients pris en charge en réanimations médicale (48%) et chirurgicale (7%), ainsi que dans les services de chirurgie (10%), de pneumologie (9%) et de pédiatrie/néonatalogie (6%). Seules 2% des souches ont été isolées chez des patients de maladies du sang adultes (MDS). Des proportions plus faibles de souches (inférieures ou égales à 1%) ont été isolées dans d'autres services prenant en charge des patients à risque d'IFI comme la transplantation, le centre de traitement des brûlés, la néphrologie, l'urologie, la cardiologie ou encore les maladies infectieuses.

Les souches provenant de centres extérieurs représentent 6% de notre population étudiée mais malheureusement les services d'origine n'ont pas pu être identifiés.

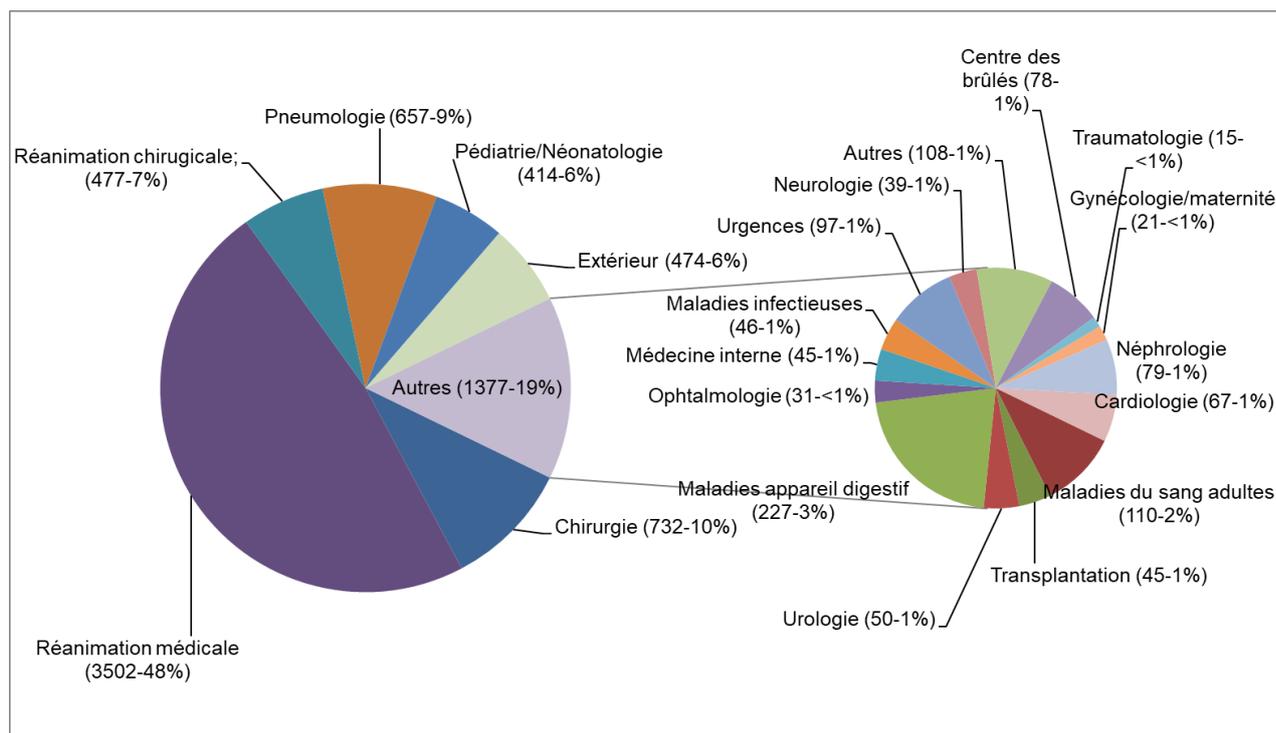


Figure 28 : Répartition des souches de levures dans les services cliniques (n=7314)

3.1.3 Répartition des espèces dans les services à risque d'IFI

La répartition des espèces a été déterminée pour les principaux services à risque d'IFI dans lesquels la majorité des souches a été isolée (Fig.29).

On observe une certaine homogénéité d'isolement de *C. albicans*, espèce majoritaire représentant plus de la moitié des souches isolées (55 à 70%) pour l'ensemble des services, excepté pour le service de MDS où cette espèce représente moins de la moitié des souches isolées (48%). De plus, la proportion des *Candida* non *albicans* isolés est non négligeable mais avec des fréquences variables entre les différents services cliniques.

Ainsi, la répartition des *Candida* non *albicans* est comparable pour les services de chirurgie, de réanimations médicale et chirurgicale (Fig.29 A, B, C). Les principales espèces isolées après *C. albicans* sont *C. glabrata* (16-12-11%), *C. tropicalis* (7-8-8%) et *C. parapsilosis* (6-8-6%). *C. krusei* ne représente qu'une minorité des souches avec une proportion un peu plus élevée en réanimation médicale (4%) comparativement à la réanimation chirurgicale (2%) et à la chirurgie (1%).

En MDS adultes, même si *C. albicans* reste majoritaire (48%), on observe une plus grande proportion de *Candida* non *albicans* avec notamment 19% de *C. glabrata*, 13% de *C. parapsilosis*, 7% de *C. tropicalis* et 5% de *C. krusei* (Fig.29 D).

En transplantation, *C. glabrata* est isolé de façon minoritaire et représente seulement 2% des souches après *C. tropicalis* (11%), *C. parapsilosis* (9%) et *C. krusei* (7%). On observe également une fréquence plus importante d'isolement de *C. kefyr* (9%) par rapport aux autres services (Fig.29 E).

En pneumologie (Fig.29 F), *C. glabrata* représente avec *C. tropicalis*, la majorité des souches non albicans isolées (13 et 10% respectivement), puis *C. krusei* et *C. parapsilosis* dans des proportions moindres mais similaires (4 et 3% respectivement).

En pédiatrie/néonatalogie, derrière une forte proportion de *C. albicans* (70%) isolés, *C. parapsilosis* et *C. tropicalis* arrivent en seconde position (10%). *C. glabrata* est isolé de façon moins fréquente (6%) (Fig.29 G).

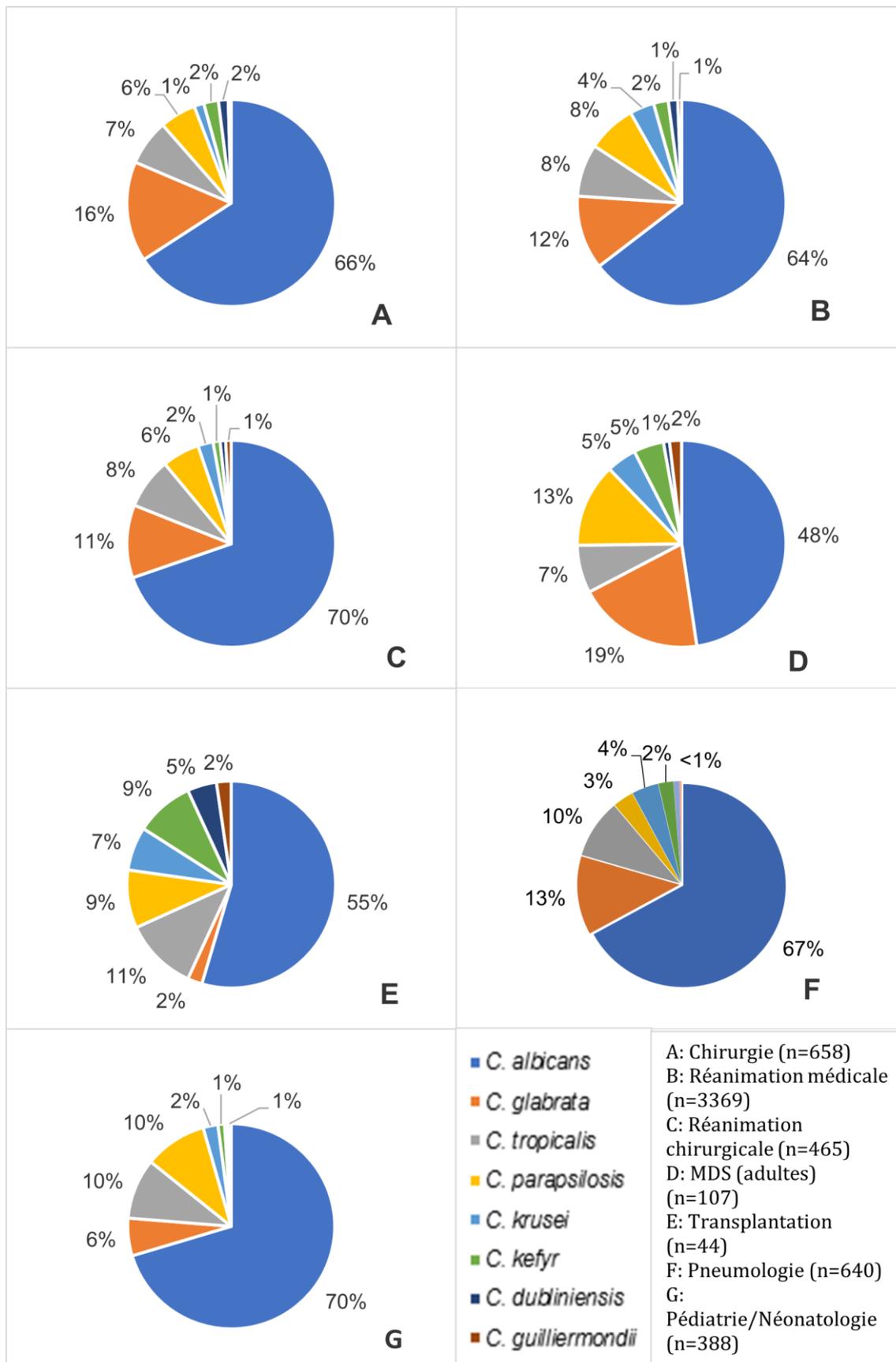


Figure 29 : Répartition en pourcentage des espèces dans les principaux services à risque d'IFI

3.1.4 Répartition globale des souches par type de prélèvement

Parmi les 7334 souches isolées, la majorité des souches provient de prélèvements respiratoires (48%, n=3518). En effet, 22% des souches proviennent d'une aspiration bronchique (n=1623), 18% d'une aspiration trachéale (n=1272) et 8% d'un liquide broncho-alvéolaire (n=574). Les hémocultures représentent 14% des prélèvements (n=1036) et les cathéters représentent aussi une proportion non négligeable de 6% (n=432).

Nous remarquons que la majorité des souches est retrouvée dans des prélèvements profonds. Ainsi, les prélèvements profonds (liquides pleuraux, liquides céphalo-rachidiens, hémocultures/cathéters, biopsies, biles, liquides gastriques, liquides d'ascite, abcès, liquides bronchiques, liquides broncho-alvéolaires et aspirations trachéales) représentent 81% des souches et les prélèvements superficiels (vagin, urines, bouche, anal/selles, expectorations) représentent 14% de celles-ci (le reste des souches étant classé en prélèvements autres) (Fig.30).

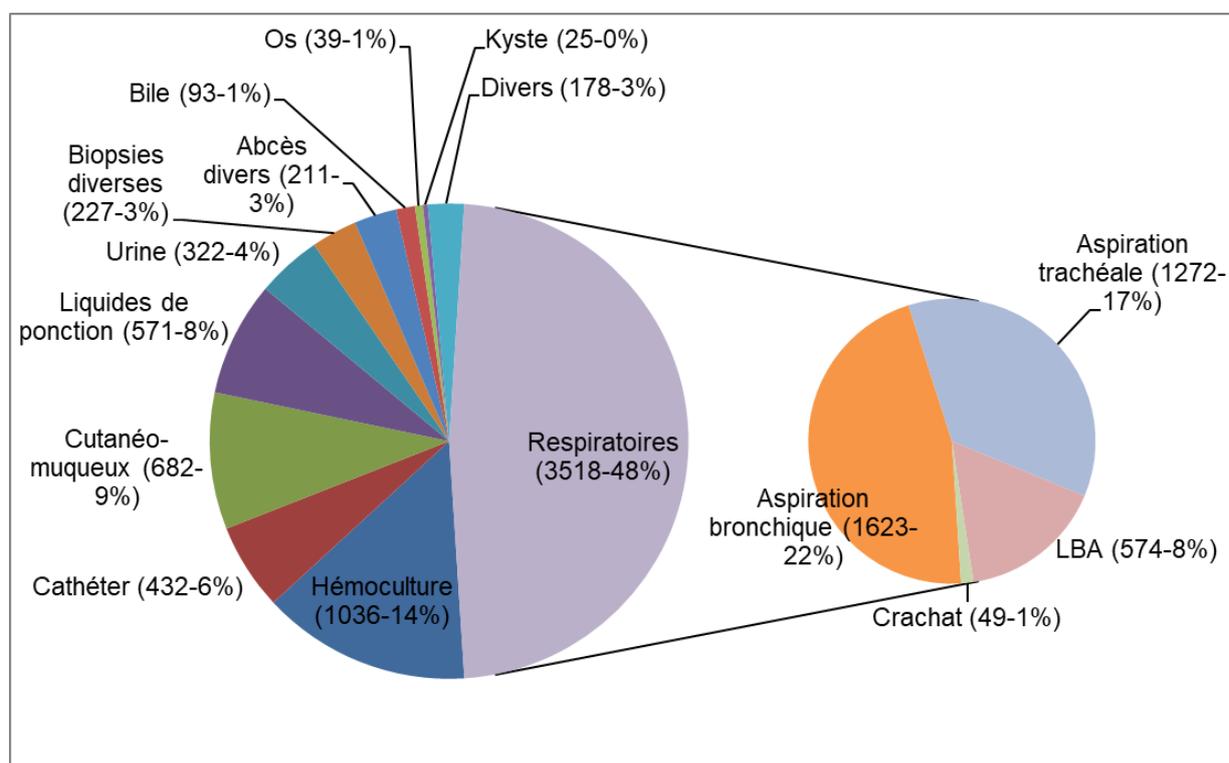


Figure 30: Répartition des souches en fonction de la nature du prélèvement d'origine

3.1.5 Candidémies

3.1.5.1 Incidence et répartition des espèces isolées dans les hémocultures

Au total, 1036 souches ont été isolées à partir des hémocultures sur la période 2009-2017. Si on s'attarde sur l'incidence des candidémies par année, on constate une augmentation régulière du nombre de candidémies sur la période 2009-2017 : n=81 en 2009 et n=143 en 2017, soit une augmentation de 57% en 9 ans avec 2 pics d'incidence, un en 2012 (n=143) et un autre en 2014 (n=126) (Fig.31).

Les espèces isolées dans les hémocultures (n=1036) sont de façon constante sur la période 2009-2017 majoritairement *C. albicans* (49%-64%), puis *C. glabrata* (9%-19%), *C. parapsilosis* (9%-19%) et *C. tropicalis* (4%-11%). *C. krusei* et *C. guilliermondii* sont isolés dans les hémocultures de façon inconstante et moins fréquente ($\leq 5\%$) sur cette période. La proportion relative entre les espèces reste similaire d'une année sur l'autre (Fig.32).

Les autres espèces isolées minoritairement sur cette même période sont : *C. lusitaniae* (n=14), *C. kefyr* (n=8), *C. dubliniensis* (n=8), *Candida sp* (n=7), *S. cerevisiae* (n=4), *Rhodotorula sp* (n=3), *C. inconspicua* (n=2), *C. norvegensis* (n=2), *G. capitatum* (n=2), *C. rugosa* (n=1), *C. fermentati* (n=1), *C. pulcherina* (n=1) et *R. mucilaginosa* (n=1).

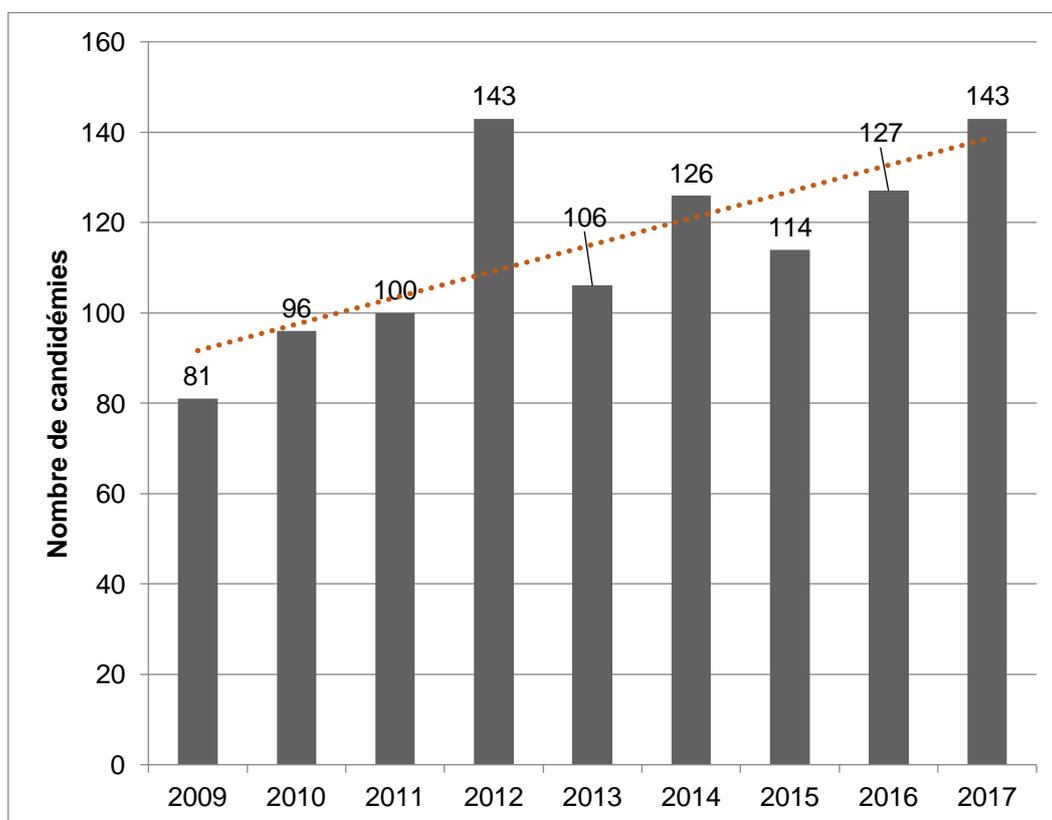


Figure 31 : Incidence des candidémies en nombre absolu sur la période 2009-2017 (n=1036)

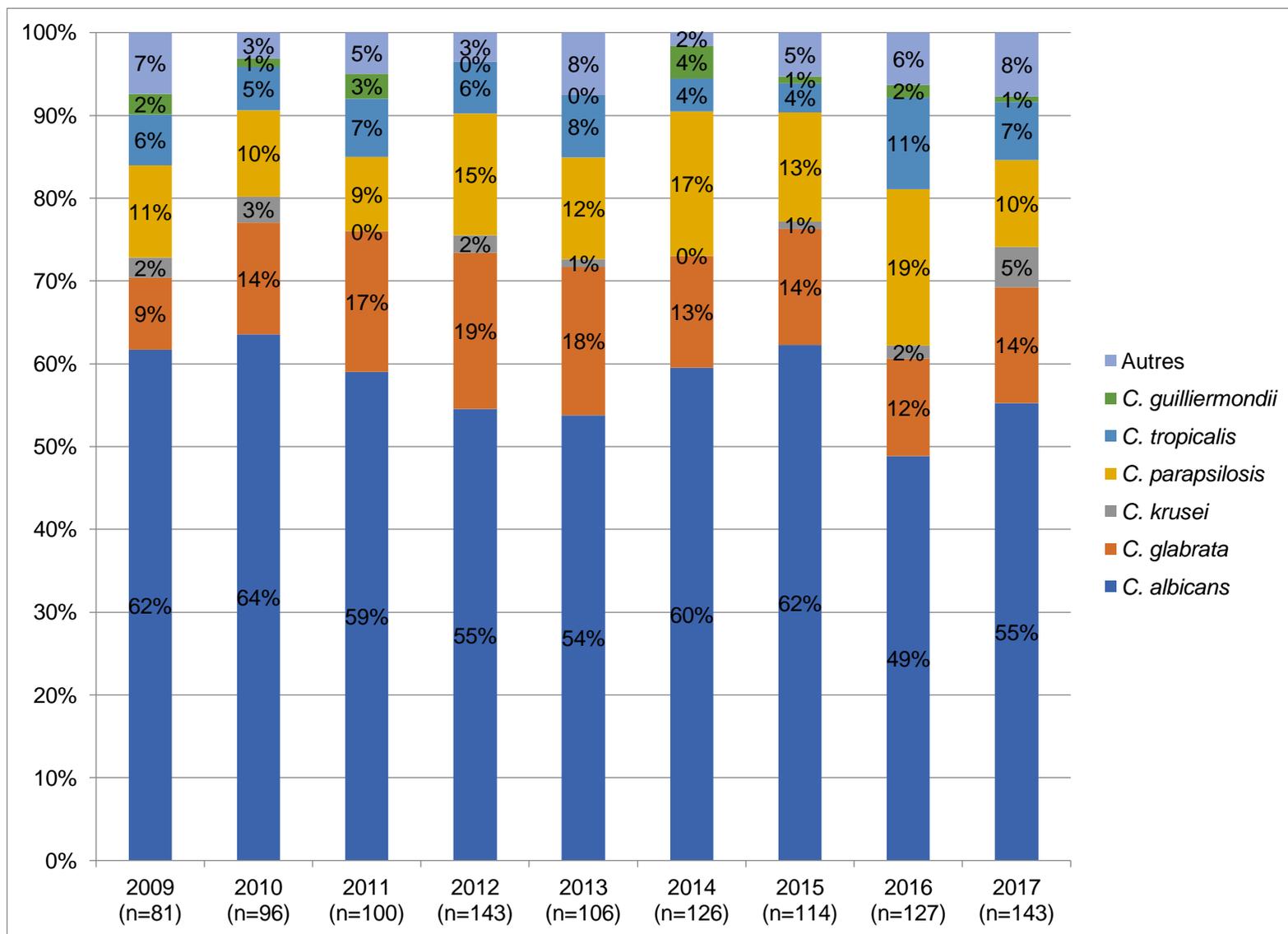


Figure 32 : Répartition en pourcentage des espèces de *Candida* isolées dans les hémocultures de 2009 à 2017 (n=1036)

3.1.5.2 Répartition par service des espèces responsables de candidémies

La répartition des espèces responsables de candidémies a été déterminée pour les principaux services à risque d'IFI dans lesquels la majorité des souches a été isolée (Fig.33).

Globalement, cette répartition est similaire à la répartition des espèces isolées dans l'ensemble des prélèvements (cf 3.1.3). *C. albicans* est l'espèce majoritairement isolée quel que soit le service clinique et représente plus de la moitié des isolats (53-63%) excepté en MDS où cette espèce est impliquée dans 40% des candidémies.

Comme pour les données obtenues sur l'ensemble des prélèvements, il existe une diversité des *Candida* non *albicans* isolés dans les différents services étudiés mais avec des fréquences variables en fonction des services.

La répartition des *Candida* non *albicans* reste comparable pour les services de chirurgie, de réanimations médicale et chirurgicale (Fig.33 A, B, C). Les principales espèces isolées après *C. albicans* sont également, dans ces 3 services, *C. glabrata*, *C. parapsilosis* et *C. tropicalis*. Néanmoins, *C. parapsilosis* occupe une place plus importante au sein des candidémies que si on tient compte de l'ensemble des prélèvements pour les services de chirurgie et de réanimation chirurgicale (14% vs 6% ; 12% vs 6% respectivement). Les autres espèces dont *C. krusei* sont rarement responsables de candidémies.

En MDS, la répartition des souches responsables de candidémies est la même que dans la répartition globale des prélèvements. Ainsi, il existe une grande proportion de *Candida* non *albicans* isolés soit *C. glabrata* (24%), *C. parapsilosis* (13%), *C. tropicalis* (11%), *C. krusei* (3%) et *C. guilliermondii* (3%) (Fig.33 D).

Enfin, dans les services de pédiatrie et néonatalogie, l'isolement des souches de *C. albicans* reste majoritaire. Cependant, son isolement est moins fréquent que dans l'ensemble des prélèvements confondus (53% vs 70%). Inversement, on observe une plus grande proportion de *C. parapsilosis* dans les hémocultures (21% vs 10%). Pour leur part, les souches de *C. tropicalis* et *C. glabrata* restent isolées dans les mêmes proportions quel que soit le prélèvement (9-5%). Enfin, *C. lusitaniae* est plus souvent responsable de candidémies en pédiatrie-néonatalogie que dans les autres services (6% vs 2% pour la réanimation médicale et 0% pour les autres services) (Fig.33 E).

Les services de transplantation et de pneumologie n'ont pas été représentés en raison de la faible incidence des candidémies dans ces services (6 et 14 cas respectivement, sur la période étudiée de 2009 à 2017).

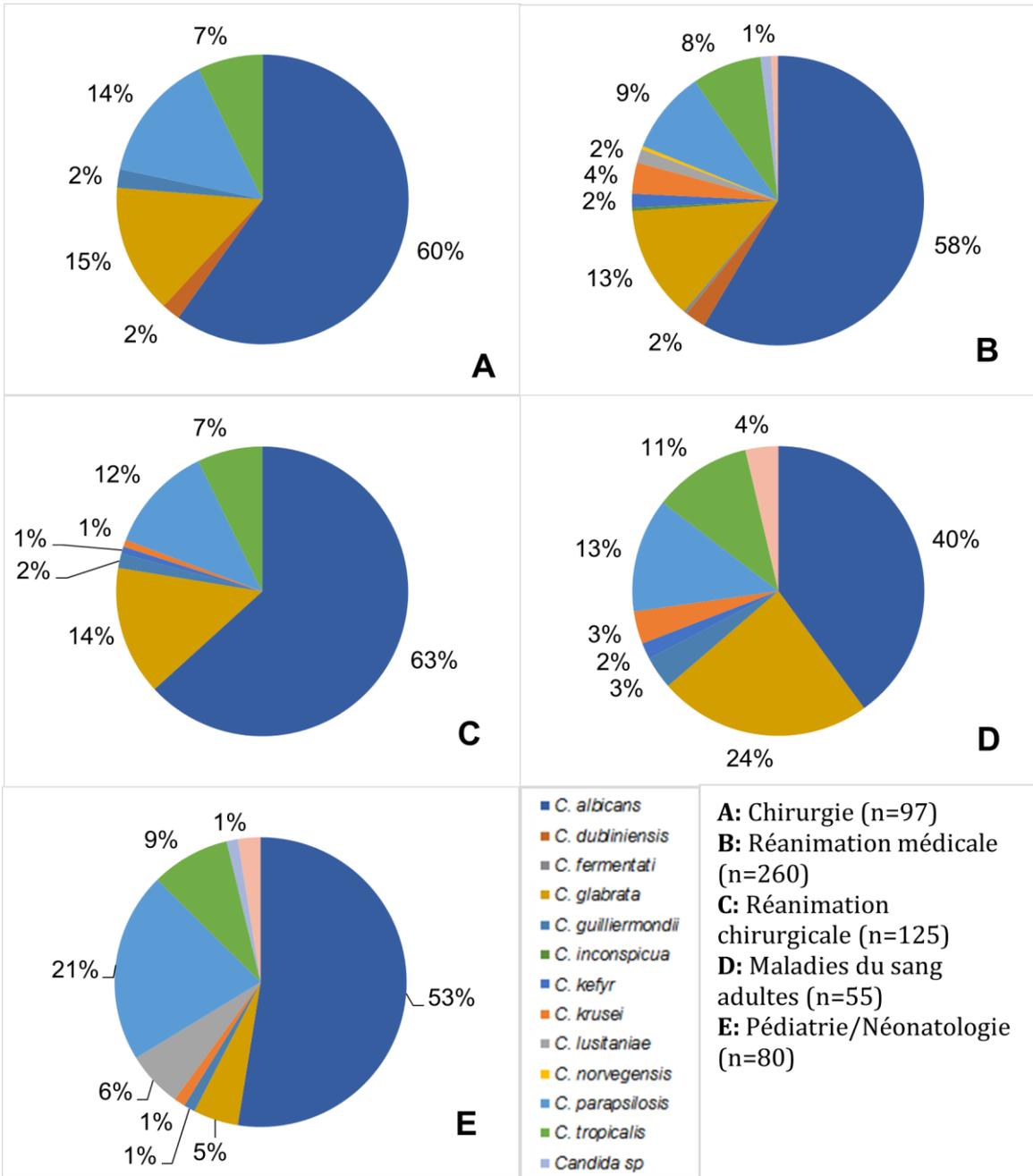


Figure 33 : Répartition en pourcentage des espèces isolées dans les hémocultures dans les principaux services à risque d'IFI

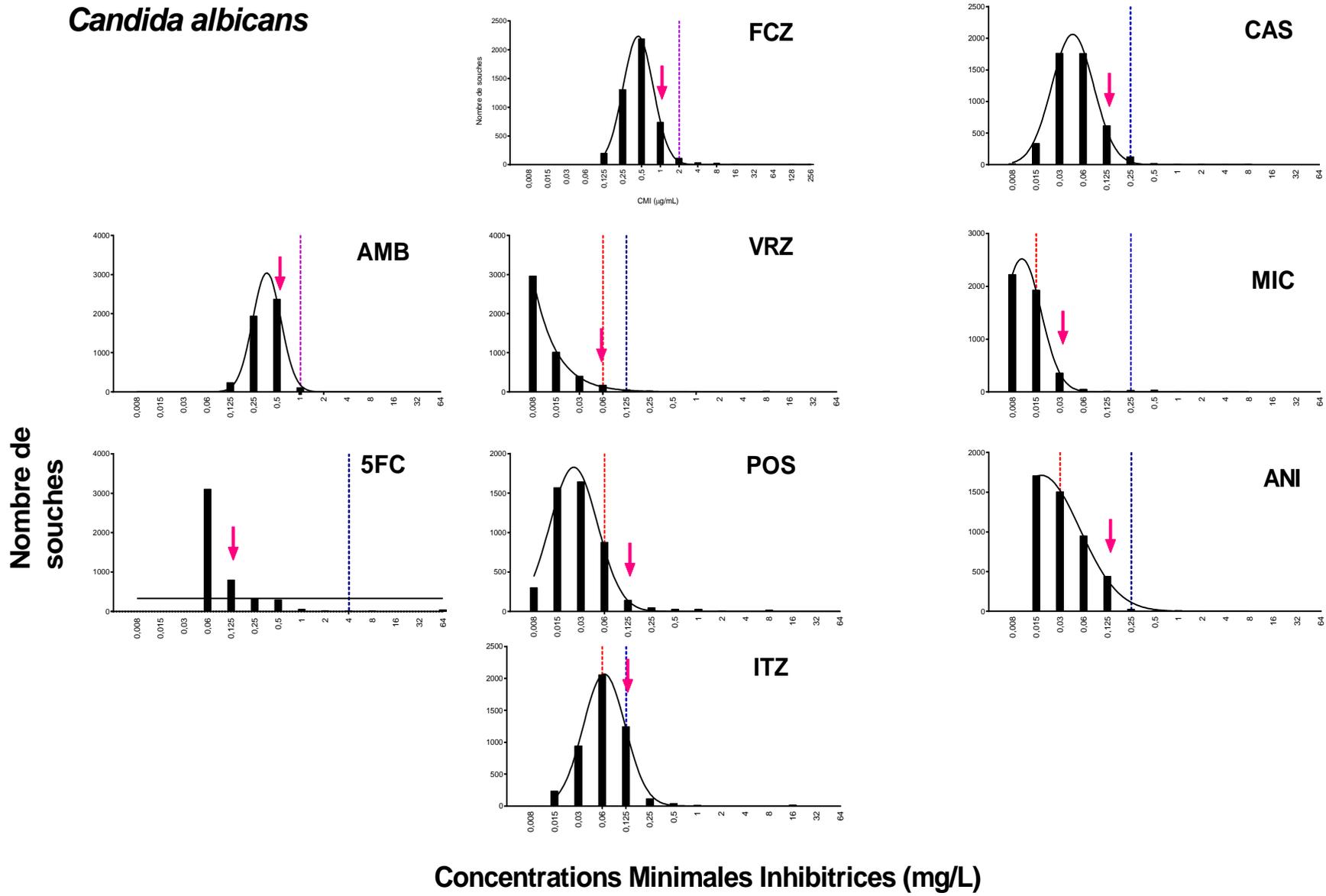
3.2 ECOFF

3.2.1 Détermination des ECOFF par la méthode GraphPad Prism

Les distributions des CMI des isolats par antifongique de *C. albicans* et de *C. glabrata* sont présentées sur les graphiques suivants (Fig.34 et 35). Nous remarquons que pour les azolés, les distributions de *C. albicans* sont plutôt décalées vers les CMI basses (vers la gauche) tandis que les distributions de *C. glabrata* sont décalées vers les CMI hautes (vers la droite). D'une manière générale, en tenant compte des SSC CLSI et EUCAST, on peut noter que les profils obtenus chez *C. albicans* sont majoritairement sensibles alors que les profils spécifiques de *C. glabrata* sont plutôt résistants.

Les distributions des CMI des isolats par antifongique des autres espèces sont présentées en annexe (Fig.A2 à A6).

Candida albicans



Concentrations Minimales Inhibitrices (mg/L)

- - - EUCAST
 - - - CLSI
 - - - EUCAST/CLSI
 ➔ ECOFF

Figure 34: Distribution des isolats de *C. glabrata* par antifongique en utilisant le logiciel GraphPad Prism

Candida glabrata

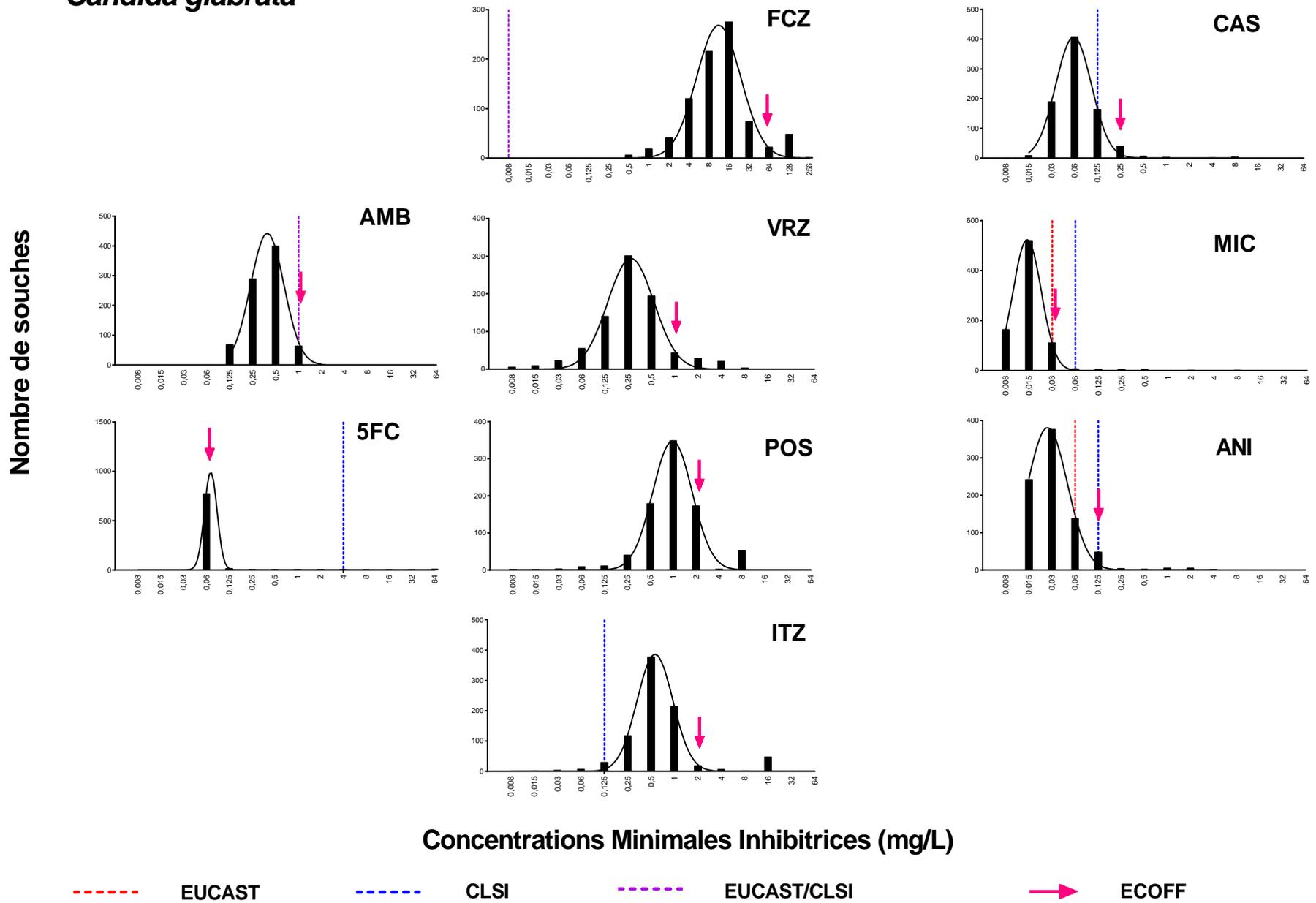


Figure 35 : Distribution des isolats de *C. glabrata* par antifongique en utilisant le logiciel GraphPad Prism

L'analyse visuelle des profils des cinq espèces principales de *Candida* isolées dans notre population (*C. albicans*, *C. glabrata*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis* et *C. krusei*) nous permet de constater que :

vis-à-vis du fluconazole, notre population de *C. albicans* est plutôt décalée vers les CMI basses (vers la gauche), nos populations de *C. glabrata* et *C. krusei* décalées vers les CMI hautes (vers la droite) et entre les deux nous retrouvons les populations de *C. tropicalis* et *C. parapsilosis* (Fig. 37).

vis-à-vis du voriconazole, excepté pour *C. parapsilosis*, les populations se répartissent globalement comme pour le fluconazole mais avec un décalage vers des CMI plus basses. La population de *C. parapsilosis*, comme celle de *C. albicans*, se distribuent autour des CMI les plus basses testées en SYO (Fig. 37).

vis-à-vis des échinocandines, notre population de *C. parapsilosis* se distribue autour de CMI plus élevées que les autres espèces. On observe une tendance de répartition des populations de *C. albicans* et *C. glabrata* vers des CMI plus basses pour la micafungine par rapport aux autres échinocandines et une tendance inverse pour *C. parapsilosis*. Ainsi, les 5 espèces principales (*C. albicans*, *C. glabrata*, *C. tropicalis*, *C. krusei* et *C. parapsilosis*) semblent plutôt sensibles aux échinocandines si on utilise les SSC du CLSI, sauf en ce qui concerne le couple *C. krusei* et caspofungine. Pour ce couple, la moitié de la population est sensible et l'autre moitié de sensibilité intermédiaire voire résistante (Fig.38).

En reportant les SSC du CLSI et de l'EUCAST disponibles, soit ici la borne inférieure discriminant la population sensible de la population intermédiaire ou résistante, sur les figures 36 à 40, on constate que les valeurs des ECOFF sont parfois très différentes des SSC des méthodes de référence. Par exemple, c'est le cas des couples flucytosine-*C. albicans* et flucytosine-*C. glabrata* où les ECOFF sont de 0,125 et 0,06 respectivement pour des SSC CLSI compris entre 4 et 16 mg/L pour ces deux couples.

Fluconazole

Voriconazole

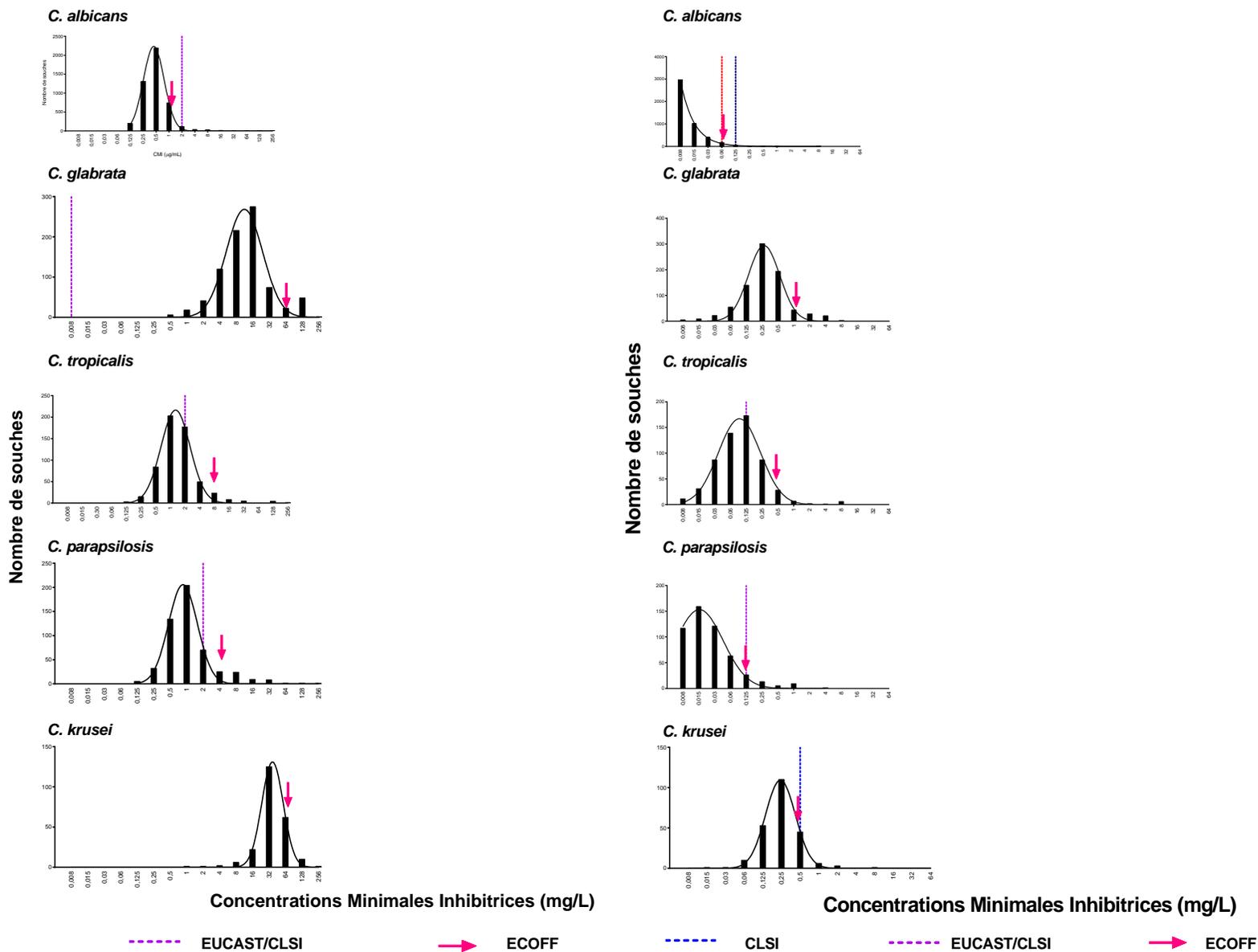


Figure 37 : Distribution des isolats chez les 5 principales espèces pour le fluconazole et le voriconazole en utilisant le logiciel GraphPad Prism

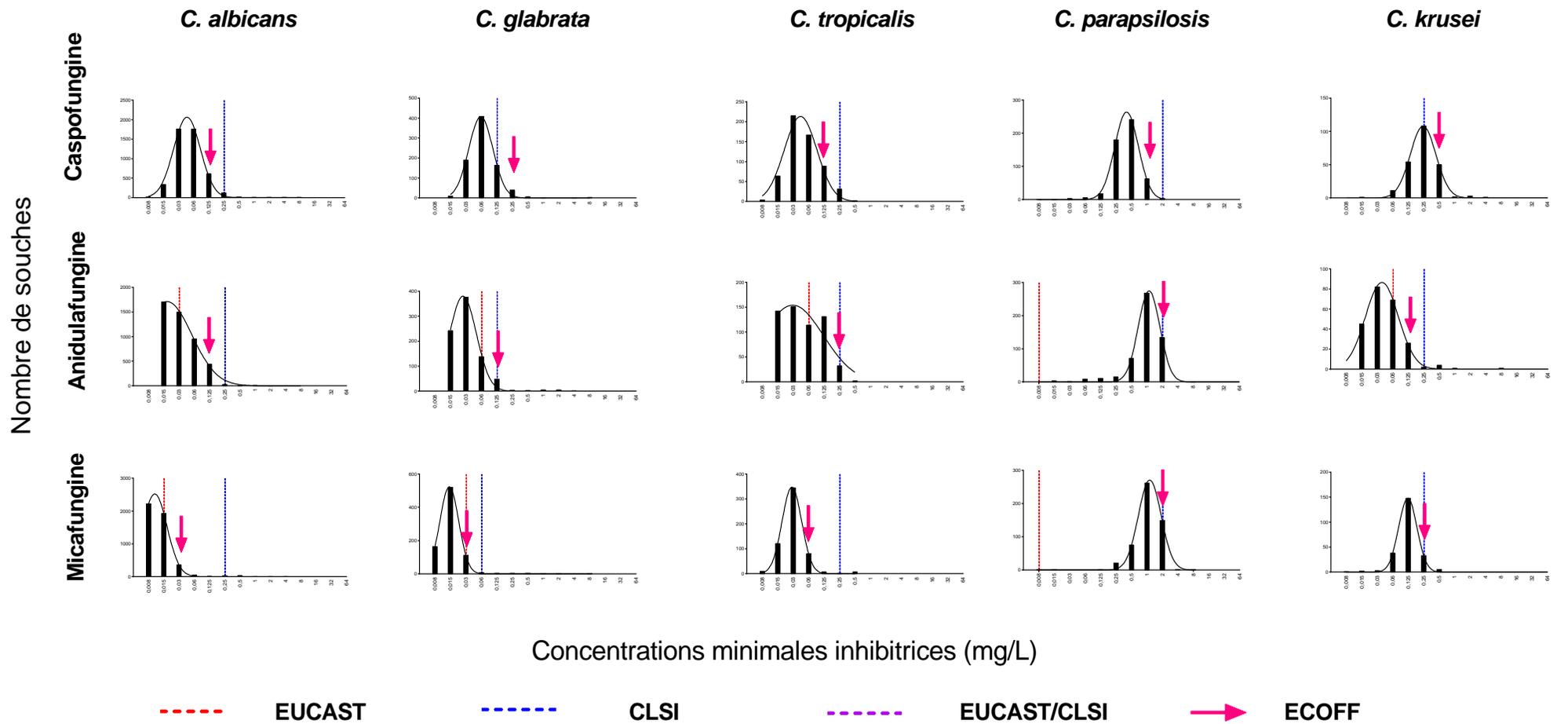


Figure 38 : Distribution des isolats chez les 5 principales espèces pour les échinocandines en utilisant le logiciel GraphPad Prism

L'analyse des données a permis de déterminer 59 ECOFF par la méthode « eye-ball » (Tab.9). Compte tenu du faible effectif de certaines espèces rares, les ECOFF ont été définis uniquement pour les espèces les plus fréquentes : *C. albicans* (n=4633), *C. glabrata* (n=819), *C. tropicalis* (n=570), *C. parapsilosis* (n=512), *C. krusei* (n=229), *C. kefyr* (n=147) et *C. lusitaniae* (n=95).

Tableau 9 : ECOFF déterminés par la méthode « eye-ball » sur GraphPad Prism

	<i>C. albicans</i>	<i>C. glabrata</i>	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. krusei</i>	<i>C. kefyr</i>	<i>C. lusitaniae</i>
	ECOFF						
Nombre de souches	4633	819	570	512	229	147	95
Amphotéricine B	0,5	1	1	0,5	1	1	1
Flucytosine	0,125	0,06	2P	0,25	16	PHo	PHo
Anidulafungine	0,125	0,125	0,25	2	0,125	0,25	0,25
Caspofungine	0,125	0,25	0,125	1	0,5	0,125	0,5
Micafungine	0,03	0,03	0,06	2	0,25	0,125	0,25
Fluconazole	1	64	4	4	R	0,5	4
Itraconazole	0,125	2	0,5	0,25	0,5	0,25	0,25
Posaconazole	0,125	2	1	0,25	0,5	0,125	0,125
Voriconazole	0,06	1	0,5	0,125	0,5	0,03	0,03

2P : 2 populations

PHo : Population homogène

Il n'a pas été possible d'estimer l'ECOFF pour les combinaisons suivantes : *C. tropicalis* – flucytosine *C. kefyr* – flucytosine et *C. lusitaniae* – flucytosine (Fig.39).

Dans le premier cas, la courbe de répartition des souches en fonction des CMI montre l'existence d'une double population : une population avec des CMI autour de 0,06 mg/L et une autre avec des CMI plus hautes autour de 64 mg/L.

Dans les deux autres cas, la répartition de la population est non gaussienne, avec la majorité des souches à une CMI de 0,06mg/L puis une homogénéité de la répartition aux CMI plus élevées (0,125 à 16 mg/L et 0,125 à 64 mg/L pour *C. kefyr* et *C. lusitaniae* respectivement).

L'ECOFF de la combinaison *C. krusei* - fluconazole n'a pas été déterminé en raison de la résistance intrinsèque de cette espèce au fluconazole.

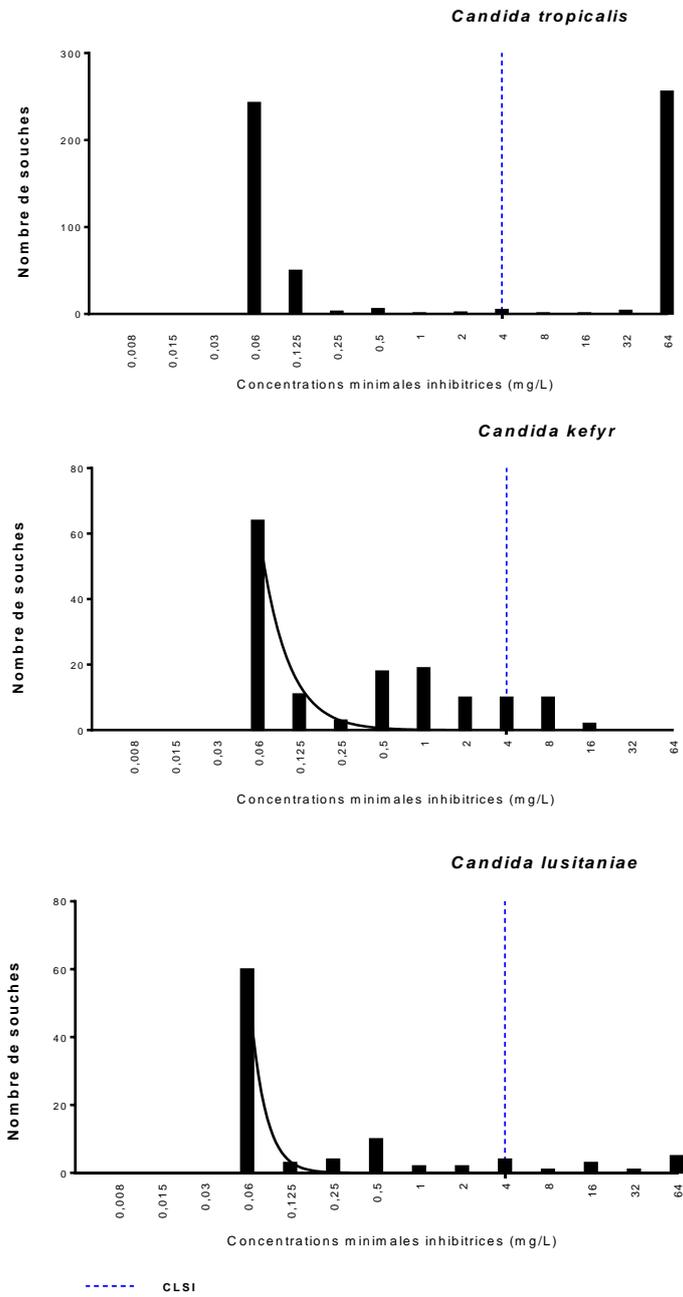


Figure 39 : Cas particuliers des ECOFF pour la flucytosine chez *C. tropicalis*, *C. kefyr*, et *C. lusitanae*

3.2.2 Evolution des ECOFF par année

L'évolution des ECOFF par année sur la période 2009-2017 a été étudiée pour les 2 espèces de levures majoritaires en nombre : *C. albicans* (n=4646) et *C. glabrata* (n=821) (Tab.10 et 11).

Chez *C. albicans*, les valeurs des ECOFF sont globalement stables : l'étendue, soit l'écart entre la valeur minimale et la valeur maximale, est nulle pour l'amphotéricine B et est d'une dilution pour les autres antifongiques systémiques excepté l'anidulafungine avec 2 dilutions d'écart.

Chez *C. glabrata*, les valeurs des ECOFF sont parfaitement stables pour l'amphotéricine B, la flucytosine et le voriconazole. L'étendue est d'une seule dilution pour 3 azolés sur 4 : le fluconazole, l'itraconazole et le posaconazole et pour 2 échinocandines sur 3 : la caspofungine et l'anidulafungine. L'étendue est plus importante, soit 2 dilutions, pour la micafungine.

Tableau 10 : Évolution des ECOFF entre 2009 et 2017 chez *C. albicans* (n=4646)

	2009	2010	2011	2012	2013	2014	2015	2016	2017	Etendue
Amphotéricine	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0 dilution
Flucytosine	0,125	0,125	0,125	0,125	0,125	0,125	0,125	0,125	0,25	1 dilution
Fluconazole	1	1	1	2	1	1	1	1	1	1 dilution
Itraconazole	0,25	0,25	0,25	0,125	0,125	0,125	0,125	0,125	0,125	1 dilution
Posaconazole	0,125	0,125	0,06	0,06	0,06	0,06	0,06	0,06	0,06	1 dilution
Voriconazole	0,03	0,03	0,06	0,06	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03	1 dilution
Caspofungine	0,125	0,25	0,125	0,125	0,125	0,125	0,125	0,125	0,125	1 dilution
Anidulafungine	0,125	0,25	0,125	0,06	0,06	0,06	0,125	0,125	0,03	2 dilutions
Micafungine	0,03	0,03	0,03	0,015	0,015	0,03	0,03	0,03	0,03	1 dilution

Tableau 11 : Évolution des ECOFF entre 2009 et 2017 chez *C. glabrata* (n=821)

	2009	2010	2011	2012	2013	2014	2015	2016	2017	Etendue
Amphotéricine	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0 dilution
Flucytosine	0,125	0,125	0,125	0,125	0,125	0,125	0,125	0,125	0,125	0 dilution
Fluconazole	64	32	32	32	32	32	32	64	32	1 dilution
Itraconazole	2	2	1	1	2	2	1	1	1	1 dilution
Posaconazole	4	4	2	2	2	4	2	4	2	1 dilution
Voriconazole	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0 dilution
Caspofungine	0,25	0,125	0,125	0,25	0,25	0,125	0,125	0,125	0,125	1 dilution
Anidulafungine	0,125	0,125	0,06	0,06	0,125	0,125	0,06	0,06	0,06	1 dilution
Micafungine	0,06	0,03	0,03	0,015	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03	2 dilutions

3.2.3 Détermination des ECOFF par la méthode ECOFFinder

Pour comparaison, les ECOFF ont été calculés en utilisant le fichier Microsoft Excel ECOFFinder et les résultats sont présentés en annexe : valeurs numériques des ECOFF (Tab.A2), pourcentages de résistance en utilisant ces valeurs (Tab.A3) et les graphes permettant leur détermination (Fig.A7 à Fig.A9).

3.2.4 Comparaison des ECOFF GraphPad Prism aux ECOFF CLSI

Les ECOFF retrouvés dans notre étude ont pu être comparés aux ECOFF du CLSI 2008 (122). Au total, 40 ECOFF ont été déterminés par le CLSI, ils sont identiques dans 32,5% des cas (13/40 ECOFF) et comparables à une dilution près dans 67,5% des cas (27/40 ECOFF) (Tab.12).

Des discordances majeures (supérieures ou égales à 2 dilutions) sont observées pour 13 couples *Candida*-antifongique (32,5%). La population lilloise de *C. albicans* et *C. parapsilosis* présente des CMI vis-à-vis de l'amphotéricine B majoritairement plus faibles que la population étudiée par le CLSI. Il en est de même pour le couple *C. parapsilosis*-anidulafungine. Pour le couple *C. kefyr*-caspofungine, les CMI sont majoritairement plus élevées que la population étudiée par le CLSI.

Cependant, la plus grande partie de ces discordances majeures est observée vis-à-vis des azolés (9/13), qui présentent systématiquement des CMI plus hautes que celles du CLSI.

Tableau 12 : Comparaison des ECOFF Lille et CLSI pour l'amphotéricine B, les échinocandines et les azolés

	ECOFFs Lille	ECOFFs CLSI		ECOFFs Lille	ECOFFs CLSI
Amphotéricine B			Fluconazole		
<i>C. albicans</i>	0,5	2	<i>C. albicans</i>	1	0,5
<i>C. glabrata</i>	1	2	<i>C. glabrata</i>	64	8
<i>C. tropicalis</i>	1	2	<i>C. tropicalis</i>	4	1
<i>C. parapsilosis</i>	0,5	2	<i>C. parapsilosis</i>	4	1
<i>C. krusei</i>	1	2	<i>C. kefyr</i>	0,5	1
<i>C. kefyr</i>	1	ND	<i>C. lusitaniae</i>	4	1
<i>C. lusitaniae</i>	1	2	Posaconazole		
Anidulafungine			<i>C. albicans</i>	0,125	0,06
<i>C. albicans</i>	0,125	0,125	<i>C. glabrata</i>	2	2
<i>C. glabrata</i>	0,125	0,125	<i>C. tropicalis</i>	1	0,125
<i>C. tropicalis</i>	0,25	0,125	Voriconazole		
<i>C. parapsilosis</i>	2	8	<i>C. albicans</i>	0,06	0,03
<i>C. krusei</i>	0,125	0,25	<i>C. glabrata</i>	1	0,25
Caspofungine			<i>C. tropicalis</i>	0,5	0,06
<i>C. albicans</i>	0,125	0,125	<i>C. parapsilosis</i>	0,125	0,03
<i>C. glabrata</i>	0,25	0,125	<i>C. krusei</i>	0,5	0,5
<i>C. tropicalis</i>	0,125	0,125	<i>C. kefyr</i>	0,03	0,016
<i>C. parapsilosis</i>	1	1	<i>C. lusitaniae</i>	0,03	0,03
<i>C. krusei</i>	0,5	0,25			
<i>C. kefyr</i>	0,125	0,03			
<i>C. lusitaniae</i>	0,5	1			
Micafungine					
<i>C. albicans</i>	0,03	0,03			
<i>C. glabrata</i>	0,03	0,03			
<i>C. tropicalis</i>	0,06	0,06			
<i>C. parapsilosis</i>	2	4			
<i>C. krusei</i>	0,25	0,25			
<i>C. kefyr</i>	0,125	0,125			

3.3 Epidémiologie des résistances des levures aux antifongiques évaluée par la méthode SYO

3.3.1 Identification des souches résistantes

Les pourcentages de résistance des levures aux antifongiques systémiques sont présentés dans le tableau suivant (Tab.13) et représentés en secteurs dans la figure suivante (Fig.40). Ils ont été déterminés en utilisant les SSC du CLSI (version 2008) à l'espèce ou à défaut au genre, sinon grâce aux ECOFF de Lille 2018.

L'indisponibilité des SSC CLSI pour certaines espèces a conduit à la détermination des pourcentages de résistance uniquement pour les espèces suivantes : *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. krusei*, *C. kefyr* et *C. lusitaniae*.

Pour *C. albicans*, la très grande majorité des souches (93.5%) est sensible aux principaux antifongiques systémiques. La résistance à au moins un azolé est la plus fréquente (4,8%). Elle concerne surtout le posaconazole (2,5%) et dans une moindre proportion les autres azolés (entre 0,5% pour l'itraconazole et le voriconazole et 1,3% pour le fluconazole). Très peu de souches sont résistantes aux échinocandines (0,8% au global). La résistance à l'amphotéricine B est également très rare (proche de 0%) et la résistance à la 5-fluorocytosine également (0,9%).

Pour *C. glabrata*, seulement 37% des souches sont sensibles. La majorité des souches sont résistantes à au moins un azolé (56,8%) avec une résistance importante à l'itraconazole de 35%, 8,7% pour le fluconazole, 6,7% pour le posaconazole et 6,4% pour le voriconazole. La résistance aux échinocandines est plus rare (4,76% au global) et entre 1 et 2% en fonction de la molécule. La résistance à l'amphotéricine B est très rare (0,1%) et la résistance à la 5-fluorocytosine également (1,2%).

Pour *C. tropicalis*, les souches sont multi-sensibles dans 41% des cas. Près d'une souche sur 2 est résistante à la fluorocytosine (45,6%). De plus, les résistances aux azolés ne sont pas rares : fluconazole 7,2%, voriconazole 2,8%, itraconazole 2,1% et posaconazole 1,2%. Cependant, aucune souche dans cette étude n'est résistante à l'amphotéricine B ou aux échinocandines.

Pour *C. parapsilosis*, la majorité des souches sont multi-sensibles (75%). Cependant, 12,3% des souches sont résistantes à au moins un azolé (8,4% pour le fluconazole) et 11,9% des souches sont résistantes à une échinocandine qui est quasi toujours la caspofungine (11,5%). La résistance à la fluorocytosine est très rare (0,2%) et la résistance à l'amphotéricine B également (0,6%).

C. krusei est une souche résistante intrinsèquement au fluconazole. La résistance aux autres azolés est comprise entre 0,4% pour l'itraconazole et 1,8% pour le voriconazole. En revanche, la très large majorité des souches restantes, si on ne tient pas compte de cette résistance intrinsèque, est sensible aux molécules antifongiques (90,8%). 3,5% des souches sont résistantes à au moins une échinocandine (dont 2,6% à la caspofungine). La résistance à la fluorocytosine est faible (2,6%) et aucune souche dans cette étude n'est résistante à l'amphotéricine B.

Tableau 13 : Pourcentages de résistances des levures étudiées en SYO par espèce et par antifongique

	<i>C. albicans</i>	<i>C. glabrata</i>	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. krusei</i>	<i>C. kefyr</i>	<i>C. lusitaniae</i>
	% de souches résistantes (n)						
Nombre de souches	4633	819	570	512	229	147	95
Amphotéricine B (AMB)	0,02 (1)	0,12 (1)	0 (0)	0,59 (3)	0 (0)	1,36 (2)	0 (0)
Flucytosine (5FC)	0,84 (39)	1,22 (10)	45,61 (260)	0,20 (1)	2,62 (6)	0 (0)	6,32 (6)
Anidulafungine (ANI)	0,26 (12)	1,59 (13)	0 (0)	0,20 (1)	0,87 (2)	2,72 (4)	2,11 (2)
Caspofungine (CAS)	0,32 (15)	1,47 (12)	0 (0)	11,52 (59)	2,62 (6)	3,40 (5)	0 (0)
Micafungine (MIC)	0,28 (13)	1,71 (14)	0 (0)	0,20 (1)	0 (0)	3,40 (5)	2,11 (2)
Résistance à ≥1 échinocandine	0,86 (40)	4,76 (39)	0 (0)	11,91 (61)	3,49 (8)	9,52 (14)	4,21 (4)
Fluconazole (FCZ)	1,27 (59)	8,67 (71)	7,19 (41)	8,40 (43)	R	8,84 (13)	7,37 (7)
Itraconazole (ITZ)	0,54 (25)	35,04 (287)	2,11 (12)	0,20 (1)	0,44 (1)	0 (0)	1,05 (1)
Posaconazole (POS)	2,55 (118)	6,72 (55)	1,23 (7)	1,76 (9)	0,87 (2)	2,72 (4)	7,37 (7)
Voriconazole (VRZ)	0,45 (21)	6,35 (52)	2,81 (16)	1,95 (10)	1,75 (4)	7,48 (11)	9,47 (9)
Résistance à ≥1 azolé	4,81 (223)	56,78 (465)	13,33 (76)	12,30 (63)	3,06 (7)	25,85 (38)	25,26 (24)
Sensibles	93,46 (4330)	37,12 (304)	41,05 (234)	75,00 (384)	90,83 (208)	70,07 (103)	64,21 (61)

R : résistance intrinsèque

ND : non déterminé en l'absence de SSC

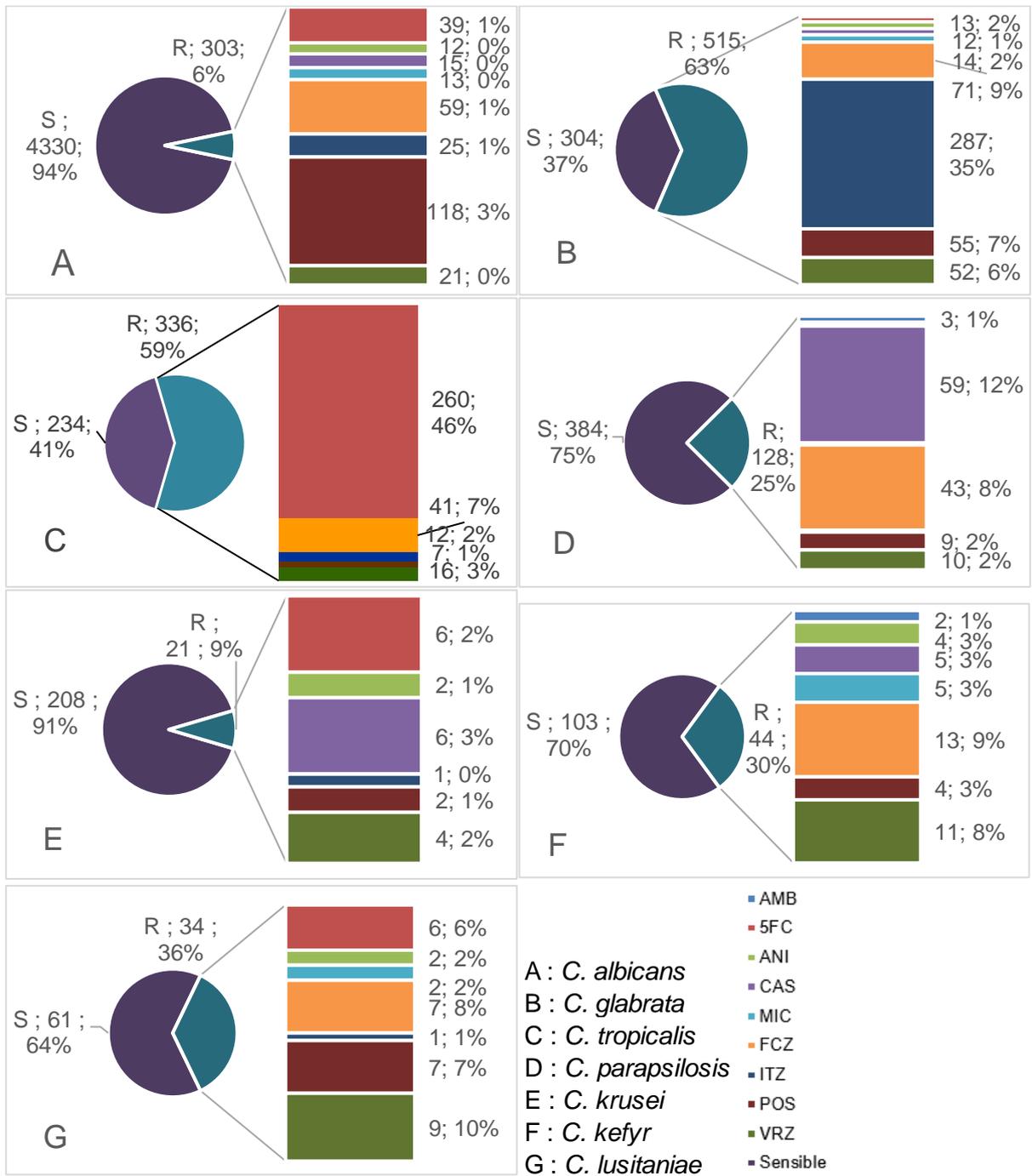


Figure 40 : Répartition des résistances aux antifongiques identifiées en SYO chez les principales espèces de levure

3.3.2 Répartition des souches résistantes en fonction du type de prélèvement

Sur les 1346 souches résistantes parmi *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. krusei*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis* et *C. guilliermondii*, la répartition en fonction du type de prélèvement est similaire à celle retrouvée sur le nombre total de souches de levures. En effet, les prélèvements concernés sont majoritairement des aspirations bronchiques (n=288, 21%), des aspirations trachéales (n=223, 17%), des hémocultures (n=221, 16%) et des liquides broncho-alvéolaires (n=115, 9%).

Ainsi, les souches résistantes peuvent être retrouvées dans toutes les localisations anatomiques, mais majoritairement dans des prélèvements profonds. Les prélèvements profonds (liquides pleuraux, liquides céphalo-rachidiens, hémocultures/cathéters, biopsies, biles, liquides gastriques, liquides d'ascite, abcès, liquides bronchiques, liquides broncho-alvéolaires et aspirations trachéales) représentent 76% des souches résistantes vs les prélèvements superficiels (vagin, urines, bouche, anal/selles, expectorations) représentant 14%, restent 10% de prélèvements autres (Fig.41).

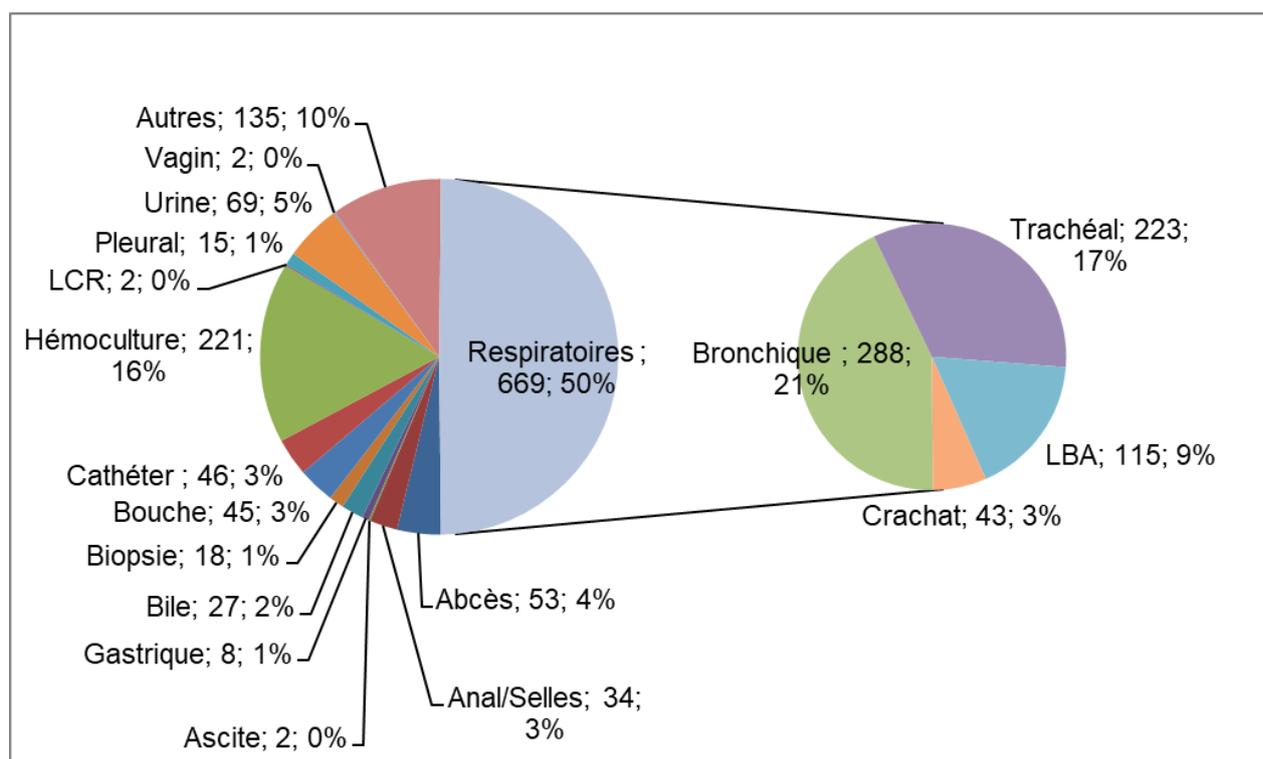


Figure 41 : Répartition des souches résistantes en fonction du type de prélèvement

3.3.3 Evolution des résistances aux azolés et aux échinocandines entre 2009 et 2017

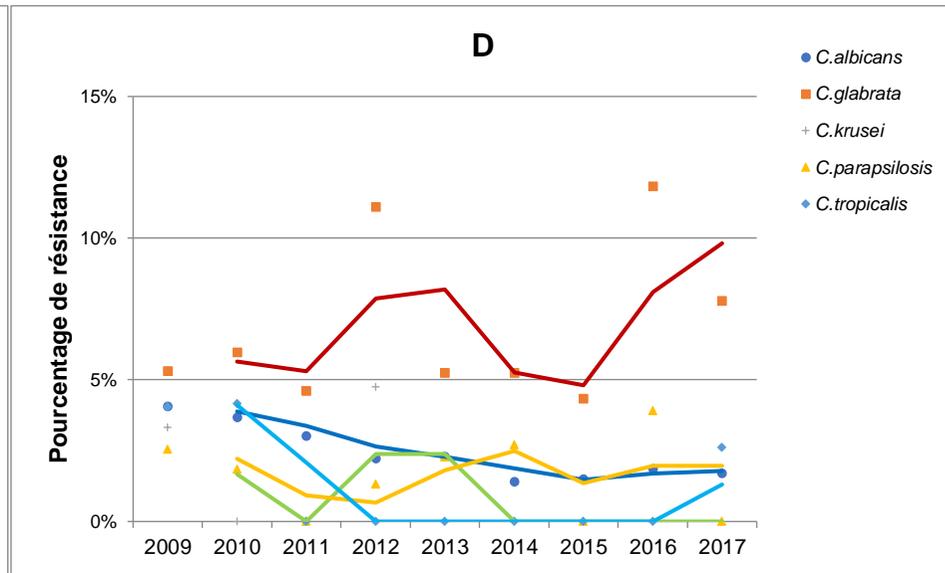
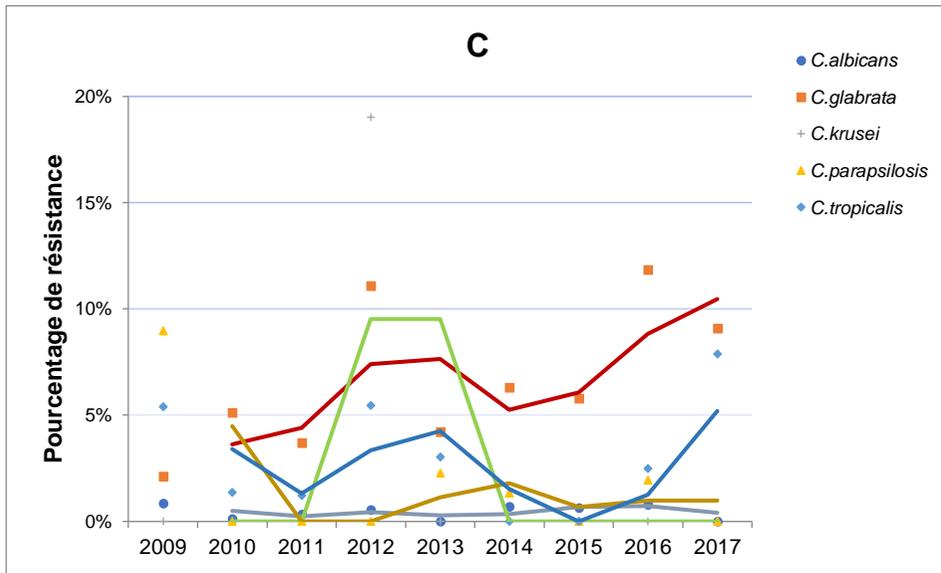
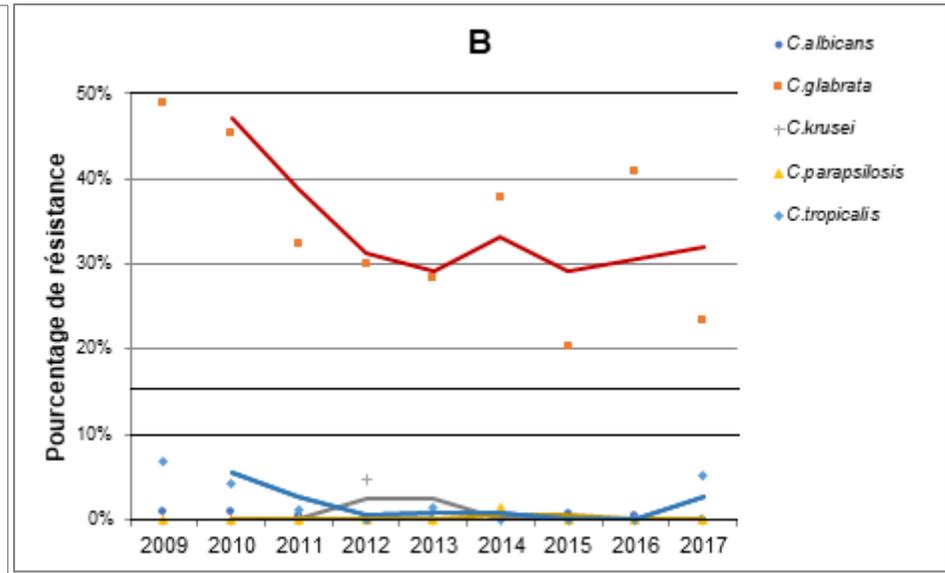
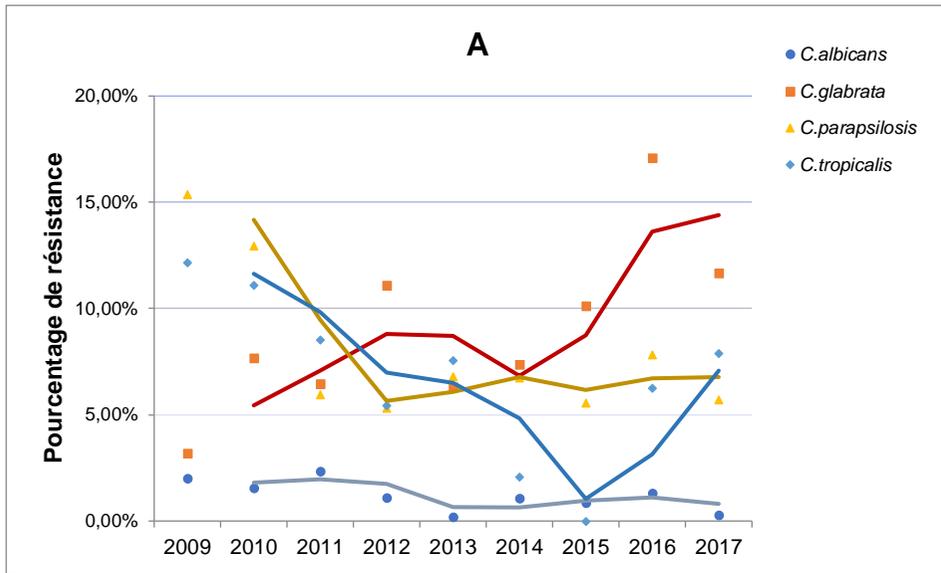
A l'aide des données recueillies, l'évolution des résistances aux azolés et aux échinocandines de *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. krusei*, *C. tropicalis* et *C. parapsilosis* a pu être étudiée sur la période 2009-2017. La résistance de *C. krusei* au fluconazole n'a pas été représentée en raison de la résistance intrinsèque de cette espèce à cette molécule (Fig.42).

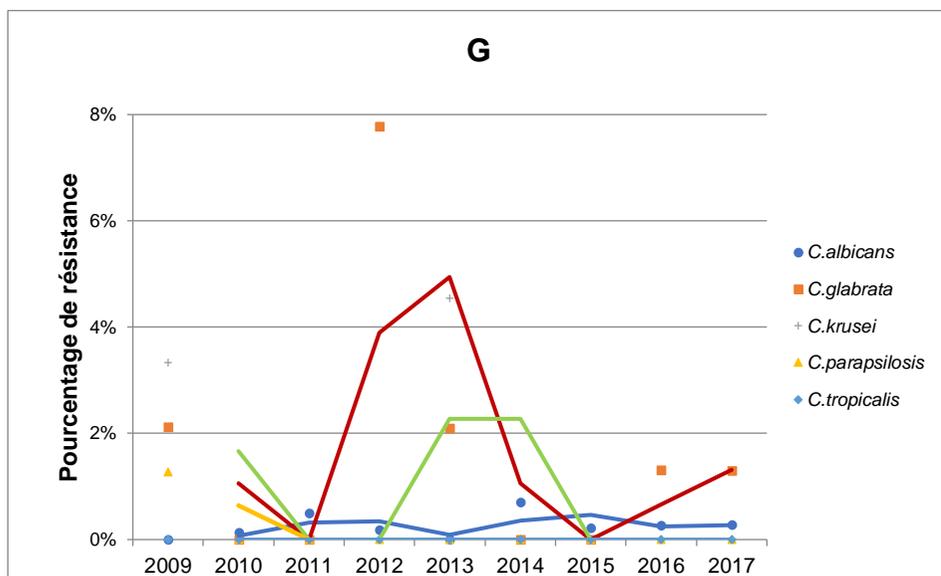
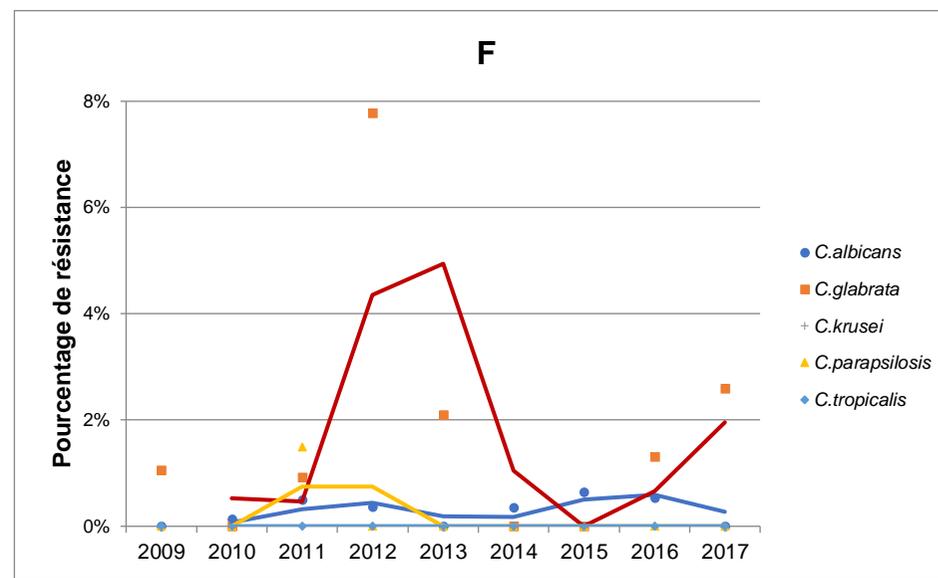
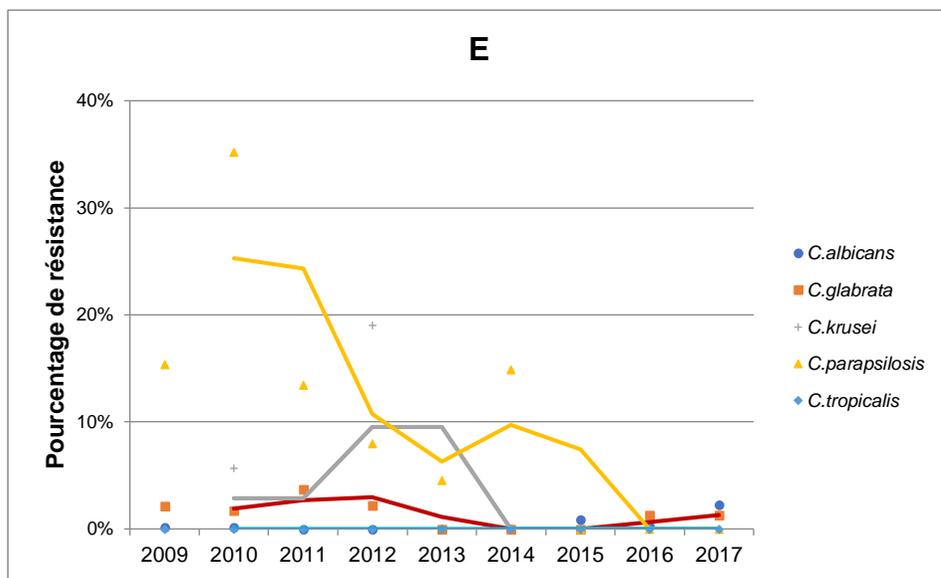
Résistance aux azolés

C. glabrata présente des pourcentages élevés de résistance aux azolés. Dans notre population c'est l'espèce la plus fréquemment résistante à l'itraconazole (20,3% - 48,9% sur la période 2009-2017) et au posaconazole (4,4% - 11,8% sur la période 2009-2017). Concernant le fluconazole, les espèces les plus résistantes entre 2009 et 2010 étaient *C. parapsilosis* (15,4% et 13% respectivement) et *C. tropicalis* (12,2% et 11,1% respectivement). Cette tendance s'est inversée en 2012 avec une augmentation du nombre de souches résistantes au fluconazole de *C. glabrata* (11,1%). Concernant le voriconazole, il y a eu un pic de résistance à cette molécule en 2012 pour *C. krusei* (19,1%), *C. glabrata* (11,1%) et *C. tropicalis* (5,5%). Cependant, l'espèce la plus résistante globalement au voriconazole est *C. glabrata* depuis 2013 (4,2% - 11,8% entre 2013 et 2016).

Résistance aux échinocandines

Les résistances de *C. parapsilosis* à la caspofungine n'étaient pas rares dans notre population surtout en 2010 (35,2%) ainsi qu'en 2012 chez *C. krusei* (19,1%), mais avec une décroissance globale pour toutes les espèces jusque 2017. Concernant la micafungine, les résistances sont rares sauf chez *C. glabrata* avec un pic en 2012 (7,8%) et une petite augmentation des résistances en 2017 (2,6%). Pour l'anidulafungine, nous constatons un pic de résistance en 2012 chez *C. glabrata* (7,8%) et un pic en 2013 chez *C. krusei* (4,6%).





A : Fluconazole
 B : Itraconazole
 C : Voriconazole
 D : Posaconazole
 E : Anidulafungine
 F : Caspofungine
 G : Micafungine

Figure 42 : Evolution des résistances aux azolés et aux échinocandines sur la période 2009-2017 pour les principales espèces de levures

Résistances croisées intra-classes et interclasses

Les résistances intra-classes

Les résistances croisées au sein des azolés concernent 2,40% des souches. Au sein de ces souches, 2 souches sont résistantes à l'ensemble des azolés (une souche de *C. albicans* et une souche de *C. glabrata*). Sur les souches résistantes au fluconazole et au voriconazole, deux molécules utilisées dans le traitement des CI, il y a 52 *C. glabrata*, 18 souches de *C. albicans*, 12 *C. tropicalis*, 10 *C. parapsilosis* et une souche de *C. krusei*.

En revanche, la résistance croisée à plusieurs échinocandines reste rare pour notre population de levures (0,29%). En effet, 2 souches sont résistantes à l'ensemble des échinocandines (une souche de *C. albicans* et une souche de *C. glabrata*). Sur les souches résistantes à la caspofungine et à la micafungine, deux autres molécules utilisées dans le traitement des CI, il y a 7 souches de *C. glabrata* et 2 souches de *C. albicans* (Tab.14).

Les résistances inter-classes

Sur les 7334 souches étudiées, seules 44 présentent des résistances interclasses et chacune des résistances croisées représente moins de 0,5% des souches résistantes. Les résistances croisées aux azolés et échinocandines sont les plus fréquentes et concernent 0,37% des souches. Les résistances aux azolés et flucytosine concernent 0,22% des souches tandis que les résistances croisées amphotéricine B avec les autres antifongiques sont extrêmement faibles (0,01% pour amphotéricine B/flucytosine et amphotéricine B/azolés) voire absentes (0% pour amphotéricine B/échinocandines). Aucune souche sur le panel étudié ne présentait de résistance croisée interclasse flucytosine/échinocandines.

Tableau 14 : Résistances croisées intra-classes au sein des azolés, des échinocandines et résistances croisées inter-classes

	n	%
Résistances croisées aux azolés	176	2.40
Résistances croisées aux candines	21	0.29
Résistances azolés/candines	27	0.37
Résistances 5FC/azolés	16	0.22
Résistances AMB/5FC	1	0.01
Résistances AMB/azolés	1	0.01
Résistances AMB/candines	0	0.00
Résistances 5FC/candines	0	0.00
Nombre total de souches	7334	

Les souches ayant des résistances croisées azolés/échinocandines sont majoritairement des souches de *C. parapsilosis* (n=9), *C. glabrata* (n=7) et *C. albicans* (n=7) dont certaines pan-azolés voire pan-échinocandines. Une seule

souche présente une résistance croisée amphotéricine B/azolés et il s'agit d'une souche de *C. tropicalis*. De la même façon, une seule souche de *C. tropicalis* présente une résistance croisée amphotéricine B/flucytosine. Les souches ayant des résistances croisées azolés/flucytosine sont également majoritairement des souches de *C. tropicalis* (n=13) (Tab.15).

Tableau 15 : Résistances croisées chez les souches de *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *C. krusei*, *C. tropicalis* et *C. guilliermondii*

	Candines/Azolés	AMB/Azolés	AMB/5FC	Azolés/5FC
<i>C albicans</i>	7 (dont 1 Pan azolés et Pan candines et 4 MICA/Pan azolés)	0	0	1
<i>C glabrata</i>	7 (dont 1 Pan azolés et Pan candines et 1 CAS/Pan azolés)	0	0	2
<i>C parapsilosis</i>	9	0	0	0
<i>C krusei</i>	3 (CAS/VRZ)	0	0	0
<i>C tropicalis</i>	0	1	1	13
Total	26	1	1	16

3.4 Vérification par la méthode de référence EUCAST

Afin de vérifier les profils de sensibilité obtenus en SYO, les souches présentant au moins une résistance à un antifongique selon les critères décrits dans le matériel et méthodes ont été testées en méthode EUCAST.

Sur 1346 souches de *Candida* présentant au moins une résistance à un antifongique, 99 souches étaient encore disponibles dans la mycothèque (souches issues d'hémocultures) au moment de l'étude. Après repiquage sur gélose Sabouraud, 89 souches ont donné une subculture.

Les souches étudiées appartiennent aux 6 espèces suivantes : *C. glabrata*(n=40), *C. tropicalis*(n=18), *C. parapsilosis* (n=16), *C. albicans* (n=9), *C. guilliermondii* (n=4) et *C. krusei* (n=2). Une souche de *C. albicans* multisensible a été ajoutée en tant que témoin.

Les CMI en SYO ainsi que les CMI obtenues par la méthode EUCAST sont résumées dans le tableau A5 en annexe.

Essential Agreement (EA)

L'EA est très variable en fonction de l'antifongique testé et est indépendant de la classe d'antifongique (Tab.16). En effet, l'EA à 2 dilutions est compris entre 47,2 pour la caspofungine et 97,7% pour la micafungine. Toutes espèces confondues, les EA à 2 dilutions sont élevés (>80%) pour les molécules d'intérêt dans la prise en charge des candidémies en dehors de la caspofungine. Ceci se vérifie à l'échelle de l'espèce pour *C. glabrata* qui présente des EA à 2 dilutions très élevés (>90%) excepté pour la caspofungine (35%). Pour *C. tropicalis* et *C. parapsilosis*, on observe des EA plus faibles vis-à-vis du fluconazole (66,7/68,7%) et du posaconazole (61,1/68,7%). Contrairement aux deux autres espèces testées, l'EA de la caspofungine est élevé pour *C. parapsilosis* (87,5%).

Tableau 16: EA calculés par antifongique pour toutes les espèces confondues et par espèce pour *C. glabrata*, *C. tropicalis* et *C. parapsilosis*

		Nombre (%) de souches testées vis-à-vis de								
		AMB	5-FC	FCZ	VRZ	PCZ	ITZ	CAS	MIC	AND
Toutes espèces confondues (n = 89)		85 (95.5)	84 (94.4)	74(83.1)	81 (89.9)	64 (71.9)	81 (91)	42 (47.2)	87 (97.7)	78 (87.6)
EA (2 dilutions)	<i>C. glabrata</i> (n=40)	38 (95)	39 (97.5)	38 (95)	38 (95)	36 (90)	37 (92.5)	14 (35)	39 (97.5)	37 (92.5)
	<i>C. tropicalis</i> (n=18)	18 (100)	18 (100)	12 (66.7)	17 (94.4)	11 (61.1)	14 (77.8)	6 (33.3)	18 (100)	15 (83.3)
	<i>C. parapsilosis</i> (n=16)	15 (93.7)	14 (87.5)	11 (68.7)	12 (75)	11 (68.7)	15 (93.7)	14 (87.5)	15 (93.7)	14 (87.5)

Categorical Agreement (CA)

Les CA ont également été calculés pour l'ensemble des espèces et par antifongique (Tab.17 et Fig.43).

Il est à noter que les CA n'ont pu être déterminés pour la 5-flucytosine, la caspofungine, et le posaconazole en raison de l'absence de SSC ou d'ECOFF EUCAST disponibles pour toutes les espèces.

Pour l'ensemble des souches testées, le CA est très élevé pour l'amphotéricine B (98.8%) et élevé pour le voriconazole (83,1%). Il est également élevé pour le fluconazole (83,1%) et la micafungine (73%) mais avec une disparité selon les espèces. Ainsi, pour le fluconazole, le CA est très élevé pour *C. glabrata* (92,5%) et <70% pour *C. tropicalis* et *C. parapsilosis*. La résistance est sous-estimée dans 16,7% des cas pour *C. tropicalis* et surestimée dans 18,7% des cas pour *C. parapsilosis* par le SYO.

Pour l'anidulafungine, la souche est classée dans une catégorie différente dans environ un cas sur deux (CA : 49.4%) avec une discordance très importante (VME) fréquente pour *C. glabrata* (42,5%). Pour cet antifongique, la totalité des souches de *C. parapsilosis* présente des discordances mineures entre les deux méthodes (MIE : 100%). Ces discordances mineures sont également fréquemment observées pour cette espèce vis-à-vis de la micafungine (MIE : 81,2%).

En ce qui concerne l'itraconazole, la concordance de catégorie est faible entre les deux méthodes (CA : 42,7%) avec dans un cas sur deux une surestimation par le SYO de la résistance pour *C. glabrata* (MAE : 45%) et une discordance de catégorisation pour *C. parapsilosis* et *C. tropicalis* (MIE : 50%) entre les deux méthodes.

Tableau 17 : CA, VME, MAE et MIE calculés par antifongique pour toutes les espèces confondues et par espèce pour *C. glabrata*, *C. tropicalis* et *C. parapsilosis*

	Nombre (%) de souches testées vis-à-vis de									
	AMB	5-FC	FCZ	VRZ	PCZ	ITZ	CAS	MIC	AND	
Toutes souches confondues (n = 89)										
CA	88 (98.8)	NA	74 (83.1)	74 (83.1)	NA	38 (42.7)	NA	65 (73)	44 (49.4)	
VME	1 (1.1)	0	4 (4.5)	4 (4.5)	6 (6.7)	4 (4.5)	0	6 (6.7)	21 (23.6)	
MAE	0	0	3 (3.37)	4 (4.5)	3 (3.37)	23 (25.8)	0	1 (1.1)	1 (1.1)	
MIE	0	0	8 (8.9)	7 (7.9)	0	24 (27)	0	13 (14.6)	19 (21.3)	
<i>C. glabrata</i> (n=40)										
CA	40 (100)	NA	37 (92.5)	36 (90)	NA	19 (47.5)	NA	37 (92.5)	21 (52.5)	
VME	0	0	0	2 (5)	0	0	0	2 (5)	17 (42.5)	
MAE	0	0	0	2 (5)	0	18 (45)	0	1 (2.5)	1 (2.5)	
MIE	0	0	3 (7.5)	0	0	3 (7.5)	0	0	1 (2.5)	
<i>C. tropicalis</i> (n=18)										
CA	18 (100)	NA	13 (68.4)	15 (83.3)	15 (83.3)	8 (44.4)	NA	18 (100)	16 (88.9)	
VME	0	0	3 (16.7)	0	3 (16.7)	0	0	0	2 (11.1)	
MAE	0	0	0	0	0	1 (5.6)	0	0	0	
MIE	0	0	2 (11.1)	3 (16.7)	0	9 (50)	0	0	0	
<i>C. parapsilosis</i> (n=16)										
CA	15 (93.7)	NA	11 (68.7)	13 (81.2)	13 (81.2)	4 (25)	NA	1 (6.2)	0	
VME	1 (6.25)	0	1 (6.3)	1 (6.2)	2 (12.5)	4 (25)	0	2 (12.5)	0	
MAE	0	0	3 (18.7)	0	1 (6.2)	0	0	0	0	
MIE	0	0	1 (6.2)	2 (12.5)	0	8 (50)	0	13 (81.2)	16 (100)	

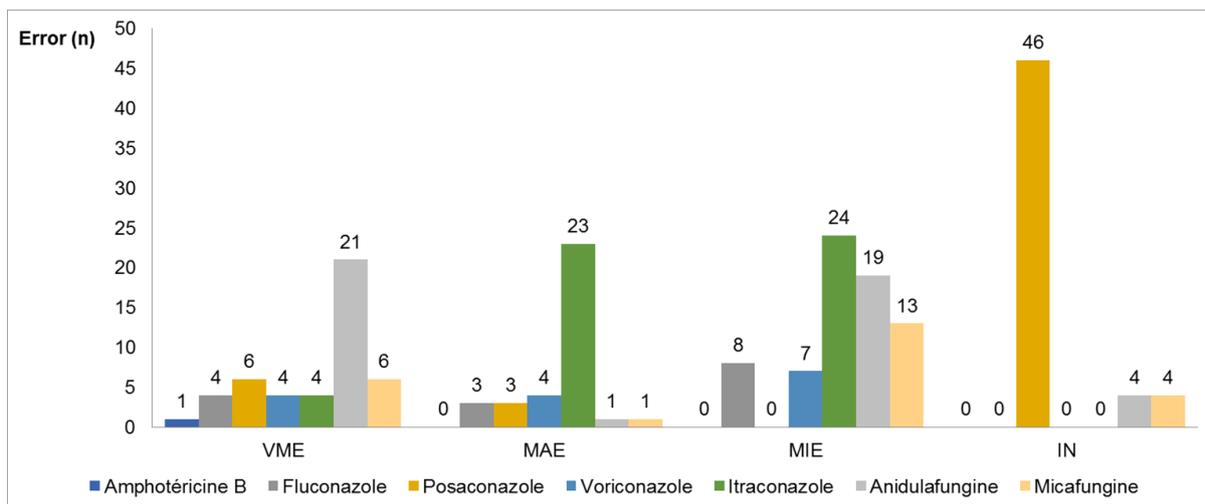


Figure 43 : CA par antifongique (n total = 89)

Confirmation des résistances observées en SYO

Les résistances mises en évidence par la méthode SYO ont été confirmées pour les azolés à 83% pour le voriconazole (20 souches/24), 76% pour le fluconazole (26 souches /34). Moins d'une souche sur deux (44%) classée résistante à l'itraconazole en SYO a été confirmée résistante en EUCAST.

Concernant les échinocandines, la résistance détectée en SYO a été confirmée uniquement pour 2 souches sur les 3 testées pour la micafungine (67%).

Aucune résistance n'avait été identifiée vis-à-vis de l'amphotéricine B en SYO dans la population étudiée (Tab.18).

Tableau 18 : Pourcentages de souches classées résistantes en SYO classées résistantes en EUCAST

	Nombre de souches résistantes en Sensititre	Nombre de souches confirmées résistantes en EUCAST	% de souches confirmées résistantes
Amphotéricine B	0	0	NA
5-Fluorocytosine	22	IN	NA
Fluconazole	34	26	76
Posaconazole	20	IN + 1 souche confirmée R	NA
Voriconazole	24	20	83
Isavuconazole	0	IN	NA
Caspofungine	3	IN	NA
Anidulafungine	1	0	0
Micafungine	3	2	67

NA : non applicable

IN : ininterprétable car absence de SSC EUCAST

Etude des discordances SYO/EUCAST

Les souches discordantes sur l'EA ou le CA ont été représentées sur la figure suivante par espèce et par antifongique. Les bornes inférieures des SSC du CLSI et de l'EUCAST ont été représentées (Fig.44).

Concernant *C. glabrata* et itraconazole, les courbes EUCAST et Sensititre se superposent sauf vers les CMI hautes. En effet, en EUCAST il y a 2 populations (une avec un pic à CMI =1µg/mL et une autre avec un pic à CMI=8µg/mL). En SYO, il semble également exister 2 populations, une autour de CMI=1µg/mL et une avec un pic à une CMI≥16µg/mL. La majorité des souches est classée résistante en ce qui concerne la courbe Sensititre par rapport aux SSC du CLSI.

Concernant *C. glabrata* et l'anidulafungine, les souches testées sont plutôt classées sensibles en Sensititre mais seulement une minorité en EUCAST. De plus, les populations ne se situent pas autour de la même CMI : autour de CMI=0.03µg/mL en SYO et autour de CMI=0.06µg/mL en EUCAST.

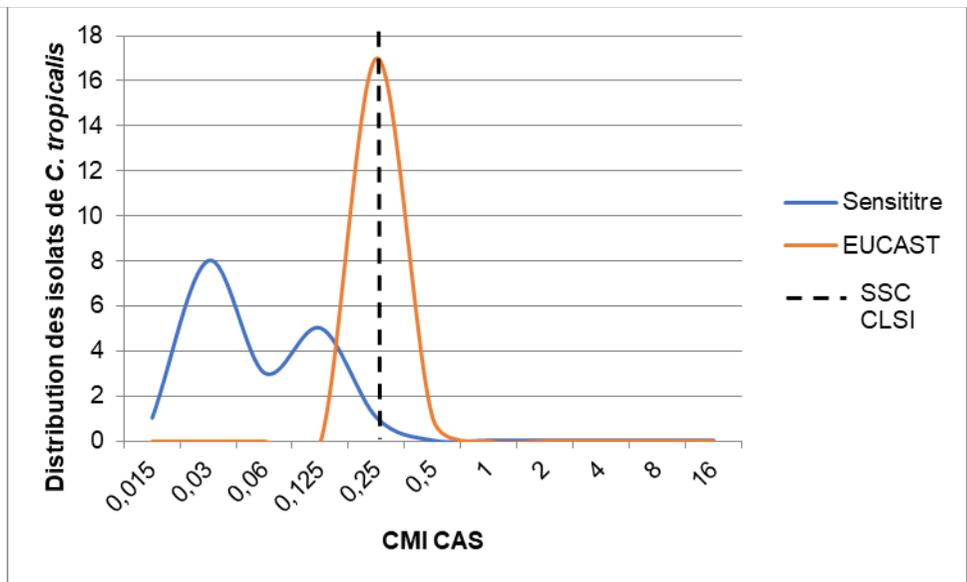
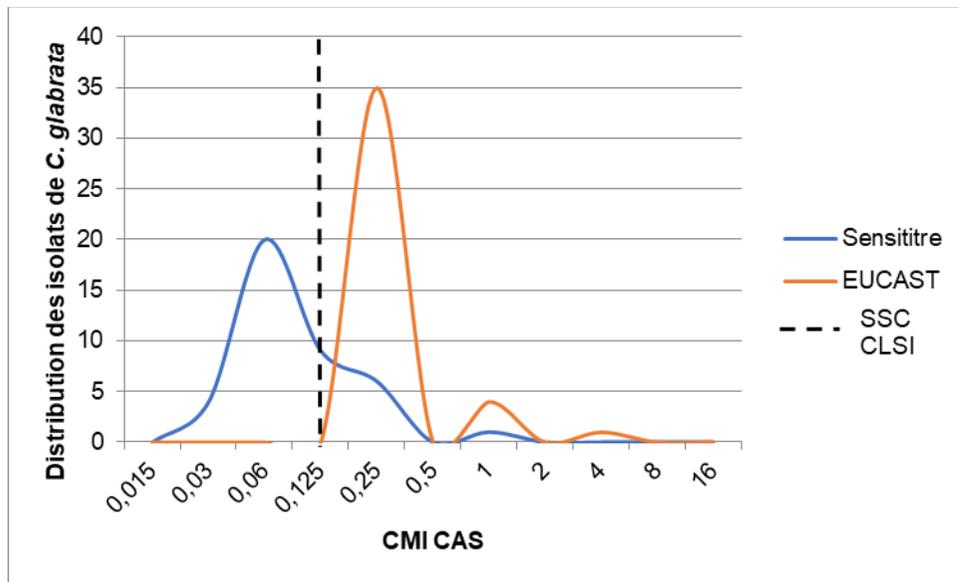
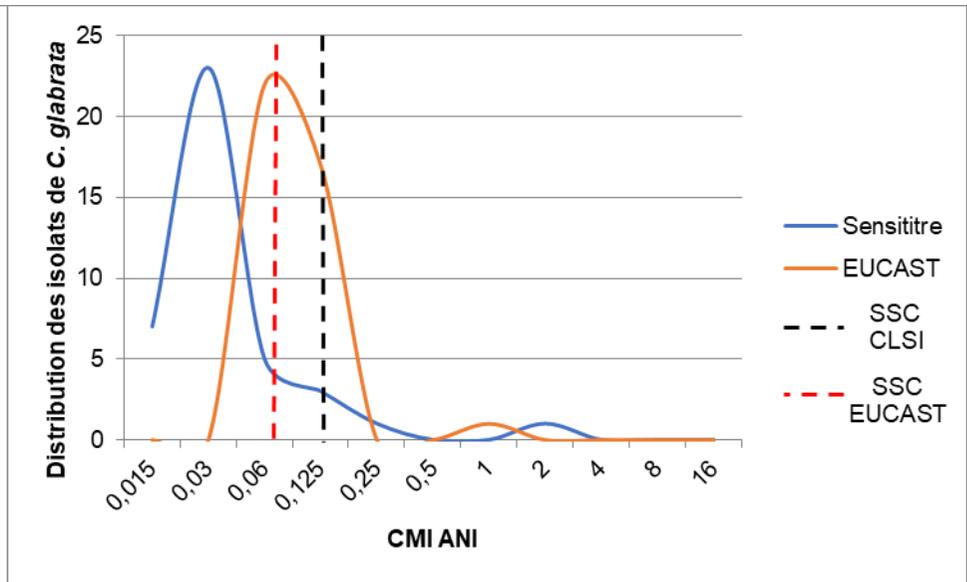
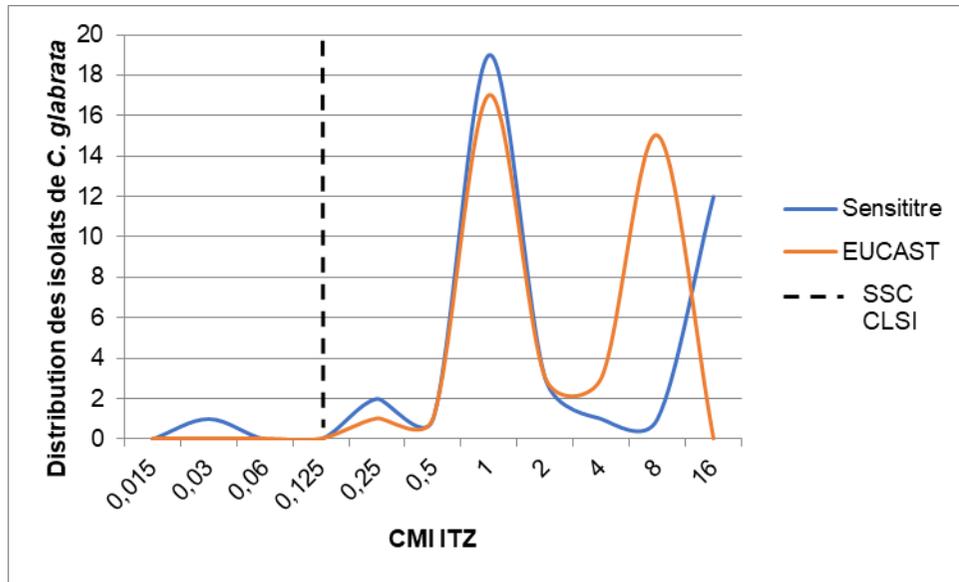
Concernant la caspofungine et *C. glabrata* ou *C. tropicalis*, la répartition des souches en fonction des CMI est très différente selon la méthode. Pour les deux espèces, la majorité des souches testées sont sensibles en SYO avec une CMI à 0.06µg/mL pour *C. glabrata* et 0.03µg/mL pour *C. tropicalis* tandis qu'en EUCAST la très grande majorité des souches présente une CMI plus élevée à 0.25µg/mL pour ces deux espèces.

Concernant *C. tropicalis* et l'itraconazole, les souches en SYO se répartissent autour d'une CMI comprise entre 0.06 et 0.125µg/mL, ce qui classe la majorité des souches dans la catégorie « intermédiaire ». La répartition des souches est très différente en EUCAST, avec une population majoritaire ayant un pic à 0.25µg/mL ce qui classe la majorité des souches en « sensible » et une petite population avec des CMI plus hautes à la CMI=1µg/mL.

Concernant *C. parapsilosis* et l'anidulafungine, les souches en SYO sont majoritairement sensibles avec un pic à 1µg/mL. Les souches en EUCAST se répartissent en 2 populations : une population minoritaire autour de 0.125µg/mL et une population majoritaire autour de 2µg/mL, mais l'ensemble de la population est intermédiaire voire résistante.

Concernant *C. parapsilosis* et l'itraconazole, la majorité des souches en SYO se répartissent autour de 0.125µg/mL entre sensible et intermédiaire. En EUCAST, il existe 3 populations : une population plutôt sensible autour de 0.06µg/mL, une population de sensibilité intermédiaire autour de 0.25µg/mL et une population minoritaire résistante autour de 4µg/mL.

Concernant *C. parapsilosis* et micafungine, les souches en SYO sont sensibles ou intermédiaires avec une répartition autour de 1-2µg/mL. En EUCAST, une minorité des souches est autour de 0.03µg/mL et la majorité se situe autour de 2µg/mL, mais l'ensemble de la population est classé en « intermédiaire » voire « résistante ».



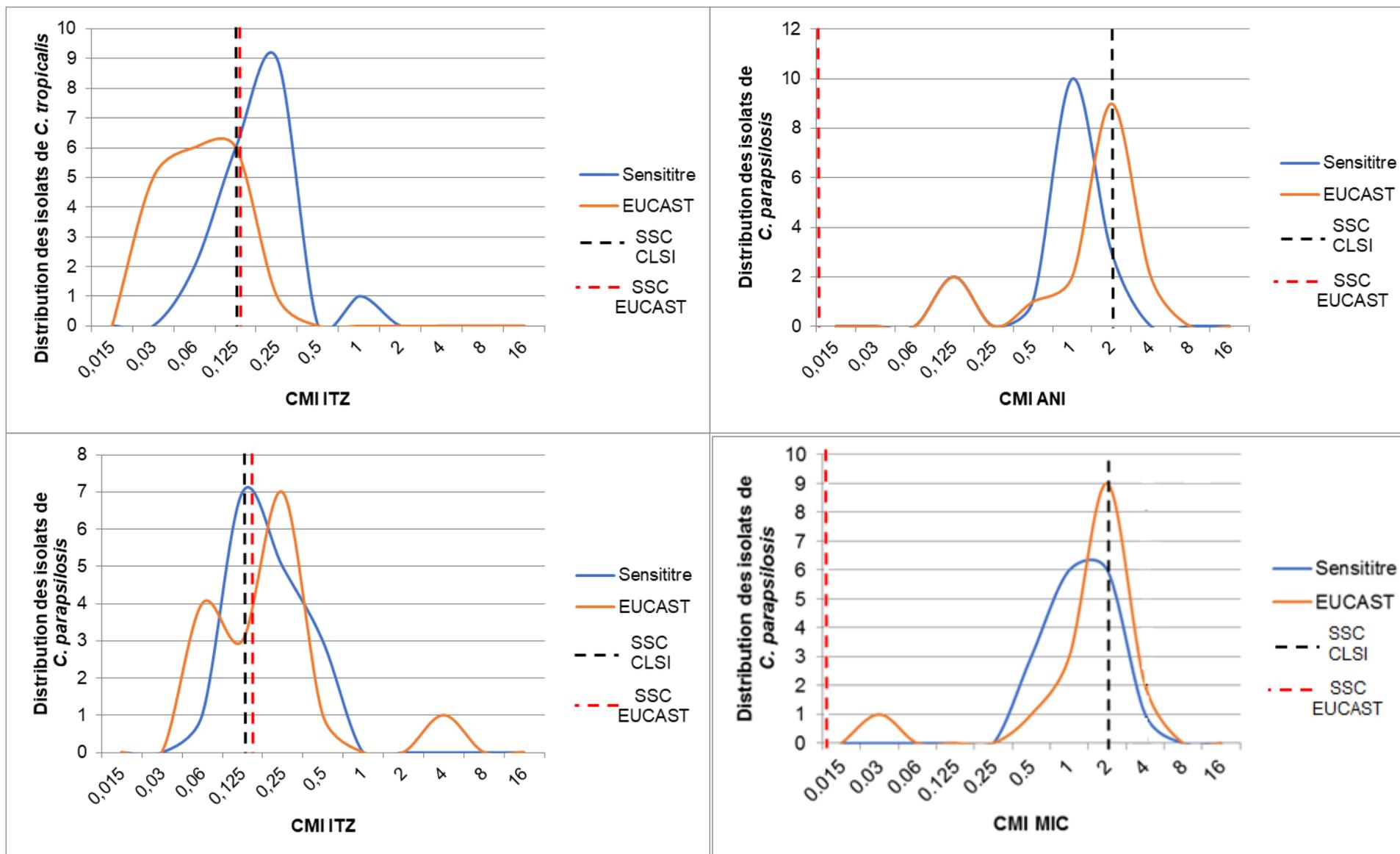


Figure 44 : Distribution des isolats discordants (sur l'EA ou le CA) par antifongique, en utilisant le SYO ou l'EUCAST

Discussion

Les CI sont des pathologies graves associées à une morbi-mortalité élevée. Elles touchent 250 000 personnes par an dans le monde et sont la 3^{ème} cause d'infection sanguine nosocomiale en France en USI. Au CHU de Lille, sur la période 2009-2017, la proportion de souches de *Candida* isolées dans les hémocultures est en constante progression avec 81 souches en 2009 et 143 en 2017 pour une moyenne de 5800 hémocultures prélevées, soit 57% d'augmentation.

Ainsi, l'épidémiologie des CI au sein de notre hôpital a connu une évolution importante qu'il convenait d'étudier pour connaître l'écologie locale en termes d'espèces dominantes, leur prévalence dans les différents services, leurs profils de sensibilité et l'évolution de ces paramètres dans le temps. Connaître cette écologie permet d'orienter les protocoles anti-infectieux notamment dans les prescriptions empiriques/préemptives.

Au CHU de Lille, entre 2009 et 2017, 52 736 souches de levures ont été isolées et 7334 antifongigrammes réalisés. Il est important de noter que l'étude porte uniquement sur ces souches ayant fait l'objet d'un antifongigramme soit 14% du total des levures isolées dans notre hôpital. De plus, l'épidémiologie relatée par la suite est à pondérer en raison des pratiques propres à chaque service. Le recours à des prélèvements mycologiques est service dépendant. Ces investigations sont systématiquement pratiquées dans les services de réanimation, de maladies infectieuses, de transplantation et d'hématologie mais peu prescrites dans certains services de chirurgie (notamment la réanimation chirurgicale).

Sur les 7334 souches ayant fait l'objet d'un antifongigramme, les levures isolées sont majoritairement du genre *Candida* (n=7250) et les 5 espèces de *Candida* les plus fréquentes y sont bien représentées : *C. albicans* (n=4633), *C. glabrata* (n=819), *C. tropicalis* (n=570), *C. parapsilosis* (n=512) et *C. krusei* (n=229).

La plupart de ces souches se répartissent majoritairement dans les services de réanimation médicale (48%). Dans tous ces services, le ratio *C. albicans* / *Candida* non *albicans* est supérieur à 1 à l'exception du service de MDS adultes où la proportion de *C. albicans* est inférieure à la moitié des isolats (48%) avec une prédominance de *C. glabrata* (19%).

L'épidémiologie locale est également marquée par la proportion de *C. tropicalis* (11%), de *C. parapsilosis* et de *C. kefyr* à 9% alors que la proportion de *C. glabrata* ne représente que 2% dans les unités de transplantation.

De même, la répartition des *Candida* non *albicans* en pédiatrie/néonatalogie est dominée par *C. parapsilosis* et *C. tropicalis* (10%) suivies par *C. glabrata* (6%).

Les hémocultures représentent à elles-seules 14% des prélèvements. Concernant les candidémies, la proportion d'hémocultures positives dans notre établissement est estimée à 2,7%. Un total de 1036 souches a été isolé sur la période 2009-2017 avec une augmentation régulière du nombre d'hémocultures positives. La répartition des espèces isolées dans les hémocultures est similaire d'une année sur l'autre et varie de la façon suivante : *C. albicans* (49% à 64%), puis *C. glabrata* (9% à 19%) et *C. parapsilosis* (9% à 19%), ensuite *C. tropicalis* (4% à 11%) et enfin *C. krusei* (0% à 5%). Cette répartition est similaire à celle retrouvée dans les autres pays européens à l'exception de certains pays d'Europe du sud (cf partie 1.1.2).

Les tests de sensibilité aux antifongiques ont porté sur la totalité des souches isolées de prélèvements profonds dont 1036 hémocultures ainsi que sur certaines souches issues de prélèvements périphériques réalisés chez des patients à risque de CI, soit un total de 7334 souches. L'interprétation des résultats nécessite des SSC prédéfinis en vue de catégoriser les souches en sensible, intermédiaire et résistante. En effet, les SSC définis par les sociétés savantes permettent de catégoriser les souches et aident à sélectionner l'antifongique le mieux adapté au champignon responsable de l'infection. Ces SSC sont définis par l'EUCAST et le CLSI pour les champignons les plus fréquemment rencontrés en pathologie humaine et notamment pour les espèces du genre *Candida* (112). Cependant, malgré une évolution constante, les SSC font encore défaut pour un certain nombre de couples champignon-antifongique comme par exemple pour *C. glabrata* et le voriconazole. De plus, lorsque ces SSC sont disponibles, il existe des disparités entre les valeurs préconisées par le CLSI vs EUCAST (112).

L'absence de SSC ainsi que les disparités entre le CLSI et l'EUCAST est d'origine multifactorielle comme par exemple l'absence de corrélation entre les CMI et la survie des patients dans les études cliniques (112)(113) ou encore une variabilité inter-laboratoires importante dans la détermination des CMI(134).

A défaut de SSC, le groupe d'experts EUCAST propose le suivi des sensibilités par la détermination d'un ECOFF. Ces ECOFF ne sont pas équivalents aux SSC mais ils

présentent une utilité dans la définition des populations de souches sauvages et permettent ainsi de détecter celles ayant une sensibilité diminuée à un antifongique (113)(127).

Dans la présente étude nous avons collecté les données de sensibilité aux antifongiques par la méthode SYO pour 7334 souches de *Candida* ce qui nous a permis de définir 59 ECOFF par la méthode du « eye ball » pour les espèces les plus fréquentes à l'exception des couples *C. tropicalis*, *C. kefyr* et *C. lusitaniae* / fluorocytosine et *C. krusei*/ fluconazole.

Ces données ont été confrontées à celles du CLSI dans le but de connaître la sensibilité globale de nos souches. Ces données étaient similaires à l'exception des couples suivants : amphotéricine B / *C. albicans* et *C. parapsilosis* ; anidulafungine et *C. parapsilosis* pour lesquels nos données du ECOFF étaient plus faibles. En revanche pour les azolés, les ECOFF obtenus à Lille étaient plus élevés pour les couples fluconazole / *C. glabrata*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis* et *C. lusitaniae* ; posaconazole / *C. albicans*, *C. tropicalis* et voriconazole *C. glabrata*, *C. tropicalis* et *C. parapsilosis* (cf Tab.10). L'analyse de l'évolution des ECOFF dans le temps pour *C. albicans* et *C. glabrata* a permis de montrer que le phénotype de sensibilité des souches est globalement stable. Ces données soulignent l'importance d'un suivi régulier de la sensibilité de nos souches aux principaux antifongiques en vue d'identifier rapidement l'apparition de souches de sensibilité diminuée. Ceci est particulièrement notable pour les antifongiques de la classe des azolés.

A l'issue de la détermination des ECOFF, les valeurs obtenues ont été appliquées afin de catégoriser les espèces ne disposant pas de SSC dans les recommandations du CLSI. Nous avons pu ainsi définir les pourcentages de résistance aux différentes classes d'antifongiques au sein de notre population.

Les souches de *C. albicans* sont majoritairement sensibles. Cependant, quelques souches sont résistantes aux azolés (1% au fluconazole, 0,45% au voriconazole) ce qui est comparable aux données du CNRMA (<2% des isolats) (107). Cette discordance est probablement liée à des différences d'exposition aux azolés (pratiques prophylactiques ou posologies différentes) (29)(30). Les taux de résistance aux échinocandines sont paradoxalement anecdotiques à Lille (<0,005%) alors qu'ils représentent 1‰ des souches au niveau national et mondial (21) (107).

En ce qui concerne les souches de *C. glabrata*, 9% présentent une résistance au fluconazole dont 6% (52/819) résistantes également au voriconazole. Ces données contrastent avec celles publiées en Amérique du Nord rapportant 10,6% de souches de *C. albicans* résistantes au fluconazole (21). Il est important de noter qu'une souche était résistante à tous les azolés. Nous rapportons aussi une résistance faible de cette espèce aux échinocandines (1-2%). Cette proportion est similaire à l'épidémiologie nationale des résistances (0-5% pour la caspofungine) (107). Ces données sont légèrement plus faibles que celles rapportées par ailleurs (3,5% des souches) (21).

Comme attendu, les souches de *C. tropicalis* se répartissent en 2 populations équivalentes en terme de sensibilité à la 5-FC. Pour les azolés, le pourcentage de souches résistantes au fluconazole (7%) est similaire à celui d'Asie orientale (9,2%) mais significativement plus élevé que celui rapporté dans le registre SENTRY en 2016 (3,2%) (21). La proportion de souches résistantes au voriconazole était de 3%. L'absence de résistance aux échinocandines de cette espèce contraste avec les données rapportées par le CNRMA qui peut atteindre jusqu'à 3% des isolats (107) et celles du registre SENTRY (2%)(21).

De manière surprenante, le pourcentage de souches de *C. parapsilosis* résistantes aux échinocandines tel que défini par le ECOFF était plus élevé pour la caspofungine (12%) que pour l'anidulafungine et la micafungine (0,2%). Cette même proportion a été rapportée dans d'autres études européennes (21). La proportion de *C. parapsilosis* résistante à la caspofungine est rarement rapportée dans la littérature en raison de l'absence de SSC disponible. Il est à noter que les CMI observées en présence de caspofungine sont souvent plus élevées que celles rapportées pour les deux autres échinocandines. En ce qui concerne la résistance aux azolés, nous retrouvons des données équivalentes à celles rapportées pour le fluconazole par le CNRMA (2-14%) (107) contre 8% dans notre étude.

Enfin, nous avons analysé la proportion de résistance au sein de l'espèce *C. krusei* (naturellement résistantes au fluconazole). La proportion de *C. krusei* caspofungine-R a été estimée à 3% des souches. Cette proportion est équivalente à celle rapportée dans le registre SENTRY en 2016 (21).

Toutes espèces confondues, les résistances intra-classes sont rares : 2,40% pour les azolés et 0,29% pour les échinocandines. Les résistances inter-classes sont également rares puisque toutes sont inférieures à 0,5%.

En dehors de quelques variations ponctuelles, l'évolution des résistances entre 2009 et 2017 aux azolés et aux candines reste stable à l'exception d'une progression visible pour *C. glabrata* et fluconazole (3,2% vs 11,7%), *C. glabrata* et voriconazole (4,2% vs. 11,8%) et *C. glabrata* et posaconazole (1% vs. 2,6%).

Nous nous sommes ensuite intéressés à la caractérisation de nos souches résistantes issues des hémocultures par la méthode de référence EUCAST. Un effectif de 89 souches résistantes à au moins un antifongique par la méthode SYO a été analysé. Nous avons analysé l'EA à 2 dilutions ainsi que le CA entre les deux méthodes. Pour des raisons d'effectif, ces pourcentages de similitude ont été analysés de manière globale (toutes espèces confondues) puis isolément pour *C. glabrata*, *C. tropicalis* et *C. parapsilosis*.

En ce qui concerne l'EA à 2 dilutions pour toutes espèces et antifongiques confondus, celui-ci a été évalué à 84,2%, proportion plus faible que celle rapportée dans l'étude d'Alexander et *al.* réalisée en 2007 sur 212 isolats de *Candida* spp, qui retrouve un EA global de 91% (105).

En ce qui concerne l'EA par espèce (cf Tab.14), le pourcentage de concordance est globalement qualifié d'élevé (>80%) avec quelques exceptions. Les EA les plus faibles ont été observés pour les couples *C. glabrata* - caspofungine (47,2%), *C. tropicalis* - fluconazole / posaconazole / caspofungine (66,7, 61,1 et 33,3% respectivement) et *C. parapsilosis* - fluconazole / posaconazole (68,7 et 68,7% respectivement).

Concernant la concordance de catégorisation (CA), elle est, dans notre étude, globalement de 71% avec également une variation importante en fonction du couple espèce-antifongique. Toutes espèces confondues, comme les EA, les CA observés sont inférieurs aux données de la littérature utilisant les SSC de l'EUCAST (135) ou du CLSI (136). Cependant, certains CA sont classés « élevés » à « acceptables » pour les molécules indiquées dans la prise en charge des CI (73% pour la micafungine, 83,1% pour le fluconazole et le voriconazole et 98,8% pour l'amphotéricine B) (cf Tab.15).

A l'échelle de l'espèce, pour les échinocandines, ces données sont discordantes avec l'étude d'Aignier et *al.* qui retrouve un CA à 94% pour *C. glabrata* et anidulafungine alors que cette concordance n'excède pas les 42 % dans notre étude (135). De même un CA de 100% est obtenu pour *C. parapsilosis* vis-à-vis de la micafungine et de l'anidulafungine alors que la quasi-totalité de nos souches

présentent des discordances de catégorisation vis-à-vis de ces deux antifongiques. Nos données convergent cependant avec les résultats de Pfaller et *al.* décrivant des CA plus faibles pour *C. glabrata* vis-à-vis de la caspofungine (136).

L'absence de SSC et d'ECOFF en EUCAST n'a pas permis de définir le CA de la caspofungine. Cependant, pour cet antifongique de première intention dans les CI, une grande variabilité de la distribution des CMI a été observée lors d'une étude menée sur 17 laboratoires dans le monde entier (Brésil, Canada, Europe, Mexique, Pérou et Etats-Unis). Cette variabilité existe quelle que soit la méthode de référence utilisée sans qu'aucune cause n'ait pu être identifiée. Ainsi, l'utilisation des SSC du CLSI pour catégoriser la caspofungine expose à un risque d'erreur. C'est pourquoi il est recommandé de tester plutôt l'anidulafungine ou la micafungine (134).

La variabilité de la concordance entre les méthodes en fonction des espèces est également observée pour les azolés. Concernant le fluconazole, l'étude de Morace et *al.*, montre une bonne concordance entre les méthodes SYO et CLSI avec une concordance globale (CA) de 81,4% (137). Ce taux est également retrouvé dans notre étude (83,1%) mais nous divergeons sur les CA observés par espèce.

Les discordances avec les autres études peuvent notamment être liées aux différences méthodologiques (SSC utilisés, temps d'incubation variables, effectif ou profil de sensibilité des populations étudiées). Il est important de noter que l'étude que nous avons réalisée est une vérification des résistances mises en évidence par la méthode SYO et non pas une comparaison de méthode nécessitant un effectif de souches de phénotypes sensibles et résistants.

Conclusion

Les CI constituent une problématique majeure de santé publique. Leur diagnostic fondé sur un faisceau d'arguments cliniques, radiologiques et biologiques est complexe. De plus, elles sont associées à une morbi-mortalité élevée, étroitement liée à mise en place précoce d'une prise en charge adaptée. L'adaptation de cette thérapeutique nécessite de connaître l'épidémiologie locale et de déterminer la sensibilité aux antifongiques des souches isolées chez les patients atteints de CI à l'aide de méthodes de détermination des CMI fiables et de critères d'interprétation des résultats de ces CMI pertinents.

C'est pourquoi nous avons, dans un premier temps, étudié l'épidémiologie des CI au CHU de Lille sur la période 2009 à 2017. Cette partie de l'étude nous a permis de montrer que l'épidémiologie des levures dans notre centre est concordante avec celle décrite dans la littérature que ce soit en terme de répartition des espèces ou en terme de fréquence des candidémies.

Ensuite, des ECOFF locaux ont été déterminés à partir de l'ensemble des résultats de CMI obtenus sur cette période pour les antifongiques systémiques d'intérêt. Ces ECOFF ont pu être établis non seulement pour les 5 principales espèces de levure mais aussi pour des espèces moins fréquentes comme *C. kefyr* et *C. lusitaniae* pour lesquels un grand nombre de souches était disponibles. L'importance des ECOFF est illustrée en pratique clinique pour orienter le traitement en l'absence de SSC définis par les sociétés savantes.

Puis, grâce aux SSC du CLSI et aux ECOFF déterminés dans cette étude, nous avons pu évaluer l'épidémiologie des résistances au sein de cet hôpital. La résistance aux antifongiques est globalement stable sur la période étudiée pour l'ensemble des molécules. Le traitement de premier choix des CI étant la famille des échinocandines, la faible résistance à ces antifongiques objectivée dans cette étude n'est pas préoccupante. Cependant, une vigilance est nécessaire sur l'évolution des résistances aux azolés, notamment le fluconazole et le posaconazole vis-à-vis de *C. glabrata* et *C. tropicalis*.

Enfin la vérification, par la méthode de référence EUCAST, des souches catégorisées « résistantes » par la méthode SYO a montré des résultats globalement acceptables mais variables en fonction des couples espèces-antifongiques avec tout

de même une mauvaise corrélation des EA pour la caspofungine. Cependant, cette discordance est concordante avec la littérature. Le SYO, utilisé en routine dans notre centre, est une méthode de détermination de la sensibilité aux antifongiques performante qui contrairement aux méthodes de référence est adaptée à un rendu de résultat rapide et donc à la pratique clinique pour orienter l'usage des antifongiques systémiques. Il est à noter que la vérification, en méthode EUCAST, des CMI obtenues en SYO pour des souches sensibles est nécessaire afin d'établir une réelle comparaison de méthode.

L'exploration moléculaire des souches phénotypiquement détectées « résistantes » dans cette étude pourrait se révéler intéressante afin de mettre en évidence les mécanismes menant à ces résistances et d'approfondir nos connaissances dans ce domaine

Annexes

Tableau A 1 : SSC CLSI et ECOFF utilisés pour la détermination de la susceptibilité des souches en SYO

	<i>C. albicans</i>		<i>C. glabrata</i>		<i>C. krusei</i>		<i>C. parapsilosis</i>		<i>C. tropicalis</i>		<i>C. kefyr</i>		<i>C. lusitanae</i>		<i>Candida sp</i>	
	S≤	R>	S≤	R>	S≤	R>	S≤	R>	S≤	R>	S≤	R>	S≤	R>	S≤	R>
Amphotéricine B	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
CLSI 2008	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	1	1
EUCAST 2018	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	ND	ND	ND	ND	IE	IE
ECOFFs Lille 2018	0,5		1		1		0,5		1		1		1		ND	ND
Flucytosine	4	16	4	16	4	16	4	16	4	16	4	16	4	16	4	16
CLSI 2008	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	4	16
EUCAST 2018	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
ECOFFs Lille 2018	0,125		0,06		16		0,25		ND		ND		ND		ND	ND
Anidulafungine	0,25	0,5	0,125	0,25	0,25	0,5	2	4	0,25	0,5	0,25		0,25		ND	ND
CLSI 2008	0,25	0,5	0,12	0,25	0,25	0,5	2	4	0,25	0,5	ND	ND	ND	ND	ND	ND
EUCAST 2018	0,032	0,032	0,064	0,064	0,064	0,064	0,002	4	0,064	0,064	ND	ND	ND	ND	IE	IE
ECOFFs Lille 2018	0,125		0,125		0,125		2		0,25		0,25		0,25		ND	ND
Caspofungine	0,25	0,5	0,125	0,25	0,25	0,5	2	4	0,25	0,5	0,125		0,5		ND	ND
CLSI 2008	0,25	0,5	0,12	0,25	0,25	0,5	2	4	0,25	0,5	ND	ND	ND	ND	ND	ND
EUCAST 2018	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	IE	IE
ECOFFs Lille 2018	0,125		0,25		0,5		1		0,125		0,125		0,5		ND	ND
Micafungine	0,25	0,5	0,06	0,125	0,25	0,5	2	4	0,25	0,5	0,125		0,25		ND	ND
CLSI 2008	0,25	0,5	0,06	0,125	0,25	0,5	2	4	0,25	0,5	ND	ND	ND	ND	ND	ND
EUCAST 2018	0,016	0,016	0,032	0,032	IE	IE	0,002	2	IE	IE	ND	ND	ND	ND	IE	IE
ECOFFs Lille 2018	0,03		0,03		0,25		2		0,06		0,125		0,25		ND	ND
Fluconazole	2	4	0,002	32	R	R	2	4	2	4	0,5		4		ND	ND
CLSI 2008	2	4	0,002	32	-	-	2	4	2	4	ND	ND	ND	ND	ND	ND
EUCAST 2018	2	4	0,002	32	-	-	2	4	2	4	ND	ND	ND	ND	2	4
ECOFFs Lille 2018	1		64		64		4		4		0,5		4		ND	ND
Itraconazole	0,125	0,5	0,125	0,5	0,125	0,5	0,125	0,5	0,125	0,5	0,125	0,5	0,125	0,5	0,125	0,5
CLSI 2008	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	0,125	0,5
EUCAST 2018	0,064	0,064	IE	IE	IE	IE	0,125	0,125	0,125	0,125	ND	ND	ND	ND	IE	IE
ECOFFs Lille 2018	0,125		2		0,5		0,25		0,5		0,25		0,25		ND	ND
Posaconazole	0,125		2		0,5		0,25		1		0,125		0,125		ND	ND
CLSI 2008	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
EUCAST 2018	0,064	0,064	IE	IE	IE	IE	0,064	0,064	0,064	0,064	ND	ND	ND	ND	IE	IE
ECOFFs Lille 2018	0,125		2		0,5		0,25		1		0,125		0,125		ND	ND
Voriconazole	0,125	0,5	1		0,5	1	0,125	0,5	0,125	0,5	0,03		0,03		ND	ND
CLSI 2008	0,12	0,5	-	-	0,5	1	0,12	0,5	0,12	0,5	ND	ND	ND	ND	ND	ND
EUCAST 2018	0,064	0,25	IE	IE	IE	IE	0,125	0,25	0,125	0,25	ND	ND	ND	ND	IE	IE
ECOFFs Lille 2018	0,06		1		0,5		0,125		0,5		0,03		0,03		ND	ND

Colonnes	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
C (µg/mL)	4	2	1	0,5	0,25	0,125	0,06	0,03	0,015	0,008	T+	T-
ATF1												
ATF1												
ATF1												
ATF1												
ATF2												
ATF2												
ATF2												
ATF2												

ATF1 : amphotéricine B ou anidulafungine ou posaconazole ou voriconazole

ATF2 : caspofungine ou micafungine ou isavuconazole ou itraconazole

T+ : témoin positif de croissance

T- : témoin négatif ou blanc

Colonnes	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
C (µg/mL)	64	32	16	8	4	2	1	0,5	0,25	0,125	T+	T-
FCZ												
FCZ												
FCZ												
FCZ												
5FC												
5FC												
5FC												
5FC												

FCZ : fluconazole

5FC : 5-fluorocytosine

T+ : témoin positif de croissance

T- : témoin négatif ou blanc

Figure A 1 : Schéma des plaques EUCAST, en haut : tous les antifongiques sauf le FCZ et la 5FC, en bas : FCZ et 5FC

Candida tropicalis

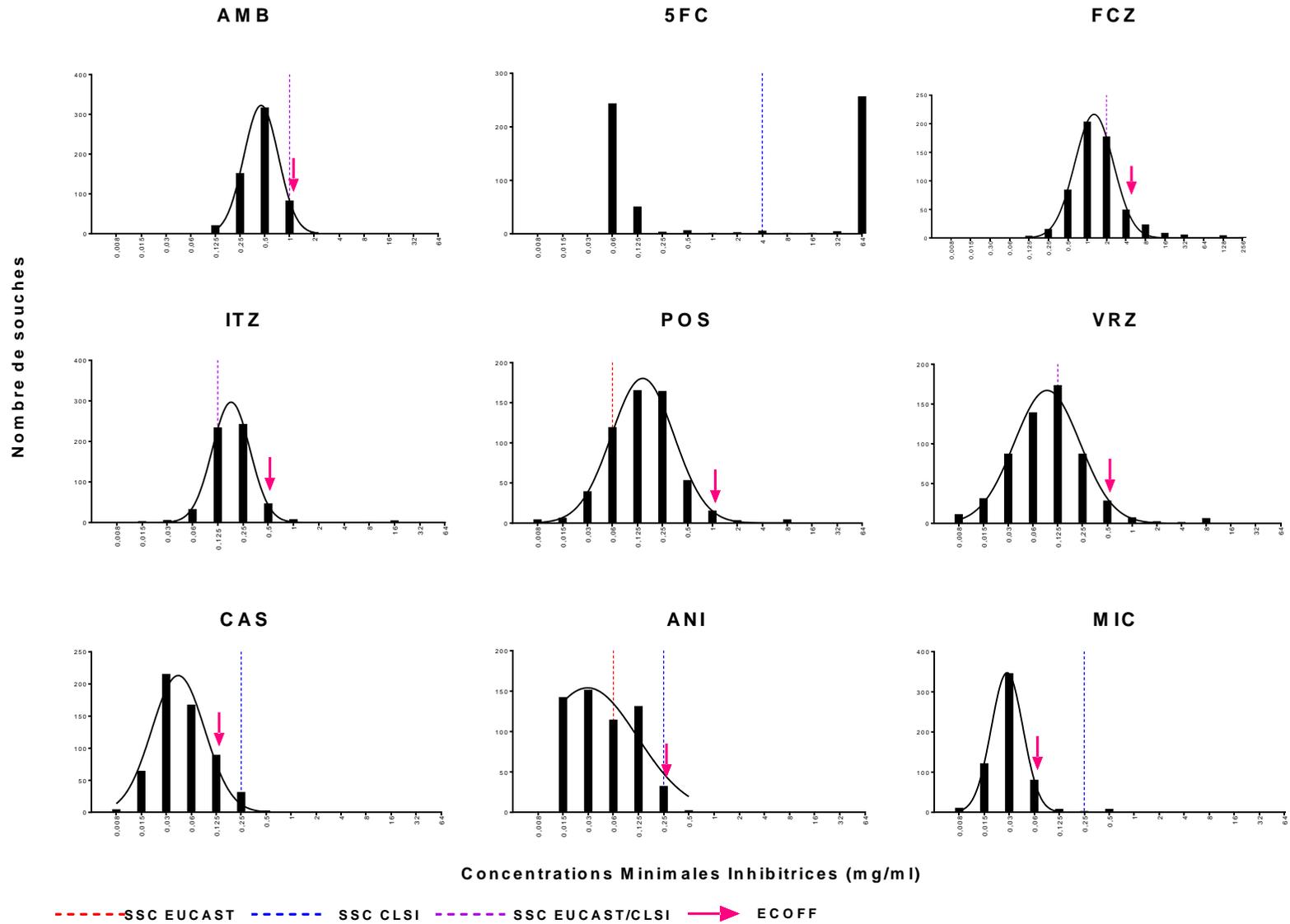


Figure A 2 : Distribution des isolats de *C. tropicalis* par antifongique en utilisant le logiciel GraphPad Prism

Candida parapsilosis

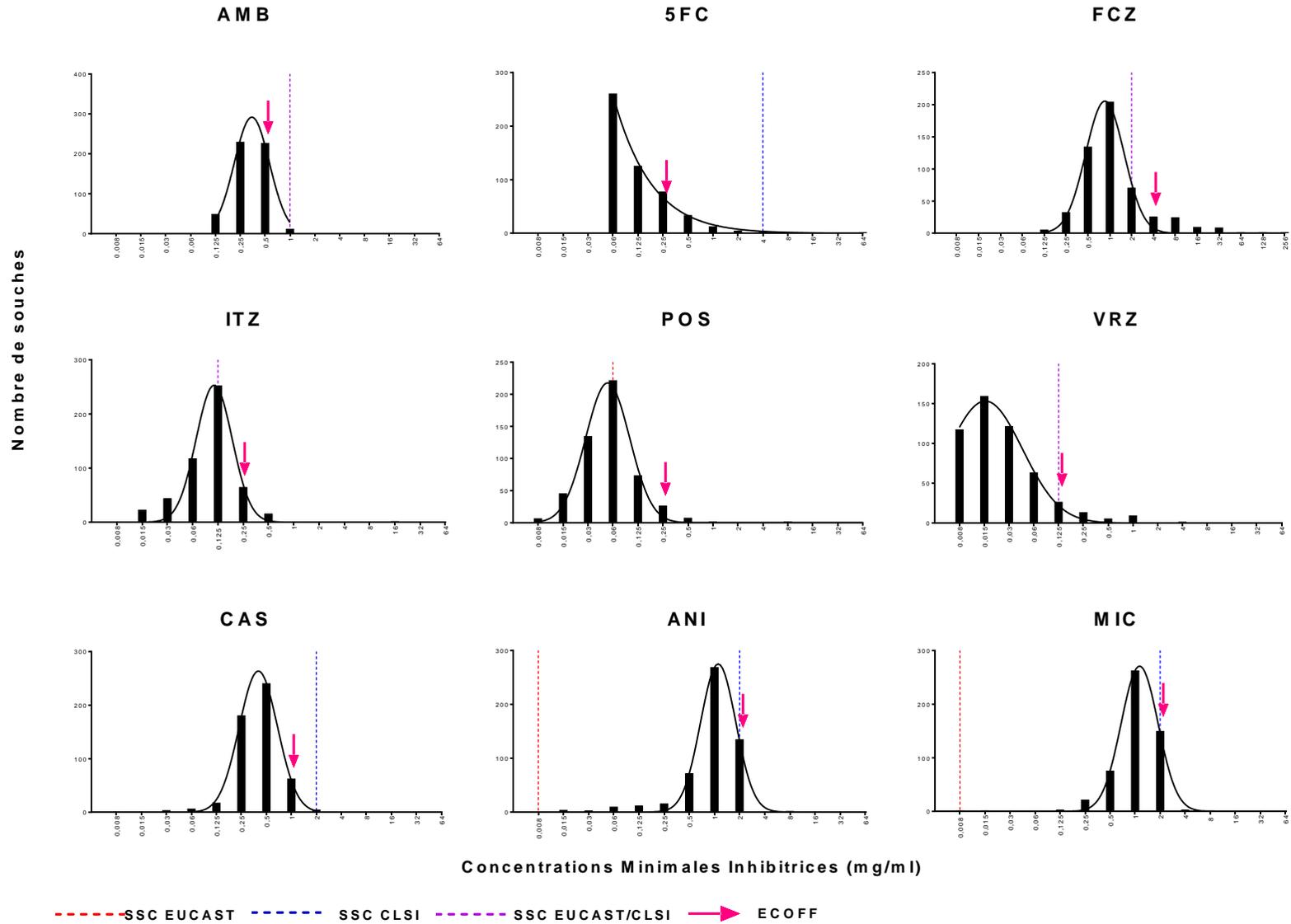


Figure A 3 : Distribution des isolats de *C. parapsilosis* par antifongique en utilisant le logiciel GraphPad Prism

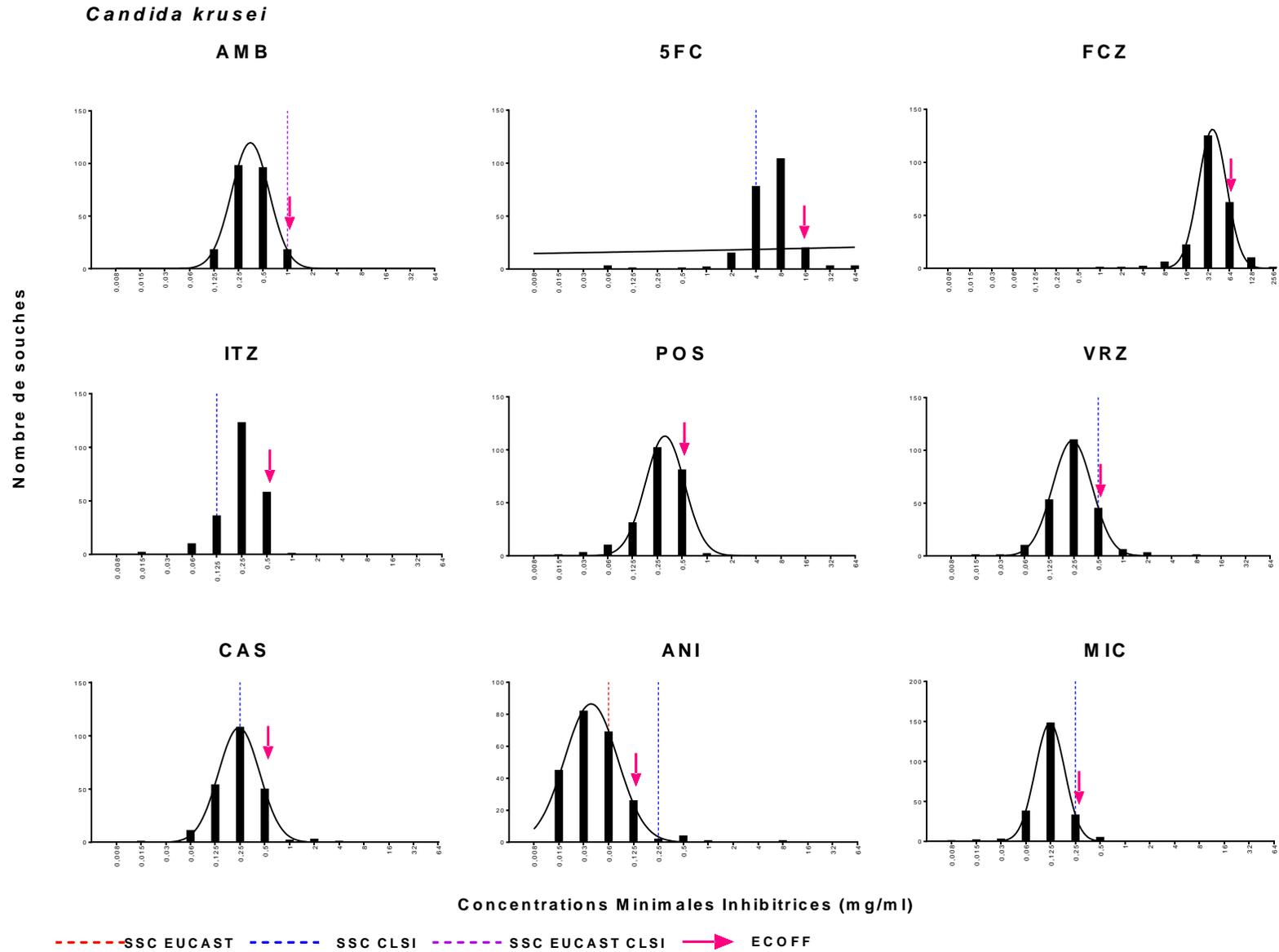


Figure A 4 : Distribution des isolats de *C. krusei* par antifongique en utilisant le logiciel GraphPad Prism

Candida kefyr

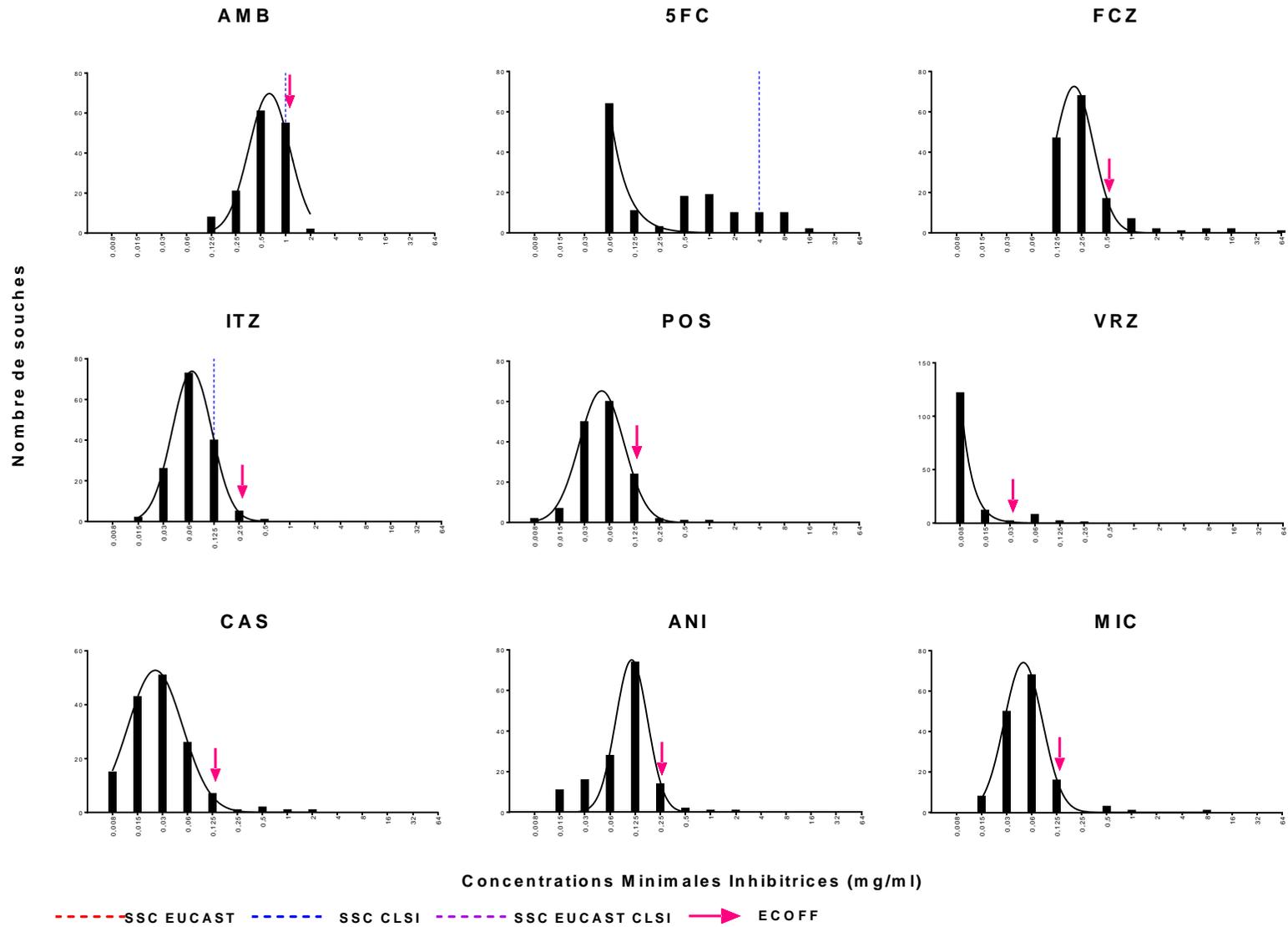


Figure A 5 : Distribution des isolats de *C. kefyr* par antifongique en utilisant le logiciel GraphPad Prism

Candida lusitaniae

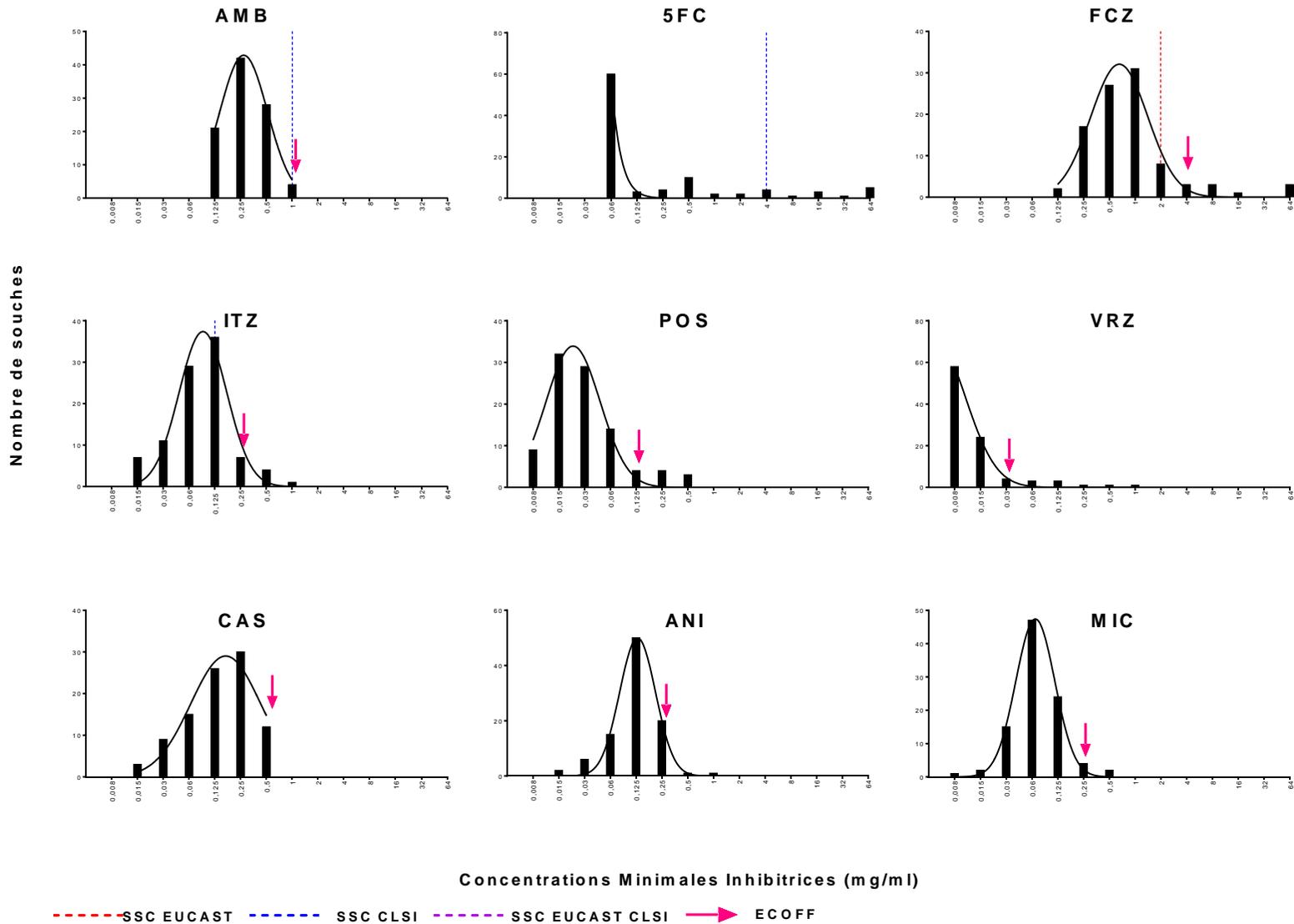


Figure A 6 : Distribution des isolats de *C. lusitaniae* par antifongique en utilisant le logiciel GraphPad Prism

Tableau A 2 : ECOFF déterminés par la méthode ECOFFinder

	<i>C. albicans</i>	<i>C. glabrata</i>	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. krusei</i>	<i>C. kefyr</i>	<i>C. lusitaniae</i>
ECOFF							
Nombre de souches	4633	819	570	512	229	147	95
Amphotéricine B	2	2	2	1	1	2	1
Flucytosine	0,25	0,25	ininterprétable	0,25	32	0,25	0,25
Anidulafungine	0,063	0,125	0,125	4	0,125	0,5	0,5
Caspofungine	0,125	0,25	0,125	2	1	0,125	1
Micafungine	0,031	0,063	4	4	0,5	0,25	0,25
Fluconazole	2	64	4	4	128	1	4
Itraconazole	0,25	2	1	0,5	1	0,25	0,5
Posaconazole	0,125	4	0,5	0,25	1	0,25	0,063
Voriconazole	0,031	1	0,5	0,063	1	0,031	0,031

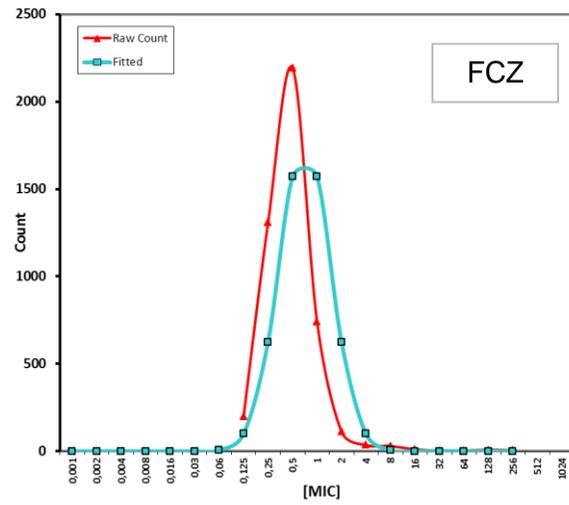
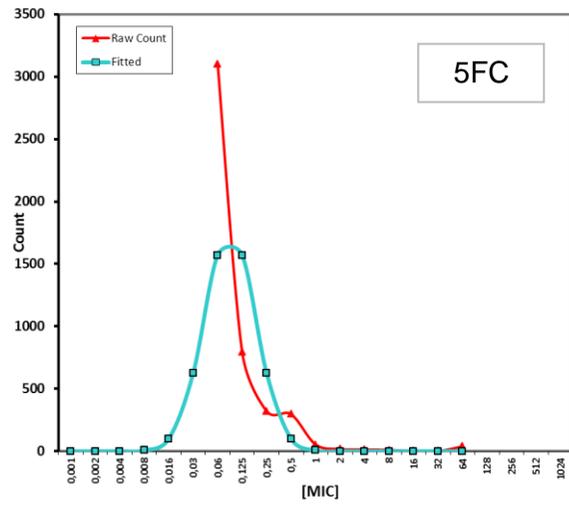
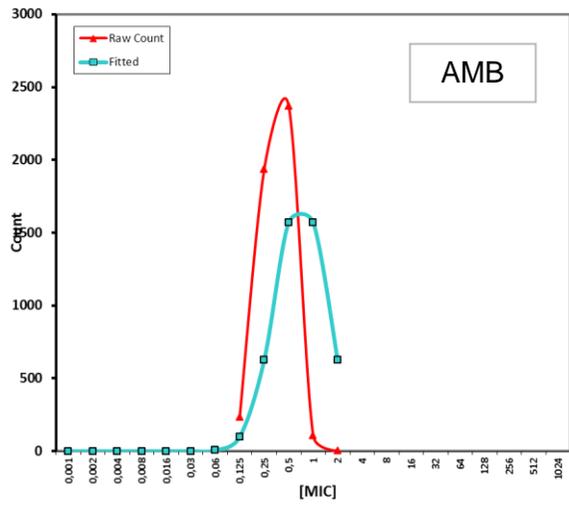
Tableau A 3 : Pourcentages de résistance déterminés en fonction des SSC du CLSI et des ECOFF déterminés par ECOFFinder

	<i>C. albicans</i>	<i>C. glabrata</i>	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. krusei</i>	<i>C. kefyr</i>	<i>C. lusitaniae</i>
% de résistance							
Nombre de souches	4633	819	570	512	229	147	95
Amphotéricine B	0,02	0,12	0,00	0,59	0,00	1,36	0,00
Flucytosine	0,84	1,22	45,61	0,20	2,62	0,00	6,32
Anidulafungine	0,26	1,59	0,00	0,20	0,87	1,36	1,05
Caspofungine	0,32	1,47	0,00	11,52	2,62	3,40	0,00
Micafungine	0,28	1,71	0,00	0,20	0,00	3,40	2,11
Fluconazole	1,27	8,67	7,19	8,40	R	5,44	7,37
Itraconazole	0,54	35,04	2,11	0,20	0,44	0,00	1,05
Posaconazole	2,57	6,47	3,86	1,76	0,00	1,36	11,58
Voriconazole	0,45	6,35	2,81	1,95	1,75	7,48	9,47

R : résistance intrinsèque

ND : non déterminé car absence de SSC

En bleu : pourcentages différents de ceux trouvés avec la méthode GraphPad Prism



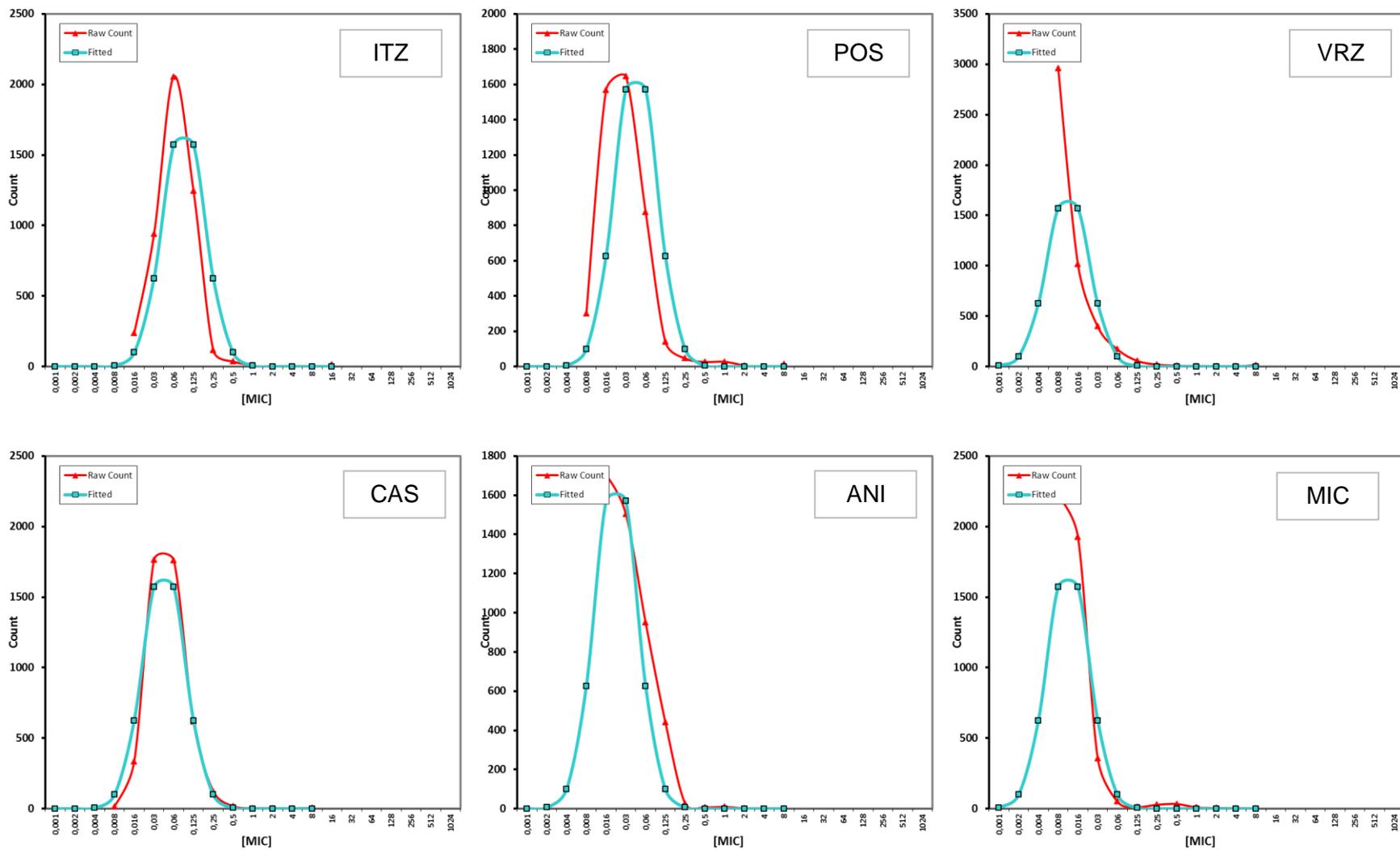
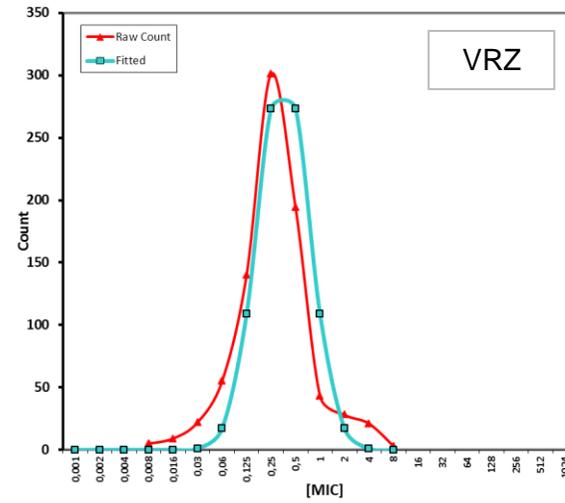
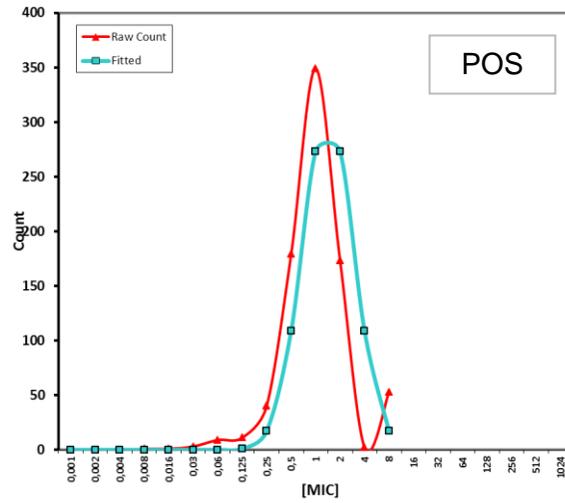
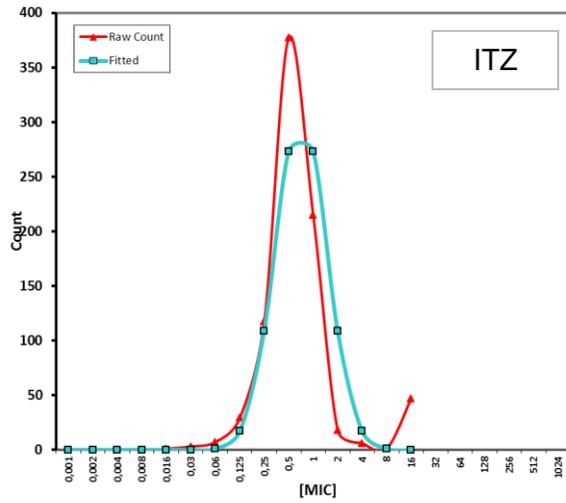
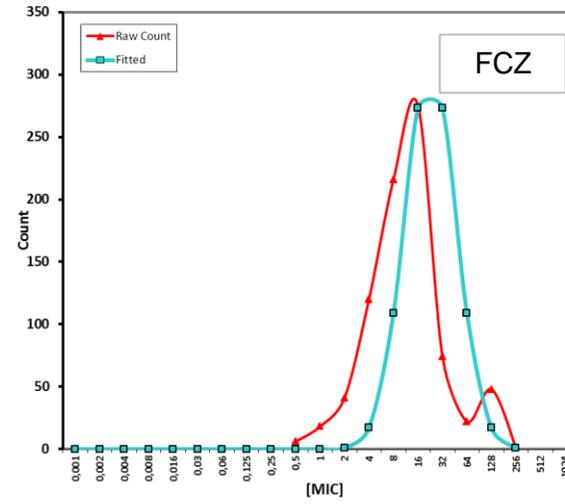
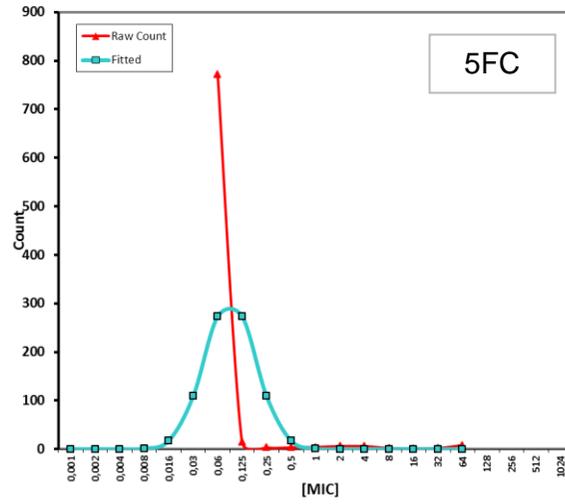
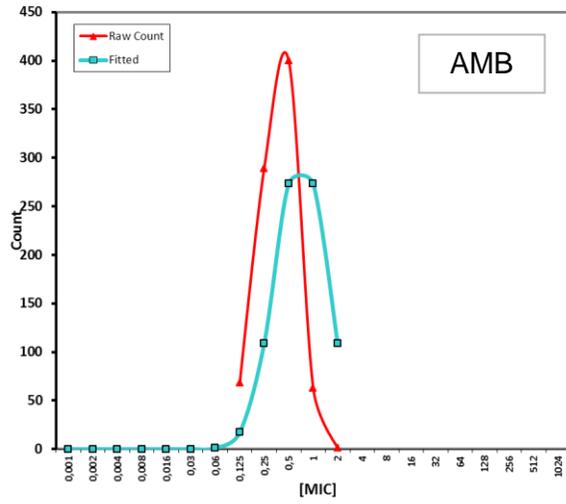


Figure A 7 : Graphiques de détermination des ECOFF par la méthode ECOFFinder chez *C. albicans* et par antifongique



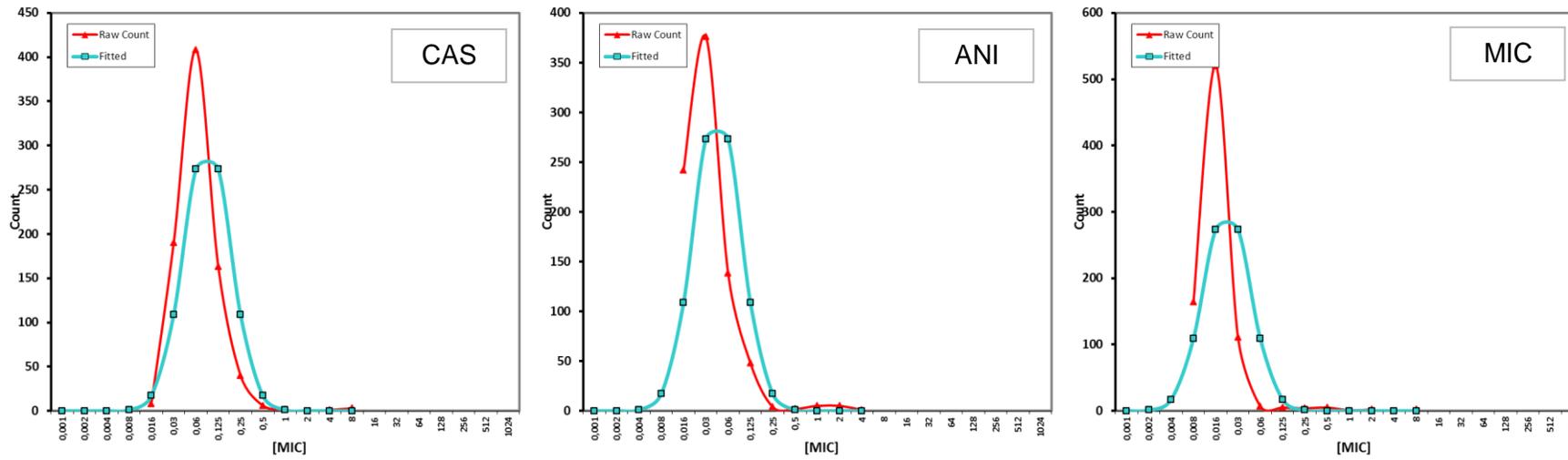
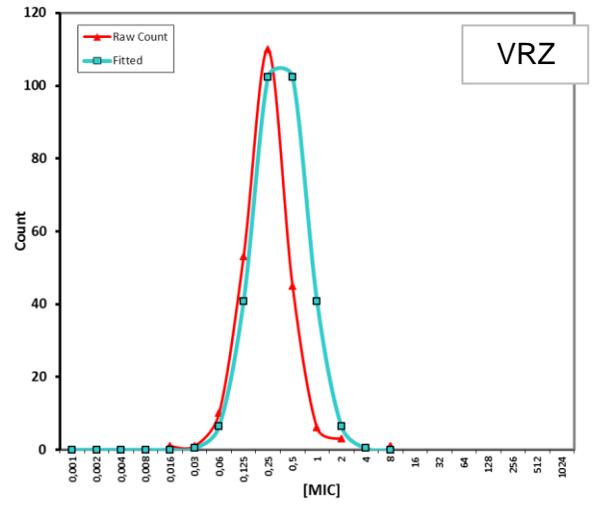
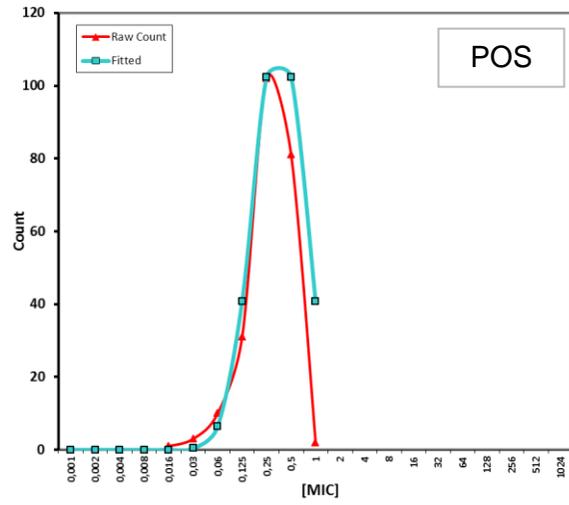
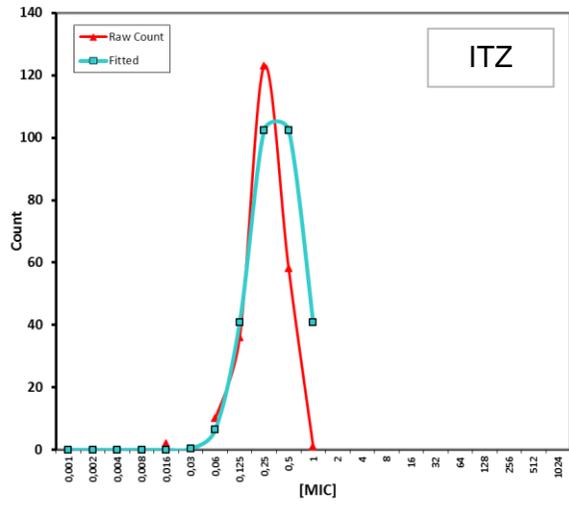
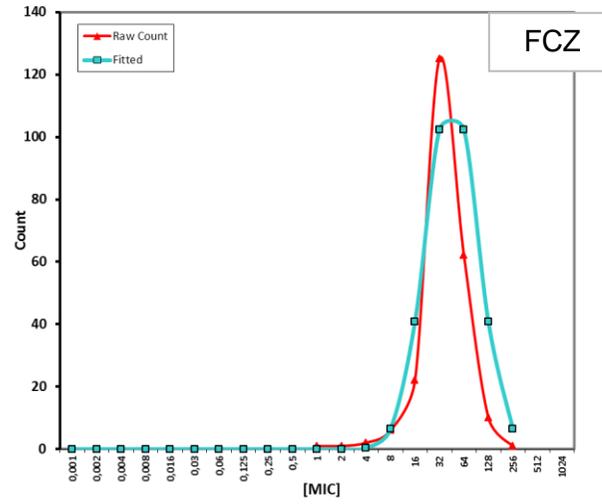
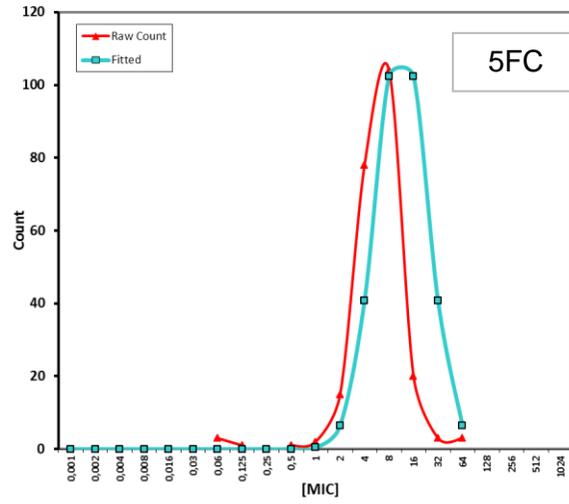
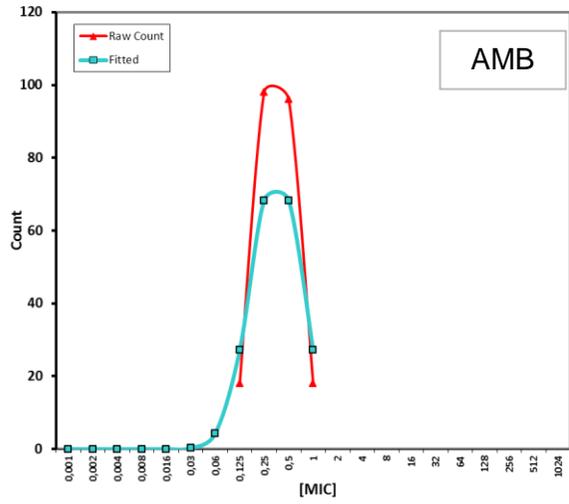


Figure A 8 : Graphiques de détermination des ECOFF par la méthode ECOFFinder chez *C. glabrata* et par antifongique



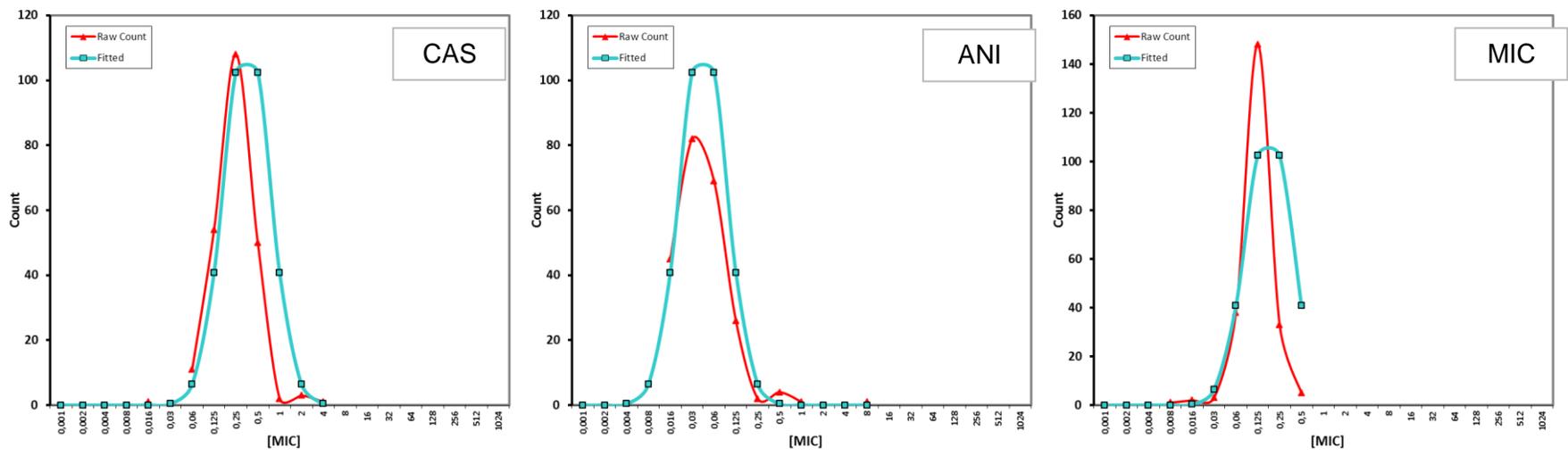


Figure A 9 : Graphiques de détermination des ECOFF par la méthode ECOFFinder chez *C. krusei* et par antifongique

Tableau A 4 : SSC utilisés pour l'interprétation des valeurs de CMI déterminées avec la méthode EUCAST

	<i>C albicans</i>		<i>C glabrata</i>		<i>C krusei</i>		<i>C parapsilosis</i>		<i>C tropicalis</i>		<i>C guilliermondii</i>	
	S≤	R>	S≤	R>	S≤	R>	S≤	R>	S≤	R>	S≤	R>
<i>Flucytosine</i>	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
EUCAST 2018	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
ECOFFs EUCAST	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
<i>Amphotericine B</i>	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	ND	ND
EUCAST 2018	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	IE	IE
ECOFFs EUCAST	1		1		1		1		1		ND	
<i>Anidulafungin</i>	0,032	0,032	0,064	0,064	0,064	0,064	0,002	4	0,064	0,064	ND	ND
EUCAST 2018	0,032	0,032	0,064	0,064	0,064	0,064	0,002	4	0,064	0,064	IE	IE
ECOFFs EUCAST	0,032		0,064		0,064		4		0,064		ND	
<i>Caspofungin</i>	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
EUCAST 2018	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	IE	IE
ECOFFs EUCAST	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
<i>Fluconazole</i>	2	4	0,002	32	128		2	4	2	4	16	
EUCAST 2018	2	4	0,002	32	-	-	2	4	2	4	IE	IE
ECOFFs EUCAST	1		32		128		2		2		16	
<i>Itraconazole</i>	0,064	0,064	2		1		0,125	0,125	0,125	0,125	2	
EUCAST 2018	0,064	0,064	IE	IE	IE	IE	0,125	0,125	0,125	0,125	IE	IE
ECOFFs EUCAST	0,064		2		1		0,125		0,125		2	
<i>Micafungin</i>	0,016	0,016	0,032	0,032	0,25		0,002	2	0,064		ND	ND
EUCAST 2018	0,016	0,016	0,032	0,032	IE	IE	0,002	2	IE	IE	IE	IE
ECOFFs EUCAST	0,016		0,032		0,25		2		0,064		ND	
<i>Posaconazole</i>	0,064	0,064	ND	ND	ND	ND	0,064	0,064	0,064	0,064	ND	ND
EUCAST 2018	0,064	0,064	IE	IE	IE	IE	0,064	0,064	0,064	0,064	IE	IE
ECOFFs EUCAST	ND		ND		ND		ND		ND		ND	
<i>Variconazole</i>	0,064	0,25	1		1		0,125	0,25	0,125	0,25	0,25	
EUCAST 2018	0,064	0,25	IE	IE	IE	IE	0,125	0,25	0,125	0,25	IE	IE
ECOFFs EUCAST	0,125		1		1		0,125		0,125		0,25	
<i>Isavuconazole</i>	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
EUCAST 2018	IE	IE	IE	IE	IE	IE	IE	IE	IE	IE	IE	IE
ECOFFs EUCAST	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND

Tableau A 5 Comparaison des CMI SYO/EUCAST par espèce et par antifongique

	AMB	5 FC	FCZ	ITZ	PCZ	VRZ	CAS	MIC	AND
<i>C. albicans</i>	0,5 / 0,125	64 / 8	1 / 0,25	0,125 / 0,06	0,125 / 0,015	0,03 / 0,008	0,06 / 0,25	0,015 / 0,008	0,015 / 0,008
	0,5 / 0,125	64 / 1	1 / 0,125	0,03 / 0,015	0,015 / 1	0,008 / 0,5	0,06 / 0,5	0,008 / 0,015	0,03 / 0,06
	0,25 / 0,125	0,125 / 0,25	2 / 1	0,125 / 0,06	8 / 8	2 / 4	0,125 / 0,5	0,03 / 0,03	0,125 / 0,125
	0,5 / 0,25	0,06 / 0,125	4 / 8	0,25 / 1	8 / 8	4 / 4	0,06 / 0,5	0,03 / 0,03	0,125 / 0,125
	0,25 / 0,25	0,06 / 0,125	0,5 / 0,125	0,125 / 0,03	2 / 0,25	0,5 / 2	0,06 / 0,5	0,015 / 0,03	0,03 / 0,06
	0,5 / 0,125	64 / 128	0,5 / 0,125	0,125 / 0,03	1 / 0,125	0,5 / 0,5	0,125 / 0,5	0,008 / 0,015	0,015 / 0,06
	1 / 0,5	64 / 32	2 / 0,5	0,5 / 0,25	0,25 / 0,03	0,03 / 0,015	1 / 2	2 / 2	1 / 2
	0,5 / 0,5	0,06 / 0,125	0,5 / 0,25	0,125 / 0,03	8 / 4	2 / 4	0,06 / 0,5	0,015 / 0,03	0,03 / 0,06
	0,5 / 0,125	0,06 / 0,125	0,5 / 0,125	0,06 / 0,03	2 / 1	1 / 0,5	0,06 / 0,5	0,03 / 0,03	0,03 / 0,06
	0,25 / 0,5	0,125 / 0,125	0,25 / 16	0,03 / 1	0,06 / 0,03	0,125 / 0,015	1 / 2	2 / 2	1 / 2
0,25 / 0,5	0,06 / 0,125	128 / 128	4 / 8	0,03 / 0,03	0,015 / 0,015	1 / 2	2 / 2	1 / 2	
0,5 / 0,5	0,06 / 0,125	256 / 128	16 / 8	8 / 4	2 / 4	0,06 / 0,5	0,008 / 0,03	0,06 / 0,125	
0,5 / 0,5	0,06 / 0,125	16 / 8	1 / 1	1 / 0,5	0,25 / 0,125	0,06 / 0,5	0,015 / 0,03	0,03 / 0,06	
0,25 / 1	0,06 / 0,125	16 / 8	1 / 0,5	0,06 / 0,03	0,03 / 0,015	1 / 2	2 / 2	2 / 2	
0,5 / 0,5	0,06 / 0,125	128 / 128	16 / 8	0,06 / 0,008	0,008 / 0,008	0,06 / 0,25	0,015 / 0,008	0,03 / 0,008	
1 / 0,5	0,06 / 0,125	16 / 8	1 / 2	2 / 1	1 / 0,5	0,125 / 1	0,015 / 0,03	0,03 / 0,125	
0,5 / 1	0,06 / 0,125	64 / 128	16 / 8	0,125 / 1	0,03 / 0,5	0,25 / 1	1 / 0,03	1 / 0,125	
0,5 / 1	0,06 / 0,125	16 / 4	1 / 1	0,125 / 0,03	1 / 1	0,25 / 2	0,5 / 0,5	0,125 / 1	
0,5 / 0,125	0,06 / 0,125	32 / 8	1 / 1	8 / 1	2 / 1	0,06 / 0,5	0,03 / 0,03	0,06 / 0,06	
0,5 / 0,25	0,06 / 0,125	64 / 32	16 / 4	1 / 2	0,5 / 1	0,25 / 0,5	0,03 / 0,03	0,06 / 0,06	
1 / 0,25	0,06 / 0,125	16 / 64	1 / 1	0,06 / 0,03	0,03 / 0,03	0,03 / 0,5	0,015 / 0,03	0,015 / 0,03	
0,5 / 0,5	0,06 / 0,125	128 / 128	16 / 8	8 / 2	4 / 4	0,06 / 0,5	0,015 / 0,03	0,03 / 0,125	
0,5 / 0,25	0,06 / 0,125	32 / 16	1 / 2	0,06 / 0,03	0,06 / 0,015	0,125 / 0,5	0,03 / 0,06	0,06 / 0,015	
0,25 / 0,125	0,06 / 0,125	16 / 32	1 / 1	2 / 1	1 / 0,25	0,03 / 0,5	0,015 / 0,03	0,015 / 0,06	
0,125 / 0,25	0,06 / 0,125	64 / 128	1 / 8	2 / 0,5	0,5 / 0,25	0,125 / 1	0,015 / 0,03	0,125 / 0,125	
0,5 / 0,5	0,06 / 0,125	16 / 16	16 / 1	0,25 / 0,03	0,125 / 0,03	0,03 / 0,5	0,06 / 0,03	0,125 / 0,03	
0,5 / 0,25	0,06 / 0,125	128 / 128	16 / 4	0,06 / 0,015	0,03 / 0,015	0,03 / 0,5	0,03 / 0,03	0,015 / 0,03	
0,25 / 0,5	0,06 / 0,125	64 / 128	8 / 8	0,25 / 0,03	0,25 / 0,06	0,5 / 1	0,03 / 0,06	0,125 / 0,03	
0,25 / 0,25	0,06 / 0,125	64 / 64	1 / 2	0,125 / 0,03	0,125 / 0,015	1 / 2	1 / 2	2 / 2	
0,5 / 0,25	0,06 / 0,125	16 / 8	1 / 1	0,06 / 0,03	0,015 / 0,015	1 / 2	2 / 4	1 / 4	
0,125 / 1	0,06 / 0,125	128 / 128	2 / 8	0,25 / 0,015	0,03 / 0,03	0,03 / 0,25	0,015 / 0,008	0,015 / 0,008	
0,5 / 0,5	0,06 / 0,125	16 / 8	1 / 1	1 / 4	2 / 4	0,06 / 1	0,015 / 0,03	0,03 / 0,125	
0,25 / 0,125	0,06 / 0,125	16 / 8	1 / 1	0,125 / 0,06	0,125 / 0,06	0,25 / 2	1 / 1	1 / 2	
0,125 / 1	4 / 0,125	1 / 16	0,25 / 1	0,25 / 0,125	0,25 / 0,5	0,25 / 1	0,25 / 0,5	0,25 / 2	
0,125 / 0,5	0,06 / 0,125	128 / 128	2 / 8	2 / 1	0,25 / 0,5	0,03 / 0,5	0,015 / 0,03	0,015 / 0,06	
0,5 / 0,25	0,06 / 0,125	128 / 64	2 / 8	0,125 / 0,03	0,06 / 0,03	0,03 / 0,5	0,015 / 0,06	0,015 / 0,125	
0,5 / 1	0,06 / 0,125	32 / 8	1 / 1	8 / 4	2 / 4	0,06 / 0,5	0,015 / 0,03	0,03 / 0,125	
0,5 / 0,5	0,06 / 0,125	128 / 128	16 / 8	8 / 4	2 / 4	0,125 / 0,5	0,015 / 0,03	0,03 / 0,125	
0,25 / 0,5	0,06 / 0,125	64 / 32	0,5 / 1	0,25 / 0,015	0,125 / 0,03	0,03 / 0,5	0,03 / 0,03	0,03 / 0,008	
0,5 / 0,5	0,06 / 0,125	16 / 32	1 / 4	0,06 / 0,03	0,03 / 0,06	0,06 / 0,5	0,03 / 0,03	0,03 / 0,008	
0,25 / 0,06	0,06 / 0,125	16 / 8	1 / 1	0,25 / 0,015	0,06 / 0,015	1 / 2	4 / 2	1 / 0,125	
0,25 / 0,25	0,06 / 0,125	32 / 16	1 / 1	1 / 2	1 / 4	0,25 / 0,5	0,015 / 0,03	0,06 / 0,125	
0,25 / 0,25	0,06 / 0,125	128 / 128	16 / 8	1 / 1	0,5 / 0,25	0,06 / 0,5	0,015 / 0,03	0,015 / 0,125	
0,25 / 0,25	0,06 / 0,125	128 / 128	16 / 8	8 / 8	4 / 8	0,06 / 0,5	0,015 / 0,06	0,015 / 0,125	
0,5 / 0,25	0,06 / 0,125	16 / 16	1 / 1	2 / 0,5	1 / 0,5	0,125 / 0,5	0,008 / 0,03	0,03 / 0,06	
0,125 / 0,25	0,06 / 0,125	8 / 2	0,5 / 0,25	0,5 / 0,5	0,125 / 0,125	0,06 / 0,5	0,015 / 0,03	0,015 / 0,06	
0,25 / 0,5	0,06 / 0,125	128 / 128	16 / 8	2 / 0,5	0,5 / 0,25	0,06 / 0,5	0,03 / 0,03	0,03 / 0,125	
0,25 / 0,5	0,06 / 0,125	16 / 8	1 / 1	0,25 / 1	0,008 / 0,5	0,25 / 0,5	0,5 / 0,03	2 / 0,06	
0,25 / 0,25	0,06 / 0,125	128 / 128	16 / 8	8 / 2	4 / 4	0,06 / 0,5	0,03 / 0,03	0,03 / 0,06	
<i>C. guilliermondii</i>	0,25 / 0,5	0,06 / 0,125	16 / 32	0,5 / 0,5	0,06 / 0,015	0,06 / 0,015	0,015 / 0,5	0,03 / 0,03	0,03 / 0,06
	0,5 / 0,25	0,06 / 0,125	128 / 64	2 / 0,5	2 / 4	2 / 2	0,125 / 0,5	0,015 / 0,03	0,03 / 0,06
	0,25 / 0,125	0,06 / 0,125	32 / 8	1 / 0,5	2 / 0,5	0,5 / 0,25	0,125 / 0,5	0,03 / 0,03	0,03 / 0,06
	1 / 0,125	0,06 / 0,125	128 / 4	1 / 1	0,125 / 0,03	0,25 / 0,25	0,5 / 2	1 / 4	1 / 4
<i>C. krusei</i>	0,25 / 1	4 / 2	128 / 128	1 / 1	0,125 / 0,03	0,06 / 0,03	0,125 / 0,5	0,03 / 0,06	0,06 / 0,03
	0,5 / 0,5	8 / 4	64 / 32	0,25 / 0,25	8 / 4	4 / 4	0,25 / 1	0,015 / 0,03	0,06 / 0,125
<i>C. parapsilosis</i>	0,25 / 0,5	1 / 0,125	1 / 0,5	0,25 / 0,06	1 / 1	2 / 1	0,25 / 0,5	0,008 / 0,03	0,03 / 0,125
	0,125 / 2	0,25 / 0,125	2 / 0,25	0,125 / 0,25	1 / 2	0,5 / 1	0,06 / 0,5	0,015 / 0,03	0,03 / 0,06
	0,5 / 1	0,125 / 0,125	0,5 / 0,25	0,06 / 0,06	0,03 / 0,015	0,008 / 0,008	8 / 4	4 / 4	0,5 / 1
	0,5 / 0,5	0,5 / 0,125	1 / 0,5	0,125 / 0,06	0,25 / 0,03	0,25 / 0,03	0,25 / 1	0,5 / 1	1 / 1
	0,25 / 0,125	64 / 0,125	2 / 16	0,25 / 4	0,06 / 0,03	0,03 / 0,015	1 / 2	2 / 2	2 / 2
	0,5 / 0,25	0,5 / 1	128 / 128	0,25 / 0,06	1 / 1	0,5 / 0,25	0,06 / 0,5	0,015 / 0,03	0,03 / 0,06
	0,5 / 0,5	0,5 / 0,125	2 / 0,5	0,25 / 0,25	2 / 1	1 / 0,5	0,03 / 0,5	0,015 / 0,03	0,015 / 0,06
	0,5 / 1	0,06 / 0,125	0,5 / 0,5	0,125 / 0,125	8 / 8	2 / 2	0,06 / 0,5	0,008 / 0,03	0,03 / 0,06
	0,25 / 0,25	0,06 / 0,125	8 / 1	0,125 / 0,25	0,25 / 0,25	8 / 8	0,125 / 1	0,06 / 0,25	0,03 / 0,125
	0,5 / 0,125	2 / 0,5	2 / 0,5	0,5 / 0,125	8 / 8	4 / 4	0,25 / 0,5	0,015 / 0,03	0,03 / 0,125
	0,25 / 1	0,06 / 0,125	32 / 16	0,25 / 0,25	1 / 1	0,5 / 0,25	0,06 / 0,5	0,015 / 0,03	0,03 / 0,06
	0,25 / 0,25	0,06 / 0,125	16 / 1	0,5 / 0,25	0,5 / 0,5	8 / 4	0,125 / 0,5	0,06 / 0,015	0,125 / 0,125
	0,5 / 0,5	0,25 / 0,125	1 / 0,5	0,125 / 0,25	0,5 / 0,125	0,125 / 0,06	1 / 4	0,03 / 0,125	0,25 / 1
	0,5 / 0,25	0,06 / 0,125	8 / 1	0,5 / 0,25	0,03 / 0,5	0,06 / 0,06	0,03 / 0,5	0,015 / 0,03	0,03 / 0,03
0,5 / 0,5	0,06 / 0,125	8 / 4	0,125 / 0,125	0,5 / 0,06	0,25 / 0,125	0,125 / 0,5	0,03 / 0,03	0,125 / 0,015	
0,125 / 0,5	0,06 / 0,125	8 / 16	0,125 / 0,5	0,5 / 0,03	0,125 / 0,03	0,25 / 1	0,5 / 1	0,125 / 0,5	
<i>C. tropicalis</i>	0,5 / 0,25	64 / 32	1 / 64	0,125 / 0,125	1 / 0,125	2 / 0,5	0,5 / 2	1 / 2	2 / 2
	0,5 / 0,25	64 / 16	1 / 0,25	0,125 / 0,06	8 / 8	8 / 8	0,125 / 0,5	0,015 / 0,03	0,03 / 0,06
	0,5 / 0,5	64 / 16	2 / 0,5	0,25 / 0,06	0,5 / 2	0,25 / 0,25	0,06 / 0,5	0,03 / 0,03	0,015 / 0,06
	0,25 / 0,25	64 / 32	0,5 / 0,125	0,125 / 0,06	1 / 0,125	1 / 0,25	0,25 / 2	0,5 / 2	2 / 2
	0,5 / 0,5	64 / 32	2 / 1	0,25 / 0,06	2 / 1	0,5 / 0,5	0,03 / 0,5	0,015 / 0,03	0,015 / 0,06
	0,5 / 0,5	64 / 32	1 / 0,25	0,25 / 0,125	0,06 / 0,015	0,5 / 0,25	0,25 / 2	1 / 2	1 / 2
	0,5 / 0,25	64 / 16	1 / 0,25	0,25 / 0,03	0,06 / 0,008	0,015 / 0,008	0,03 / 0,25	0,015 / 0,008	0,03 / 0,008
	0,5 / 0,5	64 / 32	1 / 1	0,125 / 0,125	2 / 0,125	4 / 0,25	0,5 / 2	2 / 0,5	1 / 2
	0,25 / 0,5	64 / 32	1 / 0,125	0,125 / 0,03	0,25 / 0,03	0,125 / 0,03	0,03 / 0,5	0,03 / 0,03	0,03 / 0,03
	0,5 / 1	64 / 32	1 / 0,25	0,25 / 0,03	0,03 / 0,015	0,008 / 0,008	0,03 / 0,5	0,03 / 0,015	0,015 / 0,015
	1 / 0,25	0,125 / 0,125	128 / 128	1 / 0,125	0,125 / 0,125	0,125 / 0,25	0,5 / 2	1 / 2	0,5 / 2
	0,25 / 0,25	64 / 32	0,5 / 128	0,125 / 0,03	0,25 / 0,015	0,5 / 0,03	0,125 / 0,5	0,03 / 0,03	0,125 / 0,015
	0,5 / 0,25	64 / 16	8 / 4	0,25 / 0,25	0,25 / 0,03	0,25 / 0,06	0,5 / 0,5	0,03 / 0,06	0,25 / 0,03

DEMANDE D'AUTORISATION DE SOUTENANCE

Nom et Prénom de l'étudiant : LE Vicky INE : 1503021862 R

Date, heure et lieu de soutenance :

Le

<u>15</u>	<u>06</u>	<u>20</u>
jour	mois	année

 à 18 h 15 Amphithéâtre ou salle : UR1E

Engagement de l'étudiant - Charte de non-plagiat

J'atteste sur l'honneur que tout contenu qui n'est pas explicitement présenté comme une citation est un contenu personnel et original.

Signature de l'étudiant :



Avis du directeur de thèse

Nom : LORIDANT

Prénom : Silviane

Favorable

Défavorable

Motif de l'avis défavorable :

Date : 31/03/2020

Signature: 

Avis du président du jury

Nom : ALLORGE

Prénom : Delphine

Favorable

Défavorable

Motif de l'avis défavorable :

Date : 01/04/2020

Signature: 

Décision du Doyen

Favorable

Défavorable

Le Doyen

B. DÉCAUDIN

NB : La faculté n'entend donner aucune approbation ou improbation aux opinions émises dans les thèses, qui doivent être regardées comme propres à leurs auteurs.

NW/2018

Bibliographie

1. Kullberg BJ, Arendrup MC. Invasive Candidiasis. *N Engl J Med.* 8 oct 2015;373(15):1445-56.
2. Pfaller MA, Castanheira M. Nosocomial Candidiasis: Antifungal Stewardship and the Importance of Rapid Diagnosis. *Med Mycol.* janv 2016;54(1):1-22.
3. Suleyman G, Alangaden GJ. Nosocomial Fungal Infections: Epidemiology, Infection Control, and Prevention. *Infect Dis Clin North Am.* 2016;30(4):1023-52.
4. Rafik A, Diouri M, Bahechar N, Chlihi A. Epidemiology of nosocomial fungal infections in the National Center for Burns in Casablanca, Morocco. *Ann Burns Fire Disasters.* 30 juin 2016;29(2):90-3.
5. Morrell M, Fraser VJ, Kollef MH. Delaying the Empiric Treatment of Candida Bloodstream Infection until Positive Blood Culture Results Are Obtained: a Potential Risk Factor for Hospital Mortality. *Antimicrob Agents Chemother.* sept 2005;49(9):3640-5.
6. ANOFEL [Internet]. [cité 24 mars 2020]. Disponible sur: <http://campus.cerimes.fr/parasitologie/enseignement/candidoses/site/html/4.html>
7. Haute Autorité de santé. Actualisation des actes de biologie médicale relatifs au diagnostic des candidoses invasives. 2017 p. 123.
8. Pitarch* A, Gil CN and C. Diagnosis of Invasive Candidiasis: From Gold Standard Methods to Promising Leading-edge Technologies [Internet]. *Current Topics in Medicinal Chemistry.* 2018 [cité 19 sept 2019]. Disponible sur: <http://www.eurekaselect.com/166604/article>
9. Cleveland AA, Harrison LH, Farley MM, Hollick R, Stein B, Chiller TM, et al. Declining incidence of candidemia and the shifting epidemiology of Candida resistance in two US metropolitan areas, 2008-2013: results from population-based surveillance. *PloS One.* 2015;10(3):e0120452.
10. Kollef M, Micek S, Hampton N, Doherty JA, Kumar A. Septic Shock Attributed to Candida Infection: Importance of Empiric Therapy and Source Control. *Clin Infect Dis.* 15 juin 2012;54(12):1739-46.
11. Cornely OA, Bassetti M, Calandra T, Garbino J, Kullberg BJ, Lortholary O, et al. ESCMID* *This guideline was presented in part at ECCMID 2011. European Society for Clinical Microbiology and Infectious Diseases. guideline for the diagnosis and management of Candida diseases 2012: non-neutropenic adult patients. *Clin Microbiol Infect.* 1 déc 2012;18:19-37.
12. Pappas PG, Kauffman CA, Andes DR, Clancy CJ, Marr KA, Ostrosky-Zeichner L, et al. Clinical Practice Guideline for the Management of Candidiasis: 2016 Update by the Infectious Diseases Society of America. *Clin Infect Dis.* 15 févr 2016;62(4):e1-50.
13. Bougnoux M-E, Kac G, Aegerter P, d'Enfert C, Fagon J-Y, CandiRea Study Group. Candidemia and candiduria in critically ill patients admitted to intensive

care units in France: incidence, molecular diversity, management and outcome. *Intensive Care Med.* 1 févr 2008;34(2):292-9.

14. Pfaller MA, Diekema DJ. Epidemiology of invasive candidiasis: a persistent public health problem. *Clin Microbiol Rev.* janv 2007;20(1):133-63.
15. Puig-Asensio M, Padilla B, Garnacho-Montero J, Zaragoza O, Aguado JM, Zaragoza R, et al. Epidemiology and predictive factors for early and late mortality in *Candida* bloodstream infections: a population-based surveillance in Spain. *Clin Microbiol Infect Off Publ Eur Soc Clin Microbiol Infect Dis.* avr 2014;20(4):O245-254.
16. Cleveland AA, Farley MM, Harrison LH, Stein B, Hollick R, Lockhart SR, et al. Changes in incidence and antifungal drug resistance in candidemia: results from population-based laboratory surveillance in Atlanta and Baltimore, 2008-2011. *Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am.* 15 nov 2012;55(10):1352-61.
17. Meyer E, Geffers C, Gastmeier P, Schwab F. No increase in primary nosocomial candidemia in 682 German intensive care units during 2006 to 2011. *Euro Surveill Bull Eur Sur Mal Transm Eur Commun Dis Bull.* 13 juin 2013;18(24).
18. Wisplinghoff H, Ebbers J, Geurtz L, Stefanik D, Major Y, Edmond MB, et al. Nosocomial bloodstream infections due to *Candida* spp. in the USA: species distribution, clinical features and antifungal susceptibilities. *Int J Antimicrob Agents.* janv 2014;43(1):78-81.
19. Pappas PG, Lionakis MS, Arendrup MC, Ostrosky-Zeichner L, Kullberg BJ. Invasive candidiasis. *Nat Rev Dis Primer.* 11 2018;4:18026.
20. Ruhnke M, Schwartz S. Recent developments in the management of invasive fungal infections in patients with oncohematological diseases. *Ther Adv Hematol.* déc 2016;7(6):345-59.
21. Pfaller MA, Diekema DJ, Turnidge JD, Castanheira M, Jones RN. Twenty Years of the SENTRY Antifungal Surveillance Program: Results for *Candida* Species From 1997-2016. *Open Forum Infect Dis.* mars 2019;6(Suppl 1):S79-94.
22. Montagna MT, Lovero G, Borghi E, Amato G, Andreoni S, Campion L, et al. Candidemia in intensive care unit: a nationwide prospective observational survey (GISIA-3 study) and review of the European literature from 2000 through 2013. *Eur Rev Med Pharmacol Sci.* 2014;18(5):661-74.
23. Arendrup MC. Epidemiology of invasive candidiasis. *Curr Opin Crit Care.* oct 2010;16(5):445-52.
24. Quindós G. Epidemiology of candidaemia and invasive candidiasis. A changing face. *Rev Iberoam Micol.* mars 2014;31(1):42-8.
25. Fridkin SK. The changing face of fungal infections in health care settings. *Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am.* 15 nov 2005;41(10):1455-60.
26. Lamoth F, Lockhart SR, Berkow EL, Calandra T. Changes in the epidemiological landscape of invasive candidiasis. *J Antimicrob Chemother.* 01 2018;73(suppl_1):i4-13.

27. Vasilyeva NV, Raush ER, Rudneva MV, Bogomolova TS, Taraskina AE, Fang Y, et al. Etiology of invasive candidosis agents in Russia: a multicenter epidemiological survey. *Front Med.* févr 2018;12(1):84-91.
28. Govender NP, Patel J, Magobo RE, Naicker S, Wadula J, Whitelaw A, et al. Emergence of azole-resistant *Candida parapsilosis* causing bloodstream infection: results from laboratory-based sentinel surveillance in South Africa. *J Antimicrob Chemother.* 2016;71(7):1994-2004.
29. Pfaller MA, Moet GJ, Messer SA, Jones RN, Castanheira M. *Candida* bloodstream infections: comparison of species distributions and antifungal resistance patterns in community-onset and nosocomial isolates in the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program, 2008-2009. *Antimicrob Agents Chemother.* févr 2011;55(2):561-6.
30. Garey KW, Rege M, Pai MP, Mingo DE, Suda KJ, Turpin RS, et al. Time to initiation of fluconazole therapy impacts mortality in patients with candidemia: a multi-institutional study. *Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am.* 1 juill 2006;43(1):25-31.
31. Tracking *Candida auris* | *Candida auris* | Fungal Diseases | CDC [Internet]. 2020 [cité 14 juin 2020]. Disponible sur: <https://www.cdc.gov/fungal/candida-auris/tracking-c-auris.html>
32. Friedman DZP, Schwartz IS. Emerging Fungal Infections: New Patients, New Patterns, and New Pathogens. *J Fungi.* sept 2019;5(3):67.
33. Rhodes J, Fisher MC. Global epidemiology of emerging *Candida auris*. *Curr Opin Microbiol.* 1 déc 2019;52:84-9.
34. Lockhart SR, Etienne KA, Vallabhaneni S, Farooqi J, Chowdhary A, Govender NP, et al. Simultaneous Emergence of Multidrug-Resistant *Candida auris* on 3 Continents Confirmed by Whole-Genome Sequencing and Epidemiological Analyses. *Clin Infect Dis.* 15 janv 2017;64(2):134-40.
35. Colombo AL, Júnior JN de A, Guinea J. Emerging multidrug-resistant *Candida* species. *Curr Opin Infect Dis.* déc 2017;30(6):528-38.
36. Tortorano AM, Kibbler C, Peman J, Bernhardt H, Klingspor L, Grillot R. *Candidaemia* in Europe: epidemiology and resistance. *Int J Antimicrob Agents.* 1 mai 2006;27(5):359-66.
37. Klingspor L, Tortorano AM, Peman J, Willinger B, Hamal P, Sendid B, et al. Invasive *Candida* infections in surgical patients in intensive care units: a prospective, multicentre survey initiated by the European Confederation of Medical Mycology (ECMM) (2006–2008). *Clin Microbiol Infect.* 1 janv 2015;21(1):87.e1-87.e10.
38. Honderlick P, Gravisse J, Cahen P, Vignon D. Y a-t-il un changement perceptible dans l'écologie des *Candida* species responsables de fungémie? Observation de 2000 à 2006 à l'hôpital Foch. *Pathol Biol.* 1 déc 2007;55(10):531-3.

39. Lortholary O, Renaudat C, Sitbon K, Madec Y, Denoeud-Ndam L, Wolff M, et al. Worrysome trends in incidence and mortality of candidemia in intensive care units (Paris area, 2002-2010). *Intensive Care Med.* sept 2014;40(9):1303-12.
40. Martin D, Persat F, Piens M-A, Picot S. *Candida* species distribution in bloodstream cultures in Lyon, France, 1998–2001. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 1 mai 2005;24(5):329-33.
41. Sendid B, Cotteau A, François N, D’Haveloose A, Standaert A, Camus D, et al. Candidaemia and antifungal therapy in a French University Hospital: rough trends over a decade and possible links. *BMC Infect Dis.* 2 mai 2006;6(1):80.
42. Thierry G, Morio F, Le Pape P, Gay-Andrieu F, Barre O, Miegerville M. Prévalence de *Candida parapsilosis*, *C. orthopsilosis* et de *C. metapsilosis* au sein des candidémies au CHU de Nantes et profil de sensibilité aux échinocandines par la méthode E-test® : étude rétrospective de cinq ans (2004–2009). *Pathol Biol.* 1 févr 2011;59(1):52-6.
43. Leroy O, Gangneux J-P, Montravers P, Mira J-P, Gouin F, Sollet J-P, et al. Epidemiology, management, and risk factors for death of invasive *Candida* infections in critical care: A multicenter, prospective, observational study in France (2005–2006). *Read Online Crit Care Med Soc Crit Care Med.* mai 2009;37(5):1612–1618.
44. Harbarth S, Ferrière K, Hugonnet S, Ricou B, Suter P, Pittet D. Epidemiology and Prognostic Determinants of Bloodstream Infections in Surgical Intensive Care. *Arch Surg.* 1 déc 2002;137(12):1353-9.
45. Charles P-E, Large A, Quenot J-P, Dalle F. Épidémiologie des candidoses invasives en France. *Réanimation.* 1 mai 2016;25(2):37-43.
46. Hoffmann C, Dollive S, Grunberg S, Chen J, Li H, Wu GD, et al. Archaea and fungi of the human gut microbiome: correlations with diet and bacterial residents. *PloS One.* 2013;8(6):e66019.
47. van de Wijkert JHHM, Borgdorff H, Verhelst R, Crucitti T, Francis S, Verstraelen H, et al. The vaginal microbiota: what have we learned after a decade of molecular characterization? *PloS One.* 2014;9(8):e105998.
48. Neville BA, d’Enfert C, Bougnoux M-E. *Candida albicans* commensalism in the gastrointestinal tract. *FEMS Yeast Res.* nov 2015;15(7).
49. Arendrup MC. *Candida* and candidaemia. Susceptibility and epidemiology. *Dan Med J.* nov 2013;60(11):B4698.
50. Arendrup MC, Sulim S, Holm A, Nielsen L, Nielsen SD, Knudsen JD, et al. Diagnostic issues, clinical characteristics, and outcomes for patients with fungemia. *J Clin Microbiol.* sept 2011;49(9):3300-8.
51. Rapport CNRMA 2018 [Internet]. [cité 14 juin 2020]. Disponible sur: <https://www.pasteur.fr/fr/file/21115/download>

52. Lortholary O, Renaudat C, Sitbon K, Desnos-Ollivier M, Bretagne S, Dromer F. The risk and clinical outcome of candidemia depending on underlying malignancy. *Intensive Care Med.* 2017;43(5):652-62.
53. Poissy J, Damonti L, Bignon A, Khanna N, Von Kietzell M, Boggian K, et al. Risk factors for candidemia: a prospective matched case-control study. *Crit Care* [Internet]. 18 mars 2020 [cité 14 juin 2020];24. Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7081522/>
54. Pittet D, Monod M, Suter PM, Frenk E, Auckenthaler R. Candida colonization and subsequent infections in critically ill surgical patients. *Ann Surg.* déc 1994;220(6):751-8.
55. Eggimann P, Pittet D. Candida colonization index and subsequent infection in critically ill surgical patients: 20 years later. *Intensive Care Med.* oct 2014;40(10):1429-48.
56. León C, Ruiz-Santana S, Saavedra P, Almirante B, Nolla-Salas J, Alvarez-Lerma F, et al. A bedside scoring system (« Candida score ») for early antifungal treatment in nonneutropenic critically ill patients with Candida colonization. *Crit Care Med.* mars 2006;34(3):730-7.
57. León C, Ruiz-Santana S, Saavedra P, Galván B, Blanco A, Castro C, et al. Usefulness of the « Candida score » for discriminating between Candida colonization and invasive candidiasis in non-neutropenic critically ill patients: a prospective multicenter study. *Crit Care Med.* mai 2009;37(5):1624-33.
58. Dupont H, Bourichon A, Paugam-Burtz C, Mantz J, Desmots J-M. Can yeast isolation in peritoneal fluid be predicted in intensive care unit patients with peritonitis? *Crit Care Med.* mars 2003;31(3):752-7.
59. Eggimann P, Bille J, Marchetti O. Diagnosis of invasive candidiasis in the ICU. *Ann Intensive Care.* 1 sept 2011;1:37.
60. Charles PE, Castro C, Ruiz-Santana S, León C, Saavedra P, Martín E. Serum procalcitonin levels in critically ill patients colonized with Candida spp: new clues for the early recognition of invasive candidiasis? *Intensive Care Med.* déc 2009;35(12):2146-50.
61. Falcone M, Concia E, Iori I, Lo Cascio G, Mazzone A, Pea F, et al. Identification and management of invasive mycoses in internal medicine: a road-map for physicians. *Intern Emerg Med.* août 2014;9(5):501-11.
62. Donnelly JP, Chen SC, Kauffman CA, Steinbach WJ, Baddley JW, Verweij PE, et al. Revision and Update of the Consensus Definitions of Invasive Fungal Disease From the European Organization for Research and Treatment of Cancer and the Mycoses Study Group Education and Research Consortium. *Clin Infect Dis* [Internet]. [cité 15 juin 2020]; Disponible sur: <https://academic.oup.com/cid/advance-article/doi/10.1093/cid/ciz1008/5645434>
63. Peripheral blood monocytes with ingested yeast cells (May Grünwald... | Download Scientific Diagram [Internet]. [cité 14 juin 2020]. Disponible sur: https://www.researchgate.net/figure/Peripheral-blood-monocytes-with-ingested-yeast-cells-May-Gruenwald-Giemsa-1000_fig13_49845677

64. Lung biopsy stained by methenamine silver (Gomori-Grocott) [Internet]. ResearchGate. [cité 14 juin 2020]. Disponible sur: https://www.researchgate.net/figure/Lung-biopsy-stained-by-methenamine-silver-Gomori-Grocott-illustrating-large-yeast-cells_fig4_333155901
65. Examen microscopique après coloration de Gram montrant des levures... | Download Scientific Diagram [Internet]. [cité 14 juin 2020]. Disponible sur: https://www.researchgate.net/figure/Examen-microscopique-apres-coloration-de-Gram-montrant-des-levures-bourgeonnantes-avec_fig2_313462887
66. Freydiere AM, Guinet R, Boiron P. Yeast identification in the clinical microbiology laboratory: phenotypical methods. *Med Mycol.* févr 2001;39(1):9-33.
67. Yera H, Poulain D, Lefebvre A, Camus D, Sendid B. Polymicrobial candidaemia revealed by peripheral blood smear and chromogenic medium. *J Clin Pathol.* févr 2004;57(2):196-8.
68. Neppelenbroek K, Seó R, Urban V, Silva S, Dovigo L, Jorge J, et al. Identification of *Candida* species in the clinical laboratory: a review of conventional, commercial, and molecular techniques. *Oral Dis.* 1 mai 2014;20(4):329-44.
69. Pulcrano G, Iula DV, Vollaro A, Tucci A, Cerullo M, Esposito M, et al. Rapid and reliable MALDI-TOF mass spectrometry identification of *Candida non-albicans* isolates from bloodstream infections. *J Microbiol Methods.* sept 2013;94(3):262-6.
70. Schubert S, Kostrzewa M. MALDI-TOF MS in the Microbiology Laboratory: Current Trends. *Curr Issues Mol Biol.* 2017;23:17-20.
71. Patel R. MALDI-TOF MS for the diagnosis of infectious diseases. *Clin Chem.* janv 2015;61(1):100-11.
72. Cassagne C, Normand A-C, L'Ollivier C, Ranque S, Piarroux R. Performance of MALDI-TOF MS platforms for fungal identification. *Mycoses.* nov 2016;59(11):678-90.
73. Milieux de culture classiques pour la détection d'infections fongiques - Diagnostic Clinique | bioMérieux France [Internet]. [cité 24 mars 2020]. Disponible sur: <https://www.biomerieux.fr/diagnostic-clinique/milieux-de-culture-classiques-pour-la-detection-dinfections-fongiques>
74. BD Sabouraud GC / Milieu BBL CHROMagar Candida - BD [Internet]. [cité 24 mars 2020]. Disponible sur: <https://www.bd.com/fr-fr/offerings/microbiology-solutions/identification-and-susceptibility-systems/chromogenic-media/bd-sabouraud-gc-agar-bbl-chromagar-candida>
75. Griffin AT, Hanson KE. Update on fungal diagnostics. *Curr Infect Dis Rep.* août 2014;16(8):415.
76. Clancy CJ, Nguyen MH. Diagnosing Invasive Candidiasis. *J Clin Microbiol.* 2018;56(5).

77. Delaloye J, Calandra T. Invasive candidiasis as a cause of sepsis in the critically ill patient. *Virulence*. 1 janv 2014;5(1):161-9.
78. Poissy J, Parmentier-Decrucq E, Sendid B, Mathieu D, Poulain D. Nouveaux marqueurs pour le diagnostic de la maladie fongique invasive. *Réanimation*. 1 mai 2014;23(3):298-308.
79. Tran T, Beal SG. Application of the 1,3- β -D-Glucan (Fungitell) Assay in the Diagnosis of Invasive Fungal Infections. *Arch Pathol Lab Med*. févr 2016;140(2):181-5.
80. Clancy CJ, Nguyen MH. Finding the « missing 50% » of invasive candidiasis: how nonculture diagnostics will improve understanding of disease spectrum and transform patient care. *Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am*. mai 2013;56(9):1284-92.
81. Wheat LJ. Approach to the diagnosis of invasive aspergillosis and candidiasis. *Clin Chest Med*. juin 2009;30(2):367-77, viii.
82. Karageorgopoulos DE, Vouloumanou EK, Ntziora F, Michalopoulos A, Rafailidis PI, Falagas ME. β -D-glucan assay for the diagnosis of invasive fungal infections: a meta-analysis. *Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am*. 15 mars 2011;52(6):750-70.
83. Kumar A, Sachu A, Mohan K, Vinod V, Dinesh K, Karim S. Simple low cost differentiation of *Candida auris* from *Candida haemulonii* complex using CHROMagar *Candida* medium supplemented with Pal's medium. *Rev Iberoam Micol*. juin 2017;34(2):109-11.
84. Poissy J, Sendid B, Damiens S, Ichi Ishibashi K, François N, Kouv M, et al. Presence of *Candida* cell wall derived polysaccharides in the sera of intensive care unit patients: relation with candidaemia and *Candida* colonisation. *Crit Care Lond Engl*. 29 juin 2014;18(3):R135.
85. Cuenca-Estrella M, Verweij PE, Arendrup MC, Arikan-Akdagli S, Bille J, Donnelly JP, et al. ESCMID* guideline for the diagnosis and management of *Candida* diseases 2012: diagnostic procedures. *Clin Microbiol Infect Off Publ Eur Soc Clin Microbiol Infect Dis*. déc 2012;18 Suppl 7:9-18.
86. Bassetti M, Righi E, Montravers P, Cornely OA. What has changed in the treatment of invasive candidiasis? A look at the past 10 years and ahead. *J Antimicrob Chemother*. 01 2018;73(suppl_1):i14-25.
87. Ostrosky-Zeichner L. Prophylaxis or preemptive therapy of invasive candidiasis in the intensive care unit?*. *Crit Care Med*. déc 2004;32(12):2552–2553.
88. Tissot F, Agrawal S, Pagano L, Petrikos G, Groll AH, Skiada A, et al. ECIL-6 guidelines for the treatment of invasive candidiasis, aspergillosis and mucormycosis in leukemia and hematopoietic stem cell transplant patients. *Haematologica*. 1 mars 2017;102(3):433-44.
89. Morio F, Jensen RH, Le Pape P, Arendrup MC. Molecular basis of antifungal drug resistance in yeasts. *Int J Antimicrob Agents*. nov 2017;50(5):599-606.

90. Pristov KE, Ghannoum MA. Resistance of *Candida* to azoles and echinocandins worldwide. *Clin Microbiol Infect.* 1 juill 2019;25(7):792-8.
91. Arendrup MC, Patterson TF. Multidrug-Resistant *Candida*: Epidemiology, Molecular Mechanisms, and Treatment. *J Infect Dis.* 15 2017;216(suppl_3):S445-51.
92. Sanglard D, Coste A, Ferrari S. Antifungal drug resistance mechanisms in fungal pathogens from the perspective of transcriptional gene regulation. *FEMS Yeast Res.* 2009;9(7):1029-50.
93. Sanglard D, Kuchler K, Ischer F, Pagani JL, Monod M, Bille J. Mechanisms of resistance to azole antifungal agents in *Candida albicans* isolates from AIDS patients involve specific multidrug transporters. *Antimicrob Agents Chemother.* nov 1995;39(11):2378-86.
94. Sanglard D, Ischer F, Monod M, Bille J. Susceptibilities of *Candida albicans* multidrug transporter mutants to various antifungal agents and other metabolic inhibitors. *Antimicrob Agents Chemother.* oct 1996;40(10):2300-5.
95. Sanglard D, Ischer F, Monod M, Bille J. Cloning of *Candida albicans* genes conferring resistance to azole antifungal agents: characterization of CDR2, a new multidrug ABC transporter gene. *Microbiol Read Engl.* févr 1997;143 (Pt 2):405-16.
96. Coleman JJ, Mylonakis E. Efflux in Fungi: La Pièce de Résistance. *PLOS Pathog.* 26 juin 2009;5(6):e1000486.
97. Kanafani ZA, Perfect JR. Resistance to Antifungal Agents: Mechanisms and Clinical Impact. *Clin Infect Dis.* 1 janv 2008;46(1):120-8.
98. Sagatova AA, Keniya MV, Wilson RK, Monk BC, Tyndall JDA. Structural Insights into Binding of the Antifungal Drug Fluconazole to *Saccharomyces cerevisiae* Lanosterol 14 α -Demethylase. *Antimicrob Agents Chemother.* 1 août 2015;59(8):4982-9.
99. Flowers SA, Barker KS, Berkow EL, Toner G, Chadwick SG, Gygyax SE, et al. Gain-of-Function Mutations in UPC2 Are a Frequent Cause of ERG11 Upregulation in Azole-Resistant Clinical Isolates of *Candida albicans*. *Eukaryot Cell.* 1 oct 2012;11(10):1289-99.
100. Sanglard D. Emerging Threats in Antifungal-Resistant Fungal Pathogens. *Front Med [Internet].* 2016 [cité 16 oct 2019];3. Disponible sur: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmed.2016.00011/full>
101. Selmecki A, Forche A, Berman J. Genomic Plasticity of the Human Fungal Pathogen *Candida albicans*. *Eukaryot Cell.* 1 juill 2010;9(7):991-1008.
102. Arendrup MC, Perlin DS. Echinocandin resistance: an emerging clinical problem? *Curr Opin Infect Dis.* déc 2014;27(6):484-92.
103. Mesa-Arango AC, Scorzoni L, Zaragoza O. It only takes one to do many jobs: Amphotericin B as antifungal and immunomodulatory drug. *Front Microbiol*

- [Internet]. 2012 [cité 16 oct 2019];3. Disponible sur: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2012.00286/full>
104. Vermes A, Guchelaar H-J, Dankert J. Flucytosine: a review of its pharmacology, clinical indications, pharmacokinetics, toxicity and drug interactions. *J Antimicrob Chemother.* 1 août 2000;46(2):171-9.
 105. Alexander BD, Johnson MD, Pfeiffer CD, Jiménez-Ortigosa C, Catania J, Booker R, et al. Increasing echinocandin resistance in *Candida glabrata*: clinical failure correlates with presence of FKS mutations and elevated minimum inhibitory concentrations. *Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am.* juin 2013;56(12):1724-32.
 106. Fraser M, Borman AM, Thorn R, Lawrance LM. Resistance to echinocandin antifungal agents in the United Kingdom in clinical isolates of *Candida glabrata*: Fifteen years of interpretation and assessment. *Med Mycol.* 21 mai 2019;
 107. ra2016_cnrma.pdf [Internet]. [cité 16 oct 2019]. Disponible sur: https://www.pasteur.fr/sites/default/files/rubrique_pro_sante_publique/les_cnr/mycoses_invasives_et_antifongiques/ra2016_cnrma.pdf
 108. Ostrosky-Zeichner L, Casadevall A, Galgiani JN, Odds FC, Rex JH. An insight into the antifungal pipeline: selected new molecules and beyond. *Nat Rev Drug Discov.* sept 2010;9(9):719-27.
 109. Sanguinetti M, Posteraro B. New approaches for antifungal susceptibility testing. *Clin Microbiol Infect.* 1 déc 2017;23(12):931-4.
 110. Arendrup MC, Meletiadis J, Mouton JW, Lagrou K, Hamal P, Guinea J, Subcommittee on Antifungal Susceptibility Testing of the ESCMID European Committee for Antimicrobial Susceptibility Testing. 2017. EUCAST definitive document E.DEF 7.3.1. Method for the determination of broth dilution minimum inhibitory concentrations of antifungal agents for yeasts. http://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/AFST/Files/EUCAST_E_Def_7_3_1_Yeast_testing__definitive.pdf.
 111. Clinical and Laboratory Standards Institute. 2017. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts, 4th ed. Approved standard M27. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA. [Internet]. [cité 30 août 2019]. Disponible sur: https://clsi.org/media/1461/m27a3_sample.pdf
 112. Berkow EL, Lockhart SR, Ostrosky-Zeichner L. Antifungal Susceptibility Testing: Current Approaches. *Clin Microbiol Rev.* 29 avr 2020;33(3):e00069-19, /cmr/33/3/CMR.00069-19.atom.
 113. Pfaller MA, Espinel-Ingroff A, Boyken L, Hollis RJ, Kroeger J, Messer SA, et al. Comparison of the Broth Microdilution (BMD) Method of the European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing with the 24-Hour CLSI BMD Method for Testing Susceptibility of *Candida* Species to Fluconazole, Posaconazole, and Voriconazole by Use of Epidemiological Cutoff Values. *J Clin Microbiol.* 1 mars 2011;49(3):845-50.

114. Pfaller MA, Diekema DJ. Progress in antifungal susceptibility testing of *Candida* spp. by use of Clinical and Laboratory Standards Institute broth microdilution methods, 2010 to 2012. *J Clin Microbiol.* sept 2012;50(9):2846-56.
115. Pfaller MA, Castanheira M, Messer SA, Rhomberg PR, Jones RN. Comparison of EUCAST and CLSI broth microdilution methods for the susceptibility testing of 10 Systemically active antifungal agents when tested against *Candida* spp. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 1 juin 2014;79(2):198-204.
116. ETEST® [Internet]. bioMérieux France. [cité 14 oct 2019]. Disponible sur: <https://www.biomerieux.fr/diagnostic-clinique/etestr>
117. The University of Adelaide. Laboratory Methods | Mycology Online [Internet]. [cité 14 oct 2019]. Disponible sur: <https://mycology.adelaide.edu.au/laboratory/>
118. Arikan S. Current status of antifungal susceptibility testing methods. *Med Mycol.* 1 nov 2007;45(7):569-87.
119. Khlif M, Bogreau H, Michel-Nguyen A, Ayadi A, Ranque S. Trailing or Paradoxical Growth of *Candida albicans* When Exposed to Caspofungin Is Not Associated with Microsatellite Genotypes. *Antimicrob Agents Chemother.* 1 mars 2010;54(3):1365-8.
120. Cuenca-Estrella M, Gomez-Lopez A, Alastruey-Izquierdo A, Bernal-Martinez L, Cuesta I, Buitrago MJ, et al. Comparison of the Vitek 2 antifungal susceptibility system with the clinical and laboratory standards institute (CLSI) and European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) Broth Microdilution Reference Methods and with the Sensititre YeastOne and Etest techniques for in vitro detection of antifungal resistance in yeast isolates. *J Clin Microbiol.* mai 2010;48(5):1782-6.
121. Dannaoui E, Espinel-Ingroff A. Antifungal Susceptibly Testing by Concentration Gradient Strip Etest Method for Fungal Isolates: A Review. *J Fungi Basel Switz.* 22 nov 2019;5(4).
122. Albataineh MT, Sutton DA, Fothergill AW, Wiederhold NP. Update from the Laboratory: Clinical Identification and Susceptibility Testing of Fungi and Trends in Antifungal Resistance. *Infect Dis Clin North Am.* 1 mars 2016;30(1):13-35.
123. Astvad KM, Perlin DS, Johansen HK, Jensen RH, Arendrup MC. Evaluation of Caspofungin Susceptibility Testing by the New Vitek 2 AST-YS06 Yeast Card Using a Unique Collection of FKS Wild-Type and Hot Spot Mutant Isolates, Including the Five Most Common *Candida* Species. *Antimicrob Agents Chemother.* janv 2013;57(1):177-82.
124. Pfaller MA, Diekema DJ, Procop GW, Rinaldi MG. Comparison of the Vitek 2 yeast susceptibility system with CLSI microdilution for antifungal susceptibility testing of fluconazole and voriconazole against *Candida* spp., using new clinical breakpoints and epidemiological cutoff values. *Diagn Microbiol Infect Dis.* sept 2013;77(1):37-40.
125. Peterson JF, Pfaller MA, Diekema DJ, Rinaldi MG, Riebe KM, Ledebner NA. Multicenter Comparison of the Vitek 2 Antifungal Susceptibility Test with the CLSI

Broth Microdilution Reference Method for Testing Caspofungin, Micafungin, and Posaconazole against *Candida* spp. ▽. *J Clin Microbiol.* mai 2011;49(5):1765-71.

126. Rex JH, Clinical and Laboratory Standards Institute, éditeurs. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts: approved standard. 3rd ed. Wayne, PA: National Committee for Clinical Laboratory Standards; 2008. 25 p. (Documents / Clinical and Laboratory Standards Institute).
127. Espinel-Ingroff A, Turnidge J. The role of epidemiological cutoff values (ECVs/ECOFFs) in antifungal susceptibility testing and interpretation for uncommon yeasts and moulds. *Rev Iberoam Micol.* juin 2016;33(2):63-75.
128. Arendrup MC. Breakpoints for antifungal agents: An update from EUCAST focussing on echinocandins against *Candida* spp. and triazoles against *Aspergillus* spp. *Drug Resist Updat.* 2013;15.
129. Kidd SE, Chen SC-A, Meyer W, Halliday CL. A New Age in Molecular Diagnostics for Invasive Fungal Disease: Are We Ready? *Front Microbiol.* 14 jan 2020;10:2903.
130. ECOFFinder: Free MS Excel Spreadsheet Calculator - CLSI [Internet]. Clinical & Laboratory Standards Institute. [cité 14 juin 2020]. Disponible sur: <https://clsi.org/meetings/microbiology/ecoffinder/>
131. Cid R-I. Thermo Scientific Sensititre YeastOne Susceptibility Plates. :107.
132. EUCAST: MIC and zone distributions and ECOFFs [Internet]. [cité 24 oct 2019]. Disponible sur: http://www.eucast.org/mic_distributions_and_ecoffs/
133. Cockerill et Clinical and Laboratory Standards Institute - 2015 - Methods for dilution antimicrobial susceptibility .pdf [Internet]. [cité 9 oct 2019]. Disponible sur: <https://jcm.asm.org/content/jcm/suppl/2018/03/15/JCM.01329-17.DCSupplemental/zjm999095863s1.pdf>
134. Espinel-Ingroff A, Arendrup MC, Pfaller MA, Bonfietti LX, Bustamante B, Canton E, et al. Interlaboratory variability of Caspofungin MICs for *Candida* spp. Using CLSI and EUCAST methods: should the clinical laboratory be testing this agent? *Antimicrob Agents Chemother.* déc 2013;57(12):5836-42.
135. Aigner M, Erbeznik T, Gschwentner M, Lass-Flörl C. Etest and Sensititre YeastOne Susceptibility Testing of Echinocandins against *Candida* Species from a Single Center in Austria. *Antimicrob Agents Chemother* [Internet]. 1 août 2017 [cité 18 juin 2020];61(8). Disponible sur: <https://aac.asm.org/content/61/8/e00512-17>
136. Diekema D, Arbefeville S, Boyken L, Kroeger J, Pfaller M. The changing epidemiology of healthcare-associated candidemia over three decades. *Diagn Microbiol Infect Dis.* mai 2012;73(1):45-8.
137. Morace G, Amato G, Bistoni F, Fadda G, Marone P, Montagna MT, et al. Multicenter comparative evaluation of six commercial systems and the national committee for clinical laboratory standards m27-a broth microdilution method for fluconazole susceptibility testing of *Candida* species. *J Clin Microbiol.* août 2002;40(8):2953-8.

Université de Lille
FACULTE DE PHARMACIE DE LILLE
MEMOIRE de DIPLOME D'ETUDES SPECIALISEES
(tenant lieu de Thèse en vue du Diplôme d'Etat de Docteur en Pharmacie)
Année Universitaire 2019/2020

Nom : LE
Prénom : Vicky

Titre du mémoire : Sensibilité des levures aux principaux antifongiques systémiques : intérêt du système Sensititre™ YeastOne™ et détermination des ECOFF

Mots-clés : *Candida*, levures, antifongiques, Sensititre™ YeastOne™, Cut-Off Epidémiologiques (ECOFF), EUCAST, résistance

Contexte : Les CI constituent un problème mondial majeur de santé publique avec une morbi-mortalité élevée directement liée à l'initiation précoce d'un traitement antifongique adapté. Connaître la sensibilité aux antifongiques des souches isolées est un élément majeur de cette prise en charge et nécessite de disposer de techniques fiables pour la détermination des CMI et de critères d'interprétation pertinents afin de les catégoriser et optimiser le choix de l'antifongique.

Matériel et méthodes : La méthode SYO ainsi que la détermination des ECOFF ont été utilisées afin d'évaluer l'épidémiologie des levures au CHU de Lille. Une vérification des résistances phénotypiques détectées en SYO a été réalisée par la méthode de référence EUCAST.

Résultats : L'analyse des données de sensibilité aux antifongiques de 7334 souches de levures a permis de déterminer 59 ECOFF. Les taux de résistance observés sont faibles, stables pour les échinocandines, en augmentation pour les azolés. La vérification par la méthode EUCAST des souches détectées résistantes en SYO montre des EA et CA globaux de 84,2% et 71% respectivement.

Conclusion : L'épidémiologie des CI est concordante avec celle décrite dans la littérature. Les ECOFF déterminés sont adaptés à l'écologie de notre centre. Le SYO représente un outil standardisé pour la détermination des CMI vis à vis des principaux antifongiques.

Membres du jury :

Président : Pr Delphine ALLORGE, PU-PH, CHU de Lille
Assesseurs : Pr Boualem SENDID, PU-PH, CHU de Lille
Dr Éric Dannaoui, MCU-PH, HEGP à Paris
Dr Séverine LORIDANT, PH, CHU de Lille