



HAL
open science

Aspergilloses invasives et Mucormycoses : revue bibliographique et évaluation diagnostique du kit de PCR *Aspergillus* spp.-Mucorales Mycogénie®

Laure Portejoie

► **To cite this version:**

Laure Portejoie. Aspergilloses invasives et Mucormycoses : revue bibliographique et évaluation diagnostique du kit de PCR *Aspergillus* spp.-Mucorales Mycogénie®. Sciences du Vivant [q-bio]. 2021. dumas-03557660

HAL Id: dumas-03557660

<https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-03557660>

Submitted on 4 Feb 2022

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

U.F.R. DES SCIENCES PHARMACEUTIQUES

Année 2021

Thèse n°66

THESE POUR L'OBTENTION DU

DIPLOME D'ETAT de DOCTEUR EN PHARMACIE

Présentée et soutenue publiquement

Par Laure PORTEJOIE, née le 20/01/1994, à Montluçon

Le 23 juin 2021

Aspergilloses invasives et Mucormycoses :
Revue bibliographique et évaluation diagnostique du
kit de PCR *Aspergillus* spp.-Mucorales MycoGENIE®

Sous la direction du Docteur Sébastien IMBERT

Membres du jury :

Mme le Professeur Véronique DUBOIS, PU-PH, CHU de Bordeaux,	Président
Mme le Professeur Laurence DELHAES, PU-PH, CHU de Bordeaux,	Membre
Mme le Professeur Valérie LIVRELLI, PU, UFR Pharmacie de Clermont-Ferrand,	Membre
M le Docteur Sébastien IMBERT, PHU, CHU de Bordeaux,	Directeur

REMERCIEMENTS

En préambule à cette thèse, je souhaite remercier sincèrement tous ceux qui ont participé de près ou de loin à l'élaboration de ce travail, qui est pour moi, l'accomplissement de ces belles années d'études.

A mon directeur de thèse, Sébastien IMBERT, merci pour la confiance que tu m'as accordée, ta disponibilité, le partage de tes connaissances et ton accompagnement tout au long de ce travail.

A Madame le professeur Véronique DUBOIS, pour me faire l'honneur de présider ce jury de thèse. Soyez assurée de mon profond respect et de ma plus grande reconnaissance.

A Madame le professeur Laurence DELHAES, c'est un grand honneur pour moi d'avoir participé à la mise en place d'une nouvelle technique dans votre laboratoire. Veuillez trouver dans ce travail l'expression de ma profonde gratitude.

A Madame Valérie LIVRELLI, pour avoir accepté de faire partie des membres du jury et d'évaluer ce travail. Merci pour votre investissement et votre bienveillance lors de vos enseignements à la faculté de Clermont-Ferrand, notamment pour la préparation du concours de l'internat.

Je remercie également les techniciennes du Plateau Technique de Biologie Moléculaire du CHU de Bordeaux qui m'ont beaucoup aidée sur la partie analytique et Brigitte TAUZIN pour son investissement dans la mise en place de cette technique.

Mais je souhaite également faire part de mes remerciements :

Aux biologistes qui m'ont transmis leurs connaissances et leur passion tout au long de mon internat et pour qui je ressens beaucoup de gratitude,

A tous les co-internes que j'ai pu rencontrer au cours de mes différents stages, et plus particulièrement à Claire G., Nathalie, Maxime, Audrey, Lila, Claire C., Alicia, Camille, Marine ; vous êtes de belles rencontres tant sur le plan professionnel que personnel, merci à vous pour ces moments partagés ensemble et ceux qui restent à venir,

A Pauline, tu es ma plus belle rencontre sur les bancs de la faculté, et même si 5000 km nous séparent aujourd'hui, tu n'en restes pas moins un soutien incontestable, à tout point de vue,

A Margaux, mon amie d'enfance, pour ta bonne humeur éternelle et ta joie si communicative qui nous a permis d'avoir des moments si mémorables,

A ma belle-famille, pour votre soutien à toute épreuve, la douceur et la sérénité que vous m'apportez,

A mes parents, mon frère et ma grand-mère, pour votre accompagnement sans faille tout au long de ces années d'études, pour les efforts fournis pour que je sois toujours dans les meilleures dispositions pour réussir, et surtout votre amour qui me porte chaque jour,

Et surtout, je te remercie Jason, pour ta présence et ton soutien de tous les jours, sache que, sans toi, cette thèse n'aurait probablement jamais vu le jour.

SOMMAIRE

TABLE DES ILLUSTRATIONS	5
I. FIGURES	5
II. TABLEAUX.....	6
LISTE DES ABREVIATIONS.....	7
INTRODUCTION	8
RAPPELS BIBLIOGRAPHIQUES	8
I. INFECTIONS PULMONAIRES A <i>ASPERGILLUS SPP.</i>	8
1. Agents pathogènes	8
1.1. Généralités	8
1.2. Morphologie des champignons du genre <i>Aspergillus</i>	11
2. Facteurs de virulence (<i>Aspergillus fumigatus</i>)	13
3. Mécanismes de défense immunitaire de l'hôte	14
4. Formes cliniques d'aspergillose pulmonaire.....	15
5. Facteurs de risque d'infection invasive.....	17
6. Diagnostic des aspergilloses invasives	18
6.1. Critères de définition.....	18
6.2. Outils diagnostiques microbiologiques	22
7. Traitements des aspergilloses invasives	26
7.1. Traitement curatif	26
7.2. Prophylaxie.....	26
II. INFECTIONS INVASIVES A MUCORALES	27
1. Agents responsables	27
1.1. Généralités	27
1.2. Caractères culturels	27
1.3. Morphologie microscopique	28
2. Physiopathologie	30
2.1. Mécanisme de défense immunitaire de l'hôte	30
2.3. Facteurs de risque	31
2.4. Formes cliniques.....	32
3. Diagnostic mycologique.....	33
3.1. Examen direct et culture	34
3.2. Biologie moléculaire.....	35
4. Traitement des mucormycoses.....	36
EVALUATION DE LA PCR MYCOGENIE <i>ASPERGILLUS-MUCORALES SPP.</i>.....	37
I. MATERIELS ET METHODES	37
1. Échantillons utilisés.....	37
2. Extraction.....	37
3. Kit PCR <i>Aspergillus-Mucorales MYCOGENIE</i> ®	38
4. Contrôles de PCR	39
5. Répétabilité et reproductibilité	40
6. Techniques comparatives	40
II. RESULTATS - PERFORMANCES ANALYTIQUES	41
1. Validation des contrôles de PCR	41
2. Limite de détection	42
3. Spécificité analytique.....	42

4.	Répétabilité et reproductibilité	43
5.	Comparaison aux autres méthodes diagnostiques.....	43
5.1.	PCR vs. diagnostic mycologique	43
5.2.	PCR Aspergillus vs. GM.....	44
5.3.	PCR vs. PCR de référence (CHU Besançon).....	45
III.	DISCUSSION	46
IV.	CONCLUSION.....	50
BIBLIOGRAPHIE		51

TABLE DES ILLUSTRATIONS

I. FIGURES

Figure 1 : Cycle de reproduction d' <i>Aspergillus</i> spp. selon (6).....	9
Figure 2 : Classification selon les sous-genres et sections des espèces du genre <i>Aspergillus</i> ; d'après (8).....	10
Figure 3 : Représentation schématique d'une tête aspergillaire, selon (3).....	12
Figure 4 : Représentation des différentes formes cliniques d'aspergillose en fonction de la réponse immunitaire de l'hôte et de la sévérité de la pathologie (4).....	15
Figure 5 : « signe du halo » (A) et « signe du croissant gazeux » (B) en tomographie assistée par ordinateur 16	16
Figure 6 : Filaments mycéliens septés d' <i>Aspergillus</i> spp. après coloration argentique 22	22
Figure 7 : Aspect macroscopique d'une culture de <i>Rhizopus</i> sp. (A) et architecture fongique à la loupe binoculaire (B). D'après (50). 28	28
Figure 8 : Aspect microscopique de l'appareil reproducteur des Mucorales, selon (3). 28	28
Figure 9 : Filaments coenocytiques de Mucorales après coloration argentique..... 34	34
Figure 10 : Principe de la PCR avec sonde TaqMan 38	38
Figure 11 : Exemple de courbe d'amplification obtenue pour la détection des mucorales 39	39
Figure 12 : Courbes d'amplification du contrôle interne du kit obtenues en utilisant comme témoin d'extraction..... 42	42
Figure 13 : Courbes d'amplification du contrôle interne du kit obtenues en utilisant comme témoin d'amplification..... 42	42

II. TABLEAUX

Tableau 1 : Aspect macroscopique et microscopique des principales espèces d' <i>Aspergillus</i>	13
Tableau 2 : Propositions de définitions de cas d'aspergilloses en fonction des critères d'hôte (23).....	21
Tableau 3 : Performances du dosage des GM sériques chez des patients neutropéniques en fonction de la valeur seuil utilisée, d'après (28).	23
Tableau 4 : Caractéristiques microscopiques des principales espèces de Mucorales, d'après (50).	29
Tableau 5 : Tableau de sélection des fluorophores en fonction de l'automate utilisé (selon la fiche fournisseur du kit)	39
Tableau 6 : Interprétation des résultats (selon la fiche fournisseur du kit)	39
Tableau 7 : Résultats de répétabilité et reproductibilité du kit MycoGENIE.....	43
Tableau 8 : Concordance entre PCR <i>aspergillus</i> et diagnostic mycologique tout prélèvements confondus.....	44
Tableau 9 : Concordance entre PCR Mucorales et diagnostic mycologique tout prélèvements confondus.....	44
Tableau 10 : Concordance entre PCR <i>Aspergillus</i> sp. et Ag GM (seuil de positivité $\geq 0,5$ préconisé par le fournisseur).....	45
Tableau 11 : Concordance entre PCR <i>Aspergillus</i> sp. et Ag GM (seuils recommandés par l'EORTC/MSGERC)	45
Tableau 12 : Concordance entre PCR <i>Aspergillus</i> sp. kit Mycogénie® vs. PCR maison Besançon.	45
Tableau 13 : Concordance entre PCR Mucorales kit Mycogénie® vs. PCR maison Besançon	45

LISTE DES ABREVIATIONS

ABPA	Aspergillose broncho-pulmonaire allergique
AI	Aspergillose invasive
API	Aspergillose pulmonaire invasive
BPCO	Bronchopneumopathie chronique obstructive
CSH	Cellules souches hématopoïétiques
CT-scan	<i>Computed tomography scan</i>
DO	Densité optique
ECIL	<i>European Conference on Infections in Leukaemia</i>
ECMM	<i>European Confederation of Medical Mycology</i>
ELISA	<i>Enzyme linked immunosorbent assay</i>
EORTC	<i>European Organization for Research and Treatment of Cancer</i>
ESCMID	<i>European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases</i>
GM	Antigènes galactomannanes
GVH	<i>Graft versus host disease</i>
IC	Intervalle de confiance
IFI	Infection fongique invasive
ITS	<i>Internal transcribed spacer</i>
LA	Leucémie aigüe
LAL	Leucémie aigüe lymphoblastique
LAM	Leucémie aigüe myéloblastique
LBA	Liquide de lavage broncho-alvéolaire
LCR	Liquide céphalo-rachidien
MALDI-TOF	<i>Matrix-assisted laser desorption ionization – Time of flight</i>
MSGERC	<i>Mycoses Study Group Education and Research Consortium</i>
OR	<i>Odds ratio</i>
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
PNN	Polynucléaires neutrophiles

INTRODUCTION

Les infections invasives à champignons filamenteux sont responsables d'une mortalité élevée, variable selon les études, pouvant atteindre 40 à 50% dans un contexte de leucémie aiguë ou de greffe de cellules souches hématopoïétiques (1). Les moisissures les plus fréquemment à l'origine d'infections fongiques invasives (IFI) appartiennent au genre *Aspergillus* (2), suivis par les zygomycètes dont font partie les champignons de l'ordre des Mucorales. Le diagnostic des IFI est difficile car il repose le plus souvent sur un faisceau d'arguments, comprenant des critères non spécifiques comme les symptômes cliniques ou radiologiques, ainsi que des critères mycologiques. Le retard au diagnostic participe à la mortalité élevée de ces infections. De plus, la prise en charge des IFI est différente en fonction du microorganisme impliqué. Ceci suggère l'intérêt d'avoir des outils diagnostiques biologiques fiables orientant rapidement le clinicien vers le germe impliqué afin de permettre une prise en charge optimale du patient.

L'objectif de ce travail de thèse est d'évaluer l'intérêt et les limites de la PCR (*polymerase chain reaction*) ciblant les champignons du genre *Aspergillus* spp. et de l'ordre des Mucorales afin de la mettre en place en routine au laboratoire de Mycologie du CHU de Bordeaux. La première partie de ce travail est une revue de la littérature sur les infections invasives à *Aspergillus* spp. et Mucorales. La deuxième partie présente l'étude réalisée sur le kit de PCR en temps réel Mycogénie® *Aspergillus* spp.-Mucorales (Ademtech, Pessac, France) pour évaluer ses performances analytiques.

RAPPELS BIBLIOGRAPHIQUES

I. INFECTIONS PULMONAIRES A *ASPERGILLUS* SPP.

1. Agents pathogènes

1.1. Généralités

Les champignons du genre *Aspergillus* sont des micro-organismes eucaryotes appartenant au phylum des Ascomycètes. Ce sont des champignons filamenteux, ou moisissures, environnementales, ubiquitaires, et saprophytes. Les filaments (ou hyphes), septés et hyalins, constituent le mycélium. Leur développement comprend une phase végétative et une phase de multiplication asexuée au cours de laquelle se forment des spores (ou conidies) qui assurent la dispersion du champignon dans l'environnement. Les spores germent et forment un nouveau mycélium (Figure 1). On retrouve donc les *Aspergillus* au niveau des végétaux et des sols, où ils contribuent à la décomposition des matières organiques, mais aussi sous forme de conidies dans l'air ambiant. *Aspergillus* spp. se trouve en 4^{ème} position des spores fongiques les plus fréquemment isolées dans l'air, derrière *Cladosporium*, *Alternaria* et *Penicillium* (3). L'Homme inhale ainsi plusieurs centaines de spores d'*Aspergillus* spp. par jour (4). Les spores inhalées

colonisent les voies respiratoires de l'hôte, et peuvent, si le terrain est propice, germer, former des filaments et être à l'origine d'infections pulmonaires localisées ou invasives. La colonisation pulmonaire à *Aspergillus* spp. représente un facteur de risque accru de développer une infection invasive chez l'immunodéprimé (5). Ces moisissures sont également pathogènes pour les animaux et les plantes (phytopathogène).

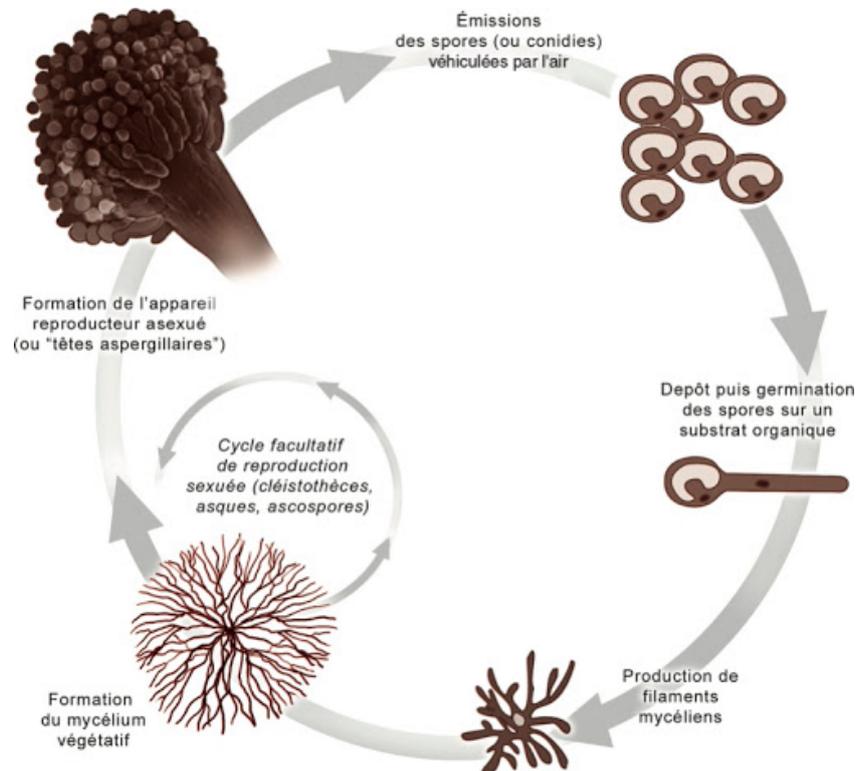


FIGURE 1 : CYCLE DE REPRODUCTION D'ASPERGILLUS SPP. SELON (6)

La production de métabolites par les *Aspergillus* spp. leur concède une place essentielle dans l'industrie agroalimentaire, pharmaceutique et les biotechnologies (7). Ils sont utilisés comme agents de fermentation dans la cuisine asiatique (fabrication du koji, du saké japonais et du miso grâce à *A. oryzae*), mais aussi pour leur production d'enzymes (amylases, pectinases), d'acides organiques (acide citrique produit par *A. niger* utilisé dans la fabrication du Coca-Cola®), d'antimicrobiens (*A. fumigatus* synthétise la fumagiline, *A. nidulans* produit un précurseur utilisé pour la synthèse d'anidulafungine).

La classification actuelle du genre *Aspergillus* est constituée de 6 sous-genres (*Aspergillus*, *Circumdati*, *Fumigati*, *Nidulantes*, *Cremeri* et *Polypaecilum*) et de 27 sections (Figure 2). Parmi les 446 espèces décrites du genre *Aspergillus*, moins de 40 ont déjà été rapportées dans des infections invasives chez l'Homme. *Aspergillus fumigatus* est l'espèce la plus fréquemment isolée, représentant environ 80% des infections invasives à *Aspergillus* spp. *A. flavus*, *A. niger*, *A. terreus*, et *A. nidulans* sont plus rarement responsables d'aspergilloses invasives.

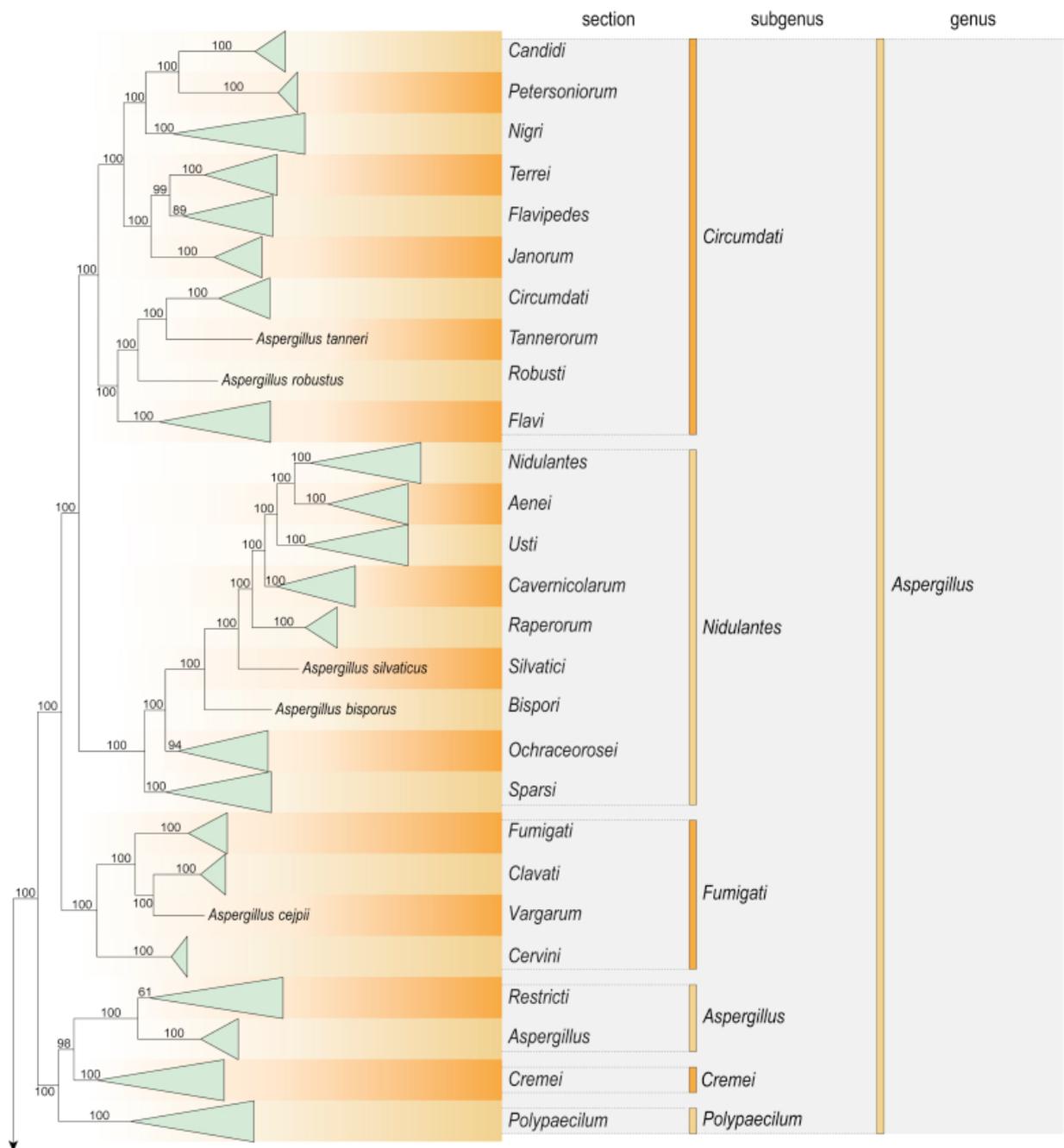


FIGURE 2 : CLASSIFICATION SELON LES SOUS-GENRES ET SECTIONS DES ESPECES DU GENRE *ASPERGILLUS* ; D'APRES (8).

L'amélioration récente des techniques d'identification fongique, et notamment le séquençage, a permis la description d'espèces d'*Aspergillus* dites « cryptiques » non définies auparavant (9). On estime la fréquence de leur isolement d'échantillons cliniques de 10 à 15%. Environ 40% des espèces cryptiques possèdent des résistances aux antifongiques (10) : certaines espèces comme *A. calidoustus* et *A. lentulus* sont considérées comme multirésistantes, et les autres espèces voient leur sensibilité fréquemment diminuée aux antifongiques azolés et/ou à l'amphotéricine B, qui sont les traitements utilisés en première intention lors d'aspergillose invasive. La problématique, au laboratoire, est donc d'identifier correctement ces espèces et de tester leur sensibilité aux antifongiques afin d'éviter l'échec thérapeutique. La spectrométrie de masse de type MALDI-TOF (*Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization – Time Of Flight*), associée à une base de données performante, permet d'avoir accès en routine à l'identification de ces espèces cryptiques.

Les formes cliniques des infections aspergillaires sont très vastes. Elles peuvent être localisées et superficielles, contractées par inoculation directe ou suite à une colonisation broncho-pulmonaire. L'infection à *Aspergillus* peut être à l'origine de formes invasives multiviscérales mais aussi de manifestations de type immuno-allergiques.

1.2. Morphologie des champignons du genre *Aspergillus*

1.2.1 Caractères cultureux

La culture, au laboratoire, de champignons filamenteux du genre *Aspergillus* est réalisée sur milieu de Sabouraud additionné d'antibiotiques (chloramphénicol, gentamicine) pour empêcher la pousse de bactéries. Le cycloheximide inhibe la croissance de la plupart des *Aspergillus* spp. La température optimale de culture se situe entre 25°C et 40°C selon les espèces. Certaines espèces, comme *A. fumigatus*, sont thermotolérantes, capables de pousser à 37°C et ayant une température maximale de croissance allant jusqu'à 55°C.

La majorité des espèces du genre *Aspergillus* responsables d'infections invasives chez l'Homme, présentent une croissance rapide. Après 24 à 48 heures de culture, on observe des colonies plates, duveteuses, formées de filaments aériens blancs. La maturation des structures conidiogènes (48 à 96 heures selon les espèces) permet aux colonies de prendre une teinte caractéristique permettant une orientation rapide du diagnostic d'espèce (Tableau 1). Les caractéristiques macroscopiques seules (taille, texture et couleur des colonies) ne sont cependant pas suffisantes pour déterminer l'espèce incriminée.

1.2.2 Aspect microscopique (3)

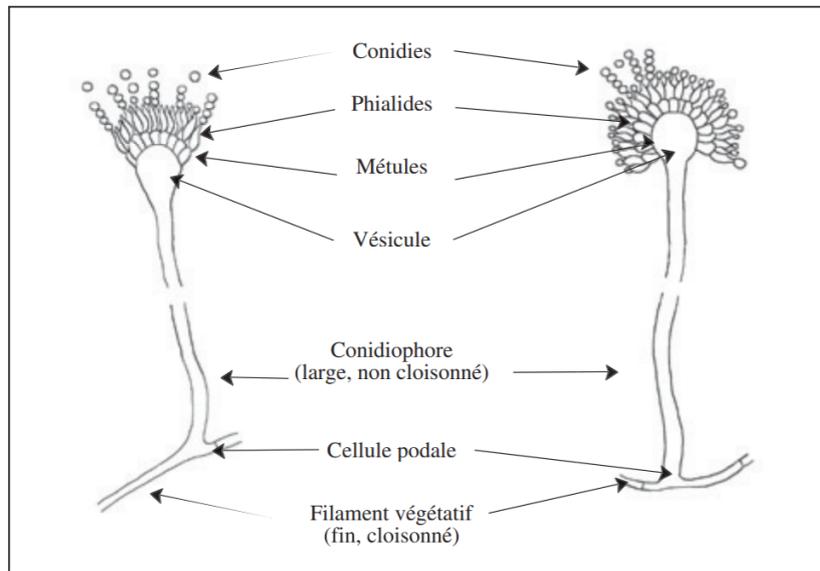


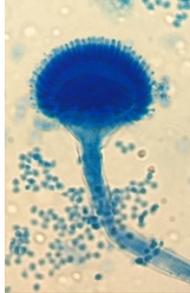
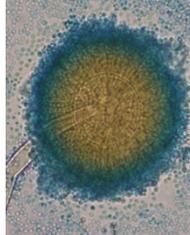
FIGURE 3 : REPRESENTATION SCHEMATIQUE D'UNE TETE ASPERGILLAIRE, SELON (3).

Aspergillus spp. est caractérisé par un mycélium septé qui émet des conidiophores, à l'extrémité desquels se forme une vésicule. Cette dernière, de forme et de taille variable, produit des cellules conidiogènes ou phialides. La conidiogenèse correspond à une reproduction asexuée qui s'effectue sur le mode blastique phialidique, par bourgeonnement à l'apex des phialides. Les conidies, ou spores, forment des chainettes. L'ensemble conidiophore - vésicule - (métules) - phialides - conidies est appelé tête aspergillaire (Figure 3). Les phialides peuvent être portées par des métules, on parle alors de têtes aspergillaires bisériées (unisériées si absence de métule). Microscopiquement, l'observation de têtes aspergillaires est caractéristique des champignons du genre *Aspergillus*. Il s'agit de leur organe de reproduction asexuée.

Selon les différentes sections du genre *Aspergillus*, les têtes aspergillaires possèdent des particularités morphologiques permettant de les distinguer en microscopie (Tableau 1), on peut décrire pour exemple :

- Section *Fumigatii* (*A. fumigatus*, *A. udagawae*, *A. lentulus*, *A. hiratsukae*...) : conidiophore lisse ; vésicule sous forme hémisphérique « en entonnoir » ; phialides réparties « en colonne » autour de la vésicule qui est unisériée, conidies de petites tailles (2-3 μ m)
- Section *Flavi* (*A. flavus*) : conidiophore long et échinulé, phialides réparties tout autour de la vésicule : on parle de vésicule « radiée », spores échinulées ; tête aspergillaire bisériée (présence de métules)
- Section *Nigri* (*A. niger*, *A. tubingensis*, *A. welwitshiae*) : tête aspergillaire bisériée et radiée avec un très long conidiophore (> 1 mm)

TABLEAU 1 : ASPECT MACROSCOPIQUE ET MICROSCOPIQUE DES PRINCIPALES ESPECES D'ASPERGILLUS

Nom de l'espèce	Aspect macroscopique	Aspect microscopique
<i>Aspergillus fumigatus</i>		
<i>Aspergillus flavus</i>		
<i>Aspergillus niger</i>		

2. Facteurs de virulence (*Aspergillus fumigatus*)

La pathogénicité plus importante de certaines espèces, peut s'expliquer par la présence de facteurs de virulence. C'est principalement le cas pour *A. fumigatus*, qui est l'*Aspergillus* le plus fréquemment retrouvé dans les infections invasives.

❖ Caractéristiques des spores

Les spores d'*Aspergillus* sont hydrophobes, ce qui leur permet de rester des heures dans l'air ambiant, après leur libération, avant de trouver un hôte ou un environnement propice pour germer. Elles sont de petite taille (2-5 µm) et ainsi, traversent facilement l'appareil respiratoire sans être capturées par le système muco-ciliaire pour atteindre les alvéoles pulmonaires.

❖ Thermotolérance

A. fumigatus est un champignon thermotolérant : sa capacité à pousser à 37°C est idéale pour se développer facilement *in vivo*. La corrélation entre la pathogénicité d'*Aspergillus* et sa thermotolérance est démontrée, notamment par Dagenais et al. (11).

❖ Production de mycotoxines

Aspergillus produit des mycotoxines nécrosantes responsables de microlésions et d'ulcérations des vaisseaux chez l'hôte. La principale toxine est la gliotoxine, sécrétée par les conidies. Elle possède des propriétés immunosuppressives et anti-angiogéniques (12), ce qui lui confère un rôle majeur dans la phase invasive de l'infection.

❖ Tropisme vasculaire

A. fumigatus possède un tropisme pour les vaisseaux sanguins de son hôte, on parle d'angiotropisme. Cette particularité facilite sa dissémination dans l'organisme.

❖ Filamentation

La germination des conidies et la production de filaments constituent une entrave à la phagocytose par les macrophages alvéolaires.

3. Mécanismes de défense immunitaire de l'hôte

Bien que l'Homme soit confronté quotidiennement aux spores *d'Aspergillus* et malgré l'existence de ces différents facteurs de virulence, il existe des moyens de défenses efficaces chez l'individu sain, pour lutter contre les infections à *Aspergillus* que nous allons décrire dans ce chapitre (13).

❖ La clairance muco-ciliaire

La porte d'entrée de la majorité des pathologies dues à *Aspergillus spp.* est respiratoire. Une grande partie des conidies inhalées va être piégée dans le mucus de l'épithélium bronchique et être expulsée de l'organisme via les cellules épithéliales ciliées. Cependant, grâce à leur petite taille, certaines spores peuvent passer au travers de la clairance muco-ciliaire et arriver directement au niveau des poumons.

❖ L'immunité innée

L'immunité innée est la prochaine ligne de défense contre le micro-organisme via les macrophages alvéolaires, les cellules dendritiques et le recrutement de leucocytes (monocytes, polynucléaires neutrophiles, cellules natural-killer) sur le site de l'infection. La reconnaissance *d'Aspergillus* a lieu via des récepteurs solubles ou présents à la surface des cellules (récepteurs toll-like, dectine-1, protéines surfactantes A et D, mannose-binding lectin, pentraxine-3). Les conidies, dans cet environnement propice, si elles ne sont pas détruites, commencent à bourgeonner et former des filaments 12 à 15h après leur arrivée au niveau des alvéoles pulmonaires.

❖ Macrophages alvéolaires

Les macrophages alvéolaires sont les principaux leucocytes présents localement au niveau des poumons et représentent une défense précoce contre les conidies inhalées. Ils détruisent les conidies par phagocytose tout en sécrétant des cytokines pro-inflammatoires. Cependant, leur

action est limitée car inefficace sur les spores germées qui ne peuvent plus être phagocytées. Ils ne sont donc pas suffisants pour lutter face à un fort inoculum.

❖ Polynucléaires neutrophiles

Les polynucléaires neutrophiles (PNN) sont les acteurs majeurs de défense contre l'aspergillose invasive : ils permettent la destruction rapide des conidies germées et du mycélium néoformé par des mécanismes oxydatifs et non oxydatifs.

4. Formes cliniques d'aspergillose pulmonaire

L'inhalation de spores d'*Aspergillus* est inévitable, et si dans la plupart des cas, ces spores sont épurées par notre organisme, une réponse inadaptée de notre système immunitaire peut conduire à diverses pathologies avec des manifestations cliniques et des mécanismes physiopathologiques différents (Figure 4). On distinguera donc 3 catégories en fonction de l'état des défenses de l'hôte vis-à-vis du champignon : altération locale des barrières mécaniques, hyperréactivité des défenses immunitaires locales et générales et enfin immunodépression locale et générale.

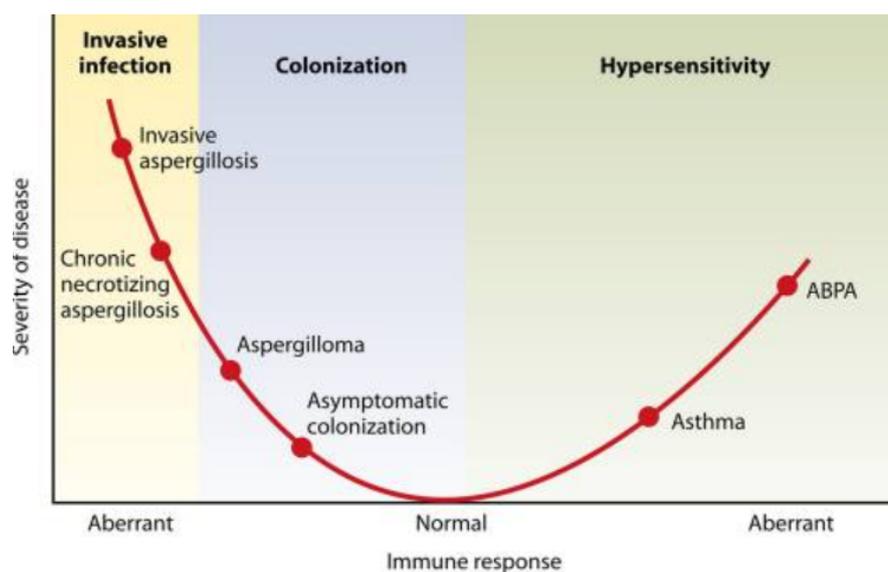


FIGURE 4 : REPRÉSENTATION DES DIFFÉRENTES FORMES CLINIQUES D'ASPERGILLOSE EN FONCTION DE LA RÉPONSE IMMUNITAIRE DE L'HÔTE ET DE LA SÉVÉRITÉ DE LA PATHOLOGIE (4).

Aspergillus spp. peut être à l'origine d'infections chroniques, non invasives, se développant de manière insidieuse. L'aspergillose pulmonaire chronique est définie par la persistance pendant plus de 3 mois de symptômes évocateurs d'une inflammation chronique : perte pondérale, toux productive ou hémoptysies (14). Elle se manifeste chez des patients peu ou pas immunodéprimés, mais avec des altérations du parenchyme pulmonaire sous-jacentes (séquelles tuberculeuses, asthme, bronchopneumopathie obstructive chronique (BPCO), pneumothorax...). L'aspergillome est une forme d'aspergillose chronique, il s'agit de la colonisation par *Aspergillus* d'une cavité pulmonaire préexistante (post-tuberculeuse ou post-

opératoire notamment). Cette forme clinique est le plus souvent asymptomatique et n'évolue généralement pas en forme invasive car contenue par le système immunitaire du patient.

Chez le patient atopique, des réactions d'hypersensibilité sont possibles, dont la forme terminale est l'aspergillose broncho-pulmonaire allergique (ABPA). C'est une broncho-pneumopathie d'origine immuno-allergique qui se manifeste suite à une exposition répétée à l'inhalation de spores aspergillaires : il s'agit d'une réaction d'hypersensibilité vis-à-vis d'antigènes aspergillaires. Cette pathologie touche surtout le sujet asthmatique ou mucoviscidosique.

L'aspergillose pulmonaire invasive (API) est la forme la plus sévère d'aspergillose avec une mortalité allant jusqu'à 71% selon les études (15). Elle correspond à la croissance du champignon directement dans les tissus conduisant à leur destruction. De symptomatologie aspécifique, elle doit être suspectée devant une pneumopathie fébrile résistante aux antibiotiques chez le sujet immunodéprimé. On distingue classiquement 2 types de populations à risque avec des symptomatologies différentes : le sujet neutropénique et le sujet non neutropénique avec des comorbidités associées.

Chez le neutropénique, il s'agit de formes angioinvasives favorisant la dissémination à d'autres organes. Les signes cliniques et radiographiques sont discrets et peu spécifiques (13). L'API peut se manifester par une hyperthermie, une toux non productive, des douleurs thoraciques. Ces signes peuvent être mineurs voire absents en début d'infection. La tomodensitométrie ou CT-scan (*computed tomography scan*) peut révéler un ou plusieurs nodules pulmonaires avec le « signe du halo », témoin de l'hémorragie et de l'œdème formés au niveau pulmonaire, entourant une zone de nécrose centrale (Figure 5A). Ce signe scannographique est très évocateur d'une API chez le sujet neutropénique. Lors de la remontée du taux de polynucléaires neutrophiles, une cavité va remplacer les lésions, en formant le « signe du croissant gazeux » à l'imagerie (Figure 5B).

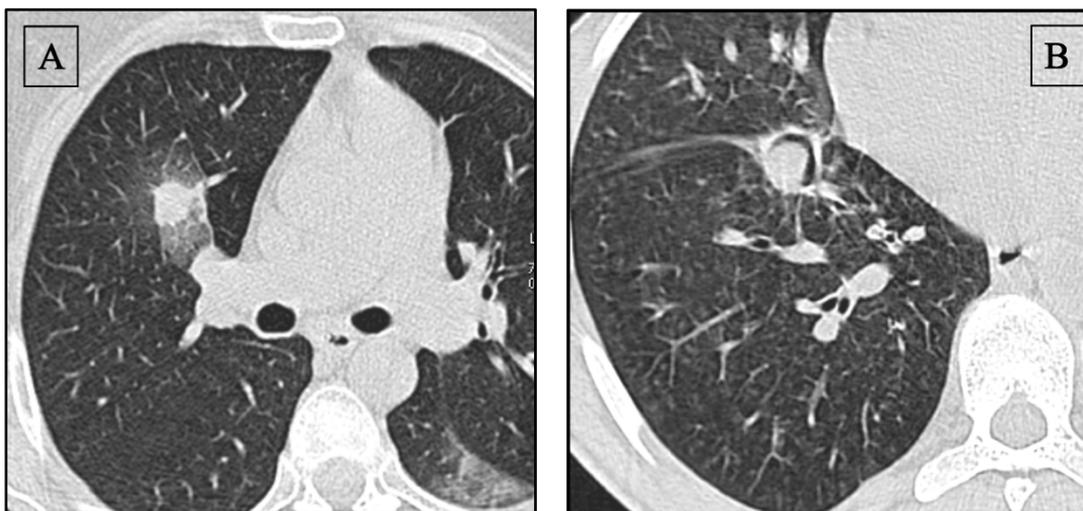


FIGURE 5 : « SIGNE DU HALO » (A) ET « SIGNE DU CROISSANT GAZEUX » (B) EN TOMODENSITOMETRIE

Chez le sujet non neutropénique, la symptomatologie de l'API est différente. L'angioinvasion est peu commune, il s'agit plutôt de formes broncho-invasives. Les symptômes sont insidieux et non spécifiques, tout comme l'imagerie. En conséquence, le diagnostic d'API est souvent non suspecté chez le sujet non neutropénique. A titre d'exemple,

l'API se situe parmi les causes les plus communes d'infection non diagnostiquée chez les patients de soins intensifs (étude faite après autopsie) (16).

Face à une symptomatologie peu spécifique, il est nécessaire de connaître les terrains à risque de développer une aspergillose invasive afin d'évoquer plus facilement l'hypothèse cette infection.

5. Facteurs de risque d'infection invasive

Les principaux facteurs de risque d'AI, correspondent à un déficit quantitatif ou qualitatif en PNN, qui sont les cellules clés de la défense anti-aspergillaire

La neutropénie profonde et prolongée (déficit quantitatif en PNN) constitue le principal facteur de risque d'AI, avec une augmentation proportionnelle du risque associée à la profondeur et la durée de celle-ci (17). Les patients les plus à risque sont ceux ayant bénéficié d'une greffe allogénique de cellules souches hématopoïétiques (CSH), ainsi que ceux ayant une neutropénie prolongée secondaire à une chimiothérapie. Notamment, le traitement des leucémies aiguës (LA) par chimiothérapies intensives provoque des phases de neutropénie profonde et prolongée exposant alors les patients au risque d'AI (risque majoré si PNN < 0,5 G/L pendant plus de 10 jours). L'incidence de l'API est supérieure pour les LA myéloblastiques (LAM) par rapport aux LA lymphoblastiques (LAL) : respectivement 6,4% et 3,8% selon Koehler *et al.* (18). La durée de la phase d'aplasie peut être limitée grâce aux facteurs de croissance hématopoïétiques (G-CSF ou granulocyte colony stimulating factor).

D'autre part, l'API survient chez le sujet non neutropénique mais immunodéprimé par ailleurs, avec un déficit qualitatif de la fonction des PNN ou d'autres facteurs de risque associés (19). Le plus commun est la corticothérapie prolongée ou à fortes doses, utilisée lors de transplantations d'organe solide, et dans les pathologies auto-immunes ou rhumatologiques. Les corticoïdes inhibent la production de dérivés oxygénés par les macrophages et les PNN lors de la phagocytose, ce qui correspond à un des mécanismes principaux de lutte contre *Aspergillus*. Par ailleurs, le mécanisme oxydatif des PNN est altéré de manière constitutive chez les patients souffrant de granulomatose septique chronique par dysfonctionnement de la NADPH oxydase.

Enfin, le traitement par certains immunosuppresseurs ciblant les lymphocytes T constitue un facteur prédisposant à l'API, en affectant la réponse immunitaire de l'hôte. Il s'agit des inhibiteurs de calcineurine (Ciclosporine), des anti TNF α , des anticorps monoclonaux, des analogues nucléosidiques, mais aussi, les inhibiteurs de la tyrosine kinase de Bruton (Ibrutinib) utilisés dans le traitement de la leucémie lymphoïde chronique.

Plus récemment, les pneumopathies infectieuses non fongiques (grippe sévère, Covid-19) à l'origine d'hospitalisations en unité de soins intensifs constituent des situations à risque d'API. De manière plus anecdotique, la BPCO et l'insuffisance hépatique peuvent favoriser la survenue d'API.

6. Diagnostic des aspergilloses invasives

6.1. Critères de définition

L'EORTC (European Organization for Research and Treatment of Cancer) et le MSGERC (Mycoses Study Group Education and Research Consortium) ont élaboré des critères de classification des IFI. Ces critères publiés pour la première fois en 2002 (20), ont été revus et mis à jour en 2008 (21), puis, plus récemment en 2019 (22). Ils ont permis de standardiser et de définir ce qu'est une AI, dans le but d'harmoniser les études pour la recherche clinique et/ou épidémiologique.

Trois types de critères doivent être pris en compte : les facteurs d'hôte, les facteurs radio-cliniques et les critères mycologiques. Ils sont détaillés selon les dernières recommandations de l'EORTC/MSGERC (2019) comme suit :

CRITERES DEFINISSANTS LES FACTEURS D'HOTE

- Neutropénie < 0,5 G/L pendant plus de 10 jours
- Pathologie onco-hématologique
- Allogreffe de cellules souches hématopoïétiques
- Corticothérapie dans les 60 derniers jours prolongée (≥ 3 semaines) et à une dose supérieure à 0,3 mg/kg/j
- Traitement dans les 90 derniers jours par des immunosuppresseurs ciblant les lymphocytes T tels que les inhibiteurs de la calcineurine (ciclosporine), des anti-TNF α , des anticorps monoclonaux ou des analogues nucléosidiques
- Inhibiteurs de la tyrosine kinase (Ibrutinib)
- Déficit immunitaire congénital (tel que la granulomatose septique chronique, déficit en STAT3 et le déficit immunitaire combiné sévère)
- Maladie du greffon contre l'hôte (graft-versus-host) grade III ou IV touchant les intestins, poumons ou foie et réfractaire au traitement de 1^{ère} intention (corticoïdes)

CRITERES CLINIQUES

Aspergillose pulmonaire

Présence d'un des trois signes suivants au scanner thoracique : nodule avec ou sans signe du halo, signe du croissant gazeux, cavité ou consolidation lobaire

Aspergillose trachéobronchique

Ulcération trachéobronchique, nodules, pseudomembranes, présence de plaque ou d'ulcère à la bronchoscopie

Aspergillose sinusienne

- Douleur aigue localisée (pouvant irradier à l'œil)
- Ulcération nasale
- Extension osseuse

Aspergillose cérébrospinale

Un des deux signes suivants : atteinte focale à l'imagerie ou rehaussement méningé à l'IRM ou au scanner cérébral

CRITERES BIOLOGIQUES

- Présence d'*Aspergillus* spp. dans une expectoration, un lavage broncho-alvéolaire, une aspiration bronchique ou une aspiration sinusienne mise en évidence par un **examen direct positif et/ou une culture positive**
- Détection d'**antigènes galactomannanes** dans le plasma, le sérum, le liquide céphalorachidien (LCR) ou dans le liquide de lavage broncho-alvéolaire (LBA) avec au moins :
 - Un sérum ou plasma avec index ≥ 1
 - Un LBA avec index ≥ 1
 - Un sérum ou plasma avec index $\geq 0,7$ et un LBA avec index $\geq 0,8$
 - Un LCR avec index ≥ 1
- **PCR *Aspergillus***
 - ≥ 2 PCR consécutives positives sur plasma, sérum, ou sang total
 - ≥ 2 PCR positives et réalisées en duplicate sur LBA
 - ≥ 1 PCR positive sur plasma, sérum ou sang total et 1 PCR positive sur LBA

Les AI sont classées en 3 niveaux de probabilité : AI « possible », AI « probable », AI « prouvée ». La classification des AI proposée par l'EORTC/MSGERC est la suivante (22):

AI prouvée

- Microscopie : Histologie ou examen direct d'un prélèvement de site stérile présentant des filaments mycéliens septés avec preuve d'une atteinte tissulaire associée
- Culture : pousse en culture d'*Aspergillus spp.* à partir d'un prélèvement issu d'un site normalement stérile et cliniquement ou radiologiquement atteint (à l'exception des prélèvements suivants : urine, LBA, sinus)
- Détection d'ADN fongique par PCR associée au séquençage si biopsie fixée

AI probable : Présence d'un critère d'hôte, d'un critère clinique et d'un critère biologique.

AI possible : Présence d'un critère d'hôte et d'un critère clinique, en l'absence de critère biologique.

La notion d'aspergillose « prouvée » s'applique pour tous types de patient peu importe leur statut immunitaire et leur facteur d'hôte, alors que les catégories « possible » ou « probable » nécessitent la présence d'un critère d'hôte.

Ces critères de définitions d'AI ne sont pas applicables pour tous les patients notamment pour les patients hospitalisés en unités de soins intensifs. En effet, pour ces derniers, les critères d'hôtes de la classification ci-dessus ne s'appliquent généralement pas. C'est pour cela qu'ont été réfléchies et publiées des recommandations spécifiques (23). L'AspICU aide à distinguer une colonisation d'une infection « putative » à *Aspergillus* chez les patients en soins intensifs. De même, pour les co-infections grippe/*Aspergillus* et Covid-19/*Aspergillus*, des groupes d'experts ont proposés des critères permettant de définir un cas d'AI (Tableau 2).

TABEAU 2 : PROPOSITIONS DE DEFINITIONS DE CAS D'ASPERGILLOSES EN FONCTION DES CRITERES D'HOTE (23).

	Host factors	Clinical factors	Mycological evidence	Comments
AspICU⁴⁷				
Putative IPA	Host risk factors (one of the following: neutropenia [absolute neutrophil count 500/mm ³] preceding or at the time of ICU admission, underlying haematological or oncological malignancy treated with cytotoxic agents, glucocorticoid treatment [prednisone equivalent, 20 mg/day], or inborn or acquired immunodeficiency);* or mycological criterion (see mycological evidence)	Compatible signs and symptoms (one of the following: fever refractory to at least 3 days of appropriate antibiotic therapy, recrudescence fever after a period of defervescence of at least 48 h while still on antibiotics and without other apparent cause, pleuritic chest pain, pleuritic rub, dyspnoea, haemoptysis, worsening respiratory insufficiency despite appropriate antibiotic therapy and ventilatory support); and abnormal medical imaging by portable chest x-ray or CT scan of the lungs	Aspergillus-positive culture from lower respiratory tract specimen (entry criterion); and semiquantitative aspergillus-positive culture of bronchoalveolar lavage fluid without bacterial growth, together with a positive cytological smear showing branching hyphae [†]	For putative IPA classification, one host risk factor, one compatible sign or symptom, abnormal medical imaging, and lower respiratory tract specimen positive for aspergillus are needed (if ≥ 1 criterion is not met, then the patient is classified as having aspergillus colonisation); modified AspICU criteria include galactomannan above threshold value, even in the absence of host factor (for classifying patients with IAPA)
Expert case definitions for IAPA⁴⁸				
Tracheobronchitis (probable)	Influenza-like illness, positive influenza PCR or antigen, and temporal relationship (entry criterion)	Airway plaque, pseudomembrane, or ulcer	At least one of the following: serum galactomannan index >0.5, bronchoalveolar lavage galactomannan index ≥ 1.0 , positive bronchoalveolar lavage culture, positive non-bronchoscopic lavage culture, positive sputum culture, or hyphae in direct microscopy consistent with <i>Aspergillus</i> spp	..
Other pulmonary forms (probable)	Influenza-like illness, positive influenza PCR or antigen, and temporal relationship (entry criterion)	Pulmonary infiltrate (not attributed to another cause)	At least one of the following: serum galactomannan index >0.5, bronchoalveolar lavage galactomannan index ≥ 1.0 , or positive bronchoalveolar lavage culture	..
Other pulmonary forms (probable)	Influenza-like illness, positive influenza PCR or antigen, and temporal relationship (entry criterion)	Cavitating infiltrate (not attributed to another cause)	One of the following: positive sputum culture or positive tracheal aspirate culture	..
Proposed case definition for CAPA (adapted from EORTC and MSGERC⁴⁹, AspICU⁴⁷, and expert case definitions of IAPA⁴⁸)				
Tracheobronchitis or other pulmonary form (proven)	Patient with COVID-19 needing intensive care and a temporal relationship (entry criterion)	..	At least one of the following: histopathological or direct microscopic detection of fungal hyphae, showing invasive growth with associated tissue damage; or aspergillus recovered by culture or microscopy or histology or PCR obtained by a sterile aspiration or biopsy from a pulmonary site, showing an infectious disease process	..
Tracheobronchitis (probable)	Patient with COVID-19 needing intensive care and a temporal relationship (entry criterion)	Tracheobronchitis, indicated by tracheobronchial ulceration, nodule, pseudomembrane, plaque, or eschar seen on bronchoscopic analysis	At least one of the following: microscopic detection of fungal elements in bronchoalveolar lavage, indicating a mould; positive bronchoalveolar lavage culture or PCR; † serum galactomannan index >0.5 or serum LFA index >0.5; ‡ or bronchoalveolar lavage galactomannan index ≥ 1.0 or bronchoalveolar lavage LFA index ≥ 1.0 ‡	..
Other pulmonary forms (probable)	Patient with COVID-19 needing intensive care and a temporal relationship (entry criterion)	Pulmonary infiltrate, preferably documented by chest CT, or cavitating infiltrate (not attributed to another cause)	At least one of the following: microscopic detection of fungal elements in bronchoalveolar lavage, indicating a mould; positive bronchoalveolar lavage culture; † serum galactomannan index >0.5 or serum LFA index >0.5; ‡ bronchoalveolar lavage galactomannan index ≥ 1.0 or bronchoalveolar lavage LFA index ≥ 1.0 ; ‡ two or more positive aspergillus PCR tests in plasma, serum, or whole blood; † a single positive aspergillus PCR in bronchoalveolar lavage fluid (<36 cycles); † or a single positive aspergillus PCR in plasma, serum, or whole blood, and a single positive in bronchoalveolar lavage fluid (any threshold cycle permitted) †	..
Other pulmonary forms (possible) [§]	Patient with COVID-19 needing intensive care and a temporal relationship (entry criterion)	Pulmonary infiltrate, preferably documented by chest CT, or cavitating infiltrate (not attributed to another cause)	At least one of the following: microscopic detection of fungal elements in non-bronchoscopic lavage indicating a mould; positive non-bronchoscopic lavage culture; † single non-bronchoscopic lavage galactomannan index >4.5; non-bronchoscopic lavage galactomannan index >1.2 twice or more; or non-bronchoscopic lavage galactomannan index >1.2 plus another non-bronchoscopic lavage mycology test positive (non-bronchoscopic lavage PCR or LFA)	..

CAPA=COVID-19-associated invasive pulmonary aspergillosis. EORTC= European Organisation for Research and Treatment of Cancer. IAPA=influenza-associated pulmonary aspergillosis. ICU=intensive care unit. IPA=invasive pulmonary aspergillosis. LFA=lateral flow assay. MSGERC=Mycoses Study Group Education and Research Consortium. *Only one of these criteria required for diagnosis. †In case of patients with chronic obstructive pulmonary disease or chronic respiratory disease, the PCR or culture results should be confirmed by galactomannan testing to rule out colonisation or chronic aspergillosis. Galactomannan index should be available; galactomannan-index threshold applies to both enzyme immunoassay and LFA. ‡Visual reader should be used for a primary result and confirmatory galactomannan testing should be sought. §Classification of possible CAPA will most likely be sufficient to initiate antifungal therapy in the clinic but, in line with other consensus statements, it is not recommended for enrolling patients into clinical trials. Possible CAPA could serve as a secondary endpoint in a randomised prophylaxis study. Additional studies are needed to support the specificity of non-bronchoscopic lavage testing. Non-bronchoscopic lavage is considered a blind application of 10–20 mL saline recovered by aspiration via the closed suction system in an intubated patient. Bronchoalveolar lavage and non-bronchoscopic lavage are currently not considered equal for diagnosing CAPA.

6.2. Outils diagnostiques microbiologiques

Le diagnostic biologique d'une AI est basé sur la mise en évidence directe du champignon :

- Mise en évidence directe du champignon par microscopie et culture
- Mise en évidence de composants du champignon :
 - Antigènes de paroi spécifiques d'*Aspergillus* : galactomannanes
 - ADN fongique

6.2.1 Examen direct et culture mycologique

Plusieurs types de prélèvements peuvent être réalisés :

- Sphère ORL et broncho-pulmonaire : expectorations, aspirations trachéales ou bronchiques, LBA
- Autres : LCR, prélèvement cutané, sinus...

L'examen direct après coloration argentique consiste en la recherche au microscope de filaments mycéliens cloisonnés ramifiés (à 45°). Leur présence dans des prélèvements normalement stériles signe une infection à champignon filamenteux. Cependant, la microscopie possède une faible sensibilité (50%)(24).

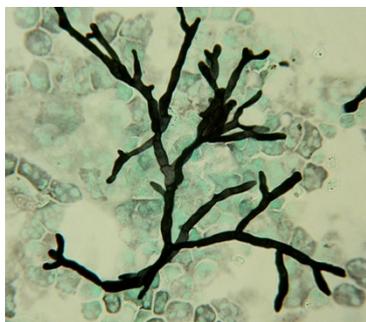


FIGURE 6 : FILAMENTS MYCELIENS SEPTES D'*ASPERGILLUS* SPP. APRES COLORATION ARGENTIQUE

La mise en culture d'un prélèvement est une technique simple et peu coûteuse. Une culture positive permet d'isoler la souche et d'obtenir une identification précise de l'espèce (critères morphologiques en microscopie, séquençage génotypique ou identification protéique par spectrométrie de masse MALDI-TOF) ainsi qu'un antifongogramme permettant d'apprécier la sensibilité de la souche aux antifongiques.

Aspergillus étant une moisissure ubiquitaire, son isolement dans un prélèvement respiratoire non stérile est difficile d'interprétation : infection active, colonisation, ou encore contamination du milieu de culture au laboratoire. Selon *Lamoth* et al., la sensibilité de la culture d'un LBA pour le diagnostic d'IFI est comprise entre 20% et 50% (25). La culture peut s'avérer négative alors que l'examen direct est positif sur le même prélèvement. Ce peut être le cas, lorsque le patient est en cours de traitement antifongique, ce qui inhibe la pousse du champignon sur les milieux de culture.

L'examen direct et la culture des prélèvements lors d'une suspicion d'IFI sont donc recommandés (24) mais l'association à d'autres techniques microbiologiques est indispensable pour affiner l'interprétation des résultats et donc améliorer la sensibilité.

6.2.2 Antigènes galactomannanes

Les antigènes galactomannanes (GM) sont des antigènes solubles présents dans la paroi des *Aspergillus* et sécrétés lors d'une infection aspergillaire. Ils sont détectables localement au niveau du site de l'infection (LBA, LCR) mais aussi dans la circulation générale où ils sont le témoin d'un mécanisme angioinvasif.

On effectue leur recherche par un dosage immuno-enzymatique de type sandwich commercialisé par BioRad sous le nom de « Platelia *Aspergillus* Ag». Le résultat de l'analyse est exprimé par un index qui correspond au rapport de la densité optique (DO) de l'échantillon sur la DO du contrôle du test.

Le dosage des GM est validé par le fournisseur uniquement sur LBA et sérum, mais peut permettre une orientation diagnostique sur d'autres matrices (26) notamment le LCR (27) en cas de suspicion d'aspergillose cérébrale.

Selon les préconisations du fournisseur BioRad, un index ≥ 0.5 est considéré comme positif sur sérum et sur LBA. Des valeurs seuils différentes sont recommandées par l'EORTC/MSGERC selon la nature de l'échantillon. Ces seuils, applicables chez l'adulte comme chez l'enfant, sont les suivants : un index ≥ 1.0 sur sérum ou plasma, ou ≥ 1.0 sur LBA, ou ≥ 0.7 sur sérum/plasma associé à un index ≥ 0.8 sur LBA.

Ces valeurs seuils sont discutables car, comme le démontrent Leeflang *et al.* dans leur méta-analyse, en augmentant la valeur seuil de positivité des GM sériques, on augmente la spécificité, au détriment de la sensibilité (Tableau 3).

TABLEAU 3 : PERFORMANCES DU DOSAGE DES GM SÉRIQUES CHEZ DES PATIENTS NEUTROPÉNIQUES EN FONCTION DE LA VALEUR SEUIL UTILISÉE, D'APRÈS (28).

Valeurs seuils GM sérique	Sensibilité	Spécificité
0,5	78%	85%
1	71%	90%
1,5	63%	93%

Le GM sérique voit ses performances varier selon le terrain du patient. Chez les patients à haut risque d'AI (patients neutropéniques sous chimiothérapie intensive ou allogreffés de moelle osseuse), le GM sérique peut être utilisé en criblage systématique bihebdomadaire ou en cas de suspicion clinique d'AI. Il possède une spécificité et une valeur prédictive négative pour l'AI élevée (spécificité $>90\%$), et une sensibilité entre 60 et 80% (29). Deux GM sériques positifs consécutifs permettent d'obtenir une spécificité encore meilleure. Cependant, les traitements antifongiques (prophylaxie chez les patients d'hématologie ou traitement probabiliste d'une AI) affectent les performances du dosage des GM en diminuant sa sensibilité. Ainsi, dans ces cas, une antigénémie négative ne permet pas d'exclure une IFI, il y a un risque de résultat faussement

négatif en raison d'une faible charge fongique (30)-(31). Le dépistage systématique par dosage des GM sériques, chez les patients sous prophylaxie antifongique, n'est donc plus recommandé.

L'intérêt pronostique de la valeur initiale des GM au diagnostic ainsi que l'intérêt de leur suivi cinétique lors d'un traitement antifongique a été démontré (32). En effet, les GM sériques sont un indicateur de succès ou d'échec thérapeutique, respectivement, en cas de diminution ou d'augmentation de leur index.

Chez les patients non neutropéniques, la sensibilité des GM est faible (40% selon (25)). Ceci est expliqué par le caractère non angioinvasif des aspergilloses chez ce profil de patients. Dans cette population, les GM ne sont donc pas réalisés en dépistage systématique mais plutôt lors d'une suspicion clinique d'AI. Les résultats doivent être confrontés au contexte clinique et radiographique.

La recherche de GM dans le LBA représente un bon marqueur diagnostique, y compris chez les patients transplantés d'organes solides et hospitalisés en unité de soins intensifs (33). Chez l'immunodéprimé, la sensibilité et la spécificité des Ag GM dans le LBA, pour un index seuil de 0,5 sont respectivement de 88% et 81% ; et de 78% et 93% pour une valeur seuil à 1 (34).

Il existe des composés ayant une réactivité croisée avec le test immuno-enzymatique des GM et pouvant être à l'origine de faux positifs (35):

- Réactions croisées avec d'autres champignons : *Penicillium* spp., *Geotrichum* spp., *Histoplasma* spp., certains *Fusarium*
- Antibiotiques semi-synthétiques d'origine fongique : Pipéracilline-Tazobactam (selon lots), Amoxicilline et Amoxicilline-Acide Clavulanique
- Nutrition parentérale
- Solutions à base de gluconate de calcium (synthétisé par *Penicillium*)
- Perfusions de solution glucosées (Plasmalyte) contenant du gluconate de calcium
- Perfusions d'immunoglobulines IV (Tegeline)
- Réaction croisée alimentaire (translocation digestive de GM d'origine alimentaire) : céréales, acides lipoteichoïques de *Bifidobacterium*
- Enfants < 2ans, GVH digestives

6.2.3 Biologie moléculaire

Les techniques de biologie moléculaire permettent de mettre en évidence la présence d'ADN fongique circulant dans divers types de prélèvements : sanguins (sérum, plasma ou sang total), respiratoires (LBA), liquides (LCR) et tissus. La PCR en temps réel utilisée pour la recherche d'*Aspergillus* peut cibler le genre *Aspergillus* ou être spécifique de l'espèce *Aspergillus fumigatus*. Elles possèdent des cibles génomiques diverses : ADN_r18s, ADN_r28s, ADN_r5.8S, régions ITS (*internal transcribed spacer*) ou ADN mitochondrial du champignon. Plusieurs kits de PCR multiplex en temps réel sont commercialisés, certains permettant la détection en parallèle des mutations de résistance aux antifongiques azolés chez *Aspergillus fumigatus*. Le manque de standardisation et de validation de ces techniques a longtemps constitué un frein à leur inclusion dans les critères diagnostiques des AI. Il a fallu attendre 2019 pour que la biologie

moléculaire soit intégrée dans les critères microbiologiques diagnostiques de l'AI selon l'EORTC/MSGERC (22).

Une méta-analyse réalisée en 2014 (36), sur les prélèvements de sang total ou sérum de 2 595 patients à risque d'AI, estime la sensibilité et la spécificité, respectivement, à 84% (IC 95% : 0,75-0,91) et 76% (IC 95% : 0,65-0,84) pour le diagnostic d'AI. En considérant 2 résultats consécutifs positifs, la spécificité atteint 95%. La présence de deux tests positifs présente une bonne valeur prédictive positive pour le diagnostic d'AI. Ces résultats ont été confirmés en 2019 lors d'une nouvelle méta-analyse (37). D'autre part, la charge fongique initiale présente dans le sérum, déterminée par PCR, est un facteur pronostique prédictif de la mortalité à 90 jours (38).

Comme pour toute analyse en biologie médicale, il est nécessaire d'étudier le pré-analytique afin d'optimiser la fiabilité des résultats obtenus. *Suarez et al.* (39) soulignent l'importance du volume utilisé pour l'extraction de l'ADN d'*Aspergillus* : une extraction en large volume (1ml de sérum) permet d'améliorer significativement les performances de la PCR en termes de sensibilité et spécificité par rapport à une extraction en faible volume (100µL).

Les différentes matrices obtenues à partir d'un prélèvement sanguin (sang total, plasma, sérum) présentent des performances analytiques différentes. Selon *White et al.* (40) et *Springer et al.* (41), le plasma est la matrice qui présente la meilleure sensibilité. La meilleure spécificité est obtenue sur sang total (96% ; IC 95% : 80,5-99,3), et est significativement supérieure aux spécificités obtenues sur sérum (69%, IC 95% : 50-83,6, P=0,0238) et plasma (53%, IC 95% : 32-72,7, P=0,0002) (41). De plus, le plasma permettrait une détection plus précoce d'ADN circulant. Néanmoins, en routine au laboratoire, le sérum semble être la matrice présentant le plus d'avantage en termes de praticité : utilisation du même échantillon que pour les GM, extraction moins complexe que sur sang total, pas de risque d'inhibition de la PCR par l'EDTA (anticoagulant présent dans les tubes de prélèvements pour sang total).

L'intérêt de l'association des GM sériques et de la PCR *Aspergillus* a été évalué. Chez les patients d'hématologie à très haut risque, en combinant ces deux marqueurs en dépistage : la négativité des tests permet d'éviter un traitement antifongique avec une valeur prédictive négative de 100%, la positivité d'au moins un des 2 marqueurs est prédictif d'une infection active avec une valeur prédictive positive de 88% (42).

La PCR *Aspergillus* sur LBA possède une sensibilité de 89% (IC 95% : 78,1%-99,1%) et une spécificité de 95% (IC 95% : 93,8%-97,2%) pour le diagnostic d'AI. L'évaluation de la charge fongique par PCR dans le LBA permet de discriminer l'aspergillose de la contamination, par contre elle ne permet pas de faire une distinction entre les formes invasives et les formes non invasives. Enfin, tout comme le sérum, la charge fongique dans le LBA chez les patients avec une AI, a une valeur pronostique avec une mortalité à 90 jours à 23,1% si le nombre de copies par millilitre est inférieur à 500, contre une mortalité à 68,4% si supérieur à 500 (p < 0,005) (43).

Sur LCR, la PCR *Aspergillus* peut être un outil moins invasif que la biopsie cérébrale pour orienter le diagnostic vers une aspergillose cérébrale avec une sensibilité de 75% (IC 95% : 62,5%-87,5%) et une spécificité de 98% (IC 95% : 95,5%-100%) (44).

On peut être confronté à un résultat faussement positif par contamination de la PCR par des spores d'*Aspergillus* au moment de la préparation de la technique ou par de l'ADN amplifié lors d'une expérience antérieure, mais on peut également rencontrer des réactions non

spécifiques avec d'autres champignons, comme *Penicillium* sp., qui sont dépendantes de la spécificité des amorces utilisées. En revanche, contrairement au GM, il n'y a pas de réaction croisée avec des substances exogènes.

7. Traitements des aspergilloses invasives

Les recommandations pour le traitement des aspergilloses invasives émanent de l'IDSA (Infectious Diseases Society of America) en 2016 (45), de l'ECIL-6 (European Conference on Infections in Leukemia) de 2017 (46) et de l'ESCMID (European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases) en 2018 (24).

7.1. *Traitement curatif*

Un traitement antifongique doit être instauré précocement dès que l'on suspecte une AI. Le traitement antifongique de première intention est le voriconazole (Vfend®), administré en IV avec une dose de charge de 2x6mg/kg le premier jour puis 2x4mg/kg pendant 6-12 semaines. Le dosage sérique de la voriconazolémie doit être effectué en concentrations résiduelles et permet d'adapter la posologie et de prévenir la toxicité du médicament. En cas de contre-indication ou de mauvaise tolérance, l'isavuconazole (Cresemba®) peut être utilisé en alternative, avec une efficacité similaire au voriconazole et une meilleure tolérance. L'amphotéricine B sous forme liposomale IV (Ambisome®) peut aussi être utilisée à la dose de 3mg/kg. Les facteurs favorisants doivent, si possible, être corrigés.

7.2. *Prophylaxie*

Chez certains patients à haut risque d'API, une prophylaxie primaire est nécessaire. C'est le cas de certains patients d'hématologie traités en prophylaxie par posaconazole, voriconazole ou micafungine lors de périodes d'aplasie ou en cas de GVH chez les patients allogreffés de moelle osseuse ; mais aussi des transplantés pulmonaires sous prophylaxie par voriconazole, itraconazole ou amphotéricine B inhalée pendant 3 à 4 mois après la greffe. D'autre part, les patients immunodéprimés ayant déjà contracté une AI peuvent être mis sous prophylaxie antifongique secondaire, afin d'éviter les récives.

L'hospitalisation en « secteur protégé » en hématologie, lors de neutropénie profonde et prolongée, permet de réduire le risque d'AI. Ce sont des chambres dotées d'un système de filtration de l'air et d'un flux laminaire maintenant la stérilité de la pièce. Il convient de limiter la circulation des personnes et des biens dans ces chambres et de contrôler les protocoles de bionettoyage. Des procédures de surveillance de la contamination fongique environnementale et d'isolement doivent être mises en place lorsque des travaux sont proches des services d'onco-hématologie.

II. INFECTIONS INVASIVES A MUCORALES

Les Mucorales sont des champignons plus rarement responsables d'infection fongique invasive. Il s'agit d'infections de symptomatologie souvent aspécifique et de progression très rapide et souvent fatale. Un diagnostic précoce permet d'améliorer la survie (47). Il y a donc un intérêt majeur d'utiliser des outils permettant un diagnostic rapide et fiable afin d'optimiser la prise en charge des patients.

1. Agents responsables

1.1. Généralités (48)

Les champignons de l'ordre des Mucorales sont cosmopolites. On peut les retrouver dans le sol (matières organiques en décomposition), les aliments (fruits et légumes), les déjections d'animaux mais aussi sous forme de spores dans l'air. Ce sont des phytopathogènes, mais aussi des pathogènes opportunistes redoutables pour l'Homme qui se contamine lors de l'ingestion d'aliments contaminés, de l'inhalation de spores ou par inoculation lors d'une altération de la barrière cutanée. Dans les pays développés, les mucormycoses surviennent surtout chez le sujet immunodéprimé (oncohématologie, transplantation d'organes, neutropénie, pathologies auto-immunes, ou autres altérations du système immunitaire). Dans les pays en développement, la maladie touche le plus souvent des patients souffrant de diabète non contrôlé ou des sujets immunocompétents suite à un traumatisme ou une blessure. La mucormycose est une maladie angio-invasive qui peut causer des thromboses et des infarctus conduisant rapidement à la nécrose tissulaire. La mortalité des mucormycoses invasives est élevée (>30-50%) ; elle est plus faible, mais tout de même élevée, lors de formes cutanées localisées (10-30%)(48). Les Mucorales présentent une résistance intrinsèque à de nombreux antifongiques ce qui contribue à leur mortalité.

De nombreux genres existent, mais seulement une dizaine sont pathogènes pour l'Homme. Les principaux genres concernés sont : *Rhizopus*, *Lichtheimia*, *Rhizomucor*, *Mucor*, *Cunninghamella*, *Saksenaea*, *Cokeromyces*, *Apophysomyces* et *Syncephalastrum*. Les quatre premiers genres cités étant ceux les plus fréquemment pathogènes chez l'Homme. *Rhizopus arrhizus* est l'espèce la plus fréquemment isolée (49). Il existe des différences géographiques dans la répartition des espèces.

1.2. Caractères cultureux

Les Mucorales présentent une croissance rapide inhibée par le cycloheximide. Les espèces responsables de mucormycoses humaines sont thermophiles et présentent des températures maximales de croissance élevée (40°C). La culture est rapide et extensive avec un

développement aérien important sur milieu de Sabouraud. Les boîtes de culture se retrouvent envahies par le champignon en quelques jours.

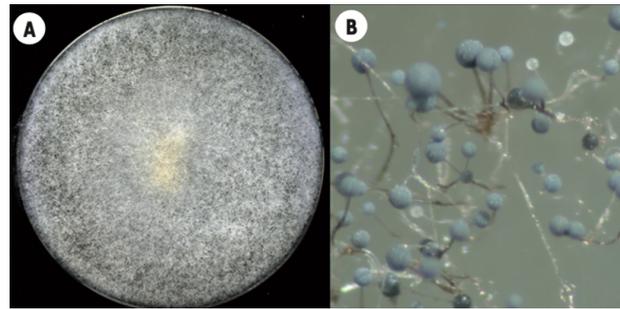


FIGURE 7 : ASPECT MACROSCOPIQUE D'UNE CULTURE DE *RHIZOPUS SP.* (A) ET ARCHITECTURE FONGIQUE A LA LOUPE BINOCULAIRE (B). D'APRES (50).

1.3. Morphologie microscopique

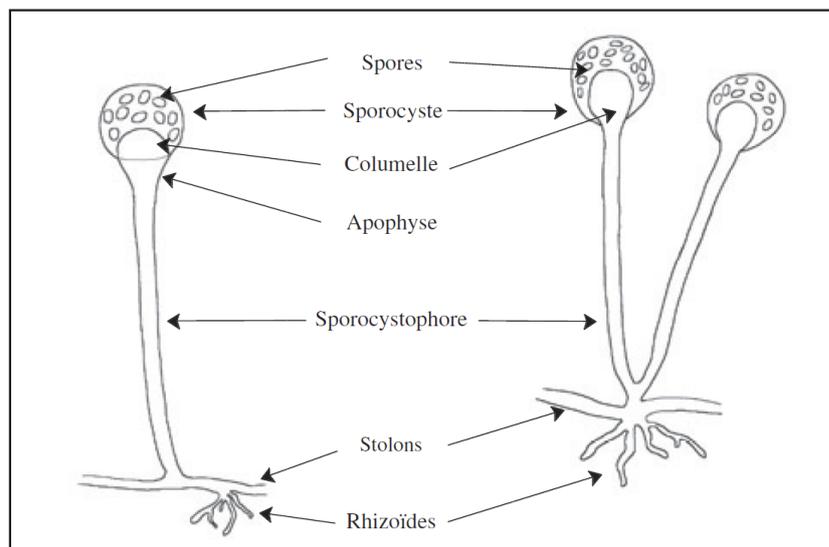
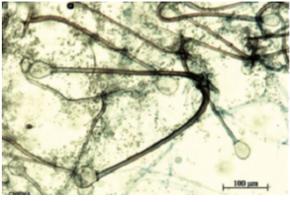
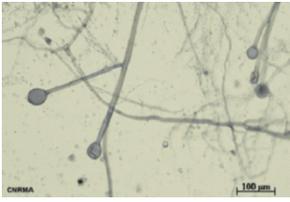
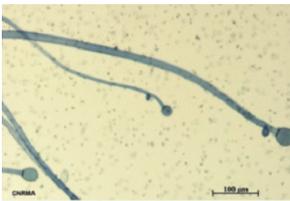
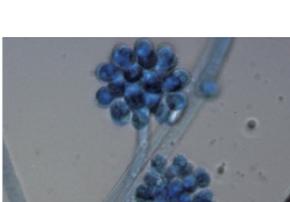


FIGURE 8 : ASPECT MICROSCOPIQUE DE L'APPAREIL REPRODUCTEUR DES MUCORALES, SELON (3).

Le thalle est constitué de filaments coenocytiques, peu cloisonnés, de diamètre large (5-15 μ m) et irrégulier, possédants des ramifications en angle droit. Chez certaines espèces, le champignon émet des stolons qui adhèrent au substrat par des rhizoïdes semblables à des petites racines. Les stolons émettent des sporocystophores qui sont des filaments porteurs des organes de reproduction asexuée. A l'extrémité du sporocystophore, se trouve un renflement en forme de vésicule : c'est la columelle. Autour de celle-ci, les sporocystes produisent les spores, aussi appelées sporocystospores. Ces dernières sont disséminées dans l'environnement par éclatement du sporocyste. Le sporocystophore présente parfois, à son extrémité, un renflement au-dessous du sporocyste : il s'agit de l'apophyse. Certaines espèces produisent des structures de résistance enflées à paroi épaisse (chlamydozspores) ou bien à paroi fine (50).

Les différents genres de Mucorales sont identifiables selon leurs caractéristiques morphologiques au microscope (Tableau 4).

TABLEAU 4 : CARACTERISTIQUES MICROSCOPIQUES DES PRINCIPALES ESPECES DE MUCORALES, D'APRES (50).

Famille	Genre/espèce	Microscopie	Caractères phénotypiques
Mucoraceae	<i>Rhizopus arrhizus</i>		<ul style="list-style-type: none"> ▪ Sporocystophore ≥ 1 cm de hauteur ▪ Rhizoïdes bien développés ▪ Sporocystospores striées
	<i>Rhizopus microsporus</i>		<ul style="list-style-type: none"> ▪ Sporocystophore ≤ 1 cm de hauteur ▪ Rhizoïdes bien développés ▪ Sporocystospores striées
	<i>Rhizomucor pusillus</i>		<ul style="list-style-type: none"> ▪ Sporocystophore branché en partie apicale ▪ Sporocystes sans apophyse ▪ Rhizoïdes simples
	<i>Mucor circinelloides</i>		<ul style="list-style-type: none"> ▪ Sporocystophore non branché ou irrégulièrement branché ▪ Absence de rhizoïdes et stolons ▪ Oidia présent
Lichthemiaceae	<i>Lichtheimia corymbifera ramosa</i>		<ul style="list-style-type: none"> ▪ Apophyse légèrement mélanisée ▪ Stolons et rhizoïdes présents ▪ Sporocystospores lisses
Saksenaseae	<i>Saksenaea</i> spp		<ul style="list-style-type: none"> ▪ Sporocystophore court ▪ Sporocystes en forme de vase ▪ Rhizoïdes pigmentés
Cunninghamellaceae	<i>Cunninghamella</i> spp		<ul style="list-style-type: none"> ▪ Sporangia portés sur des vésicules de la partie apicale du sporocystophore ▪ Sporocystospores lisses ou finement échinulés

2. Physiopathologie

2.1. Facteurs de virulence

Les principaux facteurs responsables de la virulence des champignons de l'ordre des Mucorales, permettent d'expliquer leur pathogénicité et de comprendre pourquoi certaines populations sont plus à risque que d'autres de développer une mucormycose.

❖ Angioinvasion et protéine CotH

Les protéines CotH (*spore coat protein homolog*) sont des protéines kinases qui font partie de la structure des spores et qui leur permettent d'adhérer aux cellules endothéliales via une protéine nommée GRP78 (glucose-regulated protein 78). Cette dernière voit son taux augmenter en cas d'acidocétose diabétique. La présence de CotH chez les Mucorales explique ainsi la susceptibilité aux mucormycoses des patients avec acidocétose diabétique (51).

❖ Absorption du fer de l'hôte

Le fer est un élément indispensable à la survie des champignons. Le fer libre, circulant dans le plasma, est, en grande partie, fixé à une protéine de transport : la transferrine ; ou stocké sous forme de ferritine. Lorsque les systèmes de transport et de stockage du fer sont défectueux, la concentration de fer libre augmente et crée un terrain propice au développement d'une mucormycose, en facilitant l'apport de fer au champignon. C'est ce qui se produit chez les patients atteints d'hémochromatose. Mais c'est aussi le cas lors d'une hyperglycémie ou d'une acidocétose diabétique : la diminution du pH sanguin déstabilise les protéines chélatrices du fer, facilitant sa dissociation et augmentant ainsi les taux de fer libre. Les Mucorales tirent profit de ce fer libre par différents mécanismes (52). La deferoxamine est un agent chélateur de l'ion ferrique utilisé en cas de surcharge martiale, notamment lors d'hémochromatose. Il s'agit du xénosidérophore le plus impliqué dans les cas de mucormycoses.

2.2. Mécanisme de défense immunitaire de l'hôte

La barrière cutanée représente une défense efficace contre les mucormycoses cutanées, les champignons étant incapable de pénétrer à travers une peau intacte. L'infection trouve son origine lors d'un traumatisme cutané avec une contamination concomitante par le sol ou de l'eau dans lesquels se trouve le champignon.

Tout comme *Aspergillus*, la clairance muco-ciliaire joue un rôle important lors de l'inhalation de spores de Mucorales. Cependant, certaines spores passent au travers de cette barrière et se retrouvent au niveau des poumons.

Les macrophages alvéolaires sont les cellules de l'immunité innée qui constituent la deuxième ligne de défense lors de l'inhalation de spores de Mucorales. Il a été montré que les endotoxines et l'interféron gamma sécrétés par ces cellules jouaient un rôle essentiel dans la prévention contre la germination des spores de *Rhizopus oryzae* (53).

Suite à l'inhalation, l'ingestion ou l'inoculation cutanée de conidies, chez l'individu sain, les phagocytes mononucléés et les PNN migrent rapidement vers le tissu infecté et éliminent les spores par des mécanismes oxydatifs et non oxydatifs (54). Les PNN jouent un rôle clef contre le pathogène par la production de dérivés oxygénés et la formation de NETs (*neutrophil extracellular traps*). D'autre part, les PNN modulent la réponse immunitaire de l'hôte contre les Mucorales par la production de cytokines comme l'IL-1, TNF-alpha, et IL-8. *Andrianaki* et al. ont montré que les PNN, chez la souris immunocompétente, possèdent une capacité de phagocytose moins efficace chez *Rhizopus oryzae* que chez *A. fumigatus* (55). Les cellules mononucléées circulantes sont constituées majoritairement de lymphocytes B et T, mais aussi de cellules natural-killer et de monocytes. Ces leucocytes induisent une réponse pro inflammatoire avec libération de cytokines. La production d'IL1 en réponse aux Mucorales est plus importante que pour *A. fumigatus* (56).

Les cellules endothéliales tapissent l'intérieur des vaisseaux sanguins. Elles possèdent un rôle dans la reconnaissance du pathogène. En effet, la protéine GRP78 (glucose-regulated protein 78) est un récepteur présent à la surface des cellules endothéliales qui reconnaît spécifiquement *Mucor* spp. mais pas d'autres pathogènes fongiques comme *A. fumigatus* (57).

Une altération de ces mécanismes de défense expose volontairement le patient au risque de mucormycose. C'est ainsi que certains terrains sont plus favorables que d'autres au développement du champignon. Ce sont les facteurs de risque de mucormycoses que nous allons exposer dans le chapitre suivant.

2.3. Facteurs de risque

Plusieurs facteurs de risque sont associés au développement des mucormycoses (48) : diabète non contrôlé et acidocétose diabétique, neutropénie au cours de pathologies onco-hématologiques, greffe de cellules souches hématopoïétiques, transplantation d'organes solides, immunodépression ou chimiothérapie, pathologies auto-immunes traitées, surcharges en fer, malnutrition, traumatismes (même chez l'immunocompétent) et brûlures.

De manière générale, un défaut de l'activité phagocytaire (qualitatif ou quantitatif) favorise le développement du champignon dans l'organisme.

C'est le cas chez le patient souffrant de diabète non contrôlé, en plus de l'augmentation du taux de fer libre, l'hyperglycémie et l'acidose altèrent le chimiotactisme et la fonction phagocytaire (58). Le diabète est à l'origine des mucormycose dans 27 à 52% des cas (48). Le diabète de type II est celui le plus souvent impliqué dans les mucormycoses. La mucormycose rhino-cérébrale est la forme clinique la plus fréquente chez le sujet diabétique.

Par ailleurs, les surcharges en fer et leur traitement par la deferoxamine, agent chélateur du fer, sont prédisposants. La deferoxamine augmente *in vitro* la pousse des Mucorales en agissant comme un véritable sidérophore pour le champignon lui permet de puiser facilement le fer essentiel à son développement. Les nouveaux chélateurs, deferasirox et deferiprone, ne peuvent pas être utilisés comme xénosidérophores par les Mucorales.

Les hémopathies et les transplantations de cellules souches hématopoïétiques sont les pathologies sous-jacentes les plus communes lors de mucormycoses en Europe (59), la majorité des patients souffrant de leucémie aiguë myéloïde. Le risque est le plus élevé au décours d'une neutropénie prolongée. *Marty et al*, décrivent en 2004, une augmentation du nombre de cas chez les allogreffés de cellules souches hématopoïétiques après introduction d'une chimioprophylaxie contre l'aspergillose invasive par voriconazole (60), en émettant l'hypothèse de la pression de sélection engendrée par cet antifongique sur les Mucorales. En effet, le risque relatif de développer une mucormycose chez des patients leucémiques ou transplantés de cellules souches hématopoïétiques ayant une prophylaxie par voriconazole est de 10,37 selon *Kontoyiannis et al* (61). Certaines études basées sur des modèles animaux suggèrent que le voriconazole pourrait augmenter la virulence de certaines Mucorales (62).

D'autre part, la corticothérapie au long cours et autres immunosuppresseurs sont aussi des facteurs de risque importants de mucormycose. Les corticoïdes altèrent les mécanismes de phagocytose des macrophages. De plus, ils peuvent induire un diabète secondaire iatrogène. La corticothérapie pendant plus de 3 semaines et à forte dose augmente le risque de mucormycose. Cependant, des cas de mucormycoses lors de corticothérapies courtes ont aussi été décrits (63).

2.4. Formes cliniques

Les mucormycoses peuvent se présenter sous différentes formes cliniques en fonction du mode de contamination et du terrain sous-jacent du patient (48). Les formes rhino-cérébrales et pulmonaires, secondaires à l'inhalation de spores, sont les plus fréquentes mais ne touchent pas le même profil de patient. Les mucormycoses pulmonaires atteignent surtout les patients souffrant d'hémopathies ou transplantés d'organes solides ; alors que la forme rhino-cérébrale est associée au diabète. Les mucormycoses cutanées sont dues à une inoculation directe du champignon, souvent secondaires à un traumatisme ou une chirurgie. Il existe aussi des formes gastro-intestinales secondaires à l'ingestion d'aliments contaminés par des spores. Toutes ces formes cliniques peuvent conduire, sur un terrain d'immunodépression profonde, à une mucormycose disséminée, forme la plus sévère de l'infection.

❖ Mucormycose rhino-cérébrale

Il s'agit de la forme clinique la plus fréquente. Suite à l'inhalation de spores ou lors de soins dentaires, le champignon atteint les sinus paranasaux. L'infection s'étend rapidement aux tissus adjacents et induit leur nécrose. *Rhizopus* est le genre le plus fréquemment impliqué. Cette forme clinique concerne surtout les patients diabétiques, mais aussi dans une moindre proportion, les patients atteints d'hémopathie ou de pathologies rénales. Les signes cliniques sont expliqués par la nécrose tissulaire : douleurs de la face, paralysies multiples du nerf crânien, œdème périorbitaire, fièvre et diplopie.

❖ Mucormycose pulmonaire

Les formes pulmonaires touchent plus volontairement les patients atteints d'hémopathies ou transplantés d'organe solide. Lors d'hémopathies, la présence de neutropénie, d'une corticothérapie, d'une greffe de cellules souches hématopoïétiques, le diabète et la

réaction du greffon contre l'hôte, sont des facteurs de risques identifiés de mucormycose pulmonaire.

La symptomatologie n'étant pas spécifique (fièvre, toux, dyspnée, douleurs), le diagnostic différentiel avec l'aspergillose pulmonaire invasive est difficile. En effet, ces deux infections fongiques entraînent, chez des patients ayant les mêmes facteurs de risque, une clinique, et des signes radiologiques très proches ; seul le signe du « halo inversé » semble être plus évocateur de mucormycose. *Chamilos* et al. ont comparé, dans une étude rétrospective, des patients atteints de cancer ayant développé une mucormycose pulmonaire avec d'autres ayant eu une API (64). Les signes significativement associés à une mucormycose pulmonaire étaient les suivants : présence d'une sinusite associée (OR : 25,7, p=0,012), prophylaxie par voriconazole (OR : 7,8, p=0,023), CT-scan retrouvant plus de 10 nodules (OR : 19,6, p=0,012), pleurésie associée (OR : 5,07, p=0,042).

❖ Mucormycose cutanée

Les mucormycoses cutanées résultent de l'inoculation de spores sur une altération de la barrière cutanéomuqueuse (traumatismes, chirurgie, brûlures...). Une réaction inflammatoire se forme autour de la plaie, puis elle peut être rapidement suivie d'une gangrène extensive. Cela peut conduire à des complications nécrotiques et hémorragiques voire à une infection disséminée dans 20% des cas. Plus rarement, elles peuvent être la localisation secondaire d'une mucormycose disséminée. La mucormycose cutanée peut survenir chez l'immunocompétent.

❖ Mucormycose gastro-intestinale

L'infection gastro-intestinale peut être acquise par ingestion d'aliments contaminés par des spores ou infection nosocomiale. Des plaques nécrotiques se forment dans le tube digestif avec ou sans perforation. Les deux principaux facteurs de risque décrits sont la transplantation d'organe solide et les hémopathies. Il existe également des cas décrits chez les nouveaux nés prématurés. Les symptômes aspécifiques expliquent le diagnostic souvent tardif et la mortalité élevée de cette infection.

❖ Mucormycose disséminée

L'infection disséminée est définie par l'infection d'au moins deux sites non contigus. Les principaux facteurs de risque sont les suivants : surcharge en fer (notamment traitements par deferoxamine), immunodépression profonde. C'est la forme ayant le taux de mortalité le plus élevé.

3. Diagnostic mycologique

En Décembre 2019, des recommandations consensuelles ont été élaborées pour le diagnostic et la prise en charge de ces infections, sur l'initiative de la « European Confederation of Medical Mycology » en coopération avec « Mycose Study Group Education and Research Consortium » (65). Le diagnostic biologique des mucormycoses repose sur la mise en évidence du champignon dans un prélèvement, souvent réalisé suite à une suspicion clinique, ou face à

des images suspectes à l'imagerie. Sur ces prélèvements, il est recommandé de réaliser une recherche histologique et microbiologique de mucormycose.

L'histopathologie permet d'affirmer la présence du champignon comme pathogène dans le prélèvement et donc, son caractère invasif et ainsi d'exclure une contamination du milieu de culture. Après colorations, on recherche des hyphes non pigmentés, avec un aspect de ruban, irréguliers, non ou peu septés, ramifiés à angle droit. Les ramifications typiques à 90°, par opposition aux ramifications à 45° des champignons filamenteux septés comme *Aspergillus*, sont parfois difficiles à distinguer du fait de l'architecture des tissus qui crée une contrainte au développement du champignon. C'est pour cela qu'il est recommandé, pour confirmer le diagnostic de mucormycose, d'associer à l'histopathologie, la recherche du champignon par culture mycologique et/ou par biologie moléculaire.

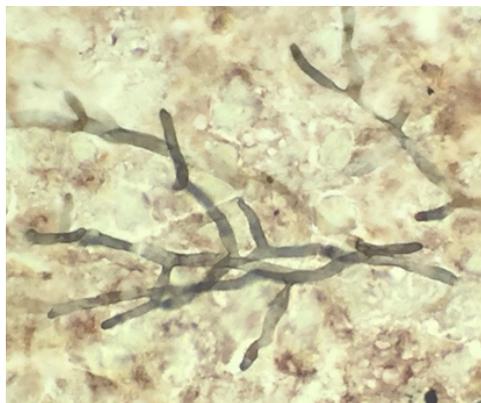


FIGURE 9 : FILAMENTS COENOCYTIQUES DE MUCORALES APRES COLORATION ARGENTIQUE

A la différence des AI, il n'y a, à ce jour, pas de marqueurs antigéniques permettant le diagnostic de mucormycoses.

3.1. Examen direct et culture (59)

L'examen direct, au microscope, permet d'orienter rapidement le diagnostic et donc la stratégie thérapeutique. Une attention particulière doit être portée sur la présence ou non de septas, l'angle des ramifications et la largeur des hyphes. La microscopie, à partir du prélèvement, ne permet pas de déterminer le genre et l'espèce de Mucorale incriminée. C'est pour cela qu'elle doit être systématiquement associée à la mise en culture du prélèvement. Cependant, selon l'EORTC/MSGERC (22), un examen direct positif avec des filaments mycéliens non septés d'un prélèvement normalement stérile comme une biopsie est un critère d'infection invasive prouvée si il est associé à la mise en évidence de lésions tissulaires en histopathologie.

La culture fongique est indispensable pour l'identification de l'espèce responsable de la mucormycose mais aussi pour tester sa sensibilité aux antifongiques. L'incubation simultanée du prélèvement à 30°C et 37°C est recommandée. Les colonies apparaissent en 24-48h, et

envahissent rapidement leur milieu de culture. L'identification de l'espèce est réalisée en routine par spectrométrie de masse de type MALDI-TOF.

La culture positive d'un site stérile confirme le diagnostic. La culture positive d'un site non stérile peut provenir d'une contamination et doit donc être interprétée en fonction du contexte clinique et radiologique.

Le broyage, l'homogénéisation du prélèvement avant ensemencement, ou la mise en route d'une thérapie antifongique avant le prélèvement peuvent altérer les hyphes et conduire à une culture faussement négative, diminuant ainsi la sensibilité de la culture.

La culture de prélèvements profonds nécessite un prélèvement invasif prélevé la plupart du temps lors d'une intervention chirurgicale ce qui peut retarder le diagnostic. De plus, il n'est parfois pas possible de faire ce genre d'intervention chez des patients instables en unités de soins intensifs ou en onco-hématologie.

3.2. Biologie moléculaire

Les techniques moléculaires permettent d'identifier directement la présence du champignon à partir de tissus infectés, de LBA, mais aussi à partir de prélèvements non invasifs comme le sérum ou le plasma. Contrairement à *Aspergillus*, la biologie moléculaire n'apparaît pas encore dans les critères diagnostiques des mucormycoses invasives de l'EORTC/MSGERC de 2019 (22), à cause du manque de validation et de standardisation de cette technique.

La rédaction de ce chapitre est basée sur une revue de la littérature publiée par Million *et al.* dans *Journal of Fungi* en 2019 (66).

Pour détecter les Mucorales, plusieurs techniques sont possibles. On peut utiliser des amorces panfongiques ciblant les régions ITS (*internal transcribed spacer*) et faire ensuite un séquençage ; ou utiliser des amorces spécifiques des Mucorales. Plusieurs PCR existent : PCR multiplex quantitative en temps réel (qPCR) ciblant les régions ITS1/ITS2 avec des sondes spécifiques de *R. oryzae*, *R. microsporus* et *Mucor spp.*, qPCR en temps réel avec des amorces spécifiques amplifiant une partie du gène du cytochrome b, qPCR spécifique ciblant l'ADNr 28S, qPCR ciblant deux régions ribosomales (18S et 28S) capable de détecter l'ADN de plusieurs espèces responsables de mucormycoses.

Certaines techniques permettent de détecter indépendamment (en utilisant dans le même run, un puit de PCR par genre) les genres les plus fréquemment impliqués en pathologie humaine (*Mucor/Rhizopus*, *Lichtheimia*, *Rhizomucor*, *Cunninghamella*).

Le LBA est un prélèvement intéressant pour le diagnostic moléculaire des mucormycoses pulmonaires, permettant un diagnostic précoce avec une sensibilité meilleure que la culture (67). Cependant, il s'agit d'un prélèvement invasif, parfois difficile à réaliser chez certains patients hospitalisés en unités de soins intensifs ou fortement immunodéprimés. Pour pallier à cette difficulté, la détection d'ADN circulant de Mucorales peut être réalisée sur sérum ou plasma. Pour optimiser les performances, il est recommandé de procéder à une extraction sur un

large volume de sérum ou plasma (1mL) qui permet d'augmenter la sensibilité de 81 à 92% par rapport à une extraction sur un plus faible volume.

Des résultats faussement positifs lors de la recherche de Mucorales par PCR sur sérum ou plasma sont rares mais possibles, avec une difficulté pour différencier un faux positif réel d'un vrai positif très précoce lorsque la PCR est faiblement positive. Dans ce cas, il est nécessaire de répéter les prélèvements pour confirmer ou infirmer le diagnostic. D'autre part, la détection d'ADN circulant peut manquer de sensibilité chez les patients ayant une infection très localisée.

Outre l'intérêt diagnostique, la biologie moléculaire peut être utile pour suivre l'évolution d'une mucormycose, en suivant la cinétique de la charge fongique (68). La négatation des qPCR sériques après la mise en route du traitement antifongique ciblé est de moins mauvais pronostic qu'une persistance de la positivité.

Il existe d'autres cibles potentielles pour le diagnostic des mucormycoses. C'est le cas des gènes codant pour la protéine CotH qui sont présents uniquement chez les Mucorales. Baldin *et al.* ont infecté des souris avec plusieurs espèces de Mucorales et ont réussi à détecter, par PCR, CotH dans le plasma, les urines et le LBA des souris seulement 24h après l'infection. Ils concluent néanmoins que la détection de CotH dans les urines semble plus fiable que dans les autres types de prélèvements avec une sensibilité de 90% et une spécificité de 100% pour le diagnostic de mucormycose prouvée (69). Cette cible semble être un bon marqueur de mucormycoses, mais doit être validée sur un plus large panel de patients avant d'être utilisée en routine.

4. Traitement des mucormycoses

Tout comme pour les aspergilloses invasives, des recommandations pour le traitement des mucormycoses sont élaborées par l'ECIL-6 (46) et l'ECMM (European Confederation of Medical Mycology) (65).

La prise en charge d'une mucormycose est multidisciplinaire et doit être la plus précoce possible, elle est thérapeutique et chirurgicale et doit prendre en compte le contrôle des facteurs favorisants. La prise en charge chirurgicale consiste en l'exérèse des tissus envahis.

Un traitement antifongique doit être instauré précocement avec, en première intention, l'amphotéricine B à fortes doses (5-10 mg/kg/j) et en alternative, les antifongiques azolés tels que le posaconazole ou l'isavuconazole peuvent être utilisés selon l'antifongigramme. Il est aussi possible d'utiliser des associations antifongiques.

Il est important de faire le diagnostic différentiel avec une aspergillose invasive car les Mucorales possèdent une résistance intrinsèque au voriconazole et aux échinocandines, très utilisés dans le traitement de l'aspergillose.

Les facteurs favorisants doivent être, si possible, corrigés : contrôle d'un déséquilibre glycémique, facteurs de croissance hématopoïétiques en cas de neutropénie, arrêt ou réduction d'une corticothérapie ou d'un traitement immunosuppresseur.

EVALUATION DE LA PCR MYCOGENIE®

ASPERGILLUS-MUCORALES SPP.

Les infections fongiques invasives telles que les aspergilloses ou les mucormycoses sont, nous l'avons vu, des pathologies qui nécessitent un diagnostic précoce et fiable afin de mettre rapidement en route une prise en charge et un traitement antifongique adaptés. Le diagnostic biologique de ces infections est difficile et nécessite de coupler les méthodes diagnostiques pour pallier aux limites de chaque technique en fonction des matrices utilisées (sensibilité, spécificité, réactions croisées, risque de contamination) afin d'interpréter les résultats le plus correctement possible (distinction colonisation/infection entre autres).

La biologie moléculaire, et notamment la PCR *Aspergillus*, récemment incluse dans les recommandations diagnostiques de l'EORTC/MSGERC de 2019, semble prometteuse pour diagnostiquer précocement les infections fongiques invasives. C'est pour ces raisons que nous avons choisi d'étudier les performances de la PCR Mycogénie® *Aspergillus-Mucorales spp* (Ademtech, Pessac, France) qui permet une détection rapide de l'ADN des champignons du genre *Aspergillus* et de l'ordre des Mucorales dans divers types de prélèvements. L'objectif de cette étude est de déterminer les performances analytiques de ce kit et de le comparer aux techniques déjà en place, dans le but, à terme, de l'utiliser en routine au laboratoire de Mycologie du CHU de Bordeaux.

I. MATERIELS ET METHODES

1. Échantillons utilisés

Les échantillons utilisés sont des prélèvements reçus au laboratoire de Mycologie du CHU de Bordeaux. Ils ont été sélectionnés de manière rétrospective entre 2014 et 2019 et prospective entre janvier et mars 2020. Il s'agit de prélèvements réalisés dans un contexte de recherche d'infection fongique invasive à *Aspergillus*, Mucorales, ou autres champignons.

2. Extraction

L'ADN total des échantillons a été extrait sur MagNA Pure 96 ® (Roche Diagnostics). Les sérums ont été extraits avec le kit « Viral NA *large volume* » à partir de 1ml de prélèvement, pour obtenir 50µL d'éluat. Les prélèvements respiratoires, quant à eux, ont été extraits à partir de 500µL de prélèvement pour obtenir 100µL d'éluat. Enfin, les autres prélèvements (biopsie, sinus, LCR) ont été extraits à partir de 200µL pour obtenir 100µL d'éluat.

3. Kit PCR *Aspergillus* spp.-Mucorales MYCOGENIE®

Le kit MycoGENIE® *Aspergillus* spp. -Mucorales est une trousse de PCR en temps réel qui possède 3 cibles : l'ADNr 28S du genre *Aspergillus*, l'ADNr 28S des Mucorales et le contrôle interne. Il permet leur détection qualitative à partir de sérums, biopsies et échantillons respiratoires. Le kit a été validé par le fournisseur sur les automates suivants : CFX96 Real-Time Detection System (Biorad) et LightCycler® 480 Real-Time Instrument II (Roche Diagnostics). C'est ce dernier que nous avons utilisé pour notre étude.

Des sondes oligonucléotidiques couplées à des fluorophores (Tableau 5) sont utilisées pour détecter l'amplification de l'ADN par hybridation à la cible (Figure 10). En l'absence d'ADN cible, les sondes correspondantes n'émettent pas de fluorescence et, par conséquent, aucun signal n'est détecté. Lorsque l'ADN cible est présent, l'intensité de la fluorescence correspondante augmente à chaque cycle d'amplification. Le « cycle threshold » ou Ct correspond au nombre de cycles d'amplification nécessaires pour obtenir un signal de fluorescence positif (Figure 11). Pour cette technique, le protocole comprend 45 cycles d'amplification.

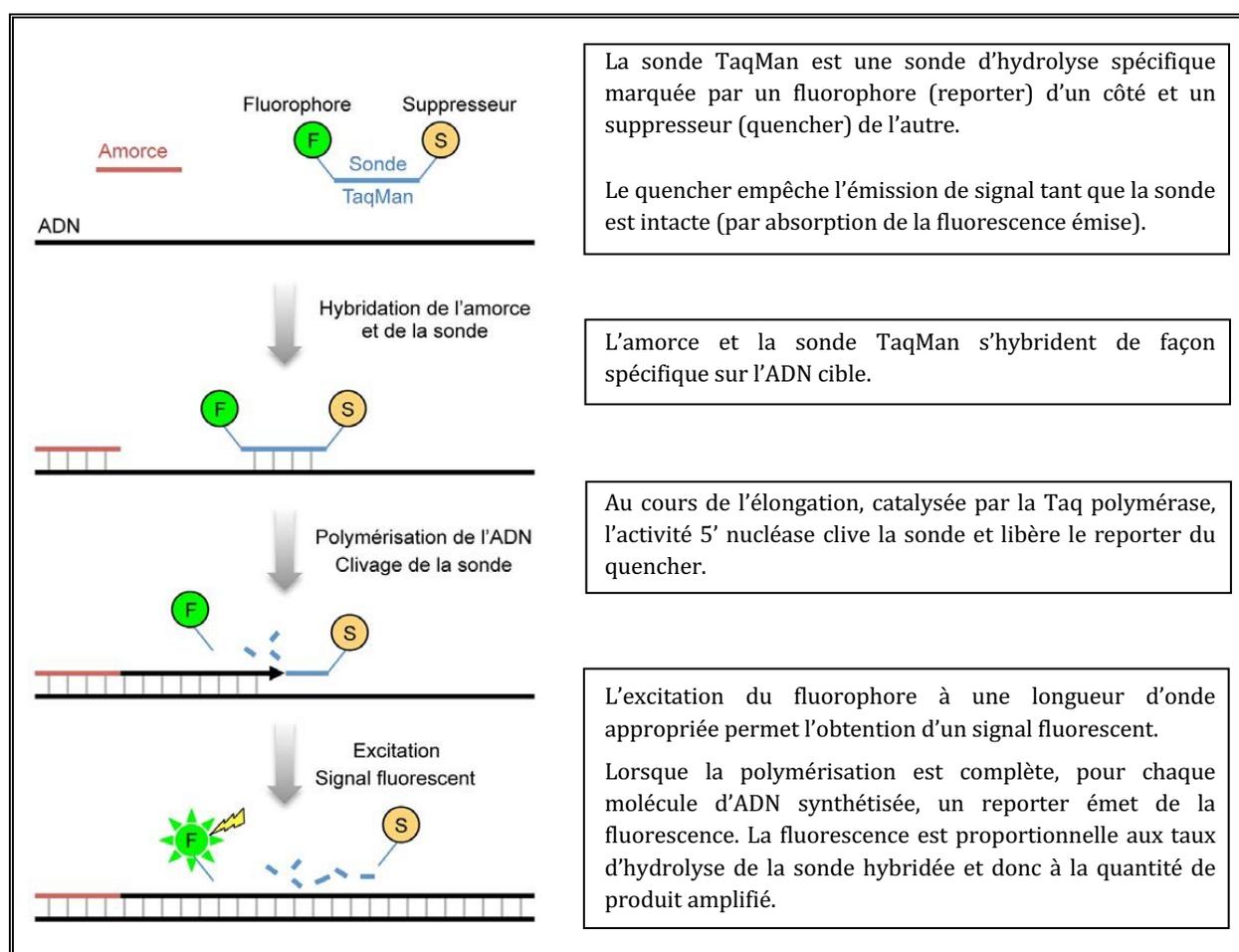


FIGURE 10 : PRINCIPE DE LA PCR AVEC SONDE TAQMAN

TABLEAU 5 : TABLEAU DE SELECTION DES FLUOROPHORES EN FONCTION DE L'AUTOMATE UTILISE (SELON LA FICHE FOURNISSEUR DU KIT)

	Reporteur/ Filtres			Quencher
	A spp	Mucorales	IC	
7500/ViiA7 -Applied Biosystems (1)	FAM	VIC	ROX	Non
Mx3000P -Agilent Technologies	FAM	HEX	ROX	
CFX96 -Biorad	FAM	HEX	ROX	
SmartCycler® II -Cepheid®	FAM	Alexa 532	Texas-Red	
LC480 I (2) -Roche Diagnostics	483/533	523/568	558/610	
LC480 II (2) -Roche Diagnostics	465/510	533/580	533/610	
RotorGene -Qiagen	FAM	HEX	ROX	

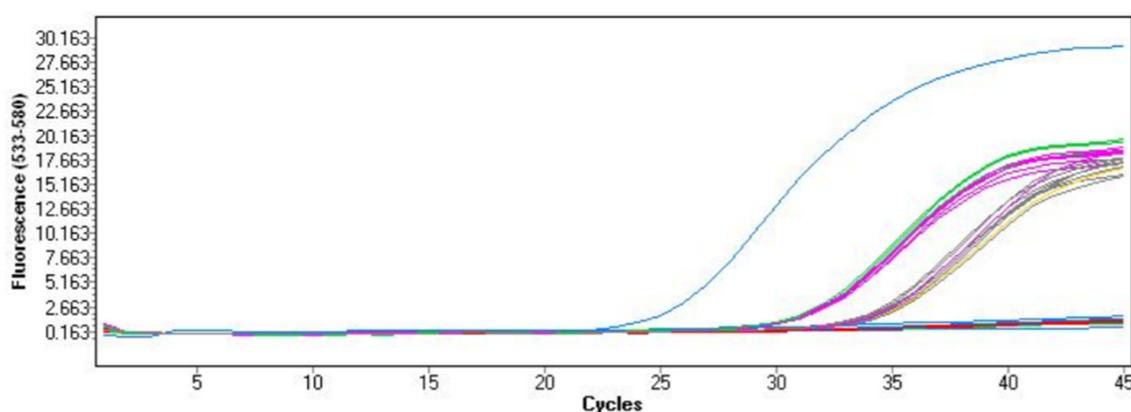


FIGURE 11 : EXEMPLE DE COURBE D'AMPLIFICATION OBTENUE POUR DETECTION DES MUCORALES

L'essai est valide si le Ct du témoin positif est inférieur à 35 pour toutes les cibles et le Ct du témoin négatif est supérieur à 45. Le fournisseur propose une interprétation des résultats en fonction des Ct obtenus (Tableau 6).

TABLEAU 6 : INTERPRETATION DES RESULTATS (SELON LA FICHE FOURNISSEUR DU KIT)

	RESULTATS		
	Positif	Négatif	Invalide
<i>Aspergillus spp./Mucorales</i> IC	Ct < 45	Ct > 45	Ct > 45
	Ct < 35	Ct < 35	Ct > 35

4. Contrôles de PCR

Deux types de contrôles de PCR ont été utilisés : le contrôle interne du kit et un contrôle externe (ADN *A. fumigatus*, Vircell). Le témoin d'extraction utilisé pour *Aspergillus* est de l'ADN génomique d'*A. fumigatus* commercial (AmpliRun, Vircell), dilué dans un pool de sérum négatifs. Après dilutions, on obtient un Ct moyen de 27, compatible une valeur physiopathologique.

5. Répétabilité et reproductibilité

La répétabilité a été évaluée pour *Aspergillus sp.* et Mucorales. Deux échantillons (un positif en Mucorales et l'autre en *Aspergillus*) ont été analysés par le même opérateur, le même jour, sur le même lot de réactif, et le même instrument analytique. Selon les recommandations du COFRAC (Comité Français d'Accréditation), la répétabilité a été mesurée à partir de deux niveaux de concentrations correspondants en valeurs physiopathologiques à un niveau « bas » et un niveau « élevé ». Chaque niveau a été analysé 10 fois.

La reproductibilité consiste en l'analyse d'un même échantillon dans des conditions différentes : opérateur, lots de réactifs. La reproductibilité a été évaluée à partir des valeurs des Ct obtenus lors de 30 passages du témoin d'extraction pour *Aspergillus* et du témoin positif du kit commercial pour les Mucorales. Les 30 passages ont été réalisés sur des jours distincts et avec des opérateurs différents sur le même automate de PCR en temps réel (LightCycler®480, Roche).

6. Techniques comparatives

PCR de référence

Avant la mise en place de la PCR *Aspergillus*/Mucorales au CHU de Bordeaux, nos demandes de biologie moléculaire étaient envoyées au CHU de Besançon pour analyse. La recherche d'*Aspergillus* est effectuée selon deux cibles distinctes : une cible mitochondriale et une cible ribosomale ciblant le gène 18S spécifique d'*A. fumigatus*. Pour la détection des Mucorales, 3 PCR sont réalisées ciblant 4 genres différents qui sont les principaux responsables de mucormycoses : 1 PCR *Rhizomucor*, 1 PCR *Lichtheimia* et enfin, 1 PCR *Mucor/Rhizopus* sans distinction possible entre les deux genres. Pour les sérums, l'extraction est réalisée sur MagNA Pure Compact (Roche Diagnostics) en « large volume » à partir de 1ml, élué dans 50µL. L'extraction des LBA est réalisée à partir de 200µL d'échantillon. Les PCR sont réalisées sur le LightCycler480® (Roche Diagnostics) et sont considérées comme positives lorsque le Ct est < 46 et négative lorsque le Ct est ≥ 46.

Diagnostic mycologique

Le diagnostic mycologique comprend l'examen direct et la mise en culture du prélèvement. La culture a été réalisée selon les méthodes utilisées en routine au laboratoire de Mycologie du CHU de Bordeaux sur les prélèvements respiratoires (expectorations, aspirations bronchiques, LBA), liquide d'ascite, biopsies pulmonaires et sinus. Un examen direct après coloration a également été fait sur ces prélèvements. Les prélèvements de sérums ne sont pas mis en culture. L'unique prélèvement de LCR inclus dans l'étude n'a pas été mis en culture.

Pour notre étude, un échantillon est considéré positif si l'on retrouve en culture et/ou à l'examen direct des champignons de type *Aspergillus* ou Mucorales. Un échantillon est considéré

comme négatif si la culture et l'examen direct sont négatifs ou retrouvent un champignon autre que *Aspergillus* ou une Mucorales.

Antigènes galactomannanes

Les antigènes galactomannanes sont dosés par technique immunoenzymatique sandwich de type ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) avec le kit Platelia® *Aspergillus* (Biorad, France) sur les échantillons de sérum, LBA et LCR. Le résultat de l'analyse est exprimé par un index qui correspond au rapport de la DO de l'échantillon sur la DO du contrôle du test. Le fournisseur préconise qu'un index $\geq 0,5$ doit être considéré comme positif quelle que soit la nature de l'échantillon testé. Les recommandations de l'EORTC/MSGERC préconisent comme valeurs seuils un index ≥ 1.0 sur sérum ou plasma, ou ≥ 1.0 sur LBA, ou ≥ 0.7 sur sérum/plasma associé à un index ≥ 0.8 sur LBA. Dans notre étude, nous avons choisi d'utiliser et de comparer le seuil recommandé par le fournisseur ainsi que ceux de l'EORTC/MSGERC aux résultats de la PCR *Aspergillus*-Mucorales.

II. RESULTATS - PERFORMANCES ANALYTIQUES

1. Validation des contrôles de PCR

Le contrôle interne contenu dans le kit MycoGENIE® était initialement ajouté avant extraction dans chaque puit de la plaque d'extraction afin de servir de témoin d'extraction. Cependant, après avoir constaté une mauvaise amplification de ce contrôle interne (Figure 12), pur et après dilution du contrôle interne au 1/8^{ème} et au 1/50^{ème}, nous avons décidé de l'ajouter après extraction lors de la PCR. Ceci nous a permis d'obtenir des courbes d'amplification satisfaisantes (Figure 13), nous faisant suspecter une mauvaise extraction du contrôle interne par l'automate MagNA Pure 96 et non pas une inhibition des prélèvements. Le contrôle externe d'extraction préparé à partir d'ADN d'*Aspergillus fumigatus* commercial (AmpliRun, Vircell) a quant à lui été correctement extrait.

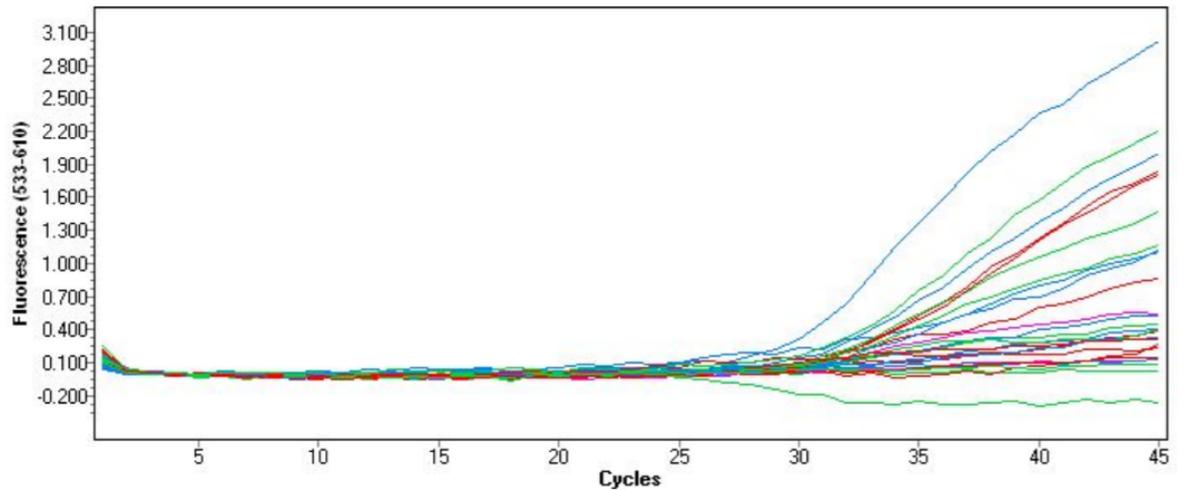


FIGURE 12 : COURBES D'AMPLIFICATION DU CONTROLE INTERNE DU KIT OBTENUES EN L'UTILISANT COMME TEMOIN D'EXTRACTION

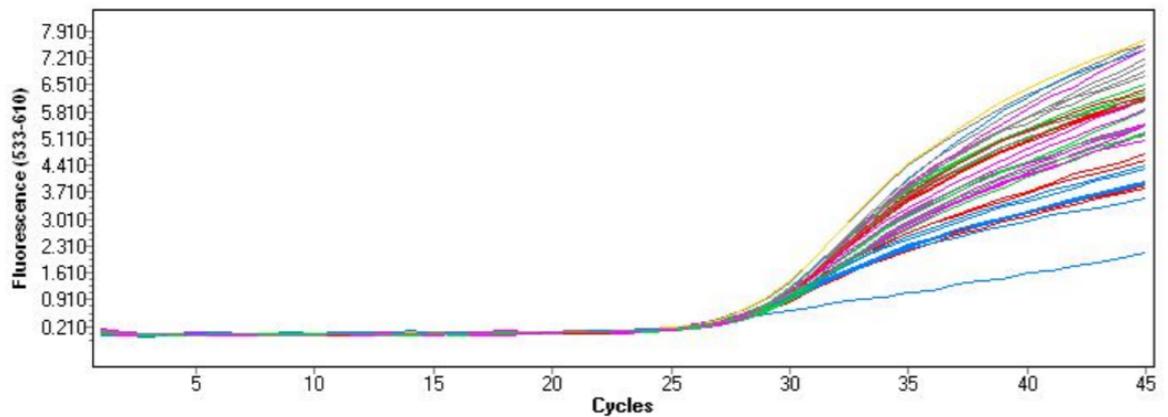


FIGURE 13 : COURBES D'AMPLIFICATION DU CONTROLE INTERNE DU KIT OBTENUES EN L'UTILISANT COMME TEMOIN D'AMPLIFICATION

2. Limite de détection

La limite de détection de la PCR *Aspergillus* a été déterminée à partir d'une gamme de dilutions d'ADN d'*Aspergillus* commercialisé (AmpliRun, Vircell). On obtient une limite de détection d'environ 10 copies/ml. Ce résultat est identique à celui spécifié dans la notice du fournisseur.

3. Spécificité analytique

La spécificité analytique est la capacité à détecter uniquement le marqueur cible. Des tests de réactivité croisée ont été effectués à partir de souches des espèces suivantes : *A. fumigatus*, *A. flavus*, *A. niger*, *A. terreus*, *A. nidulans*, *A. nishimurae*, *A. sidowi*, *Rhizopus arrhizus*, *Rhizopus microsporus*, *Rhizomucor pusillus*, *Apophysomyces*, *Mycotypha*, *Mucor indicus*, *Mucor circinelloides*,

Penicillium sp, *Paecilomyces variotii*, *Histoplasma sp*. Les souches ont été mises en suspension dans de l'eau stérile puis extraites et analysées de la même manière que les échantillons de patients. Toutes les espèces du genre *Aspergillus* ont eu un résultat de PCR positif en *Aspergillus sp*. et négatif en Mucorales. Les souches de *Penicillium sp*. et *Paecilomyces variotii* (espèce proche de *Penicillium sp*.) sont positives en PCR *Aspergillus* et négative en PCR Mucorales. Il s'agit d'une réaction croisée connue et annoncée par le fournisseur, ce kit ne permettant pas de différencier les genres *Aspergillus* et *Penicillium*. Les souches de *Rhizopus arrhizus*, *Rhizopus microsporus*, *Rhizomucor pusillus*, *Apophysomyces*, *Mycotypha*, *Mucor indicus*, *Mucor circinelloides*, appartenant à l'ordre des Mucorales, sont positives en PCR Mucorales et négatives en PCR *Aspergillus sp*. La souche d'*Histoplasma* est revenue positive pour la PCR *Aspergillus* et négative pour Mucorales.

4. Répétabilité et reproductibilité

Le tableau 7 récapitule les résultats obtenus lors des tests de répétabilité et de reproductibilité du kit de PCR. Ces résultats sont inférieurs à ceux mentionnés dans la notice du fournisseur.

TABLEAU 7 : RESULTATS DE REPETABILITE ET REPRODUCTIBILITE DU KIT MYCOGENIE

		<i>Aspergillus spp.</i>	<i>Mucorales</i>
Répétabilité (n=10)	Écart-type	0,128	0,141
	Coefficient de variation (CV)	0,4%	0,4%
	CV fournisseur	1,3%	1,45%
Reproductibilité (n=30)	Écart-type	0,54	0,44
	Coefficient de variation	0,02%	0,02%
	CV fournisseur	1%	1,1%

5. Comparaison aux autres méthodes diagnostiques

Cent-un échantillons cliniques ont été inclus dont 64 sérums, 27 prélèvements respiratoires, 10 prélèvements divers (6 sinus, 1 biopsie pulmonaire, 1 biopsie cutanée, 1 liquide d'ascite, 1 LCR). Parmi ces échantillons, on retrouvait en PCR : 67 échantillons négatifs, 23 échantillons positifs pour *Aspergillus* et 14 échantillons positifs pour Mucorales, dont 3 prélèvements avec les 2 PCR positives.

5.1. PCR vs. diagnostic mycologique

Trente-six échantillons ont été inclus car ayant eu un examen direct et une culture mycologique au laboratoire de mycologie du CHU de Bordeaux. Parmi ces 36 échantillons, il y a

27 prélèvements respiratoires (dont 14 LBA, 9 expectorations, 4 aspirations trachéales ou bronchiques), 6 prélèvements de sinus, 1 biopsie pulmonaire, 1 biopsie cutanée, 1 liquide d'ascite.

Pour la PCR *Aspergillus*, les résultats sont présentés dans le tableau 8 et pour la PCR Mucorales dans le tableau 9. Il y a 80% de concordances entre les 2 techniques pour la détection d'*Aspergillus* et 97% pour les Mucorales. Les discordances observées concernent 5 prélèvements respiratoires non invasifs (expectorations, aspirations bronchiques ou trachéales), 2 LBA, 1 liquide d'ascite. En considérant le diagnostic mycologique comme référence, on obtient une sensibilité et une spécificité respectivement de 78% (7/9) et 81% (22/27) pour la PCR *Aspergillus* et pour la PCR Mucorales, 100% (8/8) et 96% (27/28).

TABLEAU 8 : CONCORDANCE ENTRE PCR ASPERGILLUS ET DIAGNOSTIC MYCOLOGIQUE TOUS PRELEVEMENTS CONFONDUS

PCR <i>Aspergillus</i> sp.	Diagnostic mycologique		
	Positif	Négatif	Total
Positif	7	5	12
Négatif	2	22	24
Total	9	27	36

TABLEAU 9 : CONCORDANCE ENTRE PCR MUCORALES ET DIAGNOSTIC MYCOLOGIQUE TOUS PRELEVEMENTS CONFONDUS

PCR <i>Mucorales</i> Mycogénie®	Diagnostic mycologique		
	Positif	Négatif	Total
Positif	8	1	9
Négatif	0	27	27
Total	8	28	36

5.2. PCR *Aspergillus* vs. GM

Les GM sériques sont dosés uniquement dans le cadre du diagnostic d'aspergillose. Soixante-cinq prélèvements ont été étudiés dont 52 sérums, 12 LBA, et 1 LCR. Les résultats de la PCR *Aspergillus* sp. ont été comparés aux GM sériques en utilisant comme référence le seuil de positivité du fournisseur (Tableau 10) ou les seuils recommandés par l'EORTC/MSGERC (Tableau 11). La sensibilité et la spécificité calculées, en considérant le GM comme référence, sont respectivement, pour la PCR *Aspergillus*, 52% (14/27) et 92% (35/38) en utilisant le seuil du fournisseur, contre 58% (14/24) de sensibilité et 93% (38/41) de spécificité en utilisant les seuils recommandés par l'EORTC/MSGERC. On obtient 25% de discordance (16 prélèvements dont 13 sérums et 3 LBA) pour le seuil fournisseur contre 20% avec les seuils de l'EORTC/MSGERC (13 prélèvements dont 10 sérums et 3 LBA).

**TABLEAU 10 : CONCORDANCE ENTRE PCR ASPERGILLUS SP. ET AG GM TOUS PRELEVEMENTS CONFONDUS
(SEUIL DE POSITIVITE ≥ 0,5 PRECONISE PAR LE FOURNISSEUR)**

PCR <i>Aspergillus</i> sp.	Antigènes galactomannanes		
	Positif (≥ 0,5)	Négatif (<0,5)	Total
Positif	14	3	17
Négatif	13	35	48
Total	27	38	65

**TABLEAU 11 : CONCORDANCE ENTRE PCR ASPERGILLUS SP. ET AG GM TOUS PRELEVEMENTS CONFONDUS
(SEUILS RECOMMANDES PAR L'EORTC/MSGERC)**

PCR <i>Aspergillus</i> sp.	Antigènes galactomannanes		
	Positif ⁽¹⁾	Négatif	Total
Positif	14	3	17
Négatif	10	38	48
Total	24	41	65

(1) Valeurs seuils considérées positives : index ≥1.0 sur sérum, ou ≥ 1.0 sur LBA, ou ≥ 0.7 sur sérum associé à un index ≥ 0.8 sur LBA.

5.3. PCR MycoGENIE® vs. PCR de référence

Ont été inclus seulement les échantillons ayant été envoyé au CHU de Besançon pour PCR soit 26 échantillons pour *Aspergillus* (dont 16 sérums, 5 expectorations, 3 LBA, 1 aspiration bronchique et 1 biopsie pulmonaire) et 19 pour les Mucorales (dont 15 sérums, 2 prélèvements de sinus, 1 expectoration et 1 biopsie pulmonaire). En utilisant la PCR réalisée à Besançon comme référence, on obtient, pour la PCR *Aspergillus*, une sensibilité et une spécificité, respectivement de 100% (2/2) et 96% (23/34); et pour la PCR Mucorales, 75% (3/4) de sensibilité et 100% (15/15) de spécificité. Sur les échantillons testés, il y a 1 discordance pour *Aspergillus* (1 expectoration) comme pour les Mucorales (1 prélèvement de sinus) soit 96% de concordance pour *Aspergillus* (Tableau 12) et 94% de concordance pour les Mucorales (Tableau 13).

**TABLEAU 12 : CONCORDANCE ENTRE PCR ASPERGILLUS SP. KIT MYCOGENIE® VS. PCR MAISON BESANÇON
TOUS PRELEVEMENTS CONFONDUS**

PCR <i>Aspergillus</i> sp. MycoGENIE®	PCR de référence		
	Positif	Négatif	Total
Positif	2	1	3
Négatif	0	23	23
Total	2	24	26

**TABLEAU 13 : CONCORDANCE ENTRE PCR MUCORALES KIT MYCOGENIE® VS. PCR MAISON BESANÇON
TOUS PRELEVEMENTS CONFONDUS**

PCR Mucorales MycoGENIE®	PCR de référence		
	Positif	Négatif	Total
Positif	3	0	3
Négatif	1	15	16
Total	4	15	19

III. DISCUSSION

Les AI et Mucormycoses sont des infections touchant principalement les mêmes catégories de patients, dont la prise en charge thérapeutique est une urgence devant la mortalité élevée. Cependant, leur diagnostic est difficile et repose le plus souvent sur un faisceau d'arguments comprenant entre autres des critères mycologiques. Parmi ces outils, la PCR a fait ces preuves depuis plusieurs années, mais ne fait partie des recommandations (pour *Aspergillus*) que depuis récemment. La PCR n'était jusqu'à présent pas utilisée au CHU de Bordeaux. Récemment, un nouveau kit de PCR permettant de cibler le genre *Aspergillus* et les Mucorales a été développé. C'est dans ce contexte que nous avons donc décidé d'évaluer ses performances analytiques afin de le mettre en place en routine au CHU de Bordeaux pour améliorer la prise en charge de ces infections.

Les performances analytiques du kit MycoGENIE® *Aspergillus* spp.-Mucorales sont tout à fait satisfaisantes en termes de répétabilité (CV=0,4%) et reproductibilité (CV=0,02%) pour lesquelles on obtient des valeurs de coefficient de variation moyen meilleures que celles déterminées par le fournisseur.

Le contrôle interne contenu dans le kit, est fourni pour être utilisé comme témoin d'extraction. Cependant, en utilisant le MagNA Pure 96 comme automate d'extraction, nous n'avons pas réussi à obtenir des courbes d'amplification satisfaisantes en l'utilisant comme tel. Ces difficultés proviennent probablement de la nature plasmidique de ce contrôle interne. Nous avons donc choisi de l'utiliser comme témoin d'inhibition de la PCR en l'ajoutant après extraction et d'utiliser de l'ADN d'*Aspergillus fumigatus* commercialisé (AmpliRun, Vircell) comme contrôle externe d'extraction qui nous sert également de CQI (contrôle qualité interne).

Quant à la spécificité analytique, le kit permet de reconnaître les principales espèces d'*Aspergillus* spp. et de Mucorales. Les espèces d'*Aspergillus* et de Mucorales testées sont bien détectées par le kit MycoGENIE®. Cependant, il existe une réactivité croisée, annoncée par le fournisseur et confirmée par nos tests, entre *Aspergillus* spp. et *Penicillium* spp (ainsi que *Paecilomyces variotii*, espèce proche de *Penicillium*). Ces genres sont très proches sur le plan taxonomique, ce qui peut expliquer cette réaction croisée avec une PCR ciblant largement le genre *Aspergillus*. A l'inverse, des tests effectués avec une PCR spécifique *A. fumigatus* n'ont pas montré cette réaction croisée avec le genre *Penicillium*. La problématique est que *Penicillium* spp., très rarement incriminé en pathologie humaine, est un contaminant fréquent des milieux de culture au laboratoire car omniprésent dans l'environnement. Il s'agit d'une limite majeure de la technique qui est à connaître car pouvant causer des difficultés d'interprétation des résultats, surtout sans l'appui d'une culture mycologique associée ou si celle-ci est négative. Ce problème est applicable seulement pour les prélèvements respiratoires. En effet, il n'y a pas de passage d'ADN de *Penicillium* spp. dans la circulation, les sérums ne sont donc pas concernés par ce risque de réactivité croisée. Nous avons également remarqué une réactivité croisée avec les champignons du genre *Histoplasma* spp. Pour rappel, le dosage des GM possède aussi cette réaction croisée avec les genres *Histoplasma* et *Penicillium*, et donc ne permet pas non plus de distinguer ces germes d'*Aspergillus*. Concernant la PCR Mucorales, aucune réaction croisée avec un autre genre n'a été observée.

Nous avons ensuite comparé les performances de la PCR aux autres outils diagnostiques disponibles.

Concernant le diagnostic mycologique standard (examen direct et culture), sur les 36 prélèvements testés, 7 résultats sont discordants entre les 2 techniques pour *Aspergillus*. Pour les 2 prélèvements avec PCR négative et culture positive : ce sont des expectorations pour lesquelles on ne retrouvait qu'une seule colonie en culture, les examens directs et la recherche de GM associés revenaient négatifs. Il s'agit probablement d'une contamination des milieux de culture par des spores présentes dans l'environnement, si tel est le cas, la PCR nous permet de différencier une culture positive due à une contamination au laboratoire d'une culture positive par réelle présence d'*Aspergillus* dans le prélèvement. Quant aux 5 prélèvements négatifs en culture et positifs en PCR (3 prélèvements respiratoires non invasifs, 2 LBA, 1 liquide d'ascite), pour la plupart, il s'agit de contexte d'aspergilloses invasives pour lesquels la détection en PCR a été plus précoce que la détection par culture (cultures positives sur des prélèvements ultérieurs), on ne peut donc pas parler de réels faux positifs de la PCR. Pour le prélèvement de liquide d'ascite, les PCR *Aspergillus* et Mucorales sont positives. La culture de ce prélèvement retrouvait 1 colonie de *Rhizopus microsporus* et de nombreuses levures ayant pu inhiber la pousse d'*Aspergillus spp.* Il peut donc s'agir d'une co-infection mais la PCR Mucorale étant fortement positive, se pose tout de même la question d'une réactivité croisée (PCR spécifique d'*A. fumigatus* négative sur ce même prélèvement). Notons, par ailleurs, que le kit Mycogénie® n'est pas validé par le fournisseur pour cette nature de prélèvement. Pour les Mucorales, on ne retrouve qu'une seule discordance : une expectoration avec une PCR positive mais un examen direct et une culture négative. Concernant ce patient, un prélèvement de biopsie pulmonaire ultérieur retrouve des filaments coenocytiques à l'examen direct et une colonie de *Rhizopus sp.* en culture. Sur l'expectoration, on peut faire l'hypothèse que la PCR montre une meilleure sensibilité que le diagnostic mycologique. Globalement, d'après les prélèvements étudiés, la PCR MycoGENIE® semble être un outil plus précoce et plus sensible que la culture mycologique.

Concernant la comparaison avec le GM, il y a 16 discordances en utilisant le seuil du fournisseur et 13 discordances avec les seuils recommandés par l'EORTC/MSGERC. Pour les prélèvements retrouvant une PCR *Aspergillus* positive avec des GM inférieurs aux seuils de positivité (n= 3). Il s'agit des mêmes prélèvements pour les deux seuils comparés : un sérum fortement positif en PCR Mucorales (29Ct) se positive tardivement en PCR *Aspergillus* (37Ct), il peut s'agir, comme évoqué précédemment pour le liquide d'ascite, d'un vrai positif avec une co-infection aux deux champignons, ou d'une réaction croisée ; pour les 2 autres « discordances », il s'agit en fait probablement d'une sensibilité meilleure de la PCR par rapport aux dosages des GM car ce sont des contextes d'AI probable avec des prélèvements respiratoires associés fortement positifs en PCR, en culture et/ou au dosage des GM. Concernant les PCR négatives avec GM positifs, pour la plupart (6 prélèvements), ce sont des prélèvements issus de patients en cours de traitement antifongiques (de 7 jours à plus d'un mois d'antifongiques selon les prélèvements), on peut penser que la PCR se négative avant les GM sériques dans ce contexte, sans pouvoir exclure l'hypothèse d'un défaut de sensibilité de la PCR. Pour 3 patients (4 prélèvements), il s'agit d'un contexte d'AI probable, pas encore traités au moment du prélèvement, mais avec décision de prise en charge thérapeutique par les cliniciens, pouvant ici faire évoquer un défaut de précocité et de sensibilité de la PCR ; il est cependant difficile de conclure car on ne disposait pas d'assez de prélèvement pour faire une « cinétique » de la positivité de la PCR avant/après traitement. Par ailleurs, 2 résultats de GM sériques sont probablement des faux positifs, dus à

des réactions croisées, car les contrôles des GM sur sérum ultérieurs se trouvent négatifs dans un contexte faiblement évocateur d'AI.

Au total, en comparant le seuil fournisseur et les recommandations EORTC/MSGERC, 3 sérums considérés positifs selon le seuil du fournisseur seraient négatifs en suivant les recommandations EORTC/MSGERC. Pour 2 patients, il n'y avait pas d'arguments en faveur d'une API. Par contre, pour le troisième patient, le fait de le considérer ses GM sériques comme négatifs va à l'encontre du diagnostic clinique (arguments cliniques et radiologiques en faveur d'une API ayant entraîné une mise sous voriconazole devant la forte suspicion).

Enfin, la comparaison avec la PCR externe a montré de très bons résultats en termes de sensibilité et spécificité. En effet, pour la PCR *Aspergillus*, sur les 26 prélèvements comparés, il y a une seule discordance. Il s'agit d'une expectoration sur laquelle la PCR spécifique de *A. fumigatus* est également positive et les GM sériques associés fortement positifs, dans un contexte d'aspergillose probable chez une patiente en aplasie fébrile avec une imagerie évocatrice d'AI. On ne peut donc pas parler de véritable faux positif de la PCR MycoGENIE®. Quant aux Mucorales, 1 discordance est à noter entre les 2 PCR. Il s'agit d'un prélèvement de sinus qui retrouvait une culture négative avec des filaments coenocytiques à l'examen direct. On peut faire l'hypothèse d'un faux négatif de la PCR MycoGENIE®, ou d'un manque d'homogénéité du prélèvement de sinus. En effet, il s'agit d'une biopsie : la PCR à Besançon n'ayant pas été réalisée sur le même aliquot que la PCR MycoGENIE®. De plus, 2 autres biopsies de sinus associées, étaient bien positives en PCR MycoGENIE®.

Au total, nous avons 15 patients avec une AI probable, parmi lesquels 11 ont eu au moins 1 prélèvement retrouvant une PCR *Aspergillus* spp. positive (pour les 4 qui n'ont pas eu de PCR *Aspergillus* positive : 2 étaient sous traitement antifongique depuis au moins 24h au moment du prélèvement, et pour les 2 autres nous n'avions qu'un seul sérum à disposition en rétrospectif pour faire la PCR). Nous avons également inclus 5 patients avec une mucormycose dans notre étude, tous ont eu au moins un prélèvement avec une PCR Mucorales positive.

Le kit MycoGENIE® détecte la présence de champignons du genre *Aspergillus* ou de l'ordre des Mucorales, ce qui permet la mise en route précoce d'un traitement probabiliste, la distinction entre *Aspergillus* spp. et Mucorales étant importante car la thérapeutique n'est pas la même. Ce kit permet également de détecter les co-infections pour lesquelles la clinique est souvent peu spécifique. Cependant, il n'y a pas de détermination de l'espèce, et les espèces d'*Aspergillus* et genre de Mucorales n'ayant pas toutes la même sensibilité aux traitements antifongiques, la prise en charge ne pourra pas être adaptée à l'espèce incriminée. D'autres kits de biologie moléculaire permettent la détection de l'espèce *A. fumigatus*, la plus fréquemment impliquée dans l'AI, ou de distinguer les genres de Mucorales. Certains kits permettent même la détection des mutations de résistances aux azolés chez *A. fumigatus*. A défaut, la culture mycologique permet d'isoler l'espèce, de l'identifier et d'étudier sa sensibilité aux antifongiques. Pour pallier à cette limite, au laboratoire de Mycologie du CHU de Bordeaux, nous avons mis en place en parallèle la PCR MycoGENIE® détectant l'ADN de *A. fumigatus* ainsi que les mutations TR34 et L98H sur le gène *cyp51a* à l'origine de la résistance aux antifongiques azolés, et pour améliorer l'identification des Mucorales nous sommes en train de développer leur séquençage à partir du même éluat utilisé pour la PCR.

Par ailleurs, il existe une vraie difficulté pour distinguer une infection débutante d'un faux positif qui proviendrait d'une contamination via l'environnement ou d'une réaction croisée. Pour pallier à ceci plusieurs solutions existent : combiner les différentes méthodes diagnostiques pour pallier aux limites de chacune (on peut facilement imaginer de combiner la biologie moléculaire avec la recherche de GM sur un même prélèvement), contrôler un résultat douteux ou incohérent avec le contexte clinique en effectuant à nouveau l'analyse, réitérer les prélèvements. Ces options sont d'ailleurs évoquées dans les recommandations EORTC/MSGERC : pour le diagnostic moléculaire de l'AI, il faut une PCR positive sur 2 sérums différents ou réaliser l'analyse en duplicate sur LBA. D'ailleurs, pour les Ct > 37, le fournisseur recommande une confirmation du résultat car ce signal, représentant moins d'une copie de génome, peut éventuellement être attribué à une contamination environnementale. Au laboratoire de Mycologie du CHU de Bordeaux, il a été décidé de coupler la PCR de genre *Aspergillus*-Mucorales, à la PCR spécifique *A. fumigatus* lorsque la première est positive à *Aspergillus* ou lors d'une forte suspicion clinique, afin d'orienter plus précisément le diagnostic et de confirmer le résultat obtenu par la première PCR.

Enfin, malgré un nombre conséquent d'échantillons testés, nous avons été confrontés aux inconvénients d'une étude rétrospective à savoir la difficulté à interpréter certains dossiers pour lesquels nous avons peu d'éléments. De plus, cette évaluation a été réalisée sur des échantillons ciblés induisant un biais de sélection, il serait donc intéressant de procéder à ce même type d'étude mais avec des échantillons tout venant, analysés en routine au laboratoire. Par ailleurs, le kit Mycogénie® est validé par le fournisseur seulement sur certains prélèvements (sérums, biopsies ou échantillons respiratoires) ; à l'avenir, il serait pertinent de procéder à une validation sur d'autres matrices, telles que le LCR, et autres liquides biologiques, certes moins fréquemment impliqués en pratique dans la pathogénicité, mais pouvant présenter un atout diagnostique important.

Pour conclure, cette étude réalisée au sein du laboratoire de Mycologie du CHU de Bordeaux, sur le kit de PCR MycoGENIE®, a montré des résultats analytiques satisfaisants tout en permettant de souligner les limites et contraintes de son utilisation. Nous avons donc pu mettre en place la réalisation de cette analyse en routine ; tout d'abord en mars-avril 2020, en pleine pandémie de Covid-19, pour permettre le diagnostic en urgence des surinfections à *Aspergillus* lors de séjours en réanimation de patients atteints par le virus, puis, en septembre 2020, nous avons choisi, en accord avec les praticiens des services cliniques concernés, de retenir les indications suivantes : utilisation en screening, chez les patients allogreffés de moelle osseuse en couplant systématiquement la PCR au dosage des GM ; en cas de suspicion d'infection, prescription du dosage des GM et de la PCR sur sérum et/ou LBA, voire PCR sur prélèvements de biopsies ou tissus ; enfin s'il s'agit d'une infection avérée, réalisation de la PCR sur sérum le jour du diagnostic puis en suivi hebdomadaire sur sérum jusqu'à négativation.

IV. CONCLUSION

Les mucormycoses et les aspergilloses invasives sont des infections graves nécessitant une prise en charge précoce et adaptée. L'amélioration des méthodes diagnostiques est un enjeu majeur pour optimiser la thérapeutique et ainsi diminuer la mortalité de ces pathologies.

La biologie moléculaire, récemment incluse dans les recommandations de l'EORTC/MSGERC, a toute sa place dans la stratégie diagnostique des infections fongiques invasives. En effet, nous l'avons montré, elle est, la plupart du temps, concordante avec les autres méthodes diagnostiques et permet de confirmer le diagnostic ; lorsqu'elle ne l'est pas, elle peut permettre de distinguer une contamination d'une infection, ou de détecter plus précocement une infection débutante.

L'évaluation du kit MycoGENIE® de PCR *Aspergillus* spp.-Mucorales a permis de montrer que ce kit présentait des performances tout à fait prometteuses. Cette étude met en exergue l'intérêt de combiner plusieurs prélèvements et méthodes diagnostiques ainsi que de confronter les résultats au contexte clinique pour avoir une interprétation la plus juste possible et ainsi pallier aux limites de chaque technique. Grace à cette étude, nous avons pu mettre en place la PCR en routine au laboratoire de Mycologie du CHU de Bordeaux.

Cette évaluation, basée sur les performances analytiques et la comparaison à d'autres méthodes diagnostiques, sera complétée par une étude de l'intérêt et de l'apport de la PCR *Aspergillus* spp.-Mucorales, dans le diagnostic clinique des infections fongiques invasives ; c'est ce qui fera prochainement l'objet de mon mémoire de D.E.S. de Biologie Médicale.

BIBLIOGRAPHIE

1. Latgé J-P. *Aspergillus fumigatus* and Aspergillosis. Clin Microbiol Rev. avr 1999;12(2):310-50.
2. Lass-Flörl C, Cuenca-Estrella M. Changes in the epidemiological landscape of invasive mould infections and disease. J Antimicrob Chemother. mars 2017;72(suppl_1):i5-11.
3. 2002-Bioforma-25-Les moisissures d'intérêt médical.pdf [Internet]. [cité 6 août 2020]. Disponible sur: <https://sjbm.fr/images/cahiers/2002-Bioforma-25-Les%20moisissures%20d'int%C3%A9ret%20m%C3%A9dical.pdf>
4. Park SJ, Mehrad B. Innate Immunity to *Aspergillus* Species. Clin Microbiol Rev. oct 2009;22(4):535-51.
5. Perfect JR, Cox GM, Lee JY, Kauffman CA, de Repentigny L, Chapman SW, et al. The Impact of Culture Isolation of *Aspergillus* Species: A Hospital-Based Survey of Aspergillosis. Clin Infect Dis. déc 2001;33(11):1824-33.
6. Masson E. Biologie et diagnostic des infections à *Aspergillus* [Internet]. EM-Consulte. [cité 10 mars 2021]. Disponible sur: <https://www.em-consulte.com/article/846338>
7. Park H-S, Jun S-C, Han K-H, Hong S-B, Yu J-H. Diversity, Application, and Synthetic Biology of Industrially Important *Aspergillus* Fungi. In: Advances in Applied Microbiology [Internet]. Elsevier; 2017 [cité 20 déc 2020]. p. 161-202. Disponible sur: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0065216417300187>
8. Houbraeken J, Kocsubé S, Visagie CM, Yilmaz N, Wang X-C, Meijer M, et al. Classification of *Aspergillus*, *Penicillium*, *Talaromyces* and related genera (Eurotiales): An overview of families, genera, subgenera, sections, series and species. Stud Mycol. mars 2020;95:5-169.
9. Gautier M, Normand A-C, Ranque S. Previously unknown species of *Aspergillus*. Clin Microbiol Infect. 1 août 2016;22(8):662-9.
10. Alastruey-Izquierdo A, Alcazar-Fuoli L, Cuenca-Estrella M. Antifungal Susceptibility Profile of Cryptic Species of *Aspergillus*. Mycopathologia. déc 2014;178(5-6):427-33.
11. Dagenais TRT, Keller NP. Pathogenesis of *Aspergillus fumigatus* in Invasive Aspergillosis. Clin Microbiol Rev. juill 2009;22(3):447-65.
12. Ben-Ami R, Lewis RE, Leventakos K, Kontoyiannis DP. *Aspergillus fumigatus* inhibits angiogenesis through the production of gliotoxin and other secondary metabolites. Blood. 17 déc 2009;114(26):5393-9.
13. Latgé J-P, Chamilos G. *Aspergillus fumigatus* and Aspergillosis in 2019. Clin Microbiol Rev. 2020;33(1):75.
14. Ader F. Invasive Pulmonary Aspergillosis in Patients with Chronic Obstructive Pulmonary Disease: An Emerging Fungal Disease. Curr Infect Dis Rep. nov 2010;12(6):409-16.

15. Cornillet A, Camus C, Nimubona S, Gandemer V, Tattevin P, Belleguic C, et al. Comparison of Epidemiological, Clinical, and Biological Features of Invasive Aspergillosis in Neutropenic and Nonneutropenic Patients: A 6-Year Survey. *Clin Infect Dis*. sept 2006;43(5):577-84.
16. Winters B, Custer J, Galvagno SM, Colantuoni E, Kapoor SG, Lee H, et al. Diagnostic errors in the intensive care unit: a systematic review of autopsy studies. *BMJ Qual Saf*. nov 2012;21(11):894-902.
17. Kosmidis C, Denning DW. The clinical spectrum of pulmonary aspergillosis. *Thorax*. 1 mars 2015;70(3):270-7.
18. Koehler P, Hamprecht A, Bader O, Bekeredjian-Ding I, Buchheidt D, Doelken G, et al. Epidemiology of invasive aspergillosis and azole resistance in patients with acute leukaemia: the SEPIA Study. *Int J Antimicrob Agents*. févr 2017;49(2):218-23.
19. Stevens DA, Melikian GL. Aspergillosis in the « nonimmunocompromised » host. *Immunol Invest*. 2011;40(7-8):751-66.
20. Ascioglu S, Rex JH, de Pauw B, Bennett JE, Bille J, Crokaert F, et al. Defining Opportunistic Invasive Fungal Infections in Immunocompromised Patients with Cancer and Hematopoietic Stem Cell Transplants: An International Consensus. *Clin Infect Dis*. 1 janv 2002;34(1):7-14.
21. De Pauw B, Walsh TJ, Donnelly JP, Stevens DA, Edwards JE, Calandra T, et al. Revised Definitions of Invasive Fungal Disease from the European Organization for Research and Treatment of Cancer/Invasive Fungal Infections Cooperative Group and the National Institute of Allergy and Infectious Diseases Mycoses Study Group (EORTC/MSG) Consensus Group. *Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am*. 15 juin 2008;46(12):1813-21.
22. 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*. 5 déc 2019;ciz1008.
23. Koehler P, Bassetti M, Chakrabarti A, Chen SCA, Colombo AL, Hoenigl M, et al. Defining and managing COVID-19-associated pulmonary aspergillosis: the 2020 ECMM/ISHAM consensus criteria for research and clinical guidance. *Lancet Infect Dis*. déc 2020;S1473309920308471.
24. Ullman. Diagnosis and management of Aspergillus diseases: executive summary of the 2017 ESCMID-ECMM-ERS guideline | Elsevier Enhanced Reader [Internet]. [cité 10 août 2020]. Disponible sur: <https://reader.elsevier.com/reader/sd/pii/S1198743X1830051X?token=1FD196F6E2D66E16C8D02724657B65A7E2884932EB845A0F994955CDAEA0DDDA1EC555127886AEC392E50621B70FD71E>
25. Lamoth F, Calandra T. Early diagnosis of invasive mould infections and disease. *J Antimicrob Chemother*. mars 2017;72(suppl_1):i19-28.
26. Klont RR, Mennink-Kersten MASH, Verweij PE. Utility of Aspergillus Antigen Detection in Specimens Other than Serum Specimens. *Clin Infect Dis*. 15 nov 2004;39(10):1467-74.

27. Chong GM, Maertens JA, Lagrou K, Driessen GJ, Cornelissen JJ, Rijnders BJA. Diagnostic Performance of Galactomannan Antigen Testing in Cerebrospinal Fluid. Warnock DW, éditeur. *J Clin Microbiol*. févr 2016;54(2):428-31.
28. Leeflang MM, Debets-Ossenkopp YJ, Wang J, Visser CE, Scholten RJ, Hooft L, et al. Galactomannan detection for invasive aspergillosis in immunocompromised patients. *Cochrane Database Syst Rev* [Internet]. 30 déc 2015 [cité 27 déc 2020];2015(12). Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6483812/>
29. Lamoth F, Calandra T. Early diagnosis of invasive mould infections and disease. *J Antimicrob Chemother*. 1 mars 2017;72(suppl_1):i19-28.
30. Marr KA, Laverdiere M, Gugel A, Leisenring W. Antifungal Therapy Decreases Sensitivity of the Aspergillus Galactomannan Enzyme Immunoassay. *Clin Infect Dis*. 15 juin 2005;40(12):1762-9.
31. Duarte RF, Sanchez-Ortega I, Cuesta I, Arnan M, Patino B, Fernandez de Sevilla A, et al. Serum Galactomannan-Based Early Detection of Invasive Aspergillosis in Hematology Patients Receiving Effective Antimold Prophylaxis. *Clin Infect Dis*. 15 déc 2014;59(12):1696-702.
32. Bergeron A, Porcher R, Menotti J, Poirot JL, Chagnon K, Vekhoff A, et al. Prospective Evaluation of Clinical and Biological Markers To Predict the Outcome of Invasive Pulmonary Aspergillosis in Hematological Patients. *J Clin Microbiol*. mars 2012;50(3):823-30.
33. Colombo AL, de Almeida Júnior JN, Slavin MA, Chen SC-A, Sorrell TC. Candida and invasive mould diseases in non-neutropenic critically ill patients and patients with haematological cancer. *Lancet Infect Dis*. nov 2017;17(11):e344-56.
34. de Heer K, Gerritsen MG, Visser CE, Leeflang MM. Galactomannan detection in broncho-alveolar lavage fluid for invasive aspergillosis in immunocompromised patients. *Cochrane Database Syst Rev*. 20 mai 2019;5:CD012399.
35. Mennink-Kersten MA, Donnelly JP, Verweij PE. Detection of circulating galactomannan for the diagnosis and management of invasive aspergillosis. *Lancet Infect Dis*. juin 2004;4(6):349-57.
36. Arvanitis M, Ziakas PD, Zacharioudakis IM, Zervou FN, Caliendo AM, Mylonakis E. PCR in diagnosis of invasive aspergillosis: a meta-analysis of diagnostic performance. *J Clin Microbiol*. oct 2014;52(10):3731-42.
37. Cruciani M, Mengoli C, Barnes R, Donnelly JP, Loeffler J, Jones BL, et al. Polymerase chain reaction blood tests for the diagnosis of invasive aspergillosis in immunocompromised people. *Cochrane Database Syst Rev*. 3 sept 2019;9:CD009551.
38. Imbert S, Gauthier L, Joly I, Brossas J-Y, Uzunov M, Touafek F, et al. Aspergillus PCR in serum for the diagnosis, follow-up and prognosis of invasive aspergillosis in neutropenic and nonneutropenic patients. *Clin Microbiol Infect*. juin 2016;22(6):562.e1-562.e8.
39. Suarez F, Lortholary O, Buland S, Rubio MT, Ghez D, Mahé V, et al. Detection of circulating Aspergillus fumigatus DNA by real-time PCR assay of large serum volumes improves early

diagnosis of invasive aspergillosis in high-risk adult patients under hematologic surveillance. *J Clin Microbiol.* nov 2008;46(11):3772-7.

40. White PL, Barnes RA, Springer J, Klingspor L, Cuenca-Estrella M, Morton CO, et al. Clinical Performance of Aspergillus PCR for Testing Serum and Plasma: a Study by the European Aspergillus PCR Initiative. *J Clin Microbiol.* 1 sept 2015;53(9):2832-7.

41. Springer J, White PL, Hamilton S, Michel D, Barnes RA, Einsele H, et al. Comparison of Performance Characteristics of Aspergillus PCR in Testing a Range of Blood-Based Samples in Accordance with International Methodological Recommendations. *J Clin Microbiol.* 1 mars 2016;54(3):705-11.

42. Arvanitis M, Anagnostou T, Mylonakis E. Galactomannan and Polymerase Chain Reaction-Based Screening for Invasive Aspergillosis Among High-Risk Hematology Patients: A Diagnostic Meta-analysis. *Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am.* 15 oct 2015;61(8):1263-72.

43. Imbert S, Meyer I, Palous M, Brossas J-Y, Uzunov M, Touafek F, et al. Aspergillus PCR in Bronchoalveolar Lavage Fluid for the Diagnosis and Prognosis of Aspergillosis in Patients With Hematological and Non-hematological Conditions. *Front Microbiol.* 14 août 2018;9:1877.

44. Imbert S, Brossas J-Y, Palous M, Joly I, Meyer I, Fekkar A. Performance of Aspergillus PCR in cerebrospinal fluid for the diagnosis of cerebral aspergillosis. *Clin Microbiol Infect.* nov 2017;23(11):889.e1-889.e4.

45. Patterson TF, Thompson GR, Denning DW, Fishman JA, Hadley S, Herbrecht R, et al. Practice Guidelines for the Diagnosis and Management of Aspergillosis: 2016 Update by the Infectious Diseases Society of America. *Clin Infect Dis.* 15 août 2016;63(4):e1-60.

46. 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.* mars 2017;102(3):433-44.

47. Chamilos G, Lewis RE, Kontoyiannis DP. Delaying Amphotericin B-Based Frontline Therapy Significantly Increases Mortality among Patients with Hematologic Malignancy Who Have Zygomycosis. *Clin Infect Dis.* 15 août 2008;47(4):503-9.

48. Reid G, Lynch JP, Fishbein MC, Clark NM. Mucormycosis. *Semin Respir Crit Care Med.* févr 2020;41(01):099-114.

49. Lanternier F, Dannaoui E, Morizot G, Elie C, Garcia-Hermoso D, Huerre M, et al. A Global Analysis of Mucormycosis in France: The RetroZygo Study (2005-2007). *Clin Infect Dis.* 1 févr 2012;54(suppl 1):S35-43.

50. Garcia-Hermoso D. Diagnostic microbiologique des mucormycoses. *médecine/sciences.* mars 2013;29:13-8.

51. Gebremariam T, Liu M, Luo G, Bruno V, Phan QT, Waring AJ, et al. CoH3 mediates fungal invasion of host cells during mucormycosis [Internet]. American Society for Clinical Investigation; 2014 [cité 19 janv 2021]. Disponible sur: <https://www.jci.org/articles/view/71349/pdf>

52. Navarro-Mendoza MI, Pérez-Arques C, Murcia L, Martínez-García P, Lax C, Sanchis M, et al. Components of a new gene family of ferroxidases involved in virulence are functionally specialized in fungal dimorphism. *Sci Rep*. 16 mai 2018;8(1):7660.
53. Hassan MIA, Voigt K. Pathogenicity patterns of mucormycosis: epidemiology, interaction with immune cells and virulence factors. *Med Mycol*. avr 2019;57(Suppl 2):S245-56.
54. Montaña DE, Voigt K. Host Immune Defense upon Fungal Infections with Mucorales: Pathogen-Immune Cell Interactions as Drivers of Inflammatory Responses. *J Fungi [Internet]*. 17 sept 2020 [cité 20 janv 2021];6(3). Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7557740/>
55. Andrianaki AM, Kyrmizi I, Thanopoulou K, Baldin C, Drakos E, Soliman SSM, et al. Iron restriction inside macrophages regulates pulmonary host defense against *Rhizopus* species. *Nat Commun*. 20 août 2018;9(1):3333.
56. Wurster S, Thielen V, Weis P, Walther P, Elias J, Waaga-Gasser AM, et al. Mucorales spores induce a proinflammatory cytokine response in human mononuclear phagocytes and harbor no rodlet hydrophobins. *Virulence*. 17 nov 2017;8(8):1708-18.
57. M L, B S, Qt P, Y F, As L, Jr EJ, et al. The endothelial cell receptor GRP78 is required for mucormycosis pathogenesis in diabetic mice. *J Clin Invest*. 17 mai 2010;120(6):1914-24.
58. Kontoyiannis DP, Lewis RE. Invasive Zygomycosis: Update on Pathogenesis, Clinical Manifestations, and Management. *Infect Dis Clin North Am*. sept 2006;20(3):581-607.
59. Skiada A, Pavleas I, Drogari-Apiranthitou M. Epidemiology and Diagnosis of Mucormycosis: An Update. *J Fungi [Internet]*. 2 nov 2020 [cité 25 janv 2021];6(4). Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7711598/>
60. Marty FM, Cosimi LA, Baden LR. Breakthrough Zygomycosis after Voriconazole Treatment in Recipients of Hematopoietic Stem-Cell Transplants. *N Engl J Med*. 26 févr 2004;350(9):950-2.
61. Kontoyiannis DP, Lionakis MS, Lewis RE, Chamilos G, Healy M, Perego C, et al. Zygomycosis in a Tertiary-Care Cancer Center in the Era of Aspergillus-Active Antifungal Therapy: A Case-Control Observational Study of 27 Recent Cases. :11.
62. Lamaris GA, Ben-Ami R, Lewis RE, Chamilos G, Samonis G, Kontoyiannis DP. Increased Virulence of Zygomycetes Organisms Following Exposure to Voriconazole: A Study Involving Fly and Murine Models of Zygomycosis. *J Infect Dis*. mai 2009;199(9):1399-406.
63. A case of invasive pulmonary mucormycosis resulting from short courses of corticosteroids in a well-controlled diabetic patient | Elsevier Enhanced Reader [Internet]. [cité 26 janv 2021]. Disponible sur: <https://reader.elsevier.com/reader/sd/pii/S2211753920300373?token=FC28F4B4F421C7F039806272FF03D95B1ADB2F46B51B8C6D17C92B9855B8C9115A6BAFBAC30844437F64DD82D5A934E4>

64. Chamilos G, Marom EM, Lewis RE, Lionakis MS, Kontoyiannis DP. Predictors of Pulmonary Zygomycosis versus Invasive Pulmonary Aspergillosis in Patients with Cancer. *Clin Infect Dis*. 1 juill 2005;41(1):60-6.
65. Cornely OA, Alastruey-Izquierdo A, Arenz D, Chen SCA, Dannaoui E, Hochhegger B, et al. Global guideline for the diagnosis and management of mucormycosis: an initiative of the European Confederation of Medical Mycology in cooperation with the Mycoses Study Group Education and Research Consortium. *Lancet Infect Dis*. 1 déc 2019;19(12):e405-21.
66. Millon L, Scherer E, Rocchi S, Bellanger A-P. Molecular Strategies to Diagnose Mucormycosis. *J Fungi* [Internet]. 20 mars 2019 [cité 26 janv 2021];5(1). Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6463105/>
67. Scherer E, Iriart X, Bellanger AP, Dupont D, Guitard J, Gabriel F, et al. Quantitative PCR (qPCR) Detection of Mucorales DNA in Bronchoalveolar Lavage Fluid To Diagnose Pulmonary Mucormycosis. *J Clin Microbiol*. 2018;56(8):9.
68. Millon L, Herbrecht R, Grenouillet F, Morio F, Alanio A, Letscher-Bru V, et al. Early diagnosis and monitoring of mucormycosis by detection of circulating DNA in serum: retrospective analysis of 44 cases collected through the French Surveillance Network of Invasive Fungal Infections (RESSIF). *Clin Microbiol Infect*. sept 2016;22(9):810.e1-810.e8.
69. Baldin C, Soliman SSM, Jeon HH, Alkhazraji S, Gebremariam T, Gu Y, et al. PCR-Based Approach Targeting Mucorales-Specific Gene Family for Diagnosis of Mucormycosis. Warnock DW, éditeur. *J Clin Microbiol*. 1 août 2018;56(10):e00746-18, /jcm/56/10/e00746-18.atom.

SERMENT DE GALLIEN

« Je jure, en présence des maîtres de la faculté,

des conseillers de l'ordre des pharmaciens et de mes condisciples :

D'honorer ceux qui m'ont instruit dans les préceptes de mon art

et de leur témoigner ma reconnaissance

en restant fidèle à leur enseignement ;

D'exercer, dans l'intérêt de la santé publique, ma profession avec conscience

et de respecter non seulement la législation en vigueur,

mais aussi les règles de l'honneur, de la probité et du désintéressement ;

De ne jamais oublier ma responsabilité et mes devoirs

envers le malade et sa dignité humaine.

En aucun cas, je ne consentirai à utiliser mes connaissances et mon état

pour corrompre les mœurs et favoriser des actes criminels.

Que les hommes m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses.

Que je sois couvert d'opprobre et méprisé de mes confrères si j'y manque.

Aspergilloses invasives et Mucormycoses : revue bibliographique et évaluation diagnostique du kit de PCR *Aspergillus* spp.-Mucorales Mycogénie

Les mucormycoses et les aspergilloses invasives sont des infections graves avec une symptomatologie souvent peu spécifique, qui nécessitent une prise en charge précoce et adaptée. L'amélioration des méthodes diagnostiques est un enjeu majeur pour optimiser la thérapeutique et ainsi diminuer la mortalité de ces pathologies. Ce travail de thèse se compose en deux parties : tout d'abord une revue de la littérature décrivant les agents responsables de ces infections, leur physiopathologie et les outils diagnostiques microbiologiques actuels, notamment la biologie moléculaire récemment incluse dans les recommandations de l'EORTC/MSGERC en 2019 pour *Aspergillus*, puis une évaluation des performances analytiques et de l'intérêt diagnostique du kit de PCR *Aspergillus* spp.-Mucorales MycoGENIE®, récemment commercialisé. En comparant les résultats obtenus avec ce kit sur 101 échantillons, sélectionnés en rétrospectif et en prospectif, aux autres méthodes diagnostiques (culture mycologique, PCR de référence, antigènes galactomannanes pour *Aspergillus*), nous obtenons des résultats satisfaisants qui ont permis la mise en place de cette technique au laboratoire de Mycologie du CHU de Bordeaux. Cette étude souligne l'intérêt de combiner plusieurs prélèvements et méthodes diagnostiques ainsi que de confronter les résultats au contexte clinique pour avoir une interprétation la plus juste possible. La biologie moléculaire a donc tout sa place pour compléter les atouts et limites des autres techniques dans le diagnostic des aspergilloses invasives et des mucormycoses.

Mots clés : Mycologie, *Aspergillus*, Mucorales, infection fongique invasive, PCR, diagnostic biologique

Discipline : Biologie médicale, Mycologie

Invasive aspergillosis and Mucormycosis : literature review and diagnostic evaluation of PCR kit *Aspergillus* spp.-Mucorales Mycogénie

Mucormycosis and invasive aspergillosis are serious infections which are most often associated with nonspecific symptoms and therefore requires an early and appropriate management. Improving diagnostic methods is a key challenge for therapy optimization and reducing mortality rates associated with these diseases. This thesis is divided into two parts. First, a literature review describes the causative agents of these infections, their physiopathology and the current microbiological diagnostic tools, including the molecular biology techniques recently included in the 2019 EORTC / MSGERC recommendations for *Aspergillus*. Furthermore, we assessed the analytical performance and diagnostic value of the recently marketed *Aspergillus* spp.-Mucorales Mycogénie® PCR kit. By comparing the results obtained from 101 samples selected retrospectively and prospectively using this kit with other diagnostic methods (mycological culture, reference PCR, galactomannan antigens for *Aspergillus*), we obtained satisfactory results that allowed the implementation of this new technique at the Mycology Laboratory of the Bordeaux Hospital University Center. This study highlights the benefits of combining several samples and diagnostic methods as well as comparing the results to the clinical context in order to provide the most accurate interpretation possible. Therefore, these molecular biology techniques must be used to balance the strengths and limitations of other techniques in the diagnosis of invasive aspergillosis and mucormycosis.

Key words: Mycology, *Aspergillus*, Mucorales, invasive fungal infection, PCR, biological diagnosis