

SORBONNE UNIVERSITÉ
FACULTÉ DE MÉDECINE SORBONNE UNIVERSITÉ

ANNÉE 2020

N°2020SORUZ004

THÈSE
POUR LE DIPLÔME D'ÉTAT DE
DOCTEUR EN MÉDECINE

ET

MEMOIRE
POUR LE DIPLÔME D'ÉTUDES SPÉCIALISÉES
EN BIOLOGIE MÉDICALE

Infections invasives mixtes à *Aspergillus fumigatus* et Mucorales
chez les patients du CHU de La Pitié-Salpêtrière de 2012 à 2019

Présentée et soutenue publiquement
Le 10 janvier 2020
Par

Marion BLAIZE
Née le 09 février 1990 à Nouméa

Dirigée par Monsieur le Docteur Arnaud FEKKAR

Jury :

M. Le Professeur Renaud PIARROUX, PU-PH, Président

Mme Le Professeur Sandrine HOUZE, PU-PH

Mme Le Docteur Marie-Elisabeth BOUGNOUX, MCU-PH

M. Le Docteur Arnaud FEKKAR, MCU-PH

Table des matières

Liste des figures	3
Liste des tableaux.....	4
Liste des annexes.....	4
Liste des acronymes et abréviations.....	5
Liste des sociétés savantes.....	5
<i>Introduction</i>.....	6
Infections à <i>Aspergillus</i> chez l’Homme	7
<i>Aspergillus fumigatus</i> - caractéristiques mycologiques.....	7
Les aspergilloses	8
Infections à Mucorales chez l’Homme.....	12
Ordre des Mucorales – caractéristiques mycologiques.....	13
Les mucormycoses.....	15
Outils diagnostiques microbiologiques des infections fongiques.....	17
Infection mixte à <i>Aspergillus</i> et Mucorales : revue de la littérature	22
<i>Objectif</i>.....	24
<i>Matériel et méthodes</i>	25
Type d’étude.....	25
Critères d’inclusion	25
Réalisation des PCR	26
Extraction de l’ADN	26
Amplification	27

Contrôles internes	28
PCR <i>Aspergillus fumigatus</i>	29
PCR Mucorales	29
Recueil des données cliniques	31
Classification des patients	31
Analyses des données.....	31
Résultats.....	32
Extraction des données informatiques.....	32
Analyse rétrospective des demandes de PCR <i>Aspergillus fumigatus</i>	33
Analyse rétrospective des demandes de PCR Mucorales	36
Co-infections <i>Aspergillus fumigatus</i> et Mucorales	39
Recherche de co-infection lors de l'hospitalisation	39
Recherche rétrospective des co-infections.....	39
Discussion.....	44
Patients doubles positifs	44
Difficulté diagnostique de la PCR <i>Aspergillus</i>	48
Considérations techniques sur les PCR <i>Aspergillus</i> et Mucorales	49
Conclusion	51
Bibliographie	52
Annexes.....	62

Liste des figures

Figure 1. Schéma de la tête aspergillaire d' <i>Aspergillus fumigatus</i> (d'après de Hoog et al.) ⁸	8
Figure 2. Spectre des pathologies induites par <i>Aspergillus</i> (gravité croissante dans le sens des flèches) (d'après Mâiz et al. ¹⁰)	9
Figure 3. Critères diagnostiques de l'aspergillose pulmonaire invasive (API) selon l'EORTC/MSG 2008 (d'après Gianella et al.) ¹⁸	11
Figure 4. Classification des zygomycètes basée sur les travaux de Spatafora et al. (d'après Walther ²¹)	12
Figure 5. Caractéristiques phénotypiques des principales espèces de Mucorales pathogènes chez l'homme (d'après Garcia-Hermoso ²⁵)	14
Figure 6. Structures morphologiques des membres de l'ordre des Mucorales (d'après Garcia-Hermoso ²⁵)	14
Figure 7. Evolution du nombre de publications (PubMed) au cours du temps pour les termes (« zygomycosis » OR « mucormycosis ») AND (« <i>Aspergillus</i> » OR « aspergillosis »)	22
Figure 8. Schéma de l'étude	26
Figure 9. MagNA Pure Compact Instrument et étapes d'extraction et purification des acides nucléiques utilisée dans la technique commercialisée par Roche	26
Figure 10. Réglage des températures et durées des cycles de la PCR sur le logiciel de l'automate (7500 Fast System SDS Software)	27
Figure 11. Sélection des prélèvements de l'étude	32
Figure 12. Répartition des demandes de PCR <i>A. fumigatus</i> selon l'origine des prélèvements	33
Figure 13. Résultats des PCR <i>A. fumigatus</i> selon l'origine des prélèvements	34
Figure 14. PCR <i>A. fumigatus</i> positives selon l'origine des prélèvements	34
Figure 15. Répartition des demandes de PCR Mucorales selon l'origine des prélèvements	36
Figure 16. Résultats des PCR Mucorales selon l'origine des prélèvements	37
Figure 17. PCR Mucorales positives selon l'origine des prélèvements	37
Figure 18. Répartition des patients selon le résultat des PCR <i>A. fumigatus</i> et Mucorales	40
Figure 19. Courbes de survie des patients avec une aspergillose invasive (rouge) et des patients avec une association aspergillose et mucormycose (bleu)	42

Figure 20. Courbes de survie des patients avec une infection mixte ayant reçu de l'amphotéricine B (bleu) et ceux n'ayant pas reçu d'amphotéricine B (rouge) 42

Liste des tableaux

Tableau 1. Principales différences entre les infections fongiques dues à <i>Aspergillus</i> sp. et à Mucorales	21
Tableau 2. Caractéristiques techniques de la PCR ciblant le gène de l'albumine	28
Tableau 3. Caractéristiques techniques de la PCR à la recherche d' <i>Aspergillus fumigatus</i>	29
Tableau 4. Caractéristiques techniques des PCR Mucorales	30
Tableau 5. Principales espèces pathogènes reconnues par les amorces utilisées dans les trois PCR Mucorales ²⁵	30
Tableau 6. Patients ayant une PCR <i>Aspergillus fumigatus</i> positive sur le site de La Pitié Salpêtrière de janvier 2012 à août 2019	35
Tableau 7. Diagnostic d'infection à Mucorales à la Pitié-Salpêtrière de janvier 2012 à août 2019 avec au moins une PCR Mucorales positive	38
Tableau 8. Caractéristiques des patients co-infectés <i>Aspergillus fumigatus</i> -Mucorales.....	43

Liste des annexes

Annexe 1. Nombre de demande de PCR <i>A. fumigatus</i> et Mucorales reçues entre janvier 2012 et août 2019	62
Annexe 2. Principe de la PCR Taqman® en temps réel (document ThermoFisher Scientific).....	63
Annexe 3. Résultat de PCR obtenu après analyse par le logiciel Software 7500	64
Annexe 4. Détails des caractéristiques des patients doubles positifs.....	65

Liste des acronymes et abréviations

ABPA : aspergillose broncho-pulmonaire allergique
APHP : Assistance Publique – Hôpitaux de Paris
AI : aspergillose invasive
A. fumigatus : *Aspergillus fumigatus*
ADN : acide désoxyribonucléique
BPCO : bronchopneumopathie chronique obstructive
CSH : cellules souches hématopoïétiques
ECMO : *extracorporeal membrane oxygenation*
GM : galactomannane
GvH : *graft versus host disease* ; maladie du greffon contre l'hôte
IFI : infection fongique invasive
ITS : *internal transcribed spacer*
LBA : lavage broncho-alvéolaire
LCR : liquide céphalo-rachidien
ORL : oto-rhino-laryngologie
PDP : prélèvement distal protégé
PCR : *polymerase chain reaction*
SIL : système de gestion l'information de laboratoire
VIH : virus de l'immunodéficience humaine

Liste des sociétés savantes

ECIL : *European Conference on Infections in Leukaemia* ; conférence européenne sur les infections dans les leucémies
ECMM : *European Confederation of Medical Mycology* ; confédération européenne de mycologie médicale
EORTC/MSG : *European Organization for Research and Treatment of Cancer/ Mycoses Study Group* ; organisation européenne pour la recherche et le traitement des cancers / groupe d'étude des mycoses
ESCMID : *European Society of Clinical Microbiology and Infectious diseases* ; société européenne de microbiologie clinique et des maladies infectieuses
IDSA : *Infectious Diseases Society of America* ; société américaine des maladies infectieuses
ISHAM : *International Society for Human and Animal Mycology* ; Société Internationale de Mycologie Humaine et Animale

Introduction

Les infections invasives à champignons filamenteux sont associées à une mortalité élevée, de l'ordre de 40% pour les aspergilloses invasives¹. Les moisissures les plus fréquemment rencontrées dans ces infections appartiennent au genre *Aspergillus*. Le second type de moisissures retrouvées sont les zygomycètes dont font partie les champignons de l'ordre des Mucorales. Ces derniers sont toutefois 5 à 8 fois moins fréquents qu'*Aspergillus* lors d'infections fongiques invasives (IFI) chez les patients transplantés^{2,3}. Le diagnostic d'IFI est parfois difficile avec des signes cliniques peu spécifiques. Cela entraîne un retard au diagnostic^{4,5} qui participe à la forte mortalité de ces infections. Que l'infection soit due à *Aspergillus* ou Mucorales, les patients immunodéprimés sont la population la plus à risque de développer ces infections ; cependant la prise en charge thérapeutique est différente selon l'espèce fongique causale. Ainsi, un diagnostic rapide et fiable, orientant précisément vers le ou les agents responsables est nécessaire à une prise en charge optimale du patient.

Peu de données sont disponibles sur l'incidence des co-infections *Aspergillus* - Mucorales et leur prise en charge. L'objectif de ce travail est d'évaluer et de décrire la population de patients ayant présenté une co-infection invasive à *Aspergillus fumigatus* et Mucorales entre 2012 et 2019 à l'hôpital de La Pitié-Salpêtrière. La première partie de ce travail présente les caractéristiques mycologiques d'*Aspergillus fumigatus* et de quatre genres de Mucorales fréquents en pathologie humaine : *Mucor*, *Rhizopus*, *Lichtheimia* et *Rhizomucor* ainsi que les différentes présentations cliniques des infections fongiques, les outils diagnostiques à notre disposition et une revue de la littérature des cas d'infections mixtes. Dans la seconde partie, nous présentons les résultats de notre étude sur les cas d'infections mixtes diagnostiqués entre 2012 et 2019 au sein de l'hôpital de La Pitié-Salpêtrière.

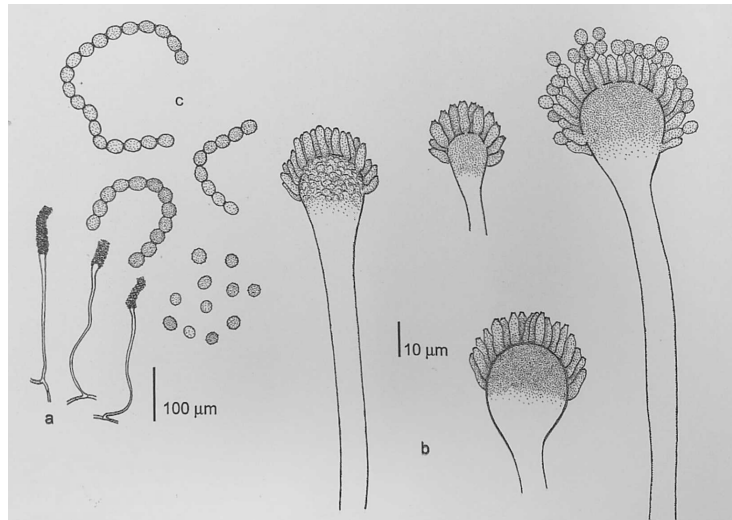
Infections à *Aspergillus* chez l'Homme

Aspergillus fumigatus - caractéristiques mycologiques

Aspergillus fumigatus est un champignon filamenteux environnemental ubiquitaire et saprophyte. Il est retrouvé principalement au niveau des sols, des végétaux ou des matières organiques en décomposition⁶ ainsi que dans l'air sous forme de conidies. Parmi les espèces du genre *Aspergillus*, environ une dizaine est pathogène pour l'homme ; cependant *Aspergillus fumigatus* est l'espèce majoritairement impliquée : elle est responsable de plus de 80% des aspergilloses invasives⁷.

En culture sur milieu de Sabouraud, les colonies d'*A. fumigatus* sont d'aspect poudreux et de couleur bleu-vert, du fait de la pigmentation des conidies par la mélanine. Sa température de croissance optimale est d'environ 25°C, mais *A. fumigatus* est une espèce thermotolérante capable de se développer jusqu'à 55°C et de survivre dans un environnement à 70°C⁶.

Microscopiquement, la forme asexuée est la seule observée bien qu'une forme sexuée existe. Le champignon se présente sous forme d'un réseau de filaments hyalins, fins, segmentés produisant des organes de fructification, nommés têtes aspergillaires situées à l'extrémité des conidiophores. Ces têtes se composent d'une vésicule centrale sur laquelle sont insérées des phialides. Chaque phialide produit des conidies disposées en chaînette. Les conidies permettent la dissémination du champignon, elles sont transportées par voie aérienne pour coloniser un nouvel environnement. Les caractéristiques morphologiques de ces têtes aspergillaires permettent de distinguer les principales espèces du genre *Aspergillus*. Ainsi, celles d'*Aspergillus fumigatus* comportent une seule rangée de phialides réparties en colonnes sur la vésicule et les conidies produites sont de petite taille (2-3µm de diamètre) (Figure 1).



a. conidiophores, b. vésicule et phialides unisériées, c. conidies

Figure 1. Schéma de la tête aspergillaire d'*Aspergillus fumigatus* (d'après de Hoog et al.)⁸

Les conidies ainsi dispersées peuvent survivre plusieurs mois dans le milieu extérieur à l'état de dormance avant de germer. Lors de la germination, les conidies dormantes perdent leur enveloppe d'hydrophobines et de mélanine et effectuent une croissance isodiamétrale (stade de conidies gonflées d'environ 4 à 5 µm), avant que ne se forme un tube germinatif, naissance du filament mycélien qui se ramifie pour constituer un nouveau mycélium.

Les aspergilloses

Un être humain inhale environ une centaine de conidies d'*Aspergillus* par jour⁹. Du fait de leur petite taille, les spores arrivent facilement jusqu'aux alvéoles pulmonaires ce qui fait de l'appareil respiratoire la localisation principale des infections à *Aspergillus*. Néanmoins, des lésions cutanées, digestives, rénales ou cérébrales ont été décrites du fait de la dissémination d'*Aspergillus* par voie hématogène au cours d'infections invasives⁶. Les tableaux cliniques des aspergilloses sont très variés (Figure 2) et peuvent être classés en 4 catégories : la colonisation, les réactions d'hypersensibilité, les infections profondes non-invasives et les aspergilloses invasives. La survenue d'une forme plutôt qu'une autre est liée aux pathologies

sous-jacentes et au degré d'immunodépression des patients^{9,10}. La nosologie des aspergilloses est complexe. Il est difficile d'évaluer la prévalence des aspergilloses, même à petite échelle, tant les présentations cliniques sont variées et les facteurs de risques sont multiples. Dans un rapport de 2017, la Haute Autorité de Santé mentionnait le chiffre de trois millions de personnes atteintes d'aspergilloses chronique et allergique dans le monde¹¹.

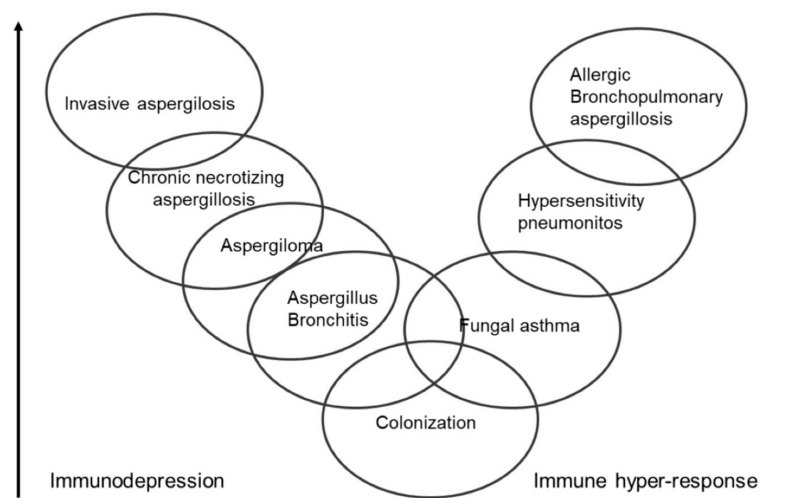


Figure 2. Spectre des pathologies induites par *Aspergillus* (gravité croissante dans le sens des flèches) (d'après Mâiz et al.¹⁰)

La colonisation correspond à la présence chronique du champignon dans un organe sans lésion tissulaire ni manifestation clinique associées. Les formes immuno-allergiques correspondent à une réponse inflammatoire exagérée du système immunitaire face à *Aspergillus* et regroupent l'asthme aspergillaire, la pneumopathie d'hypersensibilité et l'aspergillose bronchopulmonaire allergique (ABPA). Elles se rencontrent notamment chez les asthmatiques ou les personnes atteintes de mucoviscidose. Les infections pulmonaires profondes non invasives dont font partie la bronchite aspergillaire, l'aspergillome et l'aspergillose chronique (nécrotique ou cavitaire) se rencontrent chez des personnes peu immunodéprimées mais ayant une pathologie de fond - diabète, cavité pulmonaire séquellaire

post-tuberculose ou post-opératoire, bronchopneumopathie chronique obstructive (BPCO) - favorisant l'implantation du champignon.

Enfin, les infections invasives dont le pronostic est le plus sombre, sont retrouvées chez les patients ayant un déficit immunitaire acquis - neutropénie prolongée (polynucléaires neutrophiles <0,5G/L), maladie du greffon contre l'hôte (ou GvH pour *graft versus host disease*), transplantation d'organe solide, greffe de cellules souches hématopoïétiques, corticothérapie prolongée à dose élevée - ou congénital comme la granulomatose septique chronique¹². Cependant, de « nouveaux » facteurs de risque d'aspergilloses invasives sont décrits depuis quelques années : grippe sévère avec SDRA, pneumopathie non fongique, terrain de BPCO, sepsis, cancers solides, diabète, défaillance hépatique, infection par le VIH ou alcoolisme¹³⁻¹⁵.

Pour faciliter les études cliniques, l'EORTC/MSG (*European Organization for Research and Treatment of Cancer/ Mycoses Study Group*) a établi en 2002 un classement pour le diagnostic des infections fongiques invasives, dont l'aspergillose invasive (AI). Pour cette étude nous avons utilisés les critères révisés, publiés en 2008, associant des critères cliniques, radiologiques et mycologiques qui permettent de classer l'infection en AI possible, probable ou prouvée¹⁶ (Figure 3). Cette classification ne prenait pas en compte les nouvelles populations à risque et n'avait pas intégré l'apport de la biologie moléculaire dans l'approche diagnostique, par manque de standardisation des techniques¹⁷. Toutefois, une mise à jour est parue en décembre 2019 incluant la biologie moléculaire (PCR et séquençage de l'ADN) dans les critères mycologiques diagnostiques des infections invasives prouvée et probable¹⁸.

	API possible	API probable	API prouvée
Caractéristiques prédisposantes de l'hôte (≥ 1)	<ul style="list-style-type: none"> • Neutropénie prolongée (< 500/mm³ pendant > 10 jours) • Immunodéficience congénitale sévère (par exemple, CGD) • Receveur d'une transplantation médullaire allogénique • Corticostéroïdes (≥ 0,3 mg/kg/j) au long cours (> 3 semaines) • Traitement immunosuppresseur au cours des derniers 3 mois (inhibiteurs de la calcineurine, anti-TNFα, anticorps monoclonaux...) 		
Critères clinico-radiologiques	Fièvre, toux, douleur thoracique, hémoptysie, dyspnée Et un infiltrat au CT thoracique Ou Nouvel infiltrat typique au CT thoracique: cavité, signe du halo ou signe du croissant gazeux		
Critères microbiologiques (≥ 1)		<ul style="list-style-type: none"> • Examen direct ou cultures positives pour <i>Aspergillus</i> au niveau de: crachat, LBA ou aspirât de sinus • Galactomannanes au niveau de: LCR, LBA ou plasma • β-D-glucane sérique 	<ul style="list-style-type: none"> • Preuve histologique (seule suffit) • Culture d'un site stérile

CGD : granulomatose septique chronique, CT : tomodynamométrie

Figure 3. Critères diagnostiques de l'aspergillose pulmonaire invasive (API) selon l'EORTC/MSG 2008 (d'après Gianella et al.)¹⁹

La prise en charge des patients dépend du type d'infection, de sa localisation et des pathologies sous-jacentes. L'axe de traitement principal est médicamenteux mais un versant chirurgical, notamment pour les aspergillomes sinusiens ou pulmonaires, peut permettre une guérison sans traitement antifongique²⁰. Les recommandations thérapeutiques des IFI évoluent régulièrement et diffèrent légèrement selon les sociétés savantes (IDSA, ECIL, ESCMID ou ECMM).

Les azolés constituent la classe d'antifongiques de choix contre *Aspergillus*, une supériorité du voriconazole sur l'amphotéricine B ayant été démontré il y a plusieurs années²¹. Lorsqu'il y a une indication à une prophylaxie, la molécule recommandée par l'ensemble des comités d'experts est le posaconazole. Pour le traitement des aspergilloses invasives, la première ligne conseillée est une monothérapie par voriconazole ou isavuconazole, ce dernier présente une moindre toxicité notamment visuelle et hépatique par rapport au voriconazole. Le posaconazole, l'amphotéricine B liposomale (classe des polyènes) et la caspofungine (classe des échinocandines) sont proposés en deuxième ligne thérapeutique. L'intérêt d'une

association de plusieurs antifongiques est débattu et elle reste peu proposée dans les recommandations²².

Infections à Mucorales chez l'Homme

L'ordre des Mucorales comprend plusieurs familles, genres et espèces de champignons filamenteux environnementaux ubiquitaires. Cet ordre appartenait au clade des Zygomycètes qui a disparu après les travaux de génomique de Spatafora et *al.*²³ en 2016 et a été scindé en deux clades : Mucoromycota et Zoopagomycota (Figure 4). De ce fait, le terme de zygomycose est abandonné et remplacé par le terme mucormycose pour nommer les infections causées par un champignon de l'ordre des Mucorales²⁴.

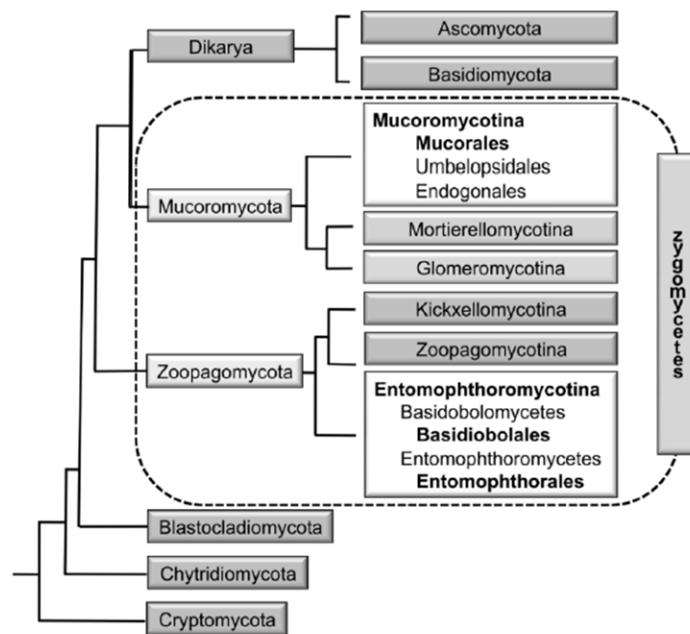


Figure 4. Nouvelle classification des zygomycètes basée sur les travaux de Spatafora et *al.* (d'après Walther²⁴)

Les espèces appartenant à l'ordre des Mucorales sont principalement phytopathogènes mais peuvent être responsables chez l'homme d'infections sévères, notamment nosocomiales. Les principaux genres retrouvés en pathologie humaine en France sont *Rhizopus* (49%) et *Lichteimia* (anciennement *Absidia* ; 29%)²⁵. Au niveau mondial, le genre *Rhizopus* est

également le premier agent de mucormycose (48%) suivi du genre *Mucor* (14%) et du genre *Lichtheimia* (13%)²⁶.

Ordre des Mucorales – caractéristiques mycologiques

Certaines caractéristiques morphologiques sont communes à l'ensemble des champignons appartenant à l'ordre des Mucorales, alors que d'autres sont plus spécifiques, permettant une identification au genre voire à l'espèce du champignon (Figure 5).

Les Mucorales poussent sur les milieux mycologiques sélectifs, mais leur croissance peut être inhibée par l'actidione contenue dans certaines géloses. Leur croissance est plutôt rapide, à des températures comprises entre 27°C et 30°C ; la plupart des espèces poussent aisément à 37°C, sauf *Mucor sp* dont c'est la température maximale de pousse. Il est conseillé d'incuber deux cultures à des températures de 25°C et 37°C pendant un minimum de 5 jours²⁷.

Macroscopiquement, les colonies ont un aspect floconneux, avec un mycélium plus ou moins aérien (développé en hauteur) et des couleurs variant du blanc au brun.

Microscopiquement, toutes les Mucorales ont un mycélium composé de filaments hyalins, larges et non segmentés dont les ramifications se font à angles droits. Le plus souvent les champignons sont observés dans un cycle de reproduction asexuée avec production de sporocystospores contenues dans des sporocystes se situant à l'extrémité d'un sporocystophore. Certaines espèces présentent des rhizoïdes, appendices leur permettant un ancrage dans le milieu extérieur (Figure 6). La forme, la couleur, la présence ou l'absence de certaines structures permettent l'identification (Figure 5). Enfin, leur reproduction sexuée par formation de zygospores est rarement observée en culture au laboratoire^{27,28}.

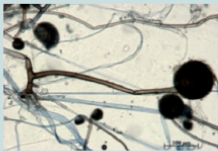
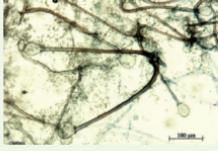
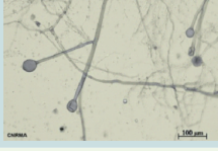
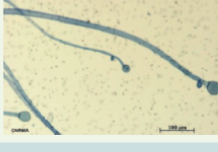
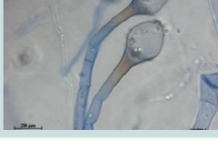
Famille	Genre/espèce	Microscopie	Caractères phénotypiques importants
Mucoraceae	<i>Rhizopus oryzae</i>		<ul style="list-style-type: none"> • Sporocystophore = 1 cm de hauteur • Rhizoïdes bien développés • Sporocystospores striées • Température maximale (T. max.) de croissance 40 °C
	<i>Rhizopus microsporus</i>		<ul style="list-style-type: none"> • Sporocystophore = 10 mm de hauteur • Rhizoïdes bien développés • Sporocystospores striées • T. max. de croissance 50-52 °C
	<i>Rhizomucor pusillus</i>		<ul style="list-style-type: none"> • Sporocystophore branché en partie apical • Sporocystes sans apophyse • Rhizoïdes simples • T. max. de croissance 55 °C
	<i>Mucor circinelloides</i>		<ul style="list-style-type: none"> • Sporocystophore pas branché ou irrégulièrement branché • Absence de rhizoïdes et stolons • Oidia présent • T. max. de croissance 37 °C
Lichthemiaceae	<i>Lichtheimia corymbifera</i> <i>ramosa</i>		<ul style="list-style-type: none"> • Apophyse légèrement mélanisée • Stolons et rhizoïdes présents • Sporocystospores lisses • T. max. de croissance entre 45 et 52 °C

Figure 5. Caractéristiques phénotypiques des principales espèces de Mucorales pathogènes chez l'homme (d'après Garcia-Hermoso²⁷)

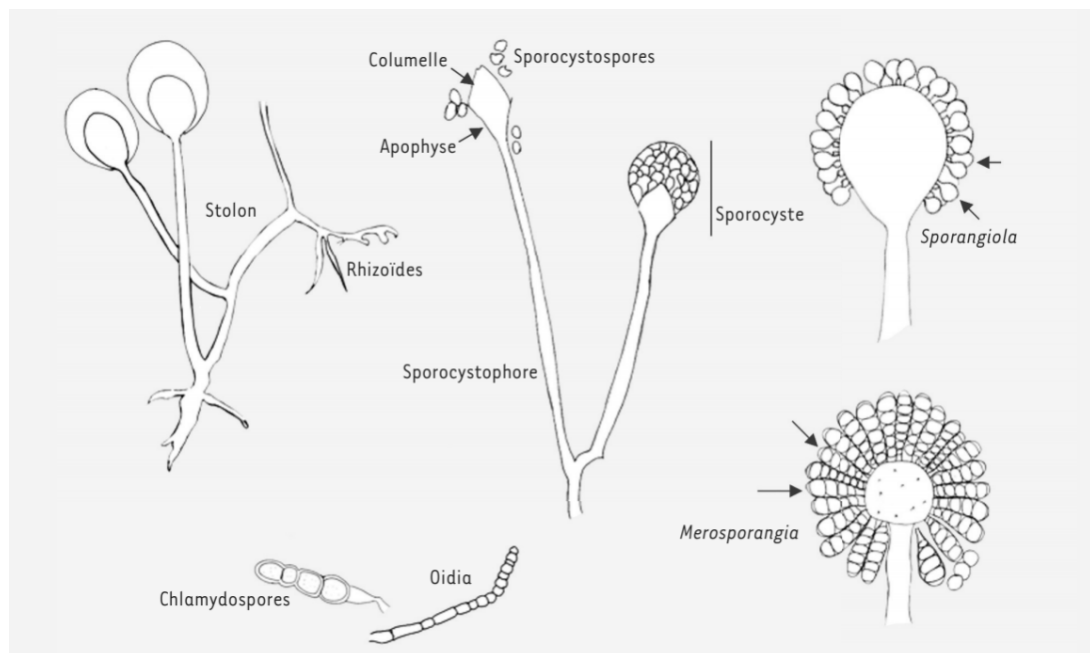


Figure 6. Structures morphologiques des membres de l'ordre des Mucorales (d'après Garcia-Hermoso²⁷)

Les mucormycoses

Dans une étude rétrospective menée entre 2002 et 2008 aux Etats-Unis, les mucormycoses représentent 8% des IFI chez les patients greffés de cellules souches hématopoïétiques et 2% chez les patients transplantés d'organes solides^{2,3}. En France, entre 1997 et 2006, l'incidence des cas estimés varie de 0,7 cas par million d'habitants à 1,2 cas par million d'habitants²⁹.

Les patients immunodéprimés, notamment en hématologie, présentant une GvH, une neutropénie prolongée ou une prise de corticoïdes sont à risque de développer des mucormycoses pulmonaires par inhalation des spores³⁰. Ces infections pulmonaires peuvent disséminer par invasion des vaisseaux ou envahir par contiguïté les tissus voisins, comme la plèvre, voire traverser le diaphragme pour envahir la cavité abdominale³⁰.

Les formes rhino-orbitaires pouvant disséminer vers le cerveau sont généralement retrouvées chez des patients diabétiques lors d'épisodes d'acidocétoses^{31,32}. L'infection commence dans un sinus puis s'étend vers la sphère ORL creusant des orifices dans le palais et/ou vers les orbites entraînant des œdèmes de la face puis vers la peau créant de larges zones de nécrose. Chez les patients immunocompétents, des formes cutanées sont possibles, après contamination par voie traumatique (accident de la voie publique, blessures profondes en zone de guerre³³, ...), chirurgicale ou lors de surinfections de plaies telles que les brûlures. Enfin une forme de mucormycose gastro-intestinale est décrite, touchant principalement l'estomac. La moitié des patients atteints sont des transplantés d'organes solides mais elle se rencontre également chez des nouveau-nés prématurés³⁴.

Les infections à Mucorales sont de mauvais pronostic. Dans une série de 929 cas répertoriés sur 20 ans, les auteurs rapportent des taux de mortalité de 45% pour les formes sinusiennes, de 70% pour les formes pulmonaires localisées et 96% pour les infections disséminées³⁵.

Comme pour le diagnostic des aspergilloses, celui des infections à Mucorales repose sur un faisceau d'arguments cliniques, radiologiques et mycologiques. Les recommandations de l'ECMM (*European Confederation of Medical Mycology*) parues en novembre 2019, intègrent le terrain du patient dans la démarche diagnostique pour le choix des examens d'imagerie. Les examens complémentaires microbiologiques sont identiques quel que soit le terrain du patient.

L'imagerie thoracique représente une aide précieuse pour le diagnostic des formes pulmonaires. Des nodules, des cavités, des condensations alvéolaires ou un épanchement pleural peuvent être observés, sans spécificité pour le diagnostic de mucormyose. Cependant, le signe du halo inversé (image en verre dépoli entourée d'un renforcement de la prise de contraste) a été décrit comme un élément d'apparition précoce en faveur d'une mucormyose pulmonaire chez des patients neutropéniques³⁶.

La prise en charge des mucormyoses se fait par plusieurs approches : débridement chirurgical, traitement antifongique et correction de la pathologie sous-jacente prédisposant à l'infection. Cette prise en charge doit être initiée rapidement afin de réduire la mortalité⁵. L'association chirurgie et antifongique donne de meilleurs résultats sur la survie des patients par rapport à un traitement antifongique seul. De plus, la chirurgie est plus efficace si les lésions sont localisées (par exemple, dans un lobe pulmonaire)²⁸.

Parmi les drogues disponibles, l'amphotéricine B liposomale est la molécule de première intention, à une posologie de 5 à 10 mg/kg/24h³⁰. Les fortes doses d'amphotéricine B liposomale permettent une diffusion de la molécule dans le système nerveux central. Bien que moins toxique que l'amphotéricine B déoxycholate, l'amphotéricine B liposomale conserve une toxicité rénale qui peut faire préférer un traitement par azolé de nouvelle génération : l'isavuconazole ou le posaconazole^{22,30}. Les bithérapies ne sont pas recommandées et aucune

recommandation n'est avancée quant à la durée du traitement. Enfin la prophylaxie primaire par posaconazole est faiblement recommandée³⁰.

Les concentrations minimales inhibitrices (CMI) des antifongiques tel que l'amphotéricine B et le posaconazole diffèrent selon les espèces de Mucorales²¹. Cependant, il y a trop peu de recul et d'études pour orienter de façon évidente le traitement en fonction de l'espèce retrouvée chez un patient²².

Outils diagnostiques microbiologiques des infections fongiques

L'histologie permet d'affirmer la présence du champignon au sein des tissus. Cependant, elle doit être associée à une approche microbiologique afin de préciser le germe en cause. De plus, la mise en évidence directe et l'identification des filaments au sein des sécrétions ou de tissu est peu sensible : une grande quantité de prélèvement est nécessaire²⁷, des colorations particulières doivent être utilisées²⁸ et l'identification du type de filaments mycéliens n'est pas toujours aisée.

La mise en culture des prélèvements biologiques autre que le sang est la méthode de référence pour isoler puis identifier les champignons. Cependant la culture peut être négative malgré la présence de filaments dans le prélèvement à l'examen direct. Le rendement de la microscopie et de la mise en culture des prélèvements est d'environ 60%¹¹. A partir d'une culture positive, l'identification de moisissures peut se faire par l'analyse des critères morphologiques au microscope, par séquençage de régions d'ADN reconnues comme spécifique de genre ou d'espèce (par exemple, les régions ITS (*internal transcribed spacer*) de l'ADN ribosomique, le gène de la calmoduline ou de la bêta-tubuline) ou par utilisation de la spectrométrie de masse MALDI-TOF avec une base de données adaptée aux champignons filamenteux. Cette dernière méthode est de plus en plus répandue dans les laboratoires de diagnostic de routine³⁷.

La culture pouvant être négative ou lente, d'autres approches existent pour orienter le diagnostic tout en s'affranchissant de la pousse du champignon.

Des tests sérologiques à la recherche d'anticorps totaux, d'IgG ou d'IgE anti-*Aspergillus* spécifiques sont disponibles. Une sérologie aspergillaire positive oriente vers un diagnostic d'aspergillose chronique³⁸.

La recherche d'antigènes fongiques tels que le galactomannane (GM) plus ou moins spécifique d'*Aspergillus* ou le β -(1,3)-D-glucane antigène pan-fongique, sont disponibles en kits commercialisés. Ils font partie des critères microbiologiques EORTC/MSG des aspergilloses probables. La recherche de GM est réalisable pour plusieurs types d'échantillons comme le plasma, le liquide céphalo-rachidien (LCR) ou les liquides de lavages broncho-alvéolaires (LBA). La recherche dans le sang (sérum ou plasma) est utilisée en stratégie de dépistage d'une aspergillose invasive (AI) avant l'apparition de signes cliniques chez les patients à haut risque, en stratégie diagnostique d'AI devant des signes cliniques et/ou radiologiques compatibles et pour le suivi thérapeutique. Dans le LBA, il a été montré que la recherche du GM est plus sensible que la mise en culture du prélèvement pour le diagnostic d'aspergillose invasive³⁹. Cependant, des résultats faussement positifs ont été observés, notamment chez des patients traités par certains antibiotiques ou produits dérivés du sang.

La technique de la recherche du β -(1,3)-D-glucane est validée pour le sérum uniquement avec une sensibilité comprise entre 60% et 80% et une spécificité entre 80% et 90% pour le diagnostic d'infection fongique invasive¹⁷. Une étude a montré une meilleure sensibilité du test dans le LBA (80%) par rapport à la culture, une spécificité moyenne (73%) mais une bonne valeur prédictive négative (94%) pouvant aider à l'élimination du diagnostic d'AI⁴⁰. Cependant, ces tests antigéniques sont insuffisants pour le diagnostic de mucormycose. En effet, la recherche de GM et de β -(1,3)-D-glucane sont négatives au cours d'infections par les

espèces appartenant aux Mucorales. C'est pourquoi des approches diagnostiques par biologie moléculaire, non basées sur la culture ou la recherche d'antigène sont développées¹⁷.

Pour la recherche d'*Aspergillus*, de nombreuses PCR en temps réel « maison » ou commercialisées existent. Elles peuvent détecter plusieurs espèces d'*Aspergillus* ou être spécifiques d'*Aspergillus fumigatus* et ont des cibles génomiques différentes : ADNr18s, ADNr28s, régions ITS ou ADN mitochondrial¹⁷. Elles peuvent être réalisées sur des échantillons d'origine différente (sang, LBA, tissus), cependant la sensibilité et la spécificité varient en fonction du type de prélèvements analysé. En effet, pour le sang il a été montré une meilleure sensibilité de la PCR dans le plasma (jusqu'à 95%) par rapport au sérum (68%)⁴¹. La PCR peut également être réalisée sur le LCR pour la recherche d'aspergillose cérébrale avec une sensibilité de 75% et une spécificité de 98%⁴². Enfin, dans les LBA la PCR a une sensibilité de 88,6% et une spécificité de 95,5% pour le diagnostic des aspergilloses invasives⁴³.

La recherche de galactomannane^{44,45} sérique ainsi que la PCR^{40,45} ont montré une bonne valeur prédictive négative dans le suivi des patients neutropéniques en onco-hématologie. L'association de ces deux outils (GM et PCR) dans le suivi des patients d'hématologie à haut risque d'IFI, permet un diagnostic plus précoce et une meilleure prise en charge des aspergilloses invasives lorsqu'un traitement est introduit dès le premier résultat positif⁴⁶.

Il est à noter que certains auteurs retrouvent une diminution de la sensibilité de la PCR chez les patients sous prophylaxie antifongique⁴⁷.

Pour la recherche de Mucorales par biologie moléculaire, des PCR « maison », en point final ou en temps réel, visant différentes cibles (ADN ribosomique ou régions ITS) ont été décrites²⁷ principalement dans du sérum ou des LBA^{48,49}. Du fait d'un manque de standardisation des techniques, la PCR est actuellement modérément recommandée en utilisation de routine pour le diagnostic des mucormycoses³⁰. Un groupe de travail (*Fungal*

PCR Initiative (FPCRI)/Mucorales Lab working group) a été créé au sein de l'ISHAM (*International Society for Human and Animal Mycology*) afin de proposer une standardisation des techniques de PCR ciblant les Mucorales.

La PCR Mucorales a nettement amélioré le diagnostic des mucormycoses. Une revue récente de la littérature sur l'utilisation de la biologie moléculaire dans le diagnostic des mucormycoses indique une meilleure sensibilité de la PCR (88%) par rapport à la culture (43%) quel que soit le type de prélèvement (LBA, liquide pleural ou biopsies tissulaires fraîches ou incluses en paraffine)⁵⁰. De plus, la détection de l'ADN des Mucorales dans le sang peut précéder l'apparition des manifestations cliniques de plusieurs jours voire semaines⁴⁸.

Néanmoins, l'ensemble de ces outils associés aux données d'imagerie ne permet pas toujours de poser un diagnostic formel de la cause d'une infection fongique invasive à champignon filamenteux. Les différences décrites entre *Aspergillus* et Mucorales (Tableau 1) peuvent parfois être difficiles à mettre en évidence dans la prise en charge quotidienne des patients et il n'est pas exceptionnel d'avoir des arguments contradictoires ou manquants pour aboutir au diagnostic. De plus, les aspergilloses et les mucormycoses se rencontrant chez les mêmes profils de patients, il peut être envisagé l'existence de co-infections entre les champignons du genre *Aspergillus* et les champignons de l'ordre des Mucorales.

	<i>Aspergillus sp.</i>	Mucorales
Mycologie		
Macroscopie	Colonies poudreuses	Colonies aériennes
Microscopie	Hyphes fins 2-4µm, septés ramifications à 45° Tête aspergillaire unisériée avec chaînettes de conidies	Hyphes larges 5-20µm, irréguliers, non septés, ramifications à 90° Sporange contenant les spores
Formes cliniques	Immuno-allergique Aspergillome Aspergillose localisée Aspergillose invasive	Rhino-cérébrale Pulmonaire Cutanée Disséminée Gastro-intestinale
Terrain	Asthme, BPCO, post-tuberculose	Diabète, brûlures Immunodéprimés
Diagnostic		
Test antigénique	GM, βDglucane	Aucun
PCR	Pan-aspergillaire ou spécifique d'espèces	Pan-mucorales ou spécifique de genre
Sérologie	Formes chroniques	Aucune
Signes radiologiques	Croissant aérique, halo, grelot Nodules, condensations pulmonaires, cavités	Halo inversé
Traitement		
Prophylaxie primaire secondaire	posaconazole voriconazole	non recommandée posaconazole
Curatif 1 ^{ère} ligne 2 ^{ème} ligne	voriconazole, isavuconazole posaconazole, amphotéricine B	chirurgie, amphotéricine B isavuconazole

GM : galactomannane, BPCO : broncho-pneumopathie chronique obstructive

Tableau 1. Principales différences entre les infections fongiques dues à Aspergillus sp. et à Mucorales

Infection mixte à *Aspergillus* et Mucorales : revue de la littérature

Nous avons effectué une revue des cas de co-infections *Aspergillus*-Mucorales décrites dans la littérature. Mille soixante-quinze articles sont proposés lors de la recherche des termes (« *zygomycosis* » OR « *mucormycosis* ») AND (« *Aspergillus* » OR « *aspergillosis* ») dans la base PubMed, entre 1952 et 2019. Le nombre d'articles portant sur le sujet a fortement augmenté ces quinze dernières années (Figure 7). Nous avons retenu 76 articles rapportant au moins un cas d'infection mixte et ajouté 5 articles non retrouvés dans la base PubMed mais dont la référence est citée dans deux des articles retenus^{33,48,49,51-128}. La cohorte de 18 patients avec une infection mixte décrite en 2014 par Klimko et *al* n'a pas été retenue¹²⁹. En effet, cette étude regroupe dans les infections mixtes les mucormycoses survenant jusqu'à 65 jours après le diagnostic d'aspergillose, sans aucune donnée clinique concernant les patients.

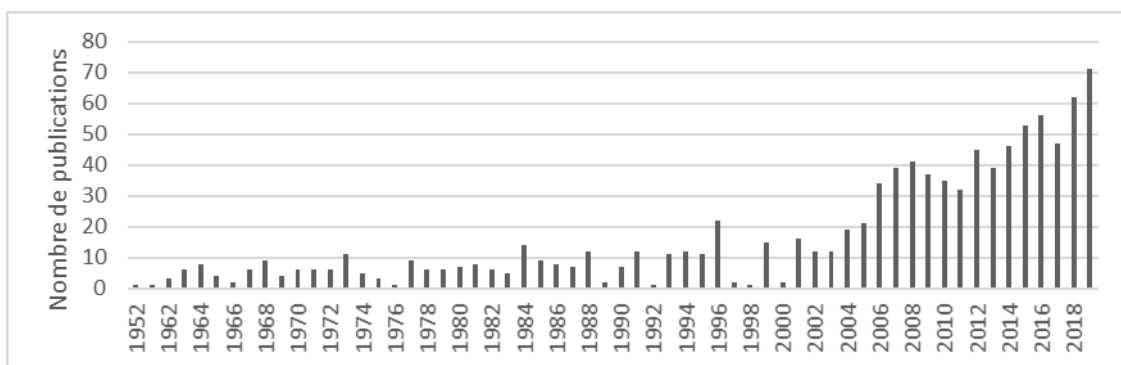


Figure 7. Evolution du nombre de publications (PubMed) au cours du temps pour les termes (« *zygomycosis* » OR « *mucormycosis* ») AND (« *Aspergillus* » OR « *aspergillosis* »)

Au total, 98 cas de patients ayant présenté une infection à *Aspergillus* et Mucorales sont analysés. Les données sont hétérogènes d'un article à un autre, seuls 24 dossiers comprennent à la fois les caractéristiques des patients, l'identification des champignons ainsi que la prise en charge et le devenir des patients.

La moyenne d'âge est de 48 ans et la valeur du sex-ratio, établie sur 66 patients, est de 25 femmes pour 41 hommes. La pathologie sous-jacente est renseignée pour 94 patients : les

hémopathies sont au premier rang (46/94) avec principalement des leucémies aiguës myéloïdes (n=13) ; puis le diabète (18/94) et les transplantations d'organe solide (10/94). A noter que pour 10 patients/94 aucun antécédent notable n'est rapporté. Les infections surviennent dans les contextes suivants : accident traumatique (n=3), noyade (n=3), intoxication à la colchicine (n=1), accès palustre grave (n=1), fièvre hémorragique (n=1) et aucun facteur de risque n'a été mis en évidence chez un patient. L'information sur l'espèce d'*Aspergillus* en cause est disponible pour 38 patients, *A. fumigatus* est l'espèce la plus fréquente (24/38) suivi par *A. flavus* (6/38) et *A. niger* (6/38) ; *A. terreus* est retrouvé chez deux patients. Pour les mucormycoses, le genre est mentionné pour 47 patients et on retrouve majoritairement *Rhizopus* (24/47), puis *Rhizomucor* (11/47), *Lichtheimia* (9/47) et enfin *Mucor* (6/47). La co-infection est co-localisée dans près de 80% des cas (73/92 patients) tandis que chez 20% des patients, les champignons ne sont pas retrouvés dans le même site anatomique. L'atteinte pulmonaire est présente chez 48 patients/92 et l'atteinte sinusienne est décrite chez 25 patients (dont 4 patients avec atteinte cérébrale par contiguïté et 2 patients avec une ostéomyélite de la face). Enfin, la mortalité à trois mois du diagnostic est de 53,7% (44/82 patients pour lesquels l'information est disponible).

Objectif

Le but de ce travail est de décrire la population, la prise en charge et le devenir des patients ayant présenté une co-infection invasive à *Aspergillus fumigatus* et Mucorales entre le 1^{er} janvier 2012 et le 31 août 2019 à l'hôpital de La Pitié-Salpêtrière (Assistance Publique-Hôpitaux de Paris).

Il s'agit en premier lieu de définir si les patients diagnostiqués avec une AI ont pu ou non présenter concomitamment une mucormycose qui n'aurait pas été diagnostiquée. Pour cela, nous avons sélectionné les prélèvements – principalement sérum, LBA, LCR – qui étaient positifs pour la recherche d'*A. fumigatus* par PCR et nous avons ensuite réalisé sur ces prélèvements et de façon complémentaire la recherche de Mucorales par PCR. Nous avons fait de même en sélectionnant les prélèvements positifs pour la recherche de Mucorales par PCR et nous avons le cas échéant réalisé une PCR *A. fumigatus*.

Matériel et méthodes

Type d'étude

Notre étude vise à caractériser l'épidémiologie des co-infections *Aspergillus fumigatus*-Mucorales. Il s'agit d'une étude rétrospective, descriptive et mono-centrique réalisée au sein de l'hôpital de La Pitié-Salpêtrière. Cet établissement compte 1758 lits d'hospitalisation dont 26 lits d'hématologie (hors soins intensifs) et 148 lits de réanimation et soins intensifs. En 2016, 359 greffes y ont été réalisées : 68 greffes de CSH et 291 transplantations d'organe solide (hépatique, cardiaque et rénale). Le laboratoire reçoit et analyse également des échantillons issus d'autres centres, tel que l'hôpital Charles Foix (APHP, 474 lits, orientation gériatrique) ou de structures privées.

Critères d'inclusion

La PCR *A. fumigatus* est réalisée en routine dans le service de Parasitologie-Mycoologie depuis octobre 2009 et la PCR Mucorales depuis le 1^{er} décembre 2016 (**Annexe I**). Les patients ont été inclus en prenant en compte l'existence d'une PCR positive dans un prélèvement. Au sein du laboratoire, l'ensemble des résultats d'analyse des échantillons de patients est enregistré sous format informatique grâce au système de gestion de l'information du laboratoire (SIL) (logiciel Glims, MIPS). Les échantillons primaires ainsi que les extraits d'ADN des prélèvements avec un résultat de PCR positif sont conservés à -20°C depuis 2012.

Une extraction des données du SIL a permis d'établir la liste des échantillons pour lesquels un résultat de PCR positif pour la détection d'ADN d'*Aspergillus fumigatus* ou d'ADN de Mucorales a été rendu entre le 1^{er} janvier 2012 et le 31 août 2019.

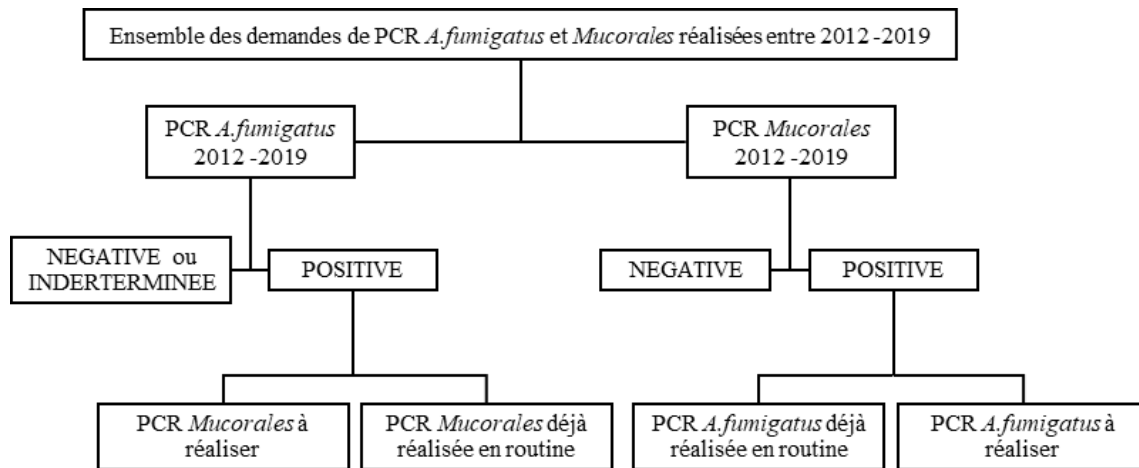


Figure 8. Schéma de l'étude

Réalisation des PCR

Extraction de l'ADN

Pour cette étude, les extraits d'ADN congelés lors de la réalisation de la PCR initiale *Aspergillus fumigatus* ou Mucorales ont été utilisés pour la réalisation des PCR complémentaires. Lorsque la quantité d'extrait disponible était insuffisante, une nouvelle extraction d'ADN à partir du prélèvement primaire a été réalisée sur l'automate d'extraction de routine du laboratoire (*MagNA Pure Compact Instrument*, Roche, Meylan, France) avec le réactif fabricant (*Large Volume MagNa Pure Nucleic Acid Isolation Kit*) (Figure 9). Un volume de 1 mL d'échantillon est extrait et élué dans 50 μ L.

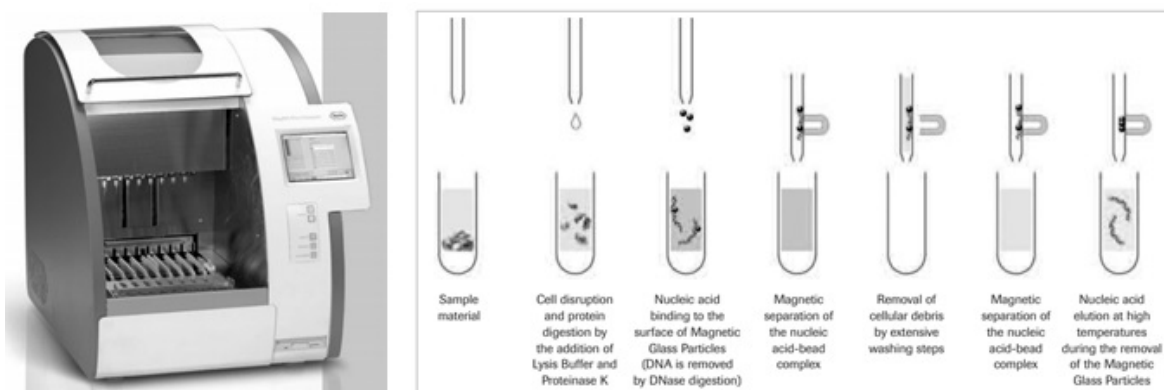


Figure 9. *MagNA Pure Compact Instrument* et étapes d'extraction et purification des acides nucléiques de la technique commercialisée par Roche

Amplification

Nous avons réalisé des PCR en temps réel de type TaqMan® (**Annexe 2**). L'ensemble des PCR est réalisé sur un thermocycleur *7500 Fast Real-Time PCR System* (Applied Biosystems, ThermoFisher). L'un des avantages de cet automate est la possibilité de réduire le temps de réalisation des PCR avec un mode « *Fast* ». Il est possible de réaliser 40 cycles d'amplification en 40 minutes dans des plaques 96 puits contenant un volume total de 25µL/puits (5µL d'extrait d'ADN et 20µL de mélange sonde-amorces). Le réactif *TaqMan Fast Universal PCR Master Mix* (AppliedBiosystems, Thermo Fisher Scientific), contenant l'ADN polymérase (AmpliTaq Fast DNA Polymerase, UP) et adapté à la PCR « rapide », est utilisé pour préparer les mélanges sondes-amorces (mix) spécifiques à chaque PCR.

La première étape de dénaturation de l'ADN a lieu pendant 20 secondes à 95°C puis chaque cycle se compose d'une étape de 3 secondes à 95°C pour l'hybridation des sondes et amorces suivie d'une étape de synthèse d'ADN de 30 secondes à 60°C. Nous avons choisi un protocole de 45 cycles (Figure 10). L'analyse des données brutes de fluorescence est effectuée par le logiciel *7500 Fast system SDS Software* (**Annexe 3**).

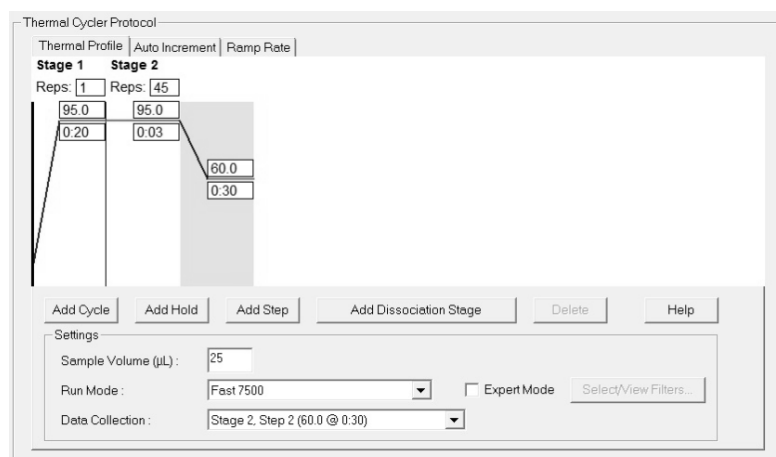


Figure 10. Réglage des températures et durées des cycles de la PCR sur le logiciel de l'automate (*7500 Fast System SDS Software*)

Les spécificités des différentes PCR utilisées dans l'étude sont décrites dans les paragraphes suivants.

Contrôles internes

La recherche du gène de l'albumine est réalisée sur chaque extrait comme témoin de la bonne extraction de l'ADN total contenu dans le prélèvement. Pour notre étude, la PCR albumine ayant déjà été réalisée en parallèle de la PCR initiale (*Aspergillus fumigatus* ou Mucorales), elle n'a pas été effectuée à nouveau sur les échantillons testés. Cependant, lorsqu'une nouvelle extraction d'ADN à partir d'un prélèvement primaire a été nécessaire, la PCR albumine a été réalisée.

PCR Albumine		Concentration finale
Amorce sens	5' TGA AAC ATA CGT TCC CAA AGA GTT T 3'	0,5 µM
Amorce anti-sens	5' CTC TCC TTC TCA GAA AGT GTG CAT AT 3'	0,5 µM
Sonde	FAM-5' TGC TGA AAC ATT CAC CTT CCA TGC AGA 3'-TAMRA	0,1 µM
Témoin positif	Extrait sang humain	

Tableau 2. Caractéristiques techniques de la PCR ciblant le gène de l'albumine

Un contrôle interne positif (*TaqMan® Exogenous Internal Positive Control Reagents*, Applied Biosystems) est ajouté pour tous les extraits testés, quelle que soit la PCR réalisée. Il permet de distinguer un résultat négatif d'une présence d'inhibiteur de PCR lié à l'extrait d'ADN. Un témoin négatif est présent sur chaque plaque de PCR pour s'assurer de l'absence de contamination lors de la préparation des suspensions de mix de réactifs. Enfin, un témoin positif par PCR permet de vérifier la bonne reconstitution du mix. Les échantillons sont déposés en double pour chaque PCR.

PCR *Aspergillus fumigatus*

La technique de PCR pour la détection de l'ADN d'*Aspergillus fumigatus* est une technique de PCR en temps réel quantitative. La cible d'amplification est le gène codant pour la sous-unité ribosomale 28S, présent en plusieurs copies dans le génome d'*A. fumigatus*¹³⁰. La performance diagnostique (sensibilité 100%, spécificité 96,7%, valeurs prédictives positive 81% et négative 100%) de ce protocole de PCR est meilleure que la recherche de galactomannane chez les patients d'hématologie à haut risque d'aspergillose invasive¹³¹. Un suivi des patients par cette PCR une fois par semaine dans le sérum contre deux fois pour le galactomannane est aussi performant et permet un diagnostic précoce des aspergilloses invasives¹³¹. Chaque passage d'une plaque d'échantillons patients est accompagné d'une gamme établie à partir d'un plasmide contenant la séquence cible et composée de 5 points dont la concentration en ADN est connue. La gamme permet de créer une droite d'étalonnage et de calculer, en nombre de copies par millilitre (cp/mL), la quantité d'ADN d'*A. fumigatus* présent dans les échantillons biologiques.

PCR <i>Aspergillus fumigatus</i>		Concentration finale
Amorce sens	5' CTC GGA ATG TAT CAC CTC TCG G 3'	0,5 µM
Amorce anti-sens	5' TCC TCG GTC CAG GCA GG 3'	0,5 µM
Sonde	FAM-5' TGT CTT ATA GCC GAG GGT GCA ATG CG 3'-TAMRA	0,1 µM
Témoin positif	Gamme	

Tableau 3. Caractéristiques techniques de la PCR à la recherche d'*Aspergillus fumigatus*

PCR Mucorales

Trois PCR en temps réel sont réalisées en parallèle : une PCR ciblant indistinctement les genres *Rhizopus* et *Mucor*, une PCR ciblant le genre *Lichtheimia* et une PCR ciblant le genre *Rhizomucor*. Les amorces et sondes utilisées sont celles décrites dans la publication de Millon et al, en 2013⁴⁸ (Tableau 4) et ciblent l'ADN ribosomal 18S. Les auteurs ont adapté un

protocole de l'Agence de Protection Environnementale des Etats-Unis utilisé pour des recherches fongiques en milieux extérieurs à l'écologie française et à la recherche dans du sérum. Ils ont également testé la spécificité de détection de différentes espèces (Tableau 5) rencontrées en pathologie humaine en France²⁵. En 2018, Scherer et al⁴⁹, montrent une bonne sensibilité et spécificité de ce protocole de PCR dans les LBA. De plus, la PCR effectuée dans les LBA des patients avec un diagnostic de mucormycose prouvée / probable est positive plus précocement que dans le sérum.

PCR Mucorales			Concentration finale
Commun aux 3 PCR	Amorce sens N592F	5' CAC CGC CCG TCG CTA C 3'	0,5 µM
	Amorce anti-sens	5' CCT AGT TTG CCA TAG TTC TCT GCA G 3'	0,5 µM
	Sonde	FAM-5' CCG ATT GAA TGG TTA TAG TGA GCA TAT GGG ATC 3'-TAMRA	0,2 µM
	Témoin positif	<i>Mucor circinelloides</i> , souche séquencée	
Lichtheimia	Amorce anti-sens	5' GCA AAG CGT TCC GAA GGA CA 3'	0,5 µM
	Sonde	FAM-5' ATG GCA CGA GCA AGC ATT AGG GAC G 3'-TAMRA	0,2 µM
	Témoin positif	<i>Absidia cylindrospora</i> , souche séquencée	
Rhizomucor	Amorce anti-sens	5' GTA GTT TGC CAT AGT TCG GCT A 3'	0,5 µM
	Sonde	VIC-5' TTG AAT GGC TAT AGT GAG CAT ATG GGA GGC T 3'-TAMRA	0,2 µM
	Témoin positif	<i>Rhizomucor variabilis</i> , souche séquencée	

Tableau 4. Caractéristiques techniques des PCR Mucorales

PCR Mucor - Rhizopus	<i>Mucor amphibiorum / circinelloides / hiemalis / indicus / mucedo / racemosus / ramosissimus</i> <i>Rhizopus azygosporus / homothalicus / microsporus / oligosporus / oryzae</i>
PCR Lichtheimia	<i>Lichtheimia corymbifera / ramosa / ornata</i>
PCR Rhizomucor	<i>Rhizomucor meihei / pusillus / variabilis</i>

Tableau 5. Principales espèces pathogènes reconnues par les amorces utilisées dans les trois PCR Mucorales²⁵

Recueil des données cliniques

Les informations cliniques concernant les patients ont été obtenues en consultant les comptes-rendus d'hospitalisation regroupés dans le dossier patient informatisé (logiciel Orbis, Agfa Healthcare). Pour les patients transférés hors de l'hôpital de La Pitié-Salpêtrière, les comptes-rendus ont été récupérés en contactant directement les services de prise en charge des patients. Pour chaque patient les facteurs de risque, le diagnostic retenu lors de l'hospitalisation, le traitement et le devenir à 3 mois du diagnostic de l'infection ont été recueillis.

Classification des patients

Les critères EORTC/MSG 2008 élargis aux nouvelles populations à risque ont été utilisés pour classer les patients en mycoses invasives possible, probable ou prouvée. La PCR a été retenue comme critère mycologique pour le diagnostic d'infection probable.

Analyses des données

Les données sont colligées et traitées avec les logiciels Excel et Prism (GraphPad).

Résultats

Extraction des données informatiques

Entre le 1^{er} janvier 2012 et le 31 août 2019, 24 742 demandes de PCR *A. fumigatus* (4 826 patients) et 346 demandes de PCR Mucorales (214 patients) ont été reçues au laboratoire. L'objectif de notre étude étant la recherche de prélèvements positifs à la fois pour *A. fumigatus* et Mucorales, nous avons sélectionné les PCR positives pour *A. fumigatus* (n=508) et les PCR positives pour Mucorales (n=21). Parmi les 508 PCR positives à *A. fumigatus*, la PCR Mucorales avait été réalisée en routine pour 10 échantillons, 60 échantillons n'étaient plus disponibles et 448 PCR Mucorales ont été réalisées dans le cadre de l'étude. Concernant les PCR Mucorales, parmi les 21 PCR positives, le résultat de la PCR *A. fumigatus* était déjà disponible pour 11 échantillons, 2 échantillons n'ont pas été retrouvés et 8 PCR *A. fumigatus* ont été réalisées dans le cadre de l'étude (Figure 11).

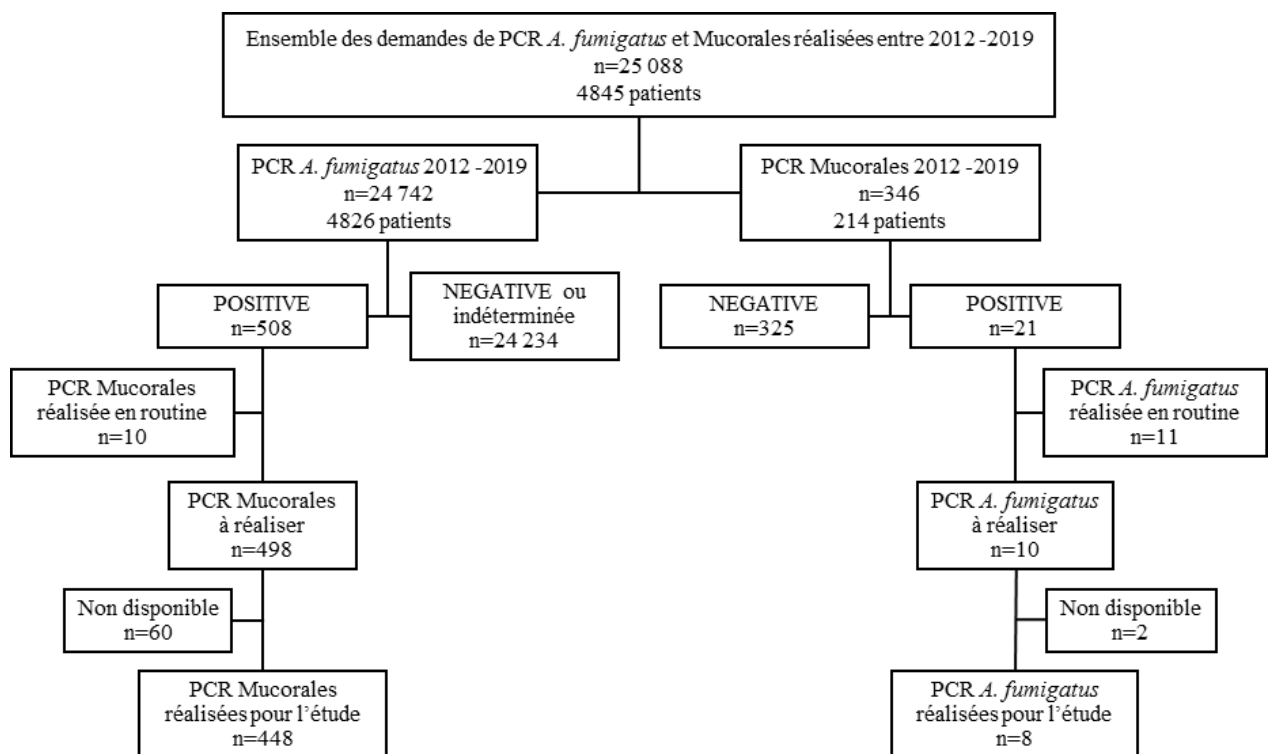


Figure 11. Sélection des prélèvements de l'étude

Analyse rétrospective des demandes de PCR *Aspergillus fumigatus*

Concernant les 24 742 demandes de PCR *A. fumigatus* reçues, la très grande majorité des demandes sont des prélèvements sanguins (85%) suivi par les prélèvements respiratoires (expectoration, aspiration bronchique, LBA, liquide pleural et biopsie pulmonaire ; 13%) (Figure 12). Les demandes proviennent d'un total de 4 826 patients principalement suivi en hématologie (18 881 prélèvements ; 76,3% des demandes ; 1 292 patients) ou hospitalisés en réanimation (2 887 prélèvements ; 11,7% des demandes ; 1 621 patients).

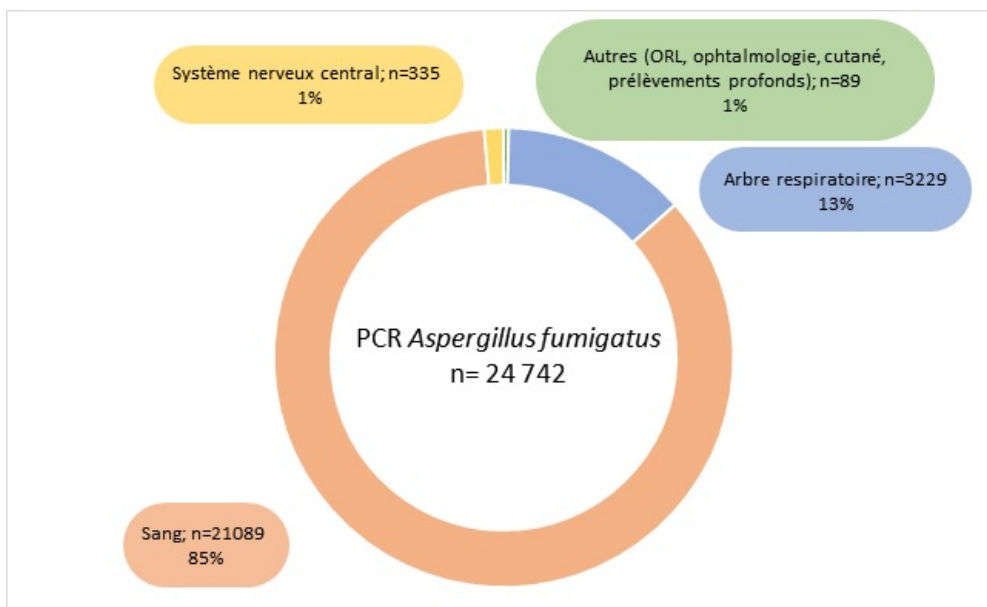


Figure 12. Répartition des demandes de PCR *A. fumigatus* selon l'origine des prélèvements

Sur la totalité des PCR *A. fumigatus* reçues, 508 sont positives (2,1%), 24 212 sont négatives (97,9%) et 22 sont indéterminées (0,1% ; 17 résultats ininterprétables et 5 PCR non réalisées car quantité de prélèvement insuffisante). La répartition des PCR positives et négatives par type de prélèvement est présentée Figure 13. Les PCR positives sont pour 47% des prélèvements sanguins et pour 42% des prélèvements respiratoires (Figure 14).

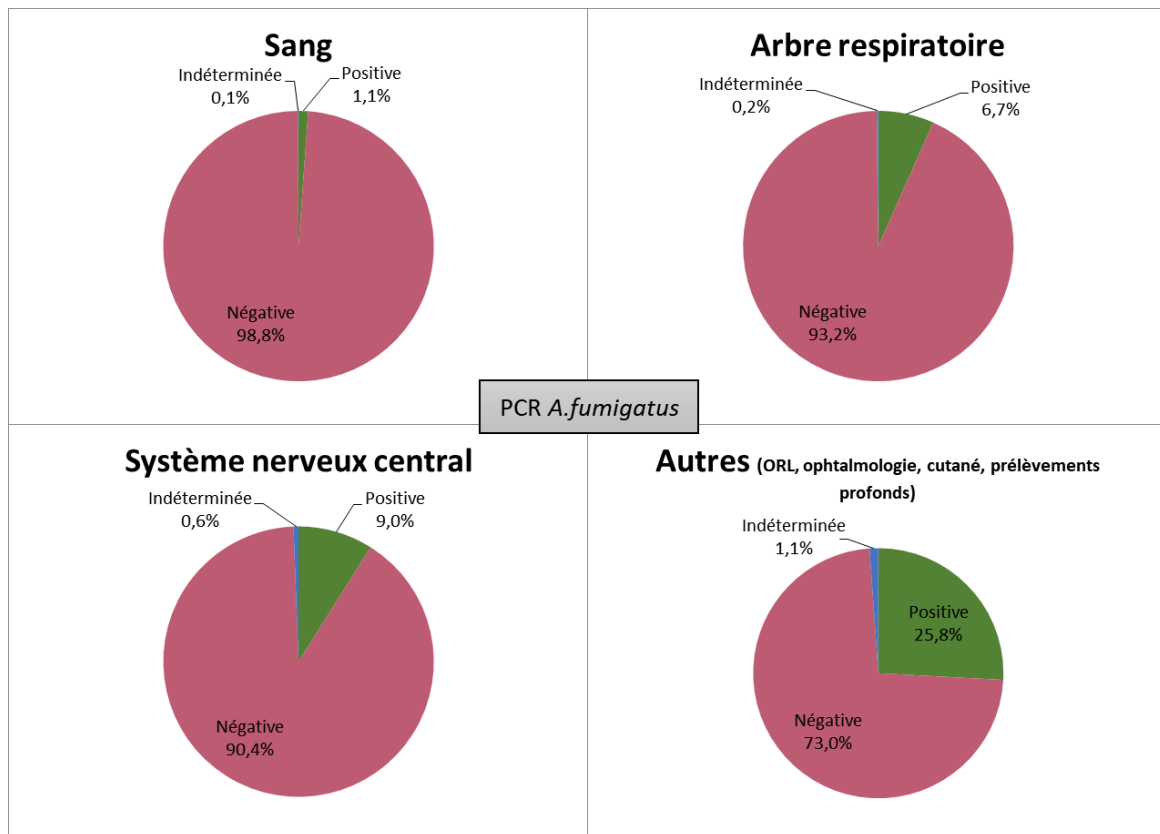


Figure 13. Résultats des PCR *A. fumigatus* selon l'origine des prélèvements

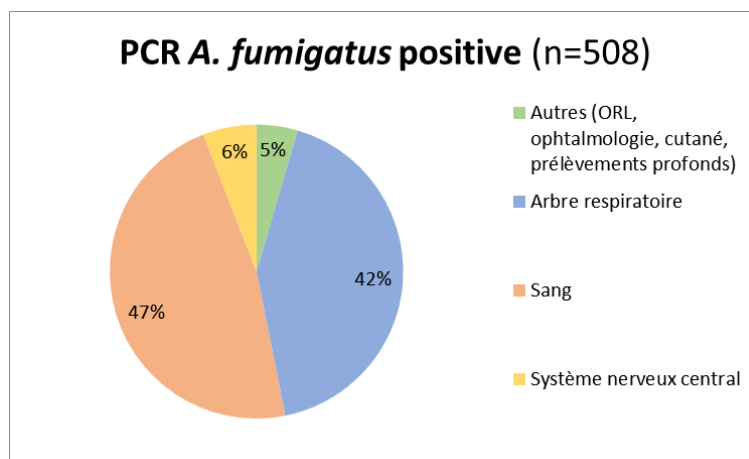


Figure 14. PCR *A. fumigatus* positives selon l'origine des prélèvements

L'ensemble des prélèvements pour lesquels une PCR *A. fumigatus* est positive (n=508) permet de constituer une cohorte de 302 patients dont 52,6% (n=159/302) ont un diagnostic d'aspergillose invasive prouvée / probable. La mortalité à 3 mois des formes invasives est de 64,3% (Tableau 6).

Les formes non-invasives représentent 22,8% des diagnostics (n=69/302) : 30 aspergillomes de localisation pulmonaire ou sinusienne, 26 aspergilloses chroniques (ABPA, APC nécrosante, APC cavitaire, bronchite) et 13 colonisations pulmonaires.

Enfin, chez 19,2% des patients (n=58/302) ayant eu un prélèvement avec une PCR *A. fumigatus* positive, le diagnostic de pathologie aspergillaire n'a pas été retenu. Cela correspond à 30 prélèvements sanguins, 28 prélèvements respiratoires et 5 LCR. Le nombre de copies/mL est inférieur à 10 pour n=28/63 prélèvements, entre 10 et 150 pour n=12/63 et supérieur à 150 pour n=23/63. Le nombre de copies maximal observé est de 167 000 copies/mL de sérum chez un patient sous traitement par voriconazole depuis 6 mois pour une aspergillose invasive et dont les autres prélèvements réalisés dans le cadre de son suivi (antigène galactomannane et PCR *A. fumigatus* sériques) sont négatifs.

	Nombre de patients ayant une PCR <i>A. fumigatus</i> positive quel que soit le prélèvement (n=302)		Devenir à 3 mois Survie/décès/NC
Aspergillose invasive			
Prouvée	11	3,6%	6 / 5 / -
Probable	148	49%	50 / 96 / 2
Aspergillose non-invasive			
ABPA	5	1,7%	
APC cavitaire	6	2,0%	
APC nécrosante	13	4,3%	
Bronchite aspergillaire	2	0,7%	
Aspergillome			
Pulmonaire	12	4,0%	
Sinusien	18	6,0%	
Colonisation		13	4,3%
Diagnostic non retenu	d'aspergillose	58	19,2%
			43 / 13 / 1
Données manquantes		16	5,3%

APC : aspergillose pulmonaire chronique ; NC : non connu

Tableau 6. Patients ayant une PCR *Aspergillus fumigatus* positive sur le site de La Pitié Salpêtrière de janvier 2012 à août 2019

Analyse rétrospective des demandes de PCR Mucorales

Sur une période de 33 mois, entre le 1^{er} décembre 2016 et le 31 août 2019, 346 demandes de PCR Mucorales ont été reçues. La majorité des échantillons ont une origine broncho-pulmonaire (LBA, expectorations, aspirations trachéales ; 42%) et sanguine (35%) (Figure 15). La PCR *A. fumigatus* est largement prescrite dans le sérum (5,7 fois plus que sur les autres prélèvements) tandis que la PCR Mucorales est deux fois plus demandée sur des prélèvements « non-sérum » ($p < 0,0001$).

Les 346 demandes de PCR Mucorales constituent une cohorte de 214 patients. Les prescripteurs principaux sont les services de réanimation et soins intensifs avec 46,2% des demandes. Les services d'hématologie ne prescrivent que 15% des demandes, les maladies infectieuses et médecine interne 12,7% et l'ORL 5,8%.

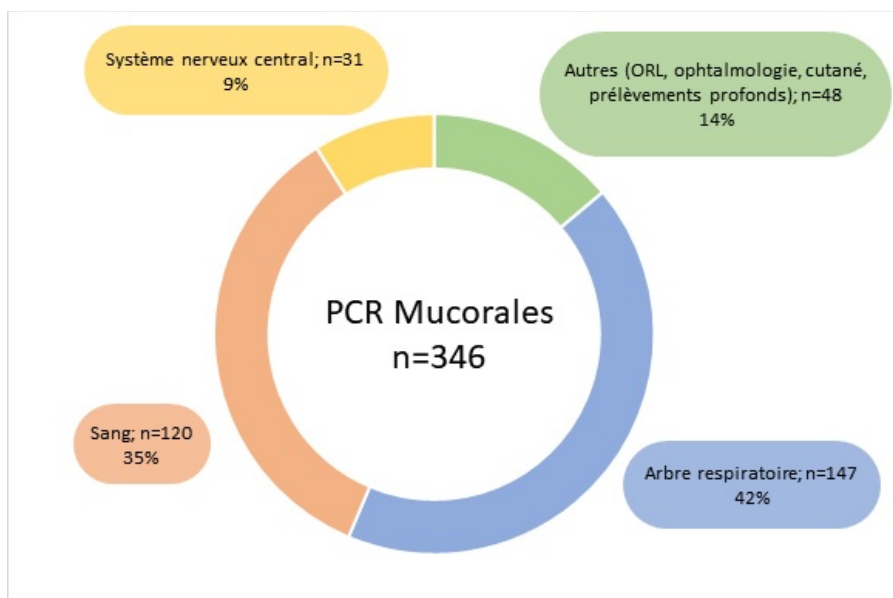


Figure 15. Répartition des demandes de PCR Mucorales selon l'origine des prélèvements

Un total de 21 PCR est positif (6,1%) et 325 PCR sont négatives (93,9%). La répartition des PCR positives selon le type de prélèvement est illustrée Figure 16. Le plus grand nombre de prélèvements positifs provient de la flore respiratoire (47%) et les prélèvements sanguins représentent 24 % des PCR positives (Figure 17).

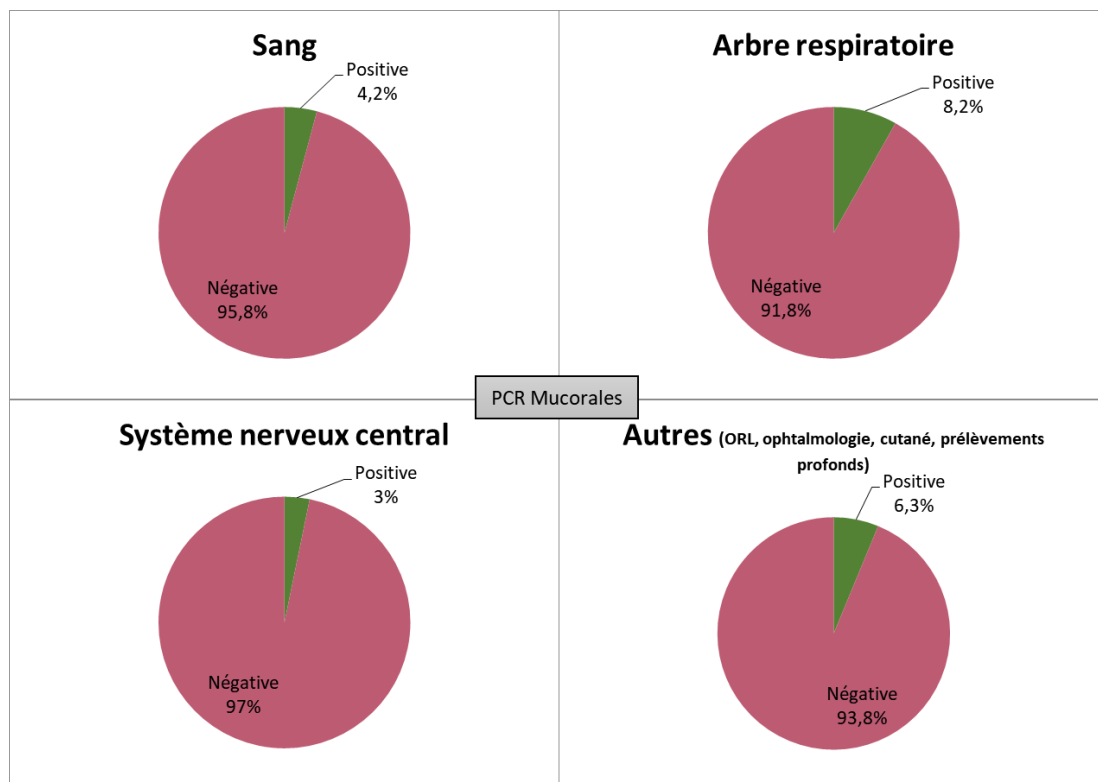


Figure 16. Résultats des PCR Mucorales selon l'origine des prélèvements

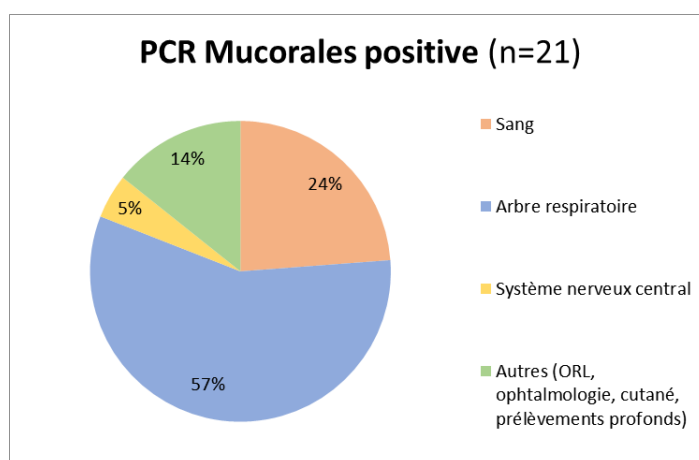


Figure 17. PCR Mucorales positives selon l'origine des prélèvements

Ces 21 prélèvements positifs en PCR Mucorales ont été réalisés chez 11 patients : 5 formes prouvées et 6 formes probables de mucormycoses. Pour quatre patients, seule la PCR Mucorales est positive, pour sept patients la culture et la PCR sont positives.

Les diagnostics de mucormycoses prouvées (n=5) sont une forme sinusienne nécrosante chez un diabétique mal équilibré sans atteinte cérébrale, une forme cutanée profonde sur un pied

diabétique, une forme digestive avec présence de filaments à la biopsie hépatique, une forme disséminée avec atteinte cérébrale et une forme pulmonaire avec l’histologie positive sur la pièce de lobectomie.

Parmi les mucormycoses probables (n=6), trois patients ont une PCR positive dans au moins un sérum et un LBA, une patiente a une PCR positive dans un LBA et un liquide pleural, et les deux derniers patients ont uniquement un prélèvement respiratoire positif (LBA). Les pathologies sous-jacentes, la prise en charge et le devenir de ces patients sont présentés dans le Tableau 7. La PCR *A. fumigatus* avait été réalisée lors de la prise en charge initiale pour sept de ces patients (6 négatifs et 1 positif). Pour les quatre autres patients, les PCR à la recherche d’*A. fumigatus* ont été réalisées dans le cadre de l’étude et sont négatives.

	Nombre de patients (n=11)	PCR Mucorales	Culture	Pathologie sous-jacente	Prise en charge	Devenir à 3 mois
Sinusienne	1 (prouvée)	<i>Mucor/Rhizopus</i>	Négative	Diabète	Chirurgie + posaconazole	Vivant
Cutanée profonde	1 (prouvée)	<i>Mucor/Rhizopus</i>	<i>Mucor sp</i>	Diabète	Chirurgie + AmB	Vivant
Cérébrale	1 (prouvée)	<i>Mucor/Rhizopus</i>	<i>Rhizopus sp</i>	TOS	Vori + AmB	Décédé
Digestive disséminée	1 (prouvée)	<i>Mucor/Rhizopus</i> + <i>Rhizomucor</i>	<i>Rhizomucor sp</i>	TOS, diabète	Vori + Caspo *	Décédé
Pulmonaire disséminée	5 (1 prouvée) (4 probables)	<i>Mucor/Rhizopus</i>	<i>Rhizopus sp</i>	TOS	Chirurgie + AmB	Vivant
		<i>Mucor/Rhizopus</i>	Négative	TOS	Chirurgie + AmB	Décédé
		<i>Mucor/Rhizopus</i>	<i>Rhizopus sp</i>	TOS	AmB	Vivant
		<i>Rhizomucor</i>	Négative	TOS	AmB	Décédé
Pulmonaire localisée	2 (probables)	<i>Mucor/Rhizopus</i>	<i>Mucor sp</i>	TOS	Non traité *	Décédé
			<i>Rhizopus sp</i>	Sain	AmB	Vivant

TOS : transplanté d’organe solide ; AmB : amphotéricine B ; Vori : voriconazole ; Caspo : caspofungine
* : diagnostic post mortem

Tableau 7. Diagnostic d’infection à Mucorales à la Pitié-Salpêtrière de janvier 2012 à août 2019 avec au moins une PCR Mucorales positive

Co-infections *Aspergillus fumigatus* et Mucorales

Recherche de co-infection lors de l'hospitalisation

Entre le 1^{er} décembre 2016 (date de mise en place de la PCR Mucorales au laboratoire) et le 31 août 2019, 2 586 patients ont eu une prescription d'au moins une PCR *A. fumigatus* ou Mucorales. Les deux PCR fongiques ont été prescrites au cours d'un même épisode infectieux pour 196 patients, soit 7,6% des patients avec une demande de PCR (196/2 586). Parmi eux, un patient est retrouvé positif pour les deux champignons filamenteux : il s'agit d'un patient transplanté rénal depuis 6 ans présentant un tableau d'aspergillose invasive probable compliqué d'une fongémie à cryptocoques. Un LBA et deux sérums sont positifs en PCR *A. fumigatus* et *Rhizomucor*. Le LBA est positif en culture à *A. fumigatus* uniquement. Le patient décède trois jours après le début du traitement par amphotéricine B liposomale prescrite dans le cadre de la cryptococcose (**Annexe 4**, patient 1).

Recherche rétrospective des co-infections

Dans notre étude, nous nous sommes intéressés aux 529 PCR positives pour *A. fumigatus* ou Mucorales entre 2012 et 2019, correspondant à un groupe de 312 patients. Soixante-deux prélèvements n'étaient plus disponibles (28 patients) et vingt-et-un avaient déjà un résultat pour la PCR complémentaire. Ainsi, j'ai effectué 448 PCR Mucorales et 8 PCR *A. fumigatus* complémentaires (Figure 11). Au total, nous avons une cohorte de 284 patients, dont 146 cas d'aspergilloses invasives, chez lesquels la recherche par PCR à la fois d'*Aspergillus fumigatus* et de Mucorales a été réalisée (Figure 18).

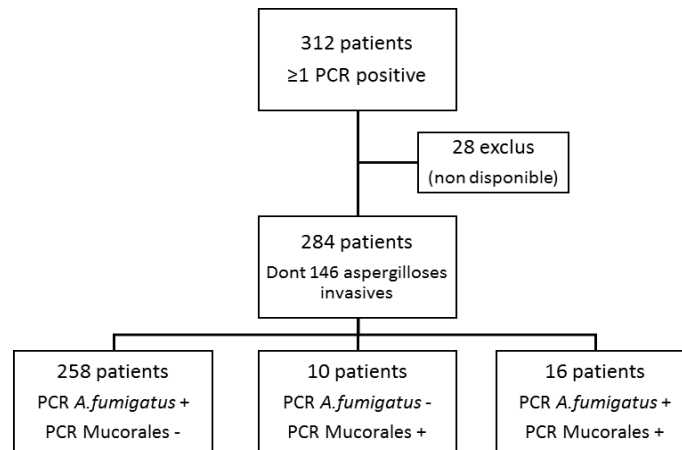


Figure 18. Répartition des patients selon le résultat des PCR *A. fumigatus* et Mucorales

Au total, 16 patients de cette cohorte de 284 ont un prélèvement positif pour les deux PCR, soit une incidence de co-détection *Aspergillus*-Mucorales de 5,6%. A l'exception d'un patient (*cf. supra*), il s'agit de patients chez lesquels le diagnostic d'aspergillose seul avait été envisagé initialement et la recherche de Mucorales non effectuée.

Parmi ces 16 patients, le diagnostic d'une forme invasive d'aspergillose prouvée ou probable a été retenu pour 12 d'entre eux (**Annexe 4**, patients 1 à 12). Ainsi, durant la période d'étude entre 2012 et 2019, la présence de Mucorales est retrouvée dans 8,2% (12/146) des cas d'aspergilloses invasives diagnostiqués avec comme critère mycologique au moins une PCR *A. fumigatus* positive. Pour 3 autres patients (**Annexe 4**, patients 14 à 16), le diagnostic initial d'aspergillose est discutable du fait du peu d'arguments cliniques ou de l'absence de renseignement disponible *a posteriori* (une patiente perdue de vue). Enfin pour la dernière patiente, le diagnostic initial est un aspergillome sinusien non invasif pour lequel la PCR *Lichtheimia* est positive (**Annexe 4**, patient 13).

La transplantation d'organe solide est la pathologie sous-jacente la plus représentée avec six patients greffés (4 transplantés cardiaques, 1 transplanté hépatique et 1 transplanté rénal). Quatre patients sont atteints de pathologies onco-hématologiques (2 leucémies lymphoïdes

chroniques et 2 leucémies aiguës) dont un patient allogreffé de cellules souches hématopoïétiques.

Chaque patient est positif pour un seul genre de Mucorales, sauf pour deux d'entre eux : le premier a une aspiration trachéale positive pour les trois PCR Mucorales et le second un LBA positif à *Mucor/Rhizopus* et *Lichtheimia*. Le genre le plus retrouvé est *Mucor/Rhizopus* chez 10 patients, suivi de *Lichtheimia* chez 5 patients et *Rhizomucor* chez 4 patients. Les deux principaux types de prélèvements positifs sont de façon équivalente des prélèvements respiratoires (n=8) et des prélèvements sanguins (n=8).

L'absence de prise en charge antifongique chez certains patients (n= 4/15) est expliquée par un diagnostic tardif ou non certain d'aspergillose invasive.

Un traitement par voriconazole seul est prescrit chez six patients : trois patients sont vivants après 90 jours de prise en charge (PCR positives dans une aspiration trachéale, un LBA et un sang) et trois patients sont décédés après 0, 5 et 7 jours de prise en charge.

Pour trois autres patients l'amphotéricine B liposomale a complété ou remplacé le traitement par voriconazole pour différentes raisons mais qui sont non liées à la suspicion de mucormycose (1 patient avec une fongémie à cryptocoques, 1 patient avec un isolat d'*A. fumigatus* résistant au voriconazole et 1 patient développant une cytolysé hépatique sous voriconazole). Ces trois patients sont décédés 9, 40 et 41 jours après leur début de traitement par voriconazole et après 6, 22 et 33 jours de traitement par amphotéricine B, respectivement.

Deux patients ont eu une prise en charge chirurgicale : une cure d'aspergillome sinusien (chirurgie seule) dans le premier cas et un traitement d'endocardite aspergillaire chez un second patient présentant une aspergillose pulmonaire invasive disséminée avec atteinte cardiaque et cérébrale (chirurgie accompagnée d'un traitement par voriconazole et amphotéricine B).

La survie après 90 jours de traitement n'est pas différente entre les aspergilloses invasives sans mucormycose associée (36,7%) par rapport aux infections fongiques invasives mixtes (33,3%) ; $p=0,64$ (Figure 19).

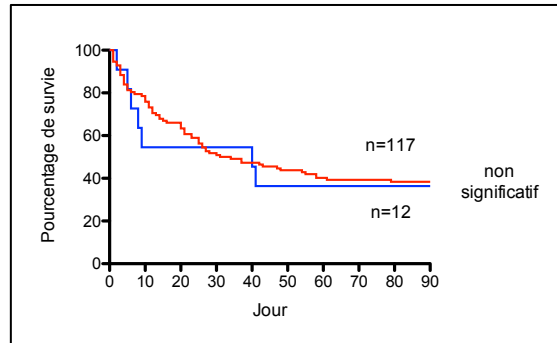


Figure 19. Courbes de survie des patients avec une aspergillose invasive (rouge) et des patients avec une association aspergillose et mucormycose (bleu)

Au sein des patients avec une infection invasive mixte, la prise d'amphotéricine B liposomale ne modifie pas la survie globale à 90 jours de prise en charge. Le taux de survie est de 25% lors de la prise d'amphotéricine B liposomale et de 37,5% chez les patients sans amphotéricine B liposomale ; $p=0,71$ (Figure 20).

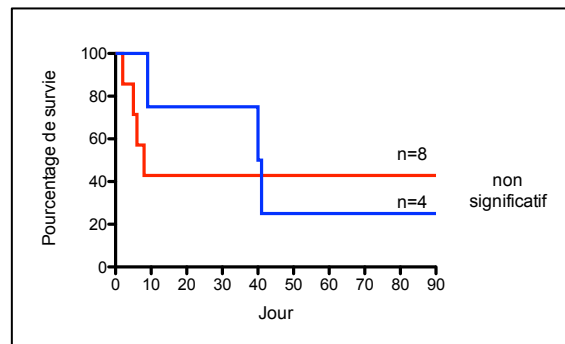


Figure 20. Courbes de survie des patients avec une infection mixte ayant reçu de l'amphotéricine B (bleu) et ceux n'ayant pas reçu d'amphotéricine B (rouge)

	Vivant à 3 mois	Décédé à 3 mois
	n= 6	n= 9
Sexe (H/F)	3 / 3	7 / 2
Age médian	61 [45-84]	59 [23-76]
Terrain		
Transplanté organe solide	4	2
Hémopathie maligne	1	3
Immunodépression ^a	0	2
Autre ^b	0	2
Sain	1	
Corticothérapie récente		
Oui	3	5
Non	3	4
ECMO		
Oui	0	3
Non	6	6
Diagnostic d'aspergillose		
AI prouvée/probable	4	8
Non étiquetée	1	1
Aspergillome	1	0
Mucorales		
<i>Mucor-Rhizopus</i>	4	6
<i>Lichtheimia</i>	4	0
<i>Rhizomucor</i>	1	3
Prélèvements		
LBA	3	5
Sérum	2	6
LCR	0	1
Sinus	1	0
Traitement		
Aucun	1	3
Chirurgie seule	1	0
Chirurgie + Vori + AmB	1	0
Vori puis AmB	0	3
Vori seul	3	3
Prophylaxie antifongique		
Oui	1 (casprofongine)	1 (posaconazole puis casprofongine)
Non	5	8

^a traitement immunosuppresseur, granulomatoses septique chronique, ^b cirrhose décompensée, vascularite granulomateuse. Vori : voriconazole, AmB : amphotéricine B liposomale

Tableau 8. Caractéristiques des patients co-infectés *Aspergillus fumigatus*-Mucorales

Discussion

Patients doubles positifs

Notre étude a permis de mettre en évidence l'existence de 16 cas de co-infection *Aspergillus fumigatus*-Mucorales sur une période de sept ans au sein de l'hôpital de La Pitié-Salpêtrière. Parmi les aspergilloses invasives, une PCR Mucorales est trouvée positive dans 8,2% des cas.

Notre étude présente certaines limites. La principale réside dans le mode de sélection des patients diagnostiqués avec une aspergillose invasive puisqu'ils ont été sélectionnés sur la base d'une PCR positive. Ainsi, les patients ayant présenté une aspergillose invasive établie par la culture et/ou une recherche d'antigène mais avec une PCR *Aspergillus* non réalisée ou négative n'ont pas été inclus. La mise à jour des définitions de l'EORTC/MSG¹⁸ début décembre 2019 intègre la biologie moléculaire dans les critères de classification, ce qui tend vers une plus grande prescription des PCR pour le diagnostic des infections fongiques invasives. D'après les données publiées dernièrement par notre équipe et reflétant l'épidémiologie de notre site, la sensibilité de la PCR est de 78,4% pour le sérum⁴⁵ et 88,6% pour les LBA⁴³. Par conséquent, notre série comprenant 159 cas d'aspergillose invasive, on peut estimer que le nombre de cas totaux d'aspergillose invasive varie entre 179 (159/0,886) et 203 (soit 159/0,784) soit un manque d'inclusion compris entre 20 et 44 patients (environ 12,5 à 27% des cas).

Une autre limite réside dans le fait que la PCR *Aspergillus* que nous utilisons est spécifique d'*Aspergillus fumigatus* ; de ce fait les patients dont l'aspergillose est due à une espèce autre que *A. fumigatus* n'ont pas été considérés. *A. fumigatus* étant l'espèce majoritairement retrouvée en pathologie humaine, on estime que le nombre de patients non inclus par ce biais est faible. Cependant, deux cas avérés de mucormycose avec une co-infection par *Aspergillus*

non *fumigatus* ont été retrouvés lors de l'analyse des dossiers cliniques. Ainsi, un patient présentait une aspergillose à *A. terreus* et un autre patient une aspergillose à *A. flavus*. Pour étendre notre cohorte et déterminer plus précisément l'incidence des co-infections invasives *Aspergillus*-Mucorales, ce travail va se poursuivre en incluant l'intégralité des patients ayant présenté une aspergillose invasive.

De même, la PCR Mucorales que nous utilisons ne détecte que quatre genres parmi les sept principaux retrouvés en pathologies humaines. Il est donc possible que nous ayons sous-diagnostiqué les cas de mucormycoses. Récemment, Bellanger et al.¹³² ont proposé une PCR ciblant *Cunninghamella*, genre responsable de 7% des mucormycoses en France²⁵. Un travail de mise au point est nécessaire pour l'intégrer à la PCR Mucorales existante, mais cela permettrait de détecter les cinq genres de Mucorales les plus fréquents en France. Deux autres genres responsables de mucormycoses en France ne sont pas détectés par la PCR : *Saksena* et *Apophysomyces*²⁵.

Ainsi, l'incidence de 8,2% est possiblement sous-estimée du fait de notre approche méthodologique basée sur un diagnostic par biologie moléculaire uniquement. Néanmoins, nous pouvons juger qu'il est déjà relativement élevé. En effet, d'autres auteurs rapportent un taux de co-infections *Aspergillus*-Mucorales d'environ 0,5% dans une cohorte de suivi de patients avec une infection fongique invasive⁸⁶.

On note également que parmi les 26 patients dont au moins un prélèvement est positif en PCR Mucorales (patients de l'étude et patients de routine), 16 (soit 61,5%) ont également un prélèvement positif à *Aspergillus fumigatus* en PCR. Million et al.¹²² en 2016 sur des prélèvements de sérum et Scherer et al.⁴⁹ en 2018 sur des prélèvements de LBA, rapportent respectivement 25% et 20% de co-infection avec *Aspergillus* dans des cohortes de mucormycoses invasives. L'impact clinique du diagnostic secondaire d'aspergillose lors d'un

diagnostic de mucormycose est moins important du fait de l'efficacité contre *Aspergillus* du traitement par amphotéricine B liposomale (généralement administrée en première intention lors du diagnostic de mucormycose). Cependant, cela reflète l'éventualité que plusieurs filamenteux puissent s'associer au cours d'infections fongiques invasives.

Les patients de notre cohorte présentant une co-infection sont principalement des transplantés d'organe solide tandis que la grande majorité des cas dans la littérature sont décrits chez des patients atteints d'hémopathie. Les genres les plus rencontrés dans notre étude sont *Mucor/Rhizopus* (10/16) ce qui correspond à l'écologie mondiale²⁶ et française²⁵ des mucormycoses. Nous retrouvons ensuite *Lichtheimia* (5/16), ce qui est en accord avec les résultats de l'étude de prévalence française²⁵. Par conséquent, les espèces de filamenteux retrouvés dans les co-infections sont les mêmes que celles responsables d'infections uniques ; il ne semble pas y avoir d'association préférentielle entre certaines espèces de champignons lors d'infections mixtes.

Dans 20% des cas co-infectés décrits dans la littérature, les localisations de l'aspergillose et de la mucormycose sont différentes. Il aurait été intéressant de rechercher la présence de Mucorales dans d'autres sites anatomiques que celui où la PCR *A. fumigatus* est retrouvée positive. Cela n'a pas été possible dans notre travail car seuls les prélèvements initialement positifs en PCR sont conservés au long cours.

Seul un patient avec une co-infection avait été diagnostiqué au cours de son hospitalisation parmi les 196 patients avec une demande pour les deux PCR. Bien qu'en augmentation depuis 2016, le nombre de PCR Mucorales prescrites dans notre hôpital est modeste. Cela peut être expliqué par le fait que les mucormycoses sont une pathologie avec une incidence plus faible

que les aspergilloses et peut être moins connue de certains prescripteurs. Le manque de recommandations sur les populations à dépister et les moyens de dépistage/diagnostic des mucormycoses participe probablement à cette faible prescription. En décembre 2019 sont parues les recommandations sur le diagnostic et le traitement des mucormycoses de l'ECMM/MSG ERC (*Mycoses Study Group Education & Research Consortium*)³⁰ rappelant les formes cliniques ainsi que les patients à risque. Les auteurs proposent un schéma diagnostique faisant apparaître la PCR en parallèle de la culture.

Dans notre cohorte de patients « doubles positifs », quatre patients sont vivants 3 mois après le diagnostic de co-infection sans instauration de traitement actif contre les Mucorales. Pour deux patients, les PCR sont positives dans un prélèvement respiratoire : une contamination ou une colonisation transitoire de l'arbre respiratoire du fait d'une intubation oro-trachéale, sans pathologie pulmonaire préexistante, sont possibles. Pour les deux autres patients, ce sont des prélèvements sanguins qui sont retrouvés positifs : le premier patient, greffé cardiaque depuis un an est hospitalisé pour une détresse respiratoire. Un diagnostic d'aspergillose (LBA positif en culture et sérum avec une PCR *A. fumigatus* et antigénémie galactomannane positives) et de grippe sévère est posé. Le sérum prélevé trois jours avant le début du traitement par voriconazole est retrouvé positif en PCR Mucorales. Le seul traitement antifongique administré est le voriconazole pendant 4 mois. Chez le second patient, hospitalisé pour une leucémie aiguë lymphoïde et sous caspofungine prophylactique depuis 24h, le prélèvement sanguin positif en PCR Mucorales et *A. fumigatus* survient lors de la sortie d'aplasie post-chimiothérapie du patient. Les prélèvements suivants sont négatifs pour *Aspergillus* et le patient ne reçoit aucun traitement antifongique supplémentaire. Les hypothèses proposées pour ces prélèvements sanguins positifs sans prise en charge antifongique spécifique des patients sont soit un contrôle spontané de la charge fongique par le patient, soit une

contamination de notre échantillon ou un manque de spécificité de la technique. Il faut souligner que la spécificité de la PCR Mucorales est à ce jour peu étudiée : les premiers résultats de l'étude ModiMucor¹³³ évaluant les performances de la PCR Mucorales sérique dans le diagnostic précoce des mucormycoses, rapportent une spécificité de 89,2% et une valeur prédictive positive de 62,7%.

Difficulté diagnostique de la PCR *Aspergillus*

Il est parfois difficile de différencier un contexte d'infection débutante d'une contamination. Dans notre cohorte, le diagnostic d'aspergillose n'a pas été retenu pour 19% des patients avec une PCR *A. fumigatus* positive. Parmi ces patients, 75% sont vivants à 3 mois. La positivité des prélèvements respiratoires peut être expliquée par une colonisation sans infection déclarée. Pour les prélèvements profonds comme le sérum et le LCR, le passage transitoire de l'ADN fongique est plus débattu. Une des hypothèses avancées est le contrôle de l'infection par l'hôte. Dans certains cas, les patients ont reçu un traitement antifongique pendant 3 à 5 jours avant que le diagnostic d'aspergillose soit écarté. Il est possible qu'une faible charge fongique associée à un traitement court puisse contrôler l'infection et permette une guérison du patient, *a fortiori* si les facteurs prédisposant le patient à l'aspergillose s'amendent. D'autre part, de réels faux positifs analytiques ont été observés lors de notre pratique au laboratoire, ainsi un nouveau prélèvement du patient lorsque celui-ci est réalisable est souhaitable pour confirmer ou infirmer le résultat.

Dans de nombreux cas, une PCR positive est retrouvée isolée sans autres arguments microbiologique ou radiologique pour appuyer le diagnostic d'aspergillose. Dans les dernières recommandations de l'EORTC/MSG¹⁸, la PCR doit être positive dans deux prélèvements différents pour être considéré comme un critère d'infection. Cette circulation d'ADN pourrait être transitoire ce qui rend ce paramètre difficile à interpréter comme marqueur prédictif pour

le suivi des patients^{39,131}. Pour au moins deux patients dont la PCR est revenue positive dans le sang, la notion de traitement par voriconazole depuis plus de 4 mois, dans le cadre d'une aspergillose invasive a été retrouvée dans les dossiers. Aucun changement de prise en charge n'a été effectué chez ces patients et le suivi a montré par la suite des PCR négatives.

Considérations techniques sur les PCR *Aspergillus* et Mucorales

Initialement, la PCR *Mucor/Rhizopus* et le contrôle interne (IPC) étaient réalisés en duplex (mix sonde-amorces commun) ainsi que les PCR *Lichtheimia* et *Rhizomucor* selon un protocole réalisé dans plusieurs laboratoires. Cependant, de nombreux résultats faussement positifs étaient observés pour la PCR *Lichtheimia* : des échantillons patients ainsi que le témoin négatif étaient retrouvés positifs « un puits sur deux » à plusieurs reprises, avec des opérateurs différents et à plusieurs jours d'intervalle. Les résultats obtenus lors d'un second passage des échantillons n'étaient pas reproductibles tandis que les autres PCR réalisées au laboratoire sur le même automate de PCR ne présentaient pas de résultats anormaux. Ceci nous a amené à rediscuter la préparation et la distribution du mix sonde-amorces pour les PCR *Lichtheimia* et *Rhizomucor*. Les mix ont été séparés et les deux PCR réalisées chacune en simplex ce qui a permis une disparition des faux positifs de la PCR *Lichtheimia*. L'ensemble des échantillons avec un résultat douteux a été contrôlé en PCR simplex permettant de conclure à la négativité du prélèvement dans la majorité des cas. Ainsi, la réalisation sur un automate *7500 Fast Real-Time PCR System* avec un programme « *fast* » ne semble pas adaptée pour cette PCR en duplex. Le principal inconvénient de cette réalisation en simplex est la quantité d'extrait d'ADN consommé pour réaliser les trois PCR Mucorales en duplicate.

Nous avons remarqué une autre différence de résultat liée au protocole en duplex, cette fois pour la PCR *Mucor/Rhizopus* et le contrôle IPC. Lors de l'analyse de la fluorescence en fin de

PCR, la présence de l'IPC (marqué avec le fluorochrome VIC) modifiait, en le diminuant, le signal FAM de la sonde spécifique *Mucor/Rhizopus*. Ainsi, des échantillons faiblement positifs en *Mucor/Rhizopus* présentaient des résultats très faibles avec des valeurs de Ct élevées (>43) et/ou une discordance entre les 2 puits du duplicate (un puits faiblement positif et un puits négatif). Une différence de 3 à 5 Ct a été observée entre les puits dont le mix comportait l'IPC et les puits dont le mix était sans l'IPC, lors de la même manipulation. Ces échantillons ont été contrôlés en retirant le contrôle IPC du mix ce qui restaurait le résultat positif vrai.

Il a été montré une différence de rendement de la PCR *A. fumigatus* selon la nature du prélèvement sanguin (sérum ou plasma)⁴¹ et selon la quantité de prélèvement extrait¹³¹. A ce jour, aucune étude n'a comparé ces deux types de prélèvements dans le cadre de la PCR Mucorales. Un seul article de Shigemura et *al.* en 2014¹³⁴ rapporte l'utilisation de la PCR dans le LCR (positif à *Lichtheimia*) en utilisant le protocole similaire à celui pour le sérum. Les mêmes auteurs utilisent également la décroissance de la PCR comme suivi thérapeutique chez leurs patients dans le sérum et sur le LCR chez un patient^{134,135}.

Une amélioration du diagnostic des infections à Mucorales est nécessaire pour améliorer le pronostic et la prise en charge des patients. Le développement de tests antigéniques spécifiques pour les Mucorales et l'amélioration des outils existants permettraient de pouvoir combiner plusieurs méthodes et ainsi d'augmenter la sensibilité et spécificité du diagnostic mycologique. Une PCR quantitative en temps réel multiplexe détectant simultanément plusieurs espèces d'*Aspergillus* et plusieurs genres de Mucorales a été développée récemment (Adamtech[©])¹³⁶. Elle permet le dépistage combiné d'un grand nombre d'espèces fongiques. Son apport diagnostique reste cependant à démontrer sur des cohortes importantes de patients.

Conclusion

Ce travail met en évidence l'existence de seize patients ayant présenté une infection mixte à *Aspergillus fumigatus* et Mucorales parmi une cohorte de deux cent quatre-vingt-quatre patients chez qui une infection due à un seul filamenteux avait été initialement diagnostiquée. Ainsi, au sein de notre centre hospitalier, l'incidence des co-infections invasives aspergillose-mucormycose, jusqu'à présent largement sous-estimée, est de 8,2%.

Bibliographie

1. Steinbach WJ, Marr KA, Anaissie EJ, et al. Clinical epidemiology of 960 patients with invasive aspergillosis from the PATH Alliance registry. *Journal of Infection*. 2012;65(5):453-464. doi:10.1016/j.jinf.2012.08.003
2. Kontoyiannis DP, Marr KA, Park BJ, et al. Prospective surveillance for invasive fungal infections in hematopoietic stem cell transplant recipients, 2001-2006: overview of the Transplant-Associated Infection Surveillance Network (TRANSNET) Database. *Clin Infect Dis*. 2010;50(8):1091-1100. doi:10.1086/651263
3. Pappas PG, Alexander BD, Andes DR, et al. Invasive fungal infections among organ transplant recipients: results of the Transplant-Associated Infection Surveillance Network (TRANSNET). *Clin Infect Dis*. 2010;50(8):1101-1111. doi:10.1086/651262
4. von Eiff M, Roos N, Schulten R, Hesse M, Zühlsdorf M, van de Loo J. Pulmonary aspergillosis: early diagnosis improves survival. *Respiration*. 1995;62(6):341-347. doi:10.1159/000196477
5. 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*. 2008;47(4):503-509. doi:10.1086/590004
6. Latgé JP. *Aspergillus fumigatus* and aspergillosis. *Clin Microbiol Rev*. 1999;12(2):310-350.
7. Lortholary O, Gangneux J-P, Sitbon K, et al. Epidemiological trends in invasive aspergillosis in France: the SAIF network (2005-2007). *Clin Microbiol Infect*. 2011;17(12):1882-1889. doi:10.1111/j.1469-0691.2011.03548.x
8. de Hoog GS, Guarro J, Figueras MJ. *Atlas of Clinical Fungi*. 2e ed. ASM; 2001.
9. Park SJ, Mehrad B. Innate Immunity to *Aspergillus* Species. *Clin Microbiol Rev*. 2009;22(4):535-551. doi:10.1128/CMR.00014-09
10. Máiz L, Nieto R, Cantón R, Gómez G de la Pedrosa E, Martínez-García MÁ. Fungi in Bronchiectasis: A Concise Review. *Int J Mol Sci*. 2018;19(1). doi:10.3390/ijms19010142
11. Haute Autorité de Santé. Actualisation des actes de biologie médicale relatifs au diagnostic des infections à *Aspergillus*. Argumentaire. 2017:123.
12. Herbrecht R, Bories P, Moulin J-C, Ledoux M-P, Letscher-Bru V. Risk stratification for invasive aspergillosis in immunocompromised patients. *Ann N Y Acad Sci*. 2012;1272:23-30. doi:10.1111/j.1749-6632.2012.06829.x
13. Cornillet A, Camus C, Nimubona S, et al. Comparison of epidemiological, clinical, and biological features of invasive aspergillosis in neutropenic and nonneutropenic patients: a 6-year survey. *Clin Infect Dis*. 2006;43(5):577-584. doi:10.1086/505870
14. Stevens DA, Melikian GL. Aspergillosis in the “nonimmunocompromised” host. *Immunol Invest*. 2011;40(7-8):751-766. doi:10.3109/08820139.2011.614307
15. Bassetti M, Bouza E. Invasive mould infections in the ICU setting: complexities and solutions. *J Antimicrob Chemother*. 2017;72(suppl_1):i39-i47. doi:10.1093/jac/dkx032

16. De Pauw B, Walsh TJ, Donnelly JP, 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*. 2008;46(12):1813-1821. doi:10.1086/588660
17. Lamoth F, Calandra T. Early diagnosis of invasive mould infections and disease. *J Antimicrob Chemother*. 2017;72(suppl_1):i19-i28. doi:10.1093/jac/dkx030
18. Donnelly JP, Chen SC, Kauffman CA, 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*. December 2019. doi:10.1093/cid/ciz1008
19. Gianella P, Gasche-Soccal P, van Delden C, Hachulla AL, Rochat T. [Invasive pulmonary aspergillosis and chronic pulmonary aspergillosis]. *Rev Med Suisse*. 2014;10(451):2202-2207.
20. Zheng S, Li X, Hu B, Li H. Is adjuvant antifungal therapy after video-assisted thoracic surgery for pulmonary aspergilloma necessary? *J Thorac Dis*. 2018;10(11):6060-6065. doi:10.21037/jtd.2018.09.151
21. Herbrecht R, Denning DW, Patterson TF, et al. Voriconazole versus amphotericin B for primary therapy of invasive aspergillosis. *N Engl J Med*. 2002;347(6):408-415. doi:10.1056/NEJMoa020191
22. Jenks JD, Mehta SR, Hoenigl M. Broad spectrum triazoles for invasive mould infections in adults: Which drug and when? *Med Mycol*. 2019;57(Supplement_2):S168-S178. doi:10.1093/mmy/myy052
23. Spatafora JW, Chang Y, Benny GL, et al. A phylum-level phylogenetic classification of zygomycete fungi based on genome-scale data. *Mycologia*. 2016;108(5):1028-1046. doi:10.3852/16-042
24. Walther G, Wagner L, Kurzai O. Updates on the Taxonomy of Mucorales with an Emphasis on Clinically Important Taxa. *Journal of Fungi*. 2019;5(4):106. doi:10.3390/jof5040106
25. Lanternier F, Dannaoui E, Morizot G, et al. A Global Analysis of Mucormycosis in France: The RetroZygo Study (2005–2007). *Clin Infect Dis*. 2012;54(suppl_1):S35-S43. doi:10.1093/cid/cir880
26. Jeong W, Keighley C, Wolfe R, et al. The epidemiology and clinical manifestations of mucormycosis: a systematic review and meta-analysis of case reports. *Clinical Microbiology and Infection*. 2019;25(1):26-34. doi:10.1016/j.cmi.2018.07.011
27. Garcia-Hermoso D. Diagnostic microbiologique des mucormycoses. *Med Sci (Paris)*. 2013;29:13-18. doi:10.1051/medsci/201329s104
28. Ribes JA, Vanover-Sams CL, Baker DJ. Zygomycetes in human disease. *Clin Microbiol Rev*. 2000;13(2):236-301. doi:10.1128/cmr.13.2.236-301.2000
29. Bitar D, Van Cauteren D, Lanternier F, et al. Increasing Incidence of Zygomycosis (Mucormycosis), France, 1997–2006. *Emerg Infect Dis*. 2009;15(9):1395-1401. doi:10.3201/eid1509.090334
30. Cornely OA, Alastruey-Izquierdo A, Arenz D, 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. *The Lancet Infectious Diseases*. November 2019. doi:10.1016/S1473-3099(19)30312-3

31. Ramadorai A, Ravi P, Narayanan V. Rhinocerebral Mucormycosis: A Prospective Analysis of an Effective Treatment Protocol. *Ann Maxillofac Surg*. 2019;9(1):192-196. doi:10.4103/ams.ams_231_18
32. Petrikkos G, Tsioutis C. Recent Advances in the Pathogenesis of Mucormycoses. *Clinical Therapeutics*. 2018;40(6):894-902. doi:10.1016/j.clinthera.2018.03.009
33. Radowsky JS, Strawn AA, Sherwood J, Braden A, Liston W. Invasive mucormycosis and aspergillosis in a healthy 22-year-old battle casualty: case report. *Surg Infect (Larchmt)*. 2011;12(5):397-400. doi:10.1089/sur.2010.065
34. Serris A, Danion F, Lanternier F. Disease Entities in Mucormycosis. *J Fungi (Basel)*. 2019;5(1). doi:10.3390/jof5010023
35. Roden MM, Zaoutis TE, Buchanan WL, et al. Epidemiology and outcome of zygomycosis: a review of 929 reported cases. *Clin Infect Dis*. 2005;41(5):634-653. doi:10.1086/432579
36. Legouge C, Caillot D, Chrétien M-L, et al. The Reversed Halo Sign: Pathognomonic Pattern of Pulmonary Mucormycosis in Leukemic Patients With Neutropenia? *Clin Infect Dis*. 2014;58(5):672-678. doi:10.1093/cid/cit929
37. Schwarz P, Guedouar H, Laouiti F, Grenouillet F, Dannaoui E. Identification of Mucorales by Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry. *J Fungi (Basel)*. 2019;5(3). doi:10.3390/jof5030056
38. Ma X, Wang K, Zhao X, et al. Prospective study of the serum Aspergillus-specific IgG, IgA and IgM assays for chronic pulmonary aspergillosis diagnosis. *BMC Infect Dis*. 2019;19(1):694. doi:10.1186/s12879-019-4303-x
39. Bergeron A, Porcher R, Menotti J, et al. Prospective Evaluation of Clinical and Biological Markers To Predict the Outcome of Invasive Pulmonary Aspergillosis in Hematological Patients. *J Clin Microbiol*. 2012;50(3):823-830. doi:10.1128/JCM.00750-11
40. Hoenigl M, Prattes J, Spiess B, et al. Performance of galactomannan, beta-d-glucan, Aspergillus lateral-flow device, conventional culture, and PCR tests with bronchoalveolar lavage fluid for diagnosis of invasive pulmonary aspergillosis. *J Clin Microbiol*. 2014;52(6):2039-2045. doi:10.1128/JCM.00467-14
41. White PL, Barnes RA, Springer J, et al. Clinical Performance of Aspergillus PCR for Testing Serum and Plasma: a Study by the European Aspergillus PCR Initiative. *J Clin Microbiol*. 2015;53(9):2832-2837. doi:10.1128/JCM.00905-15
42. 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*. 2017;23(11):889.e1-889.e4. doi:10.1016/j.cmi.2017.06.012
43. Imbert S, Meyer I, Palous M, 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*. 2018;9:1877. doi:10.3389/fmicb.2018.01877
44. Maertens JA, Klont R, Masson C, et al. Optimization of the Cutoff Value for the Aspergillus Double-Sandwich Enzyme Immunoassay. *Clin Infect Dis*. 2007;44(10):1329-1336. doi:10.1086/514349

45. Imbert S, Gauthier L, Joly I, et al. Aspergillus PCR in serum for the diagnosis, follow-up and prognosis of invasive aspergillosis in neutropenic and nonneutropenic patients. *Clin Microbiol Infect.* 2016;22(6):562.e1-8. doi:10.1016/j.cmi.2016.01.027
46. Aguado JM, Vázquez L, Fernández-Ruiz M, et al. Serum Galactomannan Versus a Combination of Galactomannan and Polymerase Chain Reaction–Based Aspergillus DNA Detection for Early Therapy of Invasive Aspergillosis in High-Risk Hematological Patients: A Randomized Controlled Trial. *Clin Infect Dis.* 2015;60(3):405-414. doi:10.1093/cid/ciu833
47. Springer J, Lackner M, Nachbaur D, et al. Prospective multicentre PCR-based Aspergillus DNA screening in high-risk patients with and without primary antifungal mould prophylaxis. *Clinical Microbiology and Infection.* 2016;22(1):80-86. doi:10.1016/j.cmi.2015.09.009
48. Millon L, Larosa F, Lepiller Q, et al. Quantitative polymerase chain reaction detection of circulating DNA in serum for early diagnosis of mucormycosis in immunocompromised patients. *Clin Infect Dis.* 2013;56(10):e95-101. doi:10.1093/cid/cit094
49. Scherer E, Iriart X, Bellanger AP, et al. Quantitative PCR (qPCR) Detection of Mucorales DNA in Bronchoalveolar Lavage Fluid To Diagnose Pulmonary Mucormycosis. *J Clin Microbiol.* 2018;56(8). doi:10.1128/JCM.00289-18
50. Shadrivova OV, Burygina EV, Klimko NN. Molecular Diagnostics of Mucormycosis in Hematological Patients: A Literature Review. *J Fungi (Basel).* 2019;5(4). doi:10.3390/jof5040112
51. Alfano C, Chiummariello S, Dessy LA, Bistoni G, Scuderi N. Combined Mucormycosis and Aspergillosis of the Rhinocerebral Region. *In Vivo.* 2006;20(2):311-315.
52. Allan BT, Patton D, Ramsey NK, Day DL. Pulmonary fungal infections after bone marrow transplantation. *Pediatr Radiol.* 1988;18(2):118-122. doi:10.1007/bf02387554
53. Asimakopoulos P, Supriya M, Kealey S, Vernham GA. A case-based discussion on a patient with non-otogenic fungal skull base osteomyelitis: pitfalls in diagnosis. *J Laryngol Otol.* 2013;127(8):817-821. doi:10.1017/S002221511300145X
54. Barr A, Nolan M, Grant W, Costello C, Petrou MA. Rhinoorbital and pulmonary zygomycosis post pulmonary aspergilloma in a patient with chronic lymphocytic leukaemia. *Acta Biomed.* 2006;77 Suppl 4:13-18.
55. Benoit D, Peleman R, Claeys G, Hertveldt K, Vandewoude K. Mixed community-acquired fungal infection in an apparently healthy patient. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2000;19(8):642-643. doi:10.1007/s100960000331
56. Bergantim R, Rios E, Trigo F, Guimarães JE. Invasive coinfection with Aspergillus and Mucor in a patient with acute myeloid leukemia. *Clin Drug Investig.* 2013;33 Suppl 1:S51-55. doi:10.1007/s40261-012-0022-4
57. Bhagat M, Rapose A. Rapidly progressing dual infection with Aspergillus and Rhizopus: when soil inhabitants become deadly invaders. *BMJ Case Rep.* 2016;2016. doi:10.1136/bcr-2016-217535
58. Blin N, Morineau N, Gaillard F, et al. Disseminated mucormycosis associated with invasive pulmonary aspergillosis in a patient treated for post-transplant high-grade non-Hodgkin's lymphoma. *Leuk Lymphoma.* 2004;45(10):2161-2163. doi:10.1080/10428190410001700803

59. Bourke P, Castro P, Rabagliati R, et al. Zygomycosis over-infection during voriconazole therapy for aspergillosis in a heart transplant patient, successfully treated with liposomal amphotericin and posaconazole. *Transpl Infect Dis.* 2012;14(5):E56-59. doi:10.1111/j.1399-3062.2012.00772.x
60. Cateau E, Randriamalala E, Elsendoorn A, Giot J-P, du Sorbier CM, Rodier M-H. Fatal-mixed cutaneous zygomycosis-aspergillosis: a case report. *Mycopathologia.* 2013;176(5-6):423-427. doi:10.1007/s11046-013-9706-4
61. Chermetz M, Gobbo M, Rupel K, et al. Combined Orofacial Aspergillosis and Mucormycosis: Fatal Complication of a Recurrent Paediatric Glioma-Case Report and Review of Literature. *Mycopathologia.* 2016;181(9-10):723-733. doi:10.1007/s11046-016-0021-8
62. Chua JLL, Cullen JF. Fungal pan-sinusitis with severe visual loss in uncontrolled diabetes. *Ann Acad Med Singap.* 2008;37(11):964-967.
63. Clauss H, Samuel R. Simultaneous mold infections in an orthotopic heart transplant recipient. *Transpl Infect Dis.* 2008;10(5):343-345. doi:10.1111/j.1399-3062.2007.00299.x
64. Davoudi S, Anderlini P, Fuller GN, Kontoyiannis DP. A long-term survivor of disseminated *Aspergillus* and mucorales infection: an instructive case. *Mycopathologia.* 2014;178(5-6):465-470. doi:10.1007/s11046-014-9785-x
65. Diamond HJ, Phelps RG, Gordon ML, Lambroza E, Namdari H, Bottone EJ. Combined *Aspergillus* and zygomycotic (*Rhizopus*) infection in a patient with acquired immunodeficiency syndrome. Presentation as inflammatory tinea capitis. *J Am Acad Dermatol.* 1992;26(6):1017-1018. doi:10.1016/s0190-9622(08)80347-7
66. Dodémont M, Hites M, Bailly B, et al. When you can't see the wood for the trees. *Mucor circinelloides*: A rare case of primary cutaneous zygomycosis. *J Mycol Med.* 2015;25(2):151-154. doi:10.1016/j.mycmed.2015.02.043
67. Ergene U, Ozbalci D, Baykal B, Ciris IM, Yarıktas M. Aplastic anemia, mucormycosis and aspergillosis in infectious mononucleosis: Success is possible. *Transfusion and Apheresis Science.* 2007;37(2):125-129. doi:10.1016/j.transci.2007.03.016
68. Grahame-Clarke CN, Roberts CM, Empey DW. Chronic necrotizing pulmonary aspergillosis and pulmonary phycomycosis in cystic fibrosis. *Respir Med.* 1994;88(6):465-468. doi:10.1016/s0954-6111(05)80051-4
69. Habroosh FA, Eatamadi H, Mohamed RM. Concomitant orbital aspergillosis and mucormycosis in a 17 months old immunocompetent child. *Saudi J Ophthalmol.* 2017;31(3):193-195. doi:10.1016/j.sjopt.2017.05.006
70. Henn A, Mellon G, Henry B, et al. Disseminated cryptococcosis, invasive aspergillosis, and mucormycosis in a patient treated with alemtuzumab for chronic lymphocytic leukaemia. *Scandinavian Journal of Infectious Diseases.* 2014;46(3):231-234. doi:10.3109/00365548.2013.866269
71. Hofman V, Dhoubi A, Butori C, et al. Usefulness of molecular biology performed with formaldehyde-fixed paraffin embedded tissue for the diagnosis of combined pulmonary invasive mucormycosis and aspergillosis in an immunocompromised patient. *Diagn Pathol.* 2010;5:1. doi:10.1186/1746-1596-5-1
72. Imai Y, Adachi Y, Kimura T, et al. An autopsy case of pulmonary fissure induced by zygomycosis. *Int J Gen Med.* 2013;6:575-579. doi:10.2147/IJGM.S44701

73. Itoh Y, Segawa H, Kito K, et al. Lipoid pneumonia with chronic myelomonocytic leukemia. *Pathol Res Pract.* 2009;205(2):143-147. doi:10.1016/j.prp.2008.07.013
74. Johnson AS, Ranson M, Scarffe JH, Morgenstern GR, Shaw AJ, Oppenheim BA. Cutaneous infection with *Rhizopus oryzae* and *Aspergillus niger* following bone marrow transplantation. *J Hosp Infect.* 1993;25(4):293-296. doi:10.1016/0195-6701(93)90116-h
75. Kishel JJ, Sivik J. Breakthrough invasive fungal infection in an immunocompromised host while on posaconazole prophylaxis: an omission in patient counseling and follow-up. *J Oncol Pharm Pract.* 2008;14(4):189-193. doi:10.1177/1078155208094123
76. Lador N, Polacheck I, Gural A, Sanatski E, Garfunkel A. A trifungal infection of the mandible: case report and literature review. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2006;101(4):451-456. doi:10.1016/j.tripleo.2005.07.022
77. Leelawattanachai P, Montakantikul P, Nosoongnoen W, Chayakulkeeree M. Pharmacokinetic/pharmacodynamic study of posaconazole delayed-release tablet in a patient with coexisting invasive aspergillosis and mucormycosis. *Ther Clin Risk Manag.* 2019;15:589-595. doi:10.2147/TCRM.S203625
78. Leithauser M, Kahl C, Aepinus C, et al. Invasive zygomycosis in patients with graft-versus-host disease after allogeneic stem cell transplantation. *Transpl Infect Dis.* 2010;12(3):251-257. doi:10.1111/j.1399-3062.2009.00480.x
79. Lipový B, Rihová H, Hanslianová M, et al. Unsuccessful therapy of combined mycotic infection in a severely burned patient: a case study. *Acta Chir Plast.* 2009;51(3-4):83-84.
80. Mahadevaiah AH, Rajagopalan N, Patil M, C S. Coinfection of pulmonary mucormycosis and aspergillosis presenting as bilateral vocal cord palsy. *BMJ Case Rep.* 2013;2013. doi:10.1136/bcr-2013-009615
81. Maiorano E, Favia G, Capodiferro S, Montagna MT, Lo Muzio L. Combined mucormycosis and aspergillosis of the oro-sinonasal region in a patient affected by Castleman disease. *Virchows Arch.* 2005;446(1):28-33. doi:10.1007/s00428-004-1126-x
82. Malhotra S, Duggal S, Bhatia NK, Sharma N, Hans C. Rhinocerebral zygomycosis with pulmonary aspergillosis in a non-HIV-infected patient: an unusual case report from India. *J Med Microbiol.* 2009;58(Pt 1):146-150. doi:10.1099/jmm.0.005272-0
83. Mantero V, Basilico P, Pozzetti U, et al. Concomitant cerebral aspergillosis and mucormycosis in an immunocompetent woman treated with corticosteroids. *J Neurovirol.* November 2019. doi:10.1007/s13365-019-00804-4
84. McLintock LA, Gibson BES, Jones BL. Mixed pulmonary fungal infection with *Aspergillus fumigatus* and *Absidia corymbifera* in a patient with relapsed acute myeloid leukaemia. *Br J Haematol.* 2005;128(6):737. doi:10.1111/j.1365-2141.2005.05379.x
85. Mölle M, Blaschke-Hellmessen R, Schuler U, Nowak R, Ehninger G. [Disseminated aspergillosis and mucormycosis. A case report]. *Mycoses.* 1996;39 Suppl 1:59-64. doi:10.1111/j.1439-0507.1996.tb00507.x
86. Montagna MT, Lovero G, Coretti C, et al. SIMIFF study: Italian fungal registry of mold infections in hematological and non-hematological patients. *Infection.* 2014;42(1):141-151. doi:10.1007/s15010-013-0539-3

87. Safai Nodeh SR, Dehghan Manshadi SA, Jahanbin B, et al. Invasive fungal consecutive infections in a patient with acute myeloid leukaemia. *Niger J Clin Pract.* 2019;22(4):582-584. doi:10.4103/njcp.njcp_359_17
88. Pacheco P, Ventura AS, Branco T, Gonçalves L, Carvalho C. Clinical experience in invasive fungal infections. *Clin Drug Investig.* 2013;33 Suppl 1:S23-26. doi:10.1007/s40261-012-0017-1
89. Pellacchia V, Terenzi V, Moricca LM, Buonaccorsi S, Indrizzi E, Fini G. Brain abscess by mycotic and bacterial infection in a diabetic patient: clinical report and review of literature. *J Craniofac Surg.* 2006;17(3):578-584. doi:10.1097/00001665-200605000-00034
90. Persichino JG, Can AD, Van TT, Matthews MN, Filler SG. Invasive pulmonary mucormycosis and aspergillosis in a patient with decompensated hepatic cirrhosis. *Med Mycol Case Rep.* 2018;21:12-15. doi:10.1016/j.mmcr.2018.03.004
91. Point S, Gabriel F, Bégueret H, et al. Tumor shape pulmonary mucormycosis associated with sinonasal aspergillosis in a diabetic patient. *Med Mycol Case Rep.* 2018;19:13-17. doi:10.1016/j.mmcr.2017.08.001
92. Pouvaret A, Guery R, Montillet M, et al. Concurrent cerebral aspergillosis and abdominal mucormycosis during ibrutinib therapy for chronic lymphocytic leukaemia. *Clin Microbiol Infect.* 2019;25(6):771-773. doi:10.1016/j.cmi.2019.01.016
93. Pozo-Laderas JC, Pontes-Moreno A, Robles-Arista JC, et al. [Mixed invasive fungal infection due to *Rhizomucor pusillus* and *Aspergillus niger* in an immunocompetent patient]. *Rev Iberoam Micol.* 2015;32(1):46-50. doi:10.1016/j.riam.2013.03.002
94. Reyes CV, Rippon JW. Localized oxalosis associated with simultaneous *Aspergillus* and *Mucor* infection in diabetic foot gangrene. *Hum Pathol.* 1984;15(1):89-91. doi:10.1016/s0046-8177(84)80337-8
95. Rickerts V, Just-Nübling G, Konrad F, et al. Diagnosis of invasive aspergillosis and mucormycosis in immunocompromised patients by seminested PCR assay of tissue samples. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2006;25(1):8-13. doi:10.1007/s10096-005-0078-7
96. Scheld WM, Royston D, Harding SA, Hess CE, Sande MA. Simultaneous disseminated aspergillosis and zygomycosis in a leukemic patient. *South Med J.* 1979;72(10):1325-1328. doi:10.1097/00007611-197910000-00029
97. Severo LC, Guindani C, Geyer GR. Chronic sinusitis caused by zygomycosis and aspergillosis. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 1989;8(4):317-318. doi:10.1007/bf01963462
98. Sharifipour F, Rezaeetalab F, Naghibi M. Pulmonary fungal infections in kidney transplant recipients: an 8-year study. *Transplant Proc.* 2009;41(5):1654-1656. doi:10.1016/j.transproceed.2009.02.072
99. Srivastava A, Mohpatra M, Mahapatra A. Maxillary Fungal Osteomyelitis: A Review of Literature and Report of a Rare Case. *Ann Maxillofac Surg.* 2019;9(1):168-173. doi:10.4103/ams.ams_218_18
100. Suwan Y, Punyawattanaporn A, Preechawai P. Rhino-orbital fungal infection: two cases report. *J Med Assoc Thai.* 2012;95(5):739-742.
101. Torres-Damas W, Yumpo-Cárdenas D, Mota-Anaya E. [Coinfection of rhinocerebral mucormycosis and sinus aspergillosis]. *Rev Peru Med Exp Salud Publica.* 2015;32(4):813-817.

102. Urs AB, Augustine J, Singh S. Histopathological evaluation of a rare fulminant case of contemporaneous mucormycosis, aspergillosis and actinomycosis. *J Oral Maxillofac Pathol.* 2019;23(1):144-146. doi:10.4103/jomfp.JOMFP_64_19
103. Urs AB, Singh H, Mohanty S, Sharma P. Fungal osteomyelitis of maxillofacial bones: Rare presentation. *J Oral Maxillofac Pathol.* 2016;20(3):546. doi:10.4103/0973-029X.190966
104. Vallaey JH, Praet MM, Roels HJ, Van Marck E, Kaufman L. The Budd-Chiari syndrome caused by a zygomycete. A new pathogenesis of hepatic vein thrombosis. *Arch Pathol Lab Med.* 1989;113(10):1171-1174.
105. van Dam AP, Pruijm MTC, Harinck BIJ, Gelinck LBS, Kuijper EJ. Pneumonia involving *Aspergillus* and *Rhizopus* spp. after a near-drowning incident with subsequent *Nocardia cyriacigeorgici* and *N. farcinica* coinfection as a late complication. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2005;24(1):61-64. doi:10.1007/s10096-004-1263-9
106. Verma A, Williams S, Trifilio S, Zembower T, Mehta J. Successful treatment of concomitant pulmonary zygomycosis and aspergillosis with a combination of amphotericin B lipid complex, caspofungin, and voriconazole in a patient on immunosuppression for chronic graft-versus-host disease. *Bone Marrow Transplant.* 2004;33(10):1065-1066. doi:10.1038/sj.bmt.1704485
107. Vidovic A, Arsic-Arsenijevic V, Tomin D, et al. Proven invasive pulmonary mucormycosis successfully treated with amphotericin B and surgery in patient with acute myeloblastic leukemia: a case report. *J Med Case Rep.* 2013;7:263. doi:10.1186/1752-1947-7-263
108. Virk RS, Arora P. Chronic sinonasal aspergillosis with associated mucormycosis. *Ear Nose Throat J.* 2007;86(1):22.
109. Viscoli C, Dodi F, Pellicci E, et al. *Staphylococcus aureus* bacteraemia, *Absidia corymbifera* infection and probable pulmonary aspergillosis in a recipient of orthotopic liver transplantation for end stage liver disease secondary to hepatitis C. *J Infect.* 1997;34(3):281-283. doi:10.1016/s0163-4453(97)94563-1
110. Vučićević Boras V, Jurlina M, Brailo V, et al. Oral Mucormycosis and Aspergillosis in the Patient with Acute Leukemia. *Acta Stomatol Croat.* 2019;53(3):274-277. doi:10.15644/asc53/3/9
111. Webb BJ, Blair JE, Kusne S, et al. Concurrent pulmonary *Aspergillus fumigatus* and mucor infection in a cardiac transplant recipient: a case report. *Transplant Proc.* 2013;45(2):792-797. doi:10.1016/j.transproceed.2012.03.056
112. Welsch MJ, Moon CM, Elston DM, Vogel P. Invasive synergistic fungal infection after motor vehicle collision. *Cutis.* 2003;71(3):201-204.
113. Weng T-F, Ho M-W, Lin H-C, Lu M-Y, Peng C-T, Wu K-H. Successful treatment of disseminated mixed invasive fungal infection after hematopoietic stem cell transplantation for severe aplastic anemia. *Pediatr Transplant.* 2012;16(2):E35-38. doi:10.1111/j.1399-3046.2010.01406.x
114. Wilson AP, Wright S, Bellingan G. Disseminated fungal infection following falciparum malaria. *J Infect.* 2000;40(2):202-204. doi:10.1053/jinf.2000.0637
115. Zhan HX, Lv Y, Zhang Y, et al. Hepatic and Renal Artery Rupture Due to *Aspergillus* and *Mucor* Mixed Infection After Combined Liver and Kidney Transplantation: A Case Report. *Transplantation Proceedings.* 2008;40(5):1771-1773. doi:10.1016/j.transproceed.2007.10.013

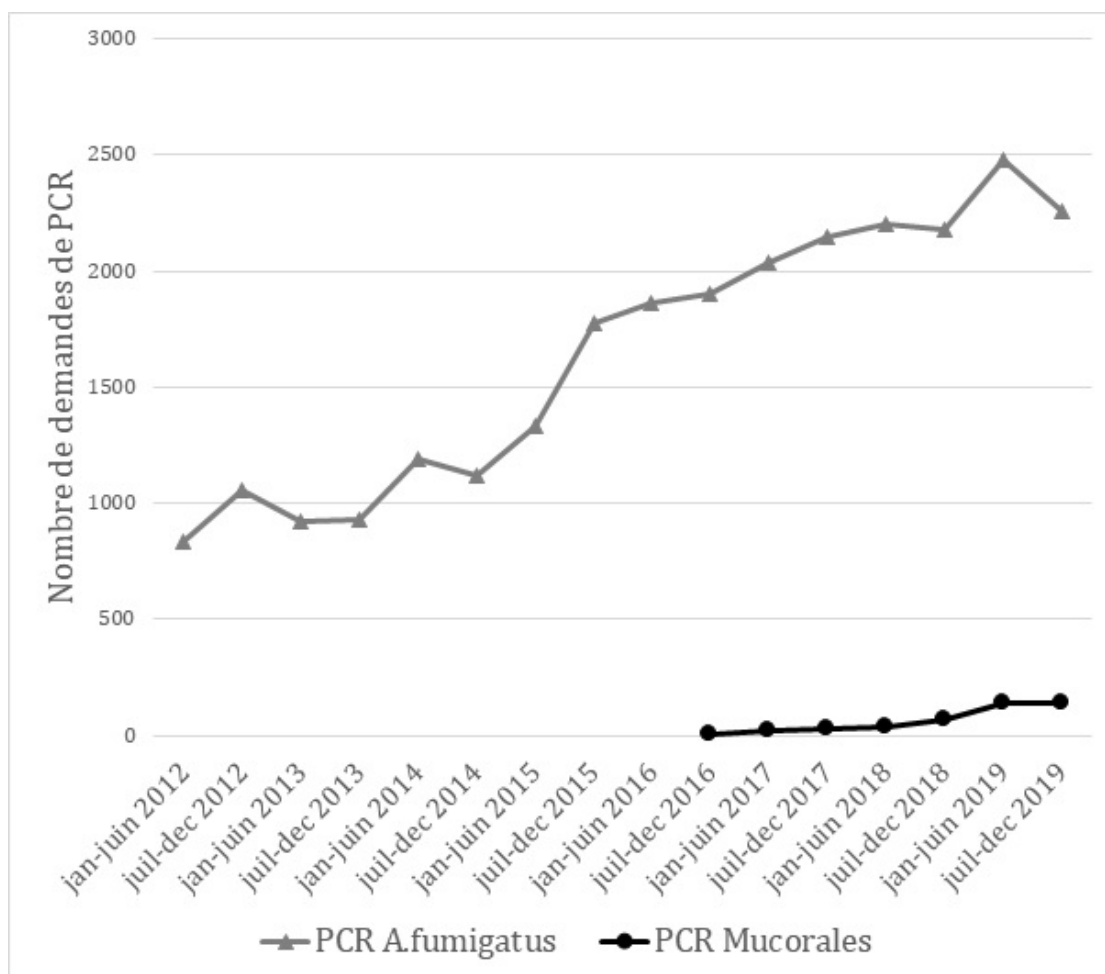
116. Zhang Q, Liu H, Qiu S, et al. A Rare Case of Pulmonary Coinfection by *Lichtheimia ramosa* and *Aspergillus fumigatus* in a Patient With Delayed Graft Function After Renal Transplantation. *Transplant Proc.* 2019;51(2):551-555. doi:10.1016/j.transproceed.2018.12.006
117. Bonfils P, Trotoux J. [Mucormycosis of the face associated with aspergillosis in the diabetic patient. Diagnostic and therapeutic considerations]. *Ann Otolaryngol Chir Cervicofac.* 1989;106(6):327-329.
118. Goswami S, Vohra R, Raju BM, Agarwal A. Concomitant Mucormycosis and Aspergillosis of Rhinocerebral Region in a Renal Transplant Patient - Air Cooler Being the Culprit. *Indian Journal of Medical Case Reports.* 2016;5(1):30-34.
119. Inoue Y, Kobayashi J, Tachibana M, et al. [A case of resected pulmonary mucormycosis that was suspected of mixed infection with *Aspergillus fumigatus*, diagnosed by transbronchial lung biopsy]. *Nihon Kokyuki Gakkai Zasshi.* 2010;48(8):625-631.
120. Lin L, Xue D, Lin T-Y, Wu Y-X, Jiang Y-T, Chen L-M. Pulmonary aspergillosis, mucormycosis, and actinomycosis co-infection presenting as a cavitory lesion in a patient with diabetes. *Chin Med J.* 2019;132(20):2512-2513. doi:10.1097/CM9.0000000000000468
121. Mahomed S, Basanth S, Mlisana K. The successful use of amphotericin B followed by oral posaconazole in a rare case of invasive fungal sinusitis caused by co-infection with mucormycosis and aspergillus. *IDCases.* 2015;2(4):116-117. doi:10.1016/j.idcr.2015.10.001
122. Millon L, Herbrecht R, Grenouillet F, 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.* 2016;22(9):810.e1-810.e8. doi:10.1016/j.cmi.2015.12.006
123. Nebel C, Gersch K, Smith JM, Rodersheimer LR, Friedstrom S. Successful treatment of ascending aortic graft and valve endocarditis after debulking splenectomy for invasive aspergillosis and mucor. *Am Surg.* 2009;75(12):1253-1255.
124. Nagarkar NM, Verma H, Punia RPS. Co-existing Mucormycosis with Aspergillosis in a patient with Diabetes Mellitus- First case report. *Otolaryngology Online Journal.* 2014;4(4).
125. Vaidya D, Shah P. Coinfection by *Aspergillus* and *Zygomycetes* Species in a Case of Acute Rhinosinusitis. *Case Rep Otolaryngol.* 2011;2011. doi:10.1155/2011/382473
126. Zhang D, Wang X, Lv J, Dong Y. Treatment of a patient with severe hemorrhagic fever accompanied by infection with methicillinresistant *Staphylococcus aureus*, *Acinetobacter baumannii*, *aspergillus* and *mucor*: a case report. *Int J Clin Pharmacol Ther.* 2015;53(12):1028-1034. doi:10.5414/CP202395
127. Terada H, Niikura H, Chikamori D, Matsushita S, Okada S. [Chronic myelomonocytic leukemia with aspergillosis and mucormycosis--a case report]. *Nippon Rinsho.* 1984;42(4):921-930.
128. Shashir W, Rupali S, Sujata L, Preeti M. Concomitant Zygomycosis and Aspergillosis of the rhinocerebral region in a post renal transplant patient. *Indian Journal of Transplantation.* 2014;8(1):25-27. doi:10.1016/j.ijt.2013.12.001
129. Klimko NN, Khostelidi SN, Volkova AG, et al. Mucormycosis in haematological patients: case report and results of prospective study in Saint Petersburg, Russia. *Mycoses.* 2014;57 Suppl 3:91-96. doi:10.1111/myc.12247

130. Challier S, Boyer S, Abachin E, Berche P. Development of a Serum-Based Taqman Real-Time PCR Assay for Diagnosis of Invasive Aspergillosis. *J Clin Microbiol.* 2004;42(2):844-846. doi:10.1128/JCM.42.2.844-846.2004
131. Suarez F, Lortholary O, Buland S, 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.* 2008;46(11):3772-3777. doi:10.1128/JCM.01086-08
132. Bellanger A-P, Berceanu A, Rocchi S, et al. Development of a quantitative PCR detecting *Cunninghamella bertholletiae* to help in diagnosing this rare and aggressive mucormycosis. *Bone Marrow Transplant.* 2018;53(9):1180-1183. doi:10.1038/s41409-018-0194-5
133. Millon L, Caillot D, Berceanu A, et al. Prospective evaluation of Mucorales DNA qPCR detection in serum for early diagnosis of mucormycosis : First results from the ModiMucor study. Poster 453 presented at the: Trends In Medical Mycology 9; October 2019; Nice, France.
134. Shigemura T, Nakazawa Y, Matsuda K, Motobayashi M, Saito S, Koike K. Evaluation of Mucorales DNA load in cerebrospinal fluid in a patient with possible cerebral mucormycosis treated with intravenous liposomal amphotericin B. *Int J Infect Dis.* 2014;29:200-202. doi:10.1016/j.ijid.2014.10.019
135. Shigemura T, Nakazawa Y, Matsuda K, et al. Serial monitoring of Mucorales DNA load in serum samples of a patient with disseminated mucormycosis after allogeneic bone marrow transplantation. *Int J Hematol.* 2014;100(2):206-209. doi:10.1007/s12185-014-1597-8
136. Godichaud S, Verrier J, Boisson R, Lagardere G, Flori P. Development of a New Quantitative Real-Time PCR Assay for the Detection and Identification of Aspergillosis and Mucormycosis Infections. Poster 114 presented at the: Trends In Medical Mycology 9; October 2019; Nice, France.

Annexes

Annexe 1. Nombre de demande de PCR *A. fumigatus* et Mucorales reçues entre janvier 2012 et août 2019

Calcul par période de 6 mois (estimation des demandes pour la période septembre à décembre 2019)

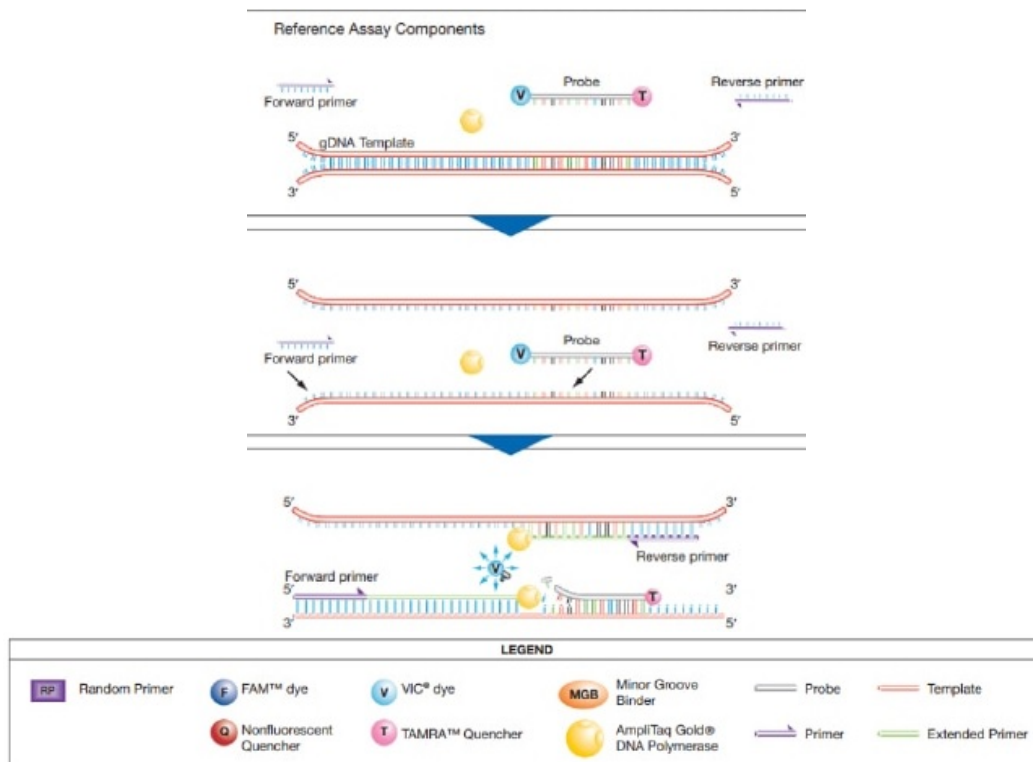


Annexe 2. Principe de la PCR Taqman® en temps réel (document ThermoFisher Scientific)

Chaque puits de réaction contient :

- les paires d'amorces non marquées spécifiques de la cible recherchée
- les sondes TaqMan® marquées par un colorant FAM™ ou VIC™ au niveau de l'extrémité 5' et un extincteur non-fluorescent TAMRA™ au niveau de l'extrémité 3'.

Le schéma ci-dessous illustre le processus de mesure de l'expression génétique TaqMan®.

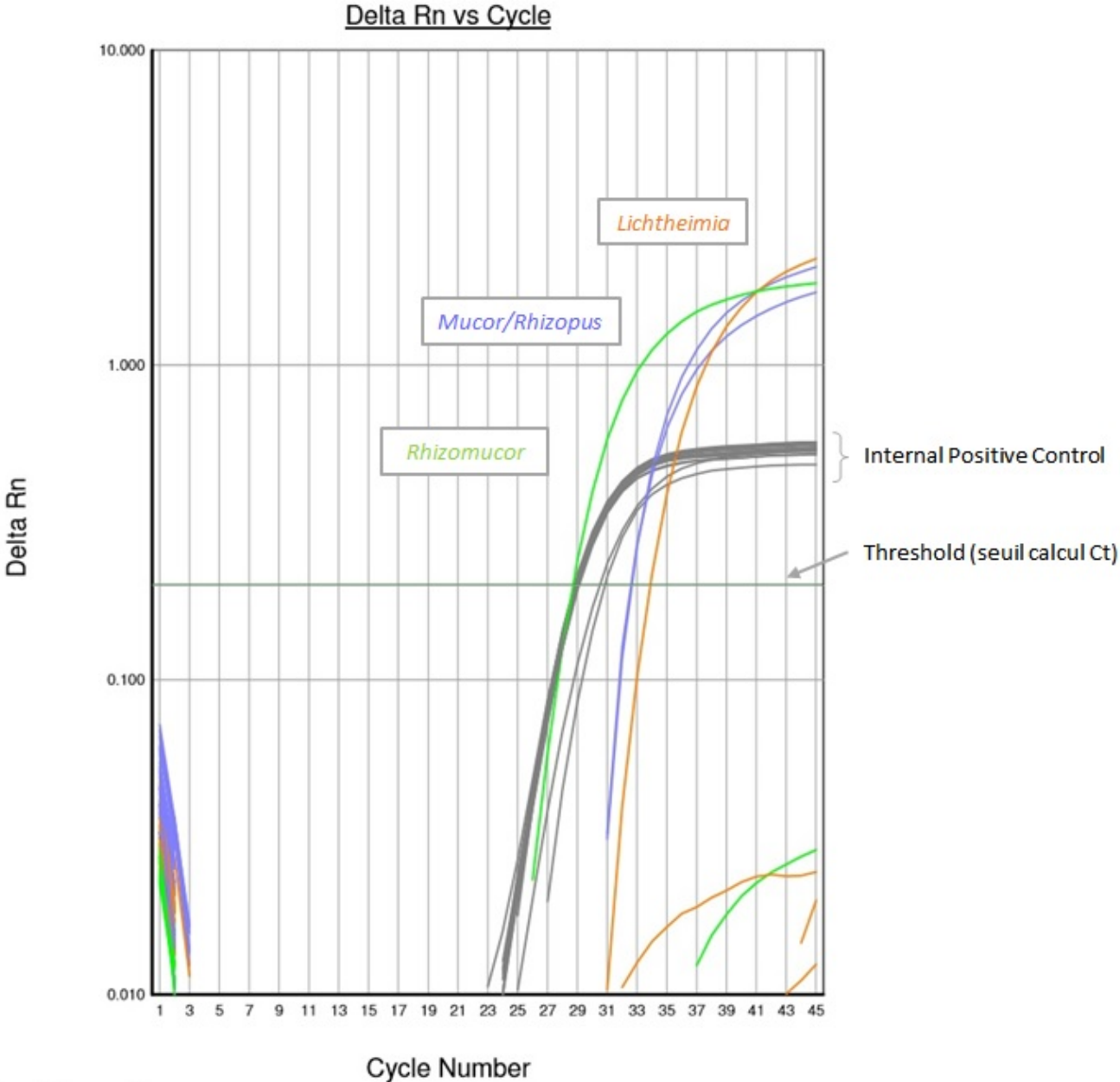


Au début de la PCR en temps réel, la température est augmentée pour dénaturer l'ADNc double brin. Au cours de cette étape, le signal du colorant fluorescent au niveau de l'extrémité 5' de la sonde TaqMan® est éteint par l'extincteur non-fluorescent au niveau de l'extrémité 3'.

1. À l'étape suivante, la température de la réaction est abaissée pour permettre aux amorces et à la sonde de s'hybrider à leurs séquences cibles spécifiques.
2. L'ADN polymérase *Taq* synthétise les nouveaux brins en utilisant les amorces non marquées et la matrice. Lorsque la polymérase atteint une sonde TaqMan, l'activité des endo-nucléases 5' a pour effet de cliver la sonde, en séparant le colorant de l'extincteur.

À chaque cycle de PCR, d'autres molécules du colorant sont libérées, entraînant une augmentation de l'intensité de fluorescence proportionnelle à la quantité d'amplicons synthétisée.

Annexe 3. Résultat de PCR obtenu après analyse par le logiciel Software 7500



Annexe 4. Détails des caractéristiques des patients doubles positifs

*RT : radio de thorax, TDM : tomodensitométrie, IRM : image par résonance magnétique
SDRA : syndrome de détresse respiratoire, GM : antigène galactomannane, ECMO :
oxygénation par membrane extra-corporelle, LLC : leucémie lymphoïde chronique,*

Patient 1

- **Terrain** : Homme, 66ans, transplanté rénal (6ans), cardiomyopathie
- **Histoire récente** : dyspnée fébrile
- **Imagerie** : opacités alvéolo-interstitielles (RT), anomalies parenchymateuses péri-bronchovasculaires (TDM)
- **Aspergillose** : aspergillose invasive probable
- . **LBA** : culture positive (*A. fumigatus*), PCR *A. fumigatus* 1700cp/mL
- . **sérum** : GM positif >8, beta-glucane >500, PCR *A. fumigatus* 1100cp/mL
- **Mucorales : LBA et sérum** : PCR *Mucor/Rhizopus* positive
- **Traitement** : voriconazole, amphotéricine B + 5FC (pour cryptococcose disséminée)
- **Devenir** : Décès à J9 de traitement

Patient 2

- **Terrain** : Homme, 55ans, 3^{ème} greffe hépatique pour cirrhose liée au VHC
- **Histoire récente** : en post-geffe immédiat diagnostic d'une aspergillose pulmonaire invasive traitée par caspofungine. 2 mois plus tard, apparition de céphalées et douleurs lombaires
- **Imagerie** : multiple abcès cérébraux, image suspecte intraventriculaire cardiaque
- **Aspergillose** : aspergillose invasive prouvée
- . **LBA** : PCR *A. fumigatus* 12000cp/mL
- . **sérum** : PCR *A. fumigatus* 4600cp/mL
- . **LCR** : GM 3.7, PCR *A. fumigatus* 3200cp/mL
- **Mucorales : LBA** : PCR *Mucor/Rhizopus* positive
- **Traitement** : voriconazole + caspofungine, chirurgie cardiaque puis voriconazole + amphotéricine B
- **Devenir** : Vivant à J90

Patient 3

- **Terrain** : Homme, 76ans, fibrose pulmonaire et cardiopathie, diagnostic de vascularite granulomateuse avec polyangéite
- **Histoire récente** : pneumopathie bilatérale avec SDRA
- **Imagerie** : verre dépoli, micronodules confluent, petits nodules excavés (TDM)
- **Aspergillose** : aspergillose invasive probable
- . **LBA** : culture positive (*A. fumigatus*), PCR *A. fumigatus* 50cp/mL
- . **Sérum** : PCR *A. fumigatus* 60cp/mL
- **Mucorales : LBA et sérum** : PCR *Mucor/Rhizopus* positive
- **Traitement** : Voriconazole
- **Devenir** : Décès à J5 de traitement

Patient 4

- **Terrain** : Homme, 50ans, transplanté cardiaque (1an)
- **Histoire récente** : pneumopathie
- **Imagerie** : bronchiolo-alvéolite, nodule excavé lobe moyen (TDM)
- **Aspergillose** : aspergillose invasive probable
- . **LBA** : culture positive (*A. fumigatus*), GM positif 2
- . **Sérum** : GM positif 0.8, PCR *A. fumigatus* 10 cp/mL
- **Mucorales : sérum** : PCR *Lichtheimia* positive
- **Traitement** : Voriconazole 6mois
- **Devenir** : Vivant à J90

Patient 5

- **Terrain** : Homme, 63ans, transplanté cardiaque (4mois)
- **Histoire récente** : état de choc sur toux et dyspnée fébrile
- **Imagerie** : condensation lobaire, verre dépoli, nodule, signe du halo (TDM)
- **Aspergillose** : aspergillose invasive probable
- . **LBA** : nombreux filaments mycéliens septés, PCR *A. fumigatus* 10cp/mL
- **Mucorales : LBA** : PCR *Mucor/Rhizopus* et *Lichtheimia* positives
- **Traitement** : voriconazole 3mois
- **Devenir** : Vivant à J90

Patient 6

- **Terrain** : Femme, 59ans, allogreffe de moelle (7ans) pour LLC
- **Histoire récente** : rechute de LLC et syndrome de Richter
- **Imagerie** : nodule (TDM)
- **Aspergillose** : aspergillose invasive probable
- . **LBA** : culture positive (*A. fumigatus*), GM positif 2.7, PCR *A. fumigatus* <10cp/mL
- . **sérum** : GM positif 4.9, PCR *A. fumigatus* 10⁶cp/mL
- **Mucorales : sérum** : PCR *Mucor/Rhizopus* positive
- **Traitement prophylactique** : posaconazole, caspofungine
- **Traitement curatif** : voriconazole puis amphotéricine B puis amphotéricine B + posaconazole puis voriconazole + caspofungine + amphotéricine B
- **Devenir** : Décès à J40 de traitement

Patient 7

- **Terrain** : Homme, 23ans, découverte de granulomatose septique chronique
- **Histoire récente** : SDRA, pose d'ECMO
- **Imagerie** : opacités bilatérales (RT), verre dépoli (TDM)
- **Aspergillose** : aspergillose invasive probable
- . **LBA** : culture positive (*A. fumigatus*), GM positif 1.2, PCR *A. fumigatus* 763cp/mL
- . **Sérum** : GM négatif, PCR *A. fumigatus* 260cp/mL
- **Mucorales : LBA et sérum** : PCR *Rhizomucor* positive
- **Traitement** : voriconazole, relais amphotéricine B + caspofungine
- **Devenir** : Décès à J40 de traitement

Patient 8

- **Terrain** : Homme, 59ans, insuffisance cardiaque terminale
- **Histoire récente** : transplantation cardiaque
- **Imagerie** : non réalisée
- **Aspergillose** : aspergillose invasive probable
- . **LBA** : culture positive (*A. fumigatus*), GM positif 3.5, PCR *A. fumigatus* 1400cp/mL
- **Mucorales : LBA** : PCR *Mucor/Rhizopus* positive
- **Traitement** : aucun
- **Devenir** : Décès à J6 de la greffe

Patient 9

- **Terrain** : Femme, 43ans, cirrhose alcoolique décompensée non suivie
- **Histoire récente** : SDRA à J7 de prise en charge d'une hépatite aiguë alcoolique
- **Imagerie** : syndrome interstitiel (RT)
- **Aspergillose** : aspergillose invasive probable
- . **LBA** : culture positive (*A. fumigatus*), GM positif >6
- . **Sérum** : GM positif >5, PCR *A. fumigatus* 21800cp/mL
- **Mucorales : sérum** : PCR *Rhizomucor* positive
- **Traitement** : voriconazole
- **Devenir** : Décès à J1 de traitement

Patient 10

- **Terrain** : Homme, 71ans, découverte de leucémie aiguë indifférenciée
- **Histoire récente** : sepsis sévère post-chimiothérapie
- **Imagerie** : non réalisée
- **Aspergillose** : aspergillose invasive probable
- . **LBA** : filaments mycéliens à l'examen direct,
- . **sérum** : GM positif 6.5, PCR *A. fumigatus* 860cp/mL
- **Mucorales : sérum** : PCR *Mucor/Rhizopus* positive
- **Traitement** : amphotéricineB (1jour) puis voriconazole
- **Devenir** : Décès J7 de traitement

Patient 11

- **Terrain** : Femme, 61ans, cardiomyopathie
- **Histoire récente** : transplantation cardiaque
- **Imagerie** : nodule pulmonaire (TDM)
- **Aspergillose** : aspergillose invasive probable
- . **Aspiration trachéale** : GM positif 2.7, PCR *A. fumigatus* 15000cp/mL
- . **sérum** : GM positif 0.8
- **Mucorales : Aspiration** : PCR *Mucor/Rhizopus*, *Lichtheimia* et *Rhizomucor* positives
- **Traitement** : voriconazole (4mois)
- **Devenir** :

Patient 12

- **Terrain** : Homme, 68ans, LLC traitée par rituximab
- **Histoire récente** : méningite et vascularite cérébrale
- **Imagerie** : rehaussement méningé
- **Aspergillose** : aspergillose invasive probable
- . **LBA** : GM positif >8, PCR *A. fumigatus* 1300cp/mL
- **Mucorales** : LCR : PCR *Mucor/Rhizopus* positive
- **Traitement** : aucun
- **Devenir** : Décès à J10 de prise en charge

Patient 13

- **Terrain** : Femme, 84ans,
- **Histoire récente** : sinusite chronique
- **Imagerie** : TDM sinus : corps étranger du sinus maxillaire gauche avec calcifications évocatrices d'aspergillome sinusien
- **Aspergillose** : aspergillome sinusien
- . **sinus** : nombreux filaments mycéliens à l'examen direct, PCR *A. fumigatus* positive
- **Mucorales** : sinus : PCR *Lichtheimia* positive
- **Traitement** : chirurgie (méatotomie moyenne gauche)
- **Devenir** : Vivante à J90 de la chirurgie

Patient 14

- **Terrain** : Homme, 29ans, pancolite sous immunosuppresseurs
- **Histoire récente** : choc cardiogénique sur myocardite, SDRA, pose d'ECMO
- **Imagerie** : non réalisée
- **Aspergillose** : non étiquetée
- . **LBA** : GM négatif, PCR *A. fumigatus* 10cp/mL
- **Mucorales** : LBA : PCR *Mucor/Rhizopus* positive
- **Traitement** : aucun (diagnostic post mortem)
- **Devenir** : Décès à J27 d'hospitalisation

Patient 15

- **Terrain** : Femme, 45ans
- **Histoire récente** : chimiothérapie pour découverte de leucémie aiguë myéloïde
- **Imagerie** : pas de foyer pulmonaire (RT)
- **Aspergillose** : non étiquetée
- **sérum** : GM négatif, PCR *A. fumigatus* positive 170cp/mL
- **Mucorales : sérum** : PCR *Mucor/Rhizopus* positive
- **Traitement** : aucun
- **Devenir** : Vivante à J90 de la prise en charge

Patient 16

- **Terrain** : Femme 66ans, aspergillome sinusien opéré
- **Histoire récente** : trouble de la vision (diplopie) récidivant
- **Imagerie** : IRM cérébrale leucopathie sans lésion
- **Aspergillose** : non étiquetée
- **LCR** : PCR *A. fumigatus* 93800cp/mL
- **Mucorales : LCR** : PCR *Lichtheimia* positive
- **Traitement** : non connu
- **Devenir** : perdue de vue

Titre : Infections invasives mixtes à *Aspergillus fumigatus* et Mucorales chez les patients du CHU de La Pitié-Salpêtrière de 2012 à 2019

Résumé

Les infections fongiques invasives (IFI) à moisissures sont dues principalement à *Aspergillus* et à certaines espèces de l'ordre des Mucorales bien que ces dernières soient 5 à 8 fois moins fréquentes. Ces infections sont retrouvées chez des patients immunodéprimés et le diagnostic est parfois difficile avec des signes cliniques peu spécifiques pouvant entraîner un retard au diagnostic. Le traitement d'une mucormycose, différent de celui d'une aspergillose doit être introduit précocement pour réduire le risque de mortalité. Le but de ce travail est de décrire la population, la prise en charge et le devenir des patients ayant présenté une co-infection invasive à *Aspergillus fumigatus* et Mucorales sur une période de 7 ans au sein de l'hôpital de La Pitié-Salpêtrière. Les patients avec une PCR *A. fumigatus* ou Mucorales positive ont été inclus. La recherche par PCR du second champignon a été réalisée sur l'ensemble des prélèvements disponibles. Les informations cliniques des patients avec les deux PCR positives ont été récoltées. Au total, 16 patients d'une cohorte de 284 sont retrouvés positifs pour les deux PCR. Parmi les patients avec une aspergillose invasive prouvée/probable, 8,2% sont positifs en PCR Mucorales. Il s'agit principalement de patients greffés d'organe solide (6/16) ou avec une hémopathie (4/16). Le genre de Mucorales le plus retrouvé est *Mucor/Rhizopus* (10 prélèvements/18). La mortalité globale à trois mois de prise en charge est de 56% (9/16). Il s'agit à notre connaissance de la première étude évaluant les co-infections *A. fumigatus*-Mucorales de l'ensemble d'une population hospitalière.

Mots clés : *Aspergillus*, Mucorales, aspergillose, mucormycose, PCR, infection mixte, onco-hématologie, transplanté d'organe solide

Title : Mixed invasive infections due to *Aspergillus fumigatus* and Mucorales in La Pitié-Salpêtrière hospital between 2012 and 2019

Abstract

Invasive fungal infections (IFI) due to filamentous fungi are mostly caused by *Aspergillus* species but genera of the order Mucorales are also found although these are 5 to 8 times less frequent. These infections involving immunocompromised patients are difficult to diagnose, as clinical signs are unspecific and may lead to delay both diagnosis and the therapy initiation. The treatment, different from that of aspergillosis in the case of a mucormycosis, must be introduced early to reduce patient's mortality. The aim of this work is to describe the population, the treatment and the outcome 3 months after diagnosis of the patients who presented an invasive infection due to *Aspergillus fumigatus* and Mucorales over a period of 7 years in the La Pitié-Salpêtrière hospital, Paris, France. Patients whose samples were tested positive by PCR for *A. fumigatus* or Mucorales were included. PCR to find the second fungus was performed on all available samples. Patient's clinical information with both positive PCRs were collected. A total of 16 patients from a cohort of 284 were found to be positive for both PCRs. Among patients with proven / probable invasive aspergillosis, 8.2% were co-infected with Mucorales. They were mainly receipt of solid organ transplant (6/16) or suffering from hematological disorders (4/16). The most recovered genus of Mucorales was *Mucor/Rhizopus* (10 samples / 18). The overall mortality at three months was 56% (9/16). To our knowledge, this is the first study evaluating *A. fumigatus*-Mucorales co-infections in a French hospital population.

Key words : *Aspergillus*, Mucorales, aspergillosis, mucormycosis, PCR, mixed infection, hematology, solid organ transplant