

Université de Poitiers
Faculté de Médecine et de Pharmacie

ANNÉE 2020

THÈSE
POUR LE DIPLÔME D'ÉTAT
DE DOCTEUR EN PHARMACIE
(Arrêté du 17 juillet 1987)

et

MÉMOIRE
DU DIPLOME D'ÉTUDES SPÉCIALISÉES
DE BIOLOGIE MÉDICALE
(Décret 88-996 du 19 octobre 1988)

Présentée et soutenue publiquement
le 17 décembre 2020 à POITIERS
par Madame ESNAULT DEFFOIS Émilie

PCR *Mucorales* : comparaison des performances d'une technique maison et de deux kits commerciaux

Composition du jury :

Président : Madame le Professeur Christine IMBERT

Membres : Madame le Docteur Alida MINOZA
Monsieur le Docteur Kévin BRUNET

Directeur de thèse : Madame le Docteur Estelle PERRAUD-CATEAU

Université de Poitiers
Faculté de Médecine et de Pharmacie

ANNÉE 2020

THÈSE
POUR LE DIPLÔME D'ÉTAT
DE DOCTEUR EN PHARMACIE
(Arrêté du 17 juillet 1987)

et

MÉMOIRE
DU DIPLOME D'ÉTUDES SPÉCIALISÉES
DE BIOLOGIE MÉDICALE
(Décret 88-996 du 19 octobre 1988)

Présentée et soutenue publiquement
le 17 décembre 2020 à POITIERS
par Madame ESNAULT DEFFOIS Émilie

PCR *Mucorales* : comparaison des performances d'une technique maison et de deux kits commerciaux

Composition du jury :

Président : Madame le Professeur Christine IMBERT

Membres : Madame le Docteur Alida MINOZA
Monsieur le Docteur Kévin BRUNET

Directeur de thèse : Madame le Docteur Estelle PERRAUD-CATEAU



PHARMACIE

Professeurs

- CARATO Pascal, Chimie Thérapeutique
- COUET William, Pharmacie Clinique
- DUPUIS Antoine, Pharmacie Clinique
- FAUCONNEAU Bernard, Toxicologie
- GUILLARD Jérôme, Pharmaco chimie
- IMBERT Christine, Parasitologie
- MARCHAND Sandrine, Pharmacocinétique
- OLIVIER Jean Christophe, Galénique
- PAGE Guylène, Biologie Cellulaire
- RABOUAN Sylvie, Chimie Physique, Chimie Analytique
- RAGOT Stéphanie, Santé Publique
- SARROUILHE Denis, Physiologie
- SEGUIN François, Biophysique, Biomathématiques

Maitres de Conférences

- BARRA Anne, Immunologie-Hématologie
- BARRIER Laurence, Biochimie
- BODET Charles, Bactériologie (HDR)
- BON Delphine, Biophysique
- BRILLAULT Julien, Pharmacologie
- BUYCK Julien, Microbiologie
- CHARVET Caroline, Physiologie
- CHAUZY Alexia, Pharmacologie, pharmacocinétique
- DEBORDE Marie, Sciences Physico-Chimiques
- DELAGE Jacques, Biomathématiques, Biophysique
- FAVOT Laure, Biologie Cellulaire et Moléculaire
- GIRARDOT Marion, pharmacognosie, botanique, biodiversité végétale
- GREGOIRE Nicolas, Pharmacologie (HDR)
- HUSSAIN Didja, Pharmacie Galénique (HDR)
- INGRAND Sabrina, Toxicologie
- MARIVINGT-MOUNIR Cécile Pharmaco chimie

- PAIN Stéphanie, Toxicologie (HDR)
- RIOUX BILAN Agnès, Biochimie
- TEWES Frédéric, Chimie et Pharmaco chimie
- THEVENOT Sarah, Hygiène et Santé publique
- THOREAU Vincent, Biologie Cellulaire
- WAHL Anne, Pharmaco chimie, Produits naturels

AHU

- BINSON Guillaume

PAST - Maître de Conférences Associé

- DELOFFRE Clément, Pharmacien
- ELIOT Guillaume, Pharmacien
- HOUNKANLIN Lydwin, Pharmacien

Professeur 2nd degré

- DEBAIL Didier
- GAY Julie

Poste de Doctorant

- FREYSSIN Aline

Le Doyen,

Année universitaire 2019 - 2020

LISTE DES ENSEIGNANTS DE MEDECINE

Professeurs des Universités-Praticiens Hospitaliers

- BOULETI Claire, cardiologie (**absente jusque début mars 2020**)
- BRIDOUX Frank, néphrologie
- BURUCCO Christophe, bactériologie – virologie
- CHEZE-LE REST Catherine, biophysique et médecine nucléaire
- CHRISTIAENS Luc, cardiologie
- CORBI Pierre, chirurgie thoracique et cardio-vasculaire
- DAHYOT-FIZELIER Claire, anesthésiologie – réanimation
- DEBAENE Bertrand, anesthésiologie réanimation
- DEBIAIS Françoise, rhumatologie
- DROUOT Xavier, physiologie
- DUFOUR Xavier, Oto-Rhino-Laryngologie
- FAURE Jean-Pierre, anatomie
- FRASCA Denis, anesthésiologie-réanimation
- FRITEL Xavier, gynécologie-obstétrique
- GAYET Louis-Etienne, chirurgie orthopédique et traumatologique
- GERVAIS Elisabeth, rhumatologie
- GICQUEL Ludovic, pédopsychiatrie
- GILBERT Brigitte, génétique
- GOMBERT Jean-Marc, immunologie
- GOUJON Jean-Michel, anatomie et cytologie pathologiques
- GUILLEVIN Remy, radiologie et imagerie médicale
- HAUET Thierry, biochimie et biologie moléculaire
- HOUETO Jean-Luc, neurologie
- INGRAND Pierre, biostatistiques, informatique médicale
- ISAMBERT Nicolas, cancérologie
- JAAFARI Nematollah, psychiatrie d'adultes
- JABER Mohamed, cytologie et histologie
- JAYLE Christophe, chirurgie thoracique t cardio-vasculaire
- KARAYAN-TAPON Lucie, cancérologie
- KEMOUN Gilles, médecine physique et de réadaptation (**en détachement**)
- KRAIMPS Jean-Louis, chirurgie générale
- LECLERE Franck, chirurgie plastique, reconstructrice
- LECRON Jean-Claude, biochimie et biologie moléculaire
- LELEU Xavier, hématologie
- LEVARD Guillaume, chirurgie infantile
- LEVEQUE Nicolas, bactériologie-virologie
- LEVEZIEL Nicolas, ophtalmologie
- MACCHI Laurent, hématologie
- MCHEIK Jiad, chirurgie infantile
- MEURICE Jean-Claude, pneumologie
- MIGEOT Virginie, santé publique
- MILLOT Frédéric, pédiatrie, oncologie pédiatrique
- MIMOZ Olivier, anesthésiologie – réanimation
- NEAU Jean-Philippe, neurologie
- ORIOT Denis, pédiatrie
- PACCALIN Marc, gériatrie
- PERAULT Marie-Christine, pharmacologie clinique
- PERDRISOT Rémy, biophysique et médecine nucléaire
- PIERRE Fabrice, gynécologie et obstétrique
- PRIES Pierre, chirurgie orthopédique et traumatologique
- RAMMAERT-PALTRIE Blandine, maladies infectieuses
- RICHER Jean-Pierre, anatomie
- RIGOARD Philippe, neurochirurgie

- ROBERT René, réanimation
- ROBLOT France, maladies infectieuses, maladies tropicales
- ROBLOT Pascal, médecine interne
- RODIER Marie-Hélène, parasitologie et mycologie
- SAULNIER Pierre-Jean, thérapeutique
- SCHNEIDER Fabrice, chirurgie vasculaire
- SILVAIN Christine, hépato-gastro- entérologie
- TASU Jean-Pierre, radiologie et imagerie médicale
- THIERRY Antoine, néphrologie
- THILLE Arnaud, réanimation
- TOUGERON David, gastro-entérologie
- WAGER Michel, neurochirurgie
- XAVIER Jean, pédopsychiatrie

Maitres de Conférences des Universités-Praticiens Hospitaliers

- ALBOUY-LLATY Marion, santé publique
- BEBY-DEFAUX Agnès, bactériologie – virologie
- BEN-BRIK Eric, médecine du travail (**en détachement**)
- BILAN Frédéric, génétique
- BOISSON Matthieu, anesthésiologie-réanimation et médecine péri-opératoire
- BOURMEYSTER Nicolas, biologie cellulaire
- CASTEL Olivier, bactériologie - virologie – hygiène
- CAYSSIALS Emilie, hématologie
- COUDROY Remy, réanimation
- CREMNITER Julie, bactériologie – virologie
- DIAZ Véronique, physiologie
- FROUIN Eric, anatomie et cytologie pathologiques
- GARCIA Magali, bactériologie-virologie
- JAVAUGUE Vincent, néphrologie
- KERFORNE Thomas, anesthésiologie-réanimation et médecine péri-opératoire
- LAFAY Claire, pharmacologie clinique
- MARTIN Mickaël, médecine interne
- PALAZZO Paola, neurologie
- PERRAUD Estelle, parasitologie et mycologie
- SAPANET Michel, médecine légale
- THUILLIER Raphaël, biochimie et biologie moléculaire

Professeur des universités

- PELLERIN Luc, biochimie et biologie moléculaire

Professeur des universités de médecine générale

- BINDER Philippe

Professeurs associés de médecine générale

- BIRAULT François
- FRECHE Bernard
- MIGNOT Stéphanie
- PARTHENAY Pascal
- VALETTE Thierry
- VICTOR-CHAPLET Valérie

Maîtres de Conférences associés de médecine générale

- AUDIER Pascal
- ARCHAMBAULT Pierrick
- BRABANT Yann

Enseignants d'Anglais

- DEBAIL Didier, professeur certifié

Professeurs émérites

- ALLAL Joseph, thérapeutique (08/2020)
- BATAILLE Benoît, neurochirurgie (08/2020)
- CARRETIER Michel, chirurgie générale (08/2021)
- DORE Bertrand, urologie (08/2020)
- GIL Roger, neurologie (08/2020)
- GOMES DA CUNHA José, médecine générale (08/2021)
- GUILHOT-GAUDEFROY François, hématologie et transfusion (08/2020)
- HERPIN Daniel, cardiologie (08/2020)
- KITZIS Alain, biologie cellulaire (16/02/2021)
- MARECHAUD Richard, médecine interne (24/11/2020)
- MAUCO Gérard, biochimie et biologie moléculaire (08/2021)
- RICCO Jean-Baptiste, chirurgie vasculaire (08/2020)
- SENON Jean-Louis, psychiatrie d'adultes (08/2020)
- TOUCHARD Guy, néphrologie (08/2021)

Professeurs et Maîtres de Conférences honoraires

- AGIUS Gérard, bactériologie-virologie
- ALCALAY Michel, rhumatologie
- ARIES Jacques, anesthésiologie-réanimation
- BABIN Michèle, anatomie et cytologie pathologiques
- BABIN Philippe, anatomie et cytologie pathologiques
- BARBIER Jacques, chirurgie générale (ex-émérite)
- BARRIERE Michel, biochimie et biologie moléculaire
- BECQ-GIRAUDON Bertrand, maladies infectieuses, maladies tropicales (ex-émérite)
- BEGON François, biophysique, médecine nucléaire
- BOINOT Catherine, hématologie – transfusion
- BONTOUX Daniel, rhumatologie (ex-émérite)
- BURIN Pierre, histologie
- CASTETS Monique, bactériologie -virologie – hygiène
- CAVELLIER Jean-François, biophysique et médecine nucléaire
- CHANSIGAUD Jean-Pierre, biologie du développement et de la reproduction
- CLARAC Jean-Pierre, chirurgie orthopédique
- DABAN Alain, oncologie radiothérapie (ex-émérite)
- DAGREGORIO Guy, chirurgie plastique et reconstructrice
- DESMAREST Marie-Cécile, hématologie
- DEMANGE Jean, cardiologie et maladies vasculaires
- EUGENE Michel, physiologie (ex-émérite)
- FAUCHERE Jean-Louis, bactériologie-virologie (ex-émérite)
- FONTANEL Jean-Pierre, Oto-Rhino Laryngologie (ex-émérite)
- GRIGNON Bernadette, bactériologie
- GUILLARD Olivier, biochimie et biologie moléculaire
- GUILLET Gérard, dermatologie
- JACQUEMIN Jean-Louis, parasitologie et mycologie médicale
- KAMINA Pierre, anatomie (ex-émérite)
- KLOSSEK Jean-Michel, Oto-Rhino-Laryngologie
- LAPIERRE Françoise, neurochirurgie (ex-émérite)
- LARSEN Christian-Jacques, biochimie et biologie moléculaire
- LEVILLAIN Pierre, anatomie et cytologie pathologiques
- MAIN de BOISSIERE Alain, pédiatrie
- MARCELLI Daniel, pédopsychiatrie (ex-émérite)
- MARILLAUD Albert, physiologie
- MENU Paul, chirurgie thoracique et cardio-vasculaire (ex-émérite)
- MORICHAU-BEAUCHANT Michel, hépato-gastro-entérologie
- MORIN Michel, radiologie, imagerie médicale
- PAQUEREAU Joël, physiologie
- POINTREAU Philippe, biochimie
- POURRAT Olivier, médecine interne (ex-émérite)
- REISS Daniel, biochimie
- RIDEAU Yves, anatomie
- SULTAN Yvette, hématologie et transfusion
- TALLINEAU Claude, biochimie et biologie moléculaire
- TANZER Joseph, hématologie et transfusion (ex-émérite)
- TOURANI Jean-Marc, oncologie
- VANDERMARCO Guy, radiologie et imagerie médicale

Remerciements

A Madame le Professeur Christine Imbert, merci de me faire l'honneur de présider ce jury. Veuillez trouver ici l'expression de mon profond respect.

A Madame le Docteur Estelle Perraud-Cateau, merci de m'avoir proposé ce travail concret, qui m'a beaucoup appris autant techniquement que théoriquement et qui me servira à l'avenir. Merci infiniment pour ta disponibilité (même depuis Tours !), ta bonne humeur et la bienveillance avec laquelle tu m'as toujours accueillie dans ton bureau en toutes circonstances. Enfin, merci pour tes précieux conseils tout au long de ce travail et pour tes relectures attentives.

A Madame le Docteur Alida Minoza, merci de t'être toujours rendue disponible, chaque fois que j'ai eu besoin de conseils expérimentés, et d'avoir participé quotidiennement à ma formation en parasitologie mycologie.

A Monsieur le Docteur Kévin Brunet, merci de m'avoir fait partager ton enthousiasme pour la Parasitologie-mycologie. Merci pour le temps passé à me former au b.a.-ba de la validation en biologie moléculaire, à la fabrication d'un « drapeau », et tout le reste. Le cours sur « L'essentiel pour être un bon biologiste en mycologie-parasitologie » restera toujours à portée de main. Merci pour le soutien que tu m'as apporté, et la loyauté dont tu as toujours fait preuve.

A tous ceux qui m'ont apporté leur aide,

Vincent, j'ai apprécié de partager ce sujet avec toi, autant scientifiquement que techniquement. Je te souhaite le meilleur pour la suite de ton aventure en Parasitologie-mycologie. Tu le mérites !

Les techniciennes de MMS et particulièrement : **Christelle, Isabelle, Camille, Marie-O**. Vous avez toutes contribué d'une manière ou d'une autre à ce projet, aujourd'hui devenu concret. Merci pour tout ce que vous m'avez appris, pour votre bonne humeur et pour le temps passé.

A ceux que j'ai rencontrés durant ces études,

Allan, tu es là depuis le jour 1 à la faculté de Pharmacie. Je suis reconnaissante (au destin ! comme tu dis souvent ...) d'avoir pu partager autant d'étapes importantes de nos vies durant ces huit années, et sans jamais un mot plus haut que l'autre. Merci de m'avoir appris à être plus philosophe (il y a encore du travail !), plus « en retard » aussi... « mais on ne travaille efficacement que sous pression », merci pour tous ces plannings de révisions intenable (que nous n'avons jamais réussi à respecter !). Merci de m'avoir écouté râler, protester, être mauvaise perdante, sans jamais t'agacer. Merci pour tous ces beaux moments de vie partagés et pour ton amitié sans faille.

Claire, Agathe, Erwan, Charles, Charline, Allan, à nos nombreuses parties de tarot, à notre complicité, nos rires, et aux années passées ensemble en toutes circonstances ! Malgré mes nombreuses absences téléphoniques ... sachez que je pense souvent à vous, et que je me fais la promesse de vous rappeler bientôt !

A mes co-internes de biologie médicale, et plus particulièrement : Emeline, Valentin, Vincent, Nanou, Clémence, Florent, Marine, Laura R, Le Sim', Laura C, Simon B., Andy, et Allan. Merci pour votre complicité, vos rires, et ces innombrables parties de billard bien sûr.

Aux biologistes du CHU de Poitiers qui se sont impliqués dans la formation des internes au quotidien, pour que l'on devienne grands et autonome à notre tour ... merci !

A mes amis de longue date ! **Justine** et **Pierre**. Merci d'être toujours présents à mes côtés, depuis le lycée et le collège. Merci pour vos rires, votre bonne humeur, vos encouragements, et votre présence tout simplement.

A ma famille,

Mon mari, **David**. Merci pour ton amour, ton soutien, ta patience et ta bienveillance durant ces dix dernières années. Merci d'être là chaque jour, tu me donnes force et confiance au quotidien.

Mes parents, pour le soutien que vous m'avez apporté depuis toujours, tout en me laissant libre de mes choix. Merci de m'avoir donné le goût du travail et de l'exigence envers moi-même. Merci d'avoir toujours cru en moi. Pour tout l'amour que nous me portez, merci.

Mes nombreux **cousins** et **petits cousins**, mes **oncles** et **tantes**, qui s'intéressent régulièrement à mon travail, ... encore plus en ces temps d'épidémie ! Je n'ai même plus besoin de vous expliquer ce qu'est une PCR ! Merci pour tous les moments partagés en famille, c'est chaque fois une grande joie.

Ma belle-famille, particulièrement Claudine, qui a toujours porté de l'intérêt à comprendre en quoi consistait ces études. Je suis heureuse de faire partie des vôtres.

A **mes grands-parents**, Jean, Solange, Raymond et Marie-Henriette. Mamie-Yette, je sais à quel point tu aurais été fière de moi.

A ma bonne étoile ...

Sommaire

Résumé.....	6
Introduction.....	7
Matériel et méthode	11
Souches de <i>Mucorales</i>	11
Echantillons de patients	11
Extraction	12
PCR maison.....	12
PCR multiplexe Fungiplex®	13
Kit PCR MucorGenius®	13
Résultats et discussion	15
Conclusion	21
Références.....	22
Annexes	25
Tableaux	32

Liste des abréviations

ADN : acide désoxyribonucléique

AP-HP : L'assistance publique – Hôpitaux de Paris

API : aspergillose pulmonaire invasive

CE-IVD : conformité européenne - in vitro diagnostic

CHU : centre hospitalier universitaire

CQI : contrôle de qualité interne

Ct : cycle threshold (cycle seuil ou cycle de quantification)

GRP78 : Glucose regulated protein 78

IFI : infection fongique invasive

IRM : imagerie par résonance magnétique

LAL : leucémie aiguë lymphoblastique

LAM : leucémie aiguë myéloblastique

LBA : liquide broncho-alvéolaire

LLC : leucémie lymphoïde chronique

LMMC : leucémie myélo-monocytaire chronique

NA : non applicable

NE : non effectué

PCR : polymerase chain reaction

RUO : research use only

SARS-CoV-2 : severe acute respiratory syndrome coronavirus 2

SMD : syndrome myélodysplasique

Résumé

Introduction

Les mucormycoses sont des pathologies difficiles à diagnostiquer. Le taux de mortalité est élevé, et une prise en charge précoce est essentielle pour améliorer les chances de survie. Récemment, différentes méthodes PCR permettant de détecter l'ADN des *Mucorales* ont été développées. L'objectif de cette étude est d'évaluer les performances de deux kits de PCR multiplexe : Fungiplex® *Mucorales* (Bruker) et MucorGenius® (PathoNostics) et de les comparer aux performances de la PCR *Mucorales* maison actuellement en place au CHU de Poitiers.

Méthode

Afin d'évaluer les performances des deux kits de PCR *Mucorales* multiplexées, 25 échantillons identiques provenant de patients immunodéprimés à risque d'infection fongique invasive ont été testés de manière rétrospective. Dix-sept échantillons de LBA, sérum ou biopsie étaient connus avec une PCR *Mucorales* positive. Les huit autres étaient positifs à d'autres champignons filamenteux, levures ou bactéries. Les résultats ont été comparés à ceux obtenus avec la technique de PCR maison actuellement utilisée au CHU de Poitiers.

Résultats

Les tests PCR réalisés avec les kits Fungiplex® *Mucorales* et MucorGenius® étaient positifs pour 10/17 et 14/17 échantillons respectivement. Les kits Fungiplex® *Mucorales* et MucorGenius® montrent ainsi sur ces échantillons une sensibilité respective de 58,8% et 82,4%, et une spécificité identique de 100% par rapport à la PCR maison.

Conclusion

Le kit MucorGenius® obtient des performances comparables à la technique de PCR maison, satisfaisantes pour contribuer au diagnostic des mucormycoses. En revanche, le kit Fungiplex® *Mucorales* souffre d'un manque de sensibilité.

Introduction

Les mucormycoses sont des infections fongiques invasives (IFI) causées par des champignons cosmopolites appartenant à l'ordre des *Mucorales* (1). Les genres les plus fréquemment retrouvés en pathologie humaine sont *Rhizopus*, *Lichtheimia*, *Rhizomucor*, *Mucor*, mais les genres *Cunninghamella*, *Saksenaea*, *Cokeromyces*, *Apophysomyces* et *Syncephalastrum*, plus rares, sont aussi pathogènes pour l'Homme (2). *Rhizopus arrhizus* représente 15,8% des cas de mucormycoses dans le monde, ce qui en fait l'espèce la plus fréquemment isolée (3).

Les mucormycoses surviennent le plus souvent sur un terrain d'immunodépression : hémopathie maligne, allogreffes de cellules souches, transplantation d'organe solide, diabète (4). La répartition des différentes espèces de *Mucorales* varie beaucoup en fonction du terrain ayant favorisé l'infection. Il a été démontré que les patients hyperglycémiques surexprimaient le récepteur GRP78 qui favorise l'envahissement de l'endothélium vasculaire par *Rhizopus arrhizus* (*R. oryzae*), expliquant ainsi la prédisposition de la population diabétique aux mucormycoses (5). Elles peuvent aussi parfois être consécutives à un traumatisme cutané ou à des brûlures étendues (6). En France en 2018, le premier facteur de risque de mucormycose est l'hémopathie maligne (63,5% des cas), suivi des traumatismes/brûlures, du diabète et de la transplantation d'organe solide ; soit respectivement 13,1%, 9,2% et 7,7% des cas (7).

La contamination a lieu par inhalation de spores ou par inoculation sur une brèche cutanée. Il existe différentes formes de mucormycoses : pulmonaires, rhino-orbito-cérébrales, cutanées ou disséminées principalement, et plus rarement, des endocardites, des infections gastro-intestinales, osseuses ou articulaires (8). La localisation de l'infection est étroitement liée au terrain du patient. Les formes rhino-orbito-cérébrales concernent majoritairement les patients diabétiques tandis que les formes pulmonaires touchent essentiellement les patients atteints d'hémopathies malignes (9).

La mucormycose est une maladie angio-invasive. Elle entraîne une thrombose des vaisseaux, un infarctus puis une nécrose tissulaire rapidement extensive empêchant l'afflux de leucocytes et d'agents antifongiques sur le site de l'infection (10).

Le taux d'incidence de cette infection a augmenté au cours des dernières décennies (11,12). L'augmentation des cas de diabète et le nombre croissant de patients sous chimiothérapies et sous immunosuppresseurs a en effet majoré la population à risque de mucormycoses (13).

La suspicion d'IFI repose initialement sur un ensemble de critères cliniques et radiologiques (14). Néanmoins, ces critères étant non spécifiques, il est très difficile de différencier la mucormycose d'une autre IFI, notamment de l'aspergillose pulmonaire invasive (API) très majoritaire en France chez les patients à risque d'IFI (15,16). La présentation clinique des mucormycoses est diverse, ce qui s'explique par la grande variété de facteurs favorisants, d'espèces de *Mucorales* et de sites potentiels d'infection. Le diagnostic de ces infections repose sur un faisceau d'arguments : le contexte clinique, une imagerie appropriée (scanner du thorax ou des sinus, imagerie par résonance magnétique (IRM) cérébrale), l'examen histologique d'une biopsie, l'examen direct en microscopie, la culture, ainsi que la PCR (polymerase chain reaction) sur liquides biologiques et sur biopsie, très prometteuse mais encore peu standardisée (17). Un diagnostic précoce est primordial pour améliorer les chances de survie du patient car le traitement de la mucormycose diffère de celui des autres IFI (18). Le retard de l'initiation d'un traitement antifongique adapté est associé à une mortalité accrue chez les patients d'hématologie (19).

Le traitement repose sur la chirurgie lorsque cela est envisageable, un traitement antifongique agressif, et si possible, la correction des facteurs favorisants (17,18). Les recommandations pour le traitement de la mucormycose approuvent actuellement en première intention l'utilisation de l'amphotéricine B liposomale à haute dose (5 à 10 mg/kg/j) (20,21), et l'utilisation de l'isavuconazole (22) ou du posaconazole (23) en traitement de sauvetage. Il a

par ailleurs été démontré chez la souris et la drosophile que le voriconazole, régulièrement utilisé en traitement probabiliste d'une IFI, notamment l'API, augmentait la virulence des souches de *Mucorales* et diminuait la survie chez les deux modèles utilisés (24). Parmi les IFI, les mucormycoses possèdent le taux de mortalité le plus élevé. Il varie de 32% à 70% selon les études (8) et est fortement impacté par la localisation de l'infection (5,25). Il atteint 46%, 76% et 100% respectivement dans les formes rhino-orbito-cérébrales, pulmonaires et disséminées (25). Dans 20% des cas, une co-infection, le plus souvent avec *Aspergillus fumigatus* a été retrouvée (7).

Parmi les marqueurs biologiques habituellement utilisés pour le diagnostic des IFI, l'antigène galactomannane spécifique d'*Aspergillus*, et le beta 1,3-D glucane détecté lors d'infections par *Pneumocystis*, *Aspergillus*, *Candida*, etc., ne permettent pas la détection des *Mucorales*. *Candida* est aussi plus facilement isolé en culture que les autres agents d'IFI (26). Concernant les *Mucorales*, aucun de ces marqueurs biologiques ne permet leur détection. La culture et l'analyse anatomopathologique de tissus, bien qu'établis comme diagnostic de certitude selon les critères EORTC-MSG (14), restent insuffisamment sensibles (27), et nécessitent un prélèvement invasif et un délai pour la culture.

Dans ce contexte, une PCR spécifique des *Mucorales* pourrait permettre un diagnostic fiable, précoce et rapide sur des prélèvements sanguins, respiratoires ou tissulaires. Plusieurs études ont déjà évalué différentes PCR maison sur des prélèvements le plus souvent sanguins. Elles mettent en évidence un gain non négligeable sur le délai diagnostique de l'infection par rapport à l'imagerie et à la culture, respectivement +2 et +9 jours (28–32). La sensibilité des PCR *Mucorales* sur LBA ou sur sérum est généralement proche de 90% (2,32-33). Néanmoins ces PCR « maison » ne permettent pas une large utilisation. Elles nécessitent une combinaison de trois tests PCR distincts sur chaque échantillon afin de détecter les principaux genres

responsables de mucormycoses que sont *Lichtheimia* spp., *Rhizopus-Mucor* spp., et *Rhizomucor* spp.

Des kits de PCR en temps réel multiplexés sont nouvellement commercialisés et pourraient permettre de répondre à cet objectif plus aisément. Nous avons choisi d'en évaluer deux d'entre eux : Fungiplex® RUO (Bruker, Bremen, Allemagne) et MucorGenius® certifié CE-IVD (PN-700, PathoNostics, Maastricht, Pays-Bas). Ils détectent respectivement neuf et cinq genres de *Mucorales* différents parmi les plus fréquemment retrouvés en ne réalisant qu'un seul test PCR, simplifiant et diminuant ainsi le temps nécessaire à la réalisation.

Les deux objectifs de ce travail sont : (I) évaluer la sensibilité et la spécificité des kits de PCR Fungiplex® et MucorGenius® pour la détection des différents genres de *Mucorales* retrouvés en pathologie humaine sur échantillons respiratoires et sanguins, (II) comparer la technique de PCR maison en production au CHU de Poitiers (28,33) aux PCR commerciales.

Matériel et méthode

Souches de *Mucorales*

Cinq souches de *Mucorales* : *R. arrhizus*, *Rhizomucor pusillus*, *Mucor circinelloides*, *Lichtheimia corymbifera* et *Lichtheimia ramosa*, obtenues en culture à partir des prélèvements humains ont été utilisées pour les tests PCR. Elles ont été cultivées sur un milieu Sabouraud à 27°C pendant 72h. Pour chaque souche, des suspensions de 10⁶ spores/mL ont été réalisées en sérum physiologique et ont permis de fabriquer des témoins positifs pour la PCR *Mucorales* maison ainsi qu'un contrôle interne de qualité (CQI) pour l'ensemble des PCR.

Echantillons de patients

Neuf patients atteints de mucormycoses entre 2017 et 2020 au CHU de Poitiers ont été inclus dans cette étude. Dix-sept échantillons, tous issus de la collection interne du laboratoire de Parasitologie – mycologie du CHU de Poitiers, positifs en PCR *Mucorales* au laboratoire de l'Hôpital Saint-Louis (AP-PH) et/ou au CHU de Poitiers, ont été sélectionnés. Les dix-sept échantillons comprennent onze échantillons de sérum provenant de neuf patients différents, cinq LBA provenant de cinq patients différents et une biopsie cutanée (jambe). Le tableau 1 (en annexe) décrit les caractéristiques cliniques et résultats microbiologiques des patients inclus dans ce travail. Ces échantillons ont été testés sur les kits commerciaux de PCR Fungiplex® *Mucorales* et MucorGenius®.

Huit échantillons issus de huit patients différents, tous négatifs en PCR *Mucorales* (CHU de Poitiers et/ou Hôpital Saint-Louis) mais positifs à d'autres agents infectieux ont été sélectionnés. Parmi ces patients, trois avaient une hémopathie maligne : une LAL T, une LLC, une LAM ; un avait une maladie de Crohn traitée par immunosuppresseurs ; le dernier avait une infection à SARS-CoV-2. Sur les huit échantillons, six sont des LBA et deux sont des sérums. Concernant les échantillons de LBA : une pneumocystose, une pneumopathie à *S. aureus*, une API, un aspergillome, une mucormycose possible (scanner évocateur mais prélèvements

mycologiques négatifs) et une mucormycose prouvée (patient n°9, tableau 1) ont été diagnostiqués. Les deux sérums étaient positifs à *Aspergillus fumigatus* en PCR. Ces échantillons négatifs ont servi à la fois de témoins pour les tests de contamination et les tests de spécificité.

Les différents échantillons respiratoires et sanguins étaient congelés à -20°C.

Extraction

Les mêmes extraits ont été utilisés pour réaliser la PCR maison et les PCR des deux kits commerciaux. Un aliquot de 500 µL de chaque échantillon respiratoire et sanguin a d'abord subi un broyage mécanique. La biopsie a été broyée en suivant le même protocole, dans 400 µL de tampon de lyse. Puis 400 µL de l'échantillon broyé ont été transférés dans 2 mL de tampon de lyse NucliSENS® easyMAG® (BioMérieux, Marcy-L'Etoile, France). A chaque échantillon a été ajouté 10 µL de contrôle interne IC2 de la trousse DICO Extra r-gene (ARGENE). L'ADN a été extrait de manière automatisée (purification et concentration) sur l'automate NucliSENS® easyMAG® (BioMérieux) selon le protocole Specific B.

PCR maison

La détection d'ADN de *Mucorales* par la PCR maison réalisée au CHU de Poitiers nécessite une association de quatre tests PCR. Un test vérifiant l'extraction et l'amplification en détectant le contrôle interne IC2 et les trois autres permettant la détection des genres les plus fréquemment rencontrés en France : *Rhizomucor* spp., *Rhizopus-Mucor* spp. et *Lichtheimia* spp. Chaque PCR nécessite 10 µL d'extrait ADN et 15 µL de mastermix dont la composition est détaillée dans le tableau 2.

L'amorce forward (F) est commune aux trois PCR *Mucorales*, en revanche, trois jeux différents d'amorces reverse (R) et de sondes, décrites dans le tableau 3, sont utilisés pour détecter et différencier les genres. L'amplification est réalisée sur ABI® 7500 Real-Time PCR (Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific, Inc.) en suivant les conditions thermiques décrites dans

le tableau 4. Les résultats de PCR sont exprimés en cycle de quantification (Ct). Cette valeur correspond au cycle d'amplification à partir duquel la fluorescence de l'échantillon est significativement supérieure à celle du bruit de fond. La PCR maison est considérée positive pour tout échantillon avec un Ct < 45. Tout échantillon négatif pour les trois PCR *Mucorales* doit avoir un IC2 détectable pour être rendu négatif. Pour le contrôle négatif, 10 µL d'eau DNase free pour PCR sont utilisés.

PCR multiplexe Fungiplex®

Le test PCR Fungiplex® *Mucorales* nécessite 15 µL de mastermix fourni dans le kit (dont la composition est décrite dans le tableau 5), auxquels sont ajoutés 5 µL d'extrait d'ADN. Un contrôle d'inhibition inclus dans le kit a été intégré au mastermix (1 µL/échantillon). Les réactions de PCR sont réalisées sur CFX96 Touch Real-Time PCR (Bio-Rad, Marnes-la-Coquette, France) et suivent les conditions thermiques décrites dans le tableau 6. Tous les échantillons détectables, sont considérés positifs. La détection des différentes espèces de *Mucorales* et du contrôle d'inhibition est répartie en quatre canaux utilisant chacun des fluorochromes différents, décrits dans le tableau 7.

Les contrôles positifs et négatifs sont inclus dans le kit. Le contrôle positif doit être détectable dans les canaux 2, 3 et 4 pour être valide. Le contrôle négatif doit être positif uniquement en FAM (canal 1).

Le contrôle d'inhibition doit être positif en FAM pour valider le contrôle négatif ainsi que tout échantillon négatif en VIC, ROX et Cy5. Il est considéré positif pour tout Ct détectable et > 10.

Kit PCR MucorGenius®

La PCR MucorGenius® nécessite 5 µL d'extrait d'ADN ajoutés à 20 µL de mix contenant les amorces spécifiques de *Mucorales*, et l'ensemble des éléments nécessaires à la réaction de PCR décrits dans le tableau 8. Ce kit permet de cibler à la fois *Mucor spp.*, *Rhizopus spp.*,

Rhizomucor spp., *Lichtheimia* spp. et *Cunninghamella* spp. La détection des différentes espèces de *Mucorales* se fait sur un seul canal. Tous les échantillons avec un Ct < 40 sont considérés positifs. La réaction de PCR est réalisée sur CFX96 Touch Real-Time PCR et suit les conditions thermiques décrites dans le tableau 9.

Le contrôle positif est fourni et doit avoir une valeur de Ct comprise entre 25,0 et 29,0 pour être valide. Le contrôle négatif doit être indétectable.

Le contrôle interne fourni avec le kit et ajouté à l'échantillon lors de l'extraction, doit avoir une valeur de Ct comprise entre 30,0 et 36,0 pour valider la PCR de tout échantillon négatif pour *Mucorales* spp. Dans notre cas, les échantillons étant déjà extraits, nous n'avons pas pu l'utiliser.

Résultats et discussion

Les résultats des PCR réalisées avec les kits Fungiplex® *Mucorales* et MucorGenius® sont présentés dans le tableau 10.

Les huit échantillons connus négatifs sont également négatifs avec les PCR Fungiplex® *Mucorales* et MucorGenius® soit une spécificité de 100% pour ces deux kits commerciaux. Parmi ces échantillons, six étaient connus positifs à d'autres agents infectieux fongiques ou bactériens. Aucune réactivité croisée avec ces agents infectieux (qui auraient pu être responsables de résultats faussement positifs), n'a été mise en évidence avec ces deux kits de PCR *Mucorales*.

Sur les dix-sept échantillons rendus positifs par le CHU de Poitiers (technique maison) et/ou à l'Hôpital Saint-Louis (AP-HP), la PCR Fungiplex® *Mucorales* en a seulement détecté dix (tableau 11). Les échantillons 17, 20, 21, 22 et 23 ont une PCR négative tandis que les échantillons 34 et 36 une PCR invalide (tableau 10).

L'échantillon 20 – initialement invalide puisque le témoin d'inhibition était négatif – a été repassé dans une deuxième série. Le témoin d'inhibition est sorti correctement la seconde fois (Ct = 35,5) permettant de considérer la PCR négative. Les échantillons 20 et 21, tous les deux négatifs, sont issus du même patient. Leur plus faible charge en ADN fongique par rapport aux autres échantillons (Ct = 38,96 et 39,07 respectivement avec la PCR maison) pourrait être l'explication de ces résultats négatifs.

Les échantillons 17, 22 et 23 représentaient l'ensemble des échantillons connus positifs à *Lichtheimia* spp. Ces échantillons n'étant pas connus comme faiblement positifs en PCR maison, un manque de sensibilité du kit Fungiplex® *Mucorales* semble être l'explication la plus probable à ces résultats négatifs. Un test PCR préliminaire réalisé avec une suspension

constituée à partir d'une souche de *Lichtheimia ramosa* à 10^6 spores/mL et correctement détectée sur la PCR maison du CHU de Poitiers n'était pas non plus détectée avec le kit Fungiplex® *Mucorales* malgré une PCR en *triplicate*. Seul le CQI contenant une solution à 10^6 spores/mL de *L. corymbifera* a été détecté positivement avec des Ct à 22,03 et 22,32 qui sont comparables aux valeurs rendues par la PCR du CHU de Poitiers (Ct = 21,70 en moyenne). La PCR Fungiplex® *Mucorales* est pourtant décrite comme capable de détecter l'ensemble des espèces de *Lichtheimia* (tableau 7).

Les échantillons 34 et 36 ont une PCR invalide car le témoin d'inhibition est négatif. Le manque de réactif n'a pas permis de les tester une seconde fois avec ce kit. La bonne extraction de ces échantillons a été vérifiée par l'amplification de l'IC2.

La détection réalisée avec le kit MucorGenius® est positive pour quatorze échantillons sur dix-sept (tableau 11). Les trois échantillons négatifs sont les 20, 34 et 36 (tableau 10).

L'échantillon 20 a été détecté tardivement (Ct = 43,26), et doit être considéré négatif selon les règles d'interprétation MucorGenius®. Pour autant on note bien la présence d'ADN de *Mucorales* dans l'échantillon.

Les échantillons 34 et 36, issus du même patient à cinq jours d'intervalle, n'ont été détectés avec aucun des deux kits commerciaux. Il s'agissait d'échantillons prélevés respectivement quatre et neuf jours après la mise en route d'un traitement probabiliste par Amphotéricine B liposomale (3 mg/kg/j). Le premier échantillon de sérum connu positif pour ce patient (non testé dans notre étude), a été prélevé au CHU de Tours trois jours après le début du traitement, et envoyé au CHU de Nantes pour la PCR *Mucorales*. Cet échantillon ayant contribué au diagnostic était plus fortement positif avec un Ct à 35,0 pour *Rhizopus-Mucor*. Les échantillons 34 et 36 ont été réalisés dans le cadre du suivi de l'efficacité du traitement, ce qui explique leur plus faible positivité. L'échantillon 36 était connu avec une PCR maison

très faiblement positive (Ct = 41,34). La probabilité qu'une telle quantité d'ADN ne soit pas détectée à chaque fois est donc statistiquement élevée. Cette hypothèse a d'ailleurs été vérifiée lors de la réalisation d'une seconde PCR maison pour valider l'extraction : l'échantillon était négatif pour les trois PCR *Mucorales* et le témoin d'extraction/amplification IC2 sortait positivement. Cet échantillon était aussi non détecté par la PCR de l'Hôpital Saint-Louis. Le défaut de détection des échantillons 34 et 36, tant avec MucorGenius® qu'avec Fungiplex® *Mucorales* n'est pas lié à l'espèce en cause de l'infection chez le patient 9 (*M. circinelloides*), puisque la biopsie cutanée du même patient (échantillon 33) est sortie fortement positive avec ces deux kits (Ct respectivement à 10,37 et 13,97). De plus, une souche de *M. circinelloides* à 10⁶ spores/mL était également présente dans le CQI maison et a toujours été correctement détectée par la PCR Fungiplex® *Mucorales* : Ct = 24,08 et 23,03 pour un Ct moyen à 23,71 lors de la validation de méthode de la PCR maison.

De manière générale, on observe que les valeurs des Ct avec Fungiplex® *Mucorales* sont plus élevées que celles obtenues avec la PCR maison utilisée au CHU de Poitiers et la PCR de l'Hôpital Saint-Louis (AP-HP), excepté pour l'échantillon 33 (biopsie cutanée) qui est un échantillon très chargé en ADN fongique. On peut d'ailleurs remarquer que les échantillons 12 et 13 connus positifs à la fois à *Rhizomucor* et *Rhizopus-Mucor* ne sont positifs que pour l'un des deux genres : *Rhizomucor* pour l'échantillon 12 et *Rhizopus-Mucor* pour l'échantillon 13. Le genre détecté chaque fois est celui qui était connu avec la plus faible valeur de Ct. Ceci semble traduire un manque de sensibilité globale, qui s'avère plus particulièrement marqué pour le genre *Lichtheimia* spp. (tableau 11).

La sensibilité du kit Fungiplex® *Mucorales* est de 58,8% (10/17) par rapport à la PCR maison et de 72,7% (8/11) par rapport à la PCR de l'Hôpital Saint-Louis (AP-HP), ce qui nous semble insuffisant pour le diagnostic de mucormycoses en routine (tableau 11).

La sensibilité de MucorGenius® est de 82,4% (14/17) par comparaison à la PCR maison (tableau 11) et de 90,9% (10/11) par comparaison à la PCR de l'Hôpital Saint-Louis (AP-HP). Ces performances sont acceptables, sachant en plus qu'aucun diagnostic de mucormycoses n'aurait été manqué. En effet, le patient 3 avait aussi un sérum positif (échantillon 21), et le patient 9 avait une biopsie cutanée positive (échantillon 33) en PCR et en culture (tableau 10).

Enfin, nous avons comparé la sensibilité de ces deux kits de PCR *Mucorales* à la culture de nos échantillons de LBA (échantillons : 13, 27, 29 et 32) et d'une biopsie cutanée (échantillon 33). Les deux kits permettent un gain de sensibilité diagnostique notable. En effet, trois échantillons sur cinq, négatifs en culture et positifs en PCR maison, ont également été détectés positivement par Fungiplex® *Mucorales* et MucorGenius® (tableau 12). Aucun échantillon positif en culture n'a été manqué en PCR.

Deux études récentes évaluant le kit MucorGenius® mettent en évidence des performances similaires à celles que nous avons trouvées. La première étude est réalisée sur 319 prélèvements pulmonaires, et compare les performances de MucorGenius® à une combinaison de quatre PCR internes utilisant la méthode mise en place par le professeur L. Million au CHRU de Besançon (28,32,35), permettant la détection de *Rhizomucor* spp., *Rhizopus-Mucor* spp., *Lichtheimia* spp. et *Cunninghamella bertholletiae*. Elle établit une sensibilité globale de 90% sur les mucormycoses probables/prouvées, et une sensibilité relative à la PCR interne de 81,8% (36). La seconde compare les performances de différentes PCR maison et de MucorGenius® sur six sérums chargés à différentes concentrations de spores de *R. pusillus* ou *L. corymbifera*. La sensibilité et la spécificité établies dans cette étude sont respectivement de 84% et 100% pour le kit MucorGenius® (34).

Le kit MucorGenius® contrairement au kit Fungiplex® *Mucorales* ne renseigne pas sur le genre responsable de l'infection. Cependant, il détecte les cinq genres de *Mucorales* les plus

fréquemment trouvés en France. De plus, cette information intéressante d'un point de vue épidémiologique, n'est pas essentielle pour la prise en charge du patient.

Nous avons été contraints pour cette étude de travailler à partir d'un volume d'échantillon restreint. Seul un aliquot de 500 µL a été conservé congelé avant l'envoi de l'autre partie de l'échantillon pour réalisation de la PCR *Mucorales* à l'Hôpital Saint-Louis (AP-HP). Ceci n'a pas permis de suivre les recommandations pour la PCR maison qui préconisent d'extraire l'ADN à partir d'1 mL de sérum et d'éluer dans un volume de 50 µL (1) ou à partir d'1,5 mL de LBA centrifugé en ne conservant que 200 µL du culot (33). De plus, les recommandations d'extraction pour les deux kits commerciaux diffèrent des précédentes. Concernant le kit Fungiplex® *Mucorales*, il est recommandé d'extraire en suivant les recommandations applicables à la PCR *Aspergillus* sur sérum, soit à partir d'au moins 500 µL d'échantillon et d'éluer dans un volume de moins de 100 µL (37). Pour le kit MucorGenius®, il est recommandé d'utiliser 1 mL de sérum ou de LBA et d'éluer dans un volume de 50 µL. Les volumes d'échantillons à notre disposition ne nous ont pas non plus permis la réalisation de plusieurs protocoles d'extraction en parallèle. Ceci pourrait en partie être responsable d'une sous-estimation de la sensibilité des kits Fungiplex® *Mucorales* et MucorGenius®.

Le contrôle interne fourni avec le kit MucorGenius® n'a pas pu être utilisé car l'ensemble des échantillons étaient déjà extraits au moment de la réception de ce kit.

Enfin, dans nos essais, du fait de l'absence de souches ou d'échantillons positifs à *Cunninghamella* à notre disposition, nous n'avons pas pu évaluer la sensibilité des kits commerciaux sur ce genre, non détecté avec la PCR maison, mais responsable de mucormycoses plus agressives, représentant 1 à 7% des cas en France (6,25).

La PCR *Mucorales* maison actuellement réalisée deux fois par semaine au CHU de Poitiers, nécessite un temps de préparation plus long que celui nécessaire à l'utilisation d'un kit de PCR

multiplexée. Le risque de contaminations est plus important, et la réaction d'amplification dure deux fois plus longtemps qu'avec un kit commercial.

Or, l'intérêt de mettre en place une stratégie de dépistage systématique a déjà été étudié chez certaines populations à risque de mucormycoses. A l'image de ce qui est préconisé aujourd'hui pour l'API avec le dosage bi-hebdomadaire de l'antigène aspergillaire galactomannane chez tous les patients d'hématologie en secteur stérile, il pourrait être bénéfique de réaliser la PCR *Mucorales* sur le sérum de façon bi-hebdomadaire. Legrand et *al.* (2016) se sont intéressés aux patients grands brûlés. Une PCR *Mucorales* effectuée chez ces patients deux fois par semaine, a permis de gagner en moyenne onze jours sur le diagnostic, et par conséquent sur la prise en charge adaptée d'une mucormycose (36).

La PCR *Aspergillus* est elle-même réalisée deux fois par semaine au CHU de Poitiers. La différenciation entre l'API et la mucormycose pulmonaire chez les patients immunodéprimés étant difficile, et la co-infection à *Aspergillus* et *Mucorales* relativement fréquente (33% (3/9) dans notre étude) (9), la recherche de ces deux agents d'IFI sur la même plaque de PCR permettrait l'obtention d'un diagnostic différentiel rapide et un gain de temps technique non négligeable. En effet, ces deux réactions de PCR réalisées simultanément permettraient de libérer les thermocycleurs déjà très sollicités, et ce d'autant plus que la PCR maison *Mucorales*, qui comporte 50 cycles, dure près de trois heures. A notre connaissance, deux kits permettent actuellement la réalisation de la PCR *Aspergillus* et *Mucorales* sur la même plaque de PCR : MucorGenius® associé à AsperGenius® et le kit PCR MycoGENIE® *Aspergillus/Mucorales* (Ademtech, Pessac, France) et ce en moins d'une heure et demie. Les kits de PCR MycoGENIE® *Aspergillus/Mucorales* et AsperGenius® seront prochainement évalués au laboratoire afin de chercher une solution aux difficultés techniques et organisationnelles actuellement rencontrées avec la mise en place récente de la PCR *Mucorales* maison au CHU de Poitiers.

Conclusion

Les outils diagnostics de la mucormyose ne sont pas nombreux et ont une sensibilité restreinte. Dans ce contexte, les bonnes performances du diagnostic moléculaire permettent une réelle amélioration de la prise en charge grâce à la réduction du délai diagnostique. Dans un premier temps, la détection de l'ADN de *Mucorales* directement sur les échantillons de LBA et biopsie ont permis de diagnostiquer des mucormycoses avec une culture négative, mais nécessitaient des prélèvements invasifs, non réalisables chez tous les patients. Aujourd'hui, la détection de l'ADN circulant (sérum) des *Mucorales* par PCR est une technique suscitant un intérêt certain, car prometteuse d'un bon niveau de sensibilité et spécificité, tout en nécessitant un prélèvement non invasif (29).

Nous avons mis en évidence des différences de performances importantes entre le kit de PCR multiplexe Fungiplex® *Mucorales* et la PCR maison actuellement utilisée. Alors que le kit Fungiplex® *Mucorales* ne nous semble pas suffisamment sensible pour être un bon outil diagnostique, le kit de PCR multiplexe MucorGenius® est plus prometteur et permettrait de simplifier la réalisation de la PCR *Mucorales* au laboratoire du CHU de Poitiers, voire même de la combiner à la PCR *Aspergillus* en routine.

Références

1. Farmakiotis D, Kontoyiannis DP. Mucormycoses. *Infect Dis Clin North Am.* mars 2016;30(1):143-63.
2. Garcia-Hermoso D. [Laboratory diagnosis of mucormycosis]. *Med Sci (Paris).* mars 2013;29 Spec No 1:13-8.
3. Jeong W, Keighley C, Wolfe R, Lee WL, Slavin MA, Kong DCM, et al. The epidemiology and clinical manifestations of mucormycosis: a systematic review and meta-analysis of case reports. *Clin Microbiol Infect.* janv 2019;25(1):26-34.
4. Corzo-León DE, Chora-Hernández LD, Rodríguez-Zulueta AP, Walsh TJ. Diabetes mellitus as the major risk factor for mucormycosis in Mexico: Epidemiology, diagnosis, and outcomes of reported cases. *Med Mycol.* 1 janv 2018;56(1):29-43.
5. Liu M, Spellberg B, Phan QT, Fu Y, Fu Y, Lee AS, et al. The endothelial cell receptor GRP78 is required for mucormycosis pathogenesis in diabetic mice. *J Clin Invest.* juin 2010;120(6):1914-24.
6. Lanternier F, Dannaoui E, Morizot G, Elie C, Garcia-Hermoso D, Huerre M, et al. A global analysis of mucormycosis in France: the RetroZygo Study (2005-2007). *Clin Infect Dis.* févr 2012;54 Suppl 1:S35-43.
7. Dromer F, Bretagne S, Lortholary O. Rapport annuel d'activité 2019 - Centre national de référence Mycoses Invasives et Antifongiques. avr 2019;(CNRMA 2018).
8. Serris A, Danion F, Lanternier F. Disease Entities in Mucormycosis. *J Fungi (Basel).* 14 mars 2019;5(1).
9. Skiada A, Pagano L, Groll A, Zimmerli S, Dupont B, Lagrou K, et al. Zygomycosis in Europe: analysis of 230 cases accrued by the registry of the European Confederation of Medical Mycology (ECMM) Working Group on Zygomycosis between 2005 and 2007. *Clin Microbiol Infect.* déc 2011;17(12):1859-67.
10. Hernández JL, Buckley CJ. Mucormycosis. In: *StatPearls.* 2020.
11. Bitar D, Van Cauteren D, Lanternier F, Dannaoui E, Che D, Dromer F, et al. Increasing incidence of zygomycosis (mucormycosis), France, 1997-2006. *Emerging Infect Dis.* sept 2009;15(9):1395-401.
12. Bitar D, Che D. Épidémiologie des mucormycoses en France métropolitaine, 1997–2010. *Med Sci (Paris).* 1 mars 2013;29:7-12.
13. Prakash H, Chakrabarti A. Global Epidemiology of Mucormycosis. *J Fungi (Basel).* 21 mars 2019;5(1).
14. Donnelly JP, Chen SC, Kauffman CA, Steinbach WJ, Baddley JW, Verweij PE, et al. Revision and Update of the Consensus Definitions of Invasive Fungal Disease From the European Organization for Research and Treatment of Cancer and the Mycoses Study Group Education and Research Consortium. *Clinical Infectious Diseases.* 5 déc 2019;ciz1008.

15. Bitar D, Lortholary O, Le Strat Y, Nicolau J, Coignard B, Tattevin P, et al. Population-based analysis of invasive fungal infections, France, 2001-2010. *Emerging Infect Dis.* juill 2014;20(7):1149-55.
16. Gangneux J-P, Bougnoux M-E, Hennequin C, Godet C, Chandenier J, Denning DW, et al. An estimation of burden of serious fungal infections in France. *J Mycol Med.* déc 2016;26(4):385-90.
17. Cornely OA, Alastruey-Izquierdo A, Arenz D, Chen SCA, Dannaoui E, Hochhegger B, et al. Global guideline for the diagnosis and management of mucormycosis: an initiative of the European Confederation of Medical Mycology in cooperation with the Mycoses Study Group Education and Research Consortium. *Lancet Infect Dis.* 2019;19(12):e405-21.
18. Tissot F, Agrawal S, Pagano L, Petrikos G, Groll AH, Skiada A, et al. ECIL-6 guidelines for the treatment of invasive candidiasis, aspergillosis and mucormycosis in leukemia and hematopoietic stem cell transplant patients. *Haematologica.* 2017;102(3):433-44.
19. Chamilos G, Lewis RE, Kontoyiannis DP. Delaying amphotericin B-based frontline therapy significantly increases mortality among patients with hematologic malignancy who have zygomycosis. *Clin Infect Dis.* 15 août 2008;47(4):503-9.
20. Lanternier F, Poiree S, Elie C, Garcia-Hermoso D, Bakouboula P, Sitbon K, et al. Prospective pilot study of high-dose (10 mg/kg/day) liposomal amphotericin B (L-AMB) for the initial treatment of mucormycosis. *J Antimicrob Chemother.* nov 2015;70(11):3116-23.
21. Brunet K, Rammaert B. Mucormycosis treatment: recommendations, latest advances, and perspectives. *Journal de Mycologie Médicale.* 20 juin 2020;101007.
22. Marty FM, Ostrosky-Zeichner L, Cornely OA, Mullane KM, Perfect JR, Thompson GR, et al. Isavuconazole treatment for mucormycosis: a single-arm open-label trial and case-control analysis. *Lancet Infect Dis.* juill 2016;16(7):828-37.
23. Salmanton-García J, Seidel D, Koehler P, Mellinghoff SC, Herbrecht R, Klimko N, et al. Matched-paired analysis of patients treated for invasive mucormycosis: standard treatment versus posaconazole new formulations (MoveOn). *Journal of Antimicrobial Chemotherapy.* 1 nov 2019;74(11):3315-27.
24. Lamaris GA, Ben-Ami R, Lewis RE, Chamilos G, Samonis G, Kontoyiannis DP. Increased virulence of Zygomycetes organisms following exposure to voriconazole: a study involving fly and murine models of zygomycosis. *J Infect Dis.* 1 mai 2009;199(9):1399-406.
25. Roden MM, Zaoutis TE, Buchanan WL, Knudsen TA, Sarkisova TA, Schaufele RL, et al. Epidemiology and outcome of zygomycosis: a review of 929 reported cases. *Clin Infect Dis.* 1 sept 2005;41(5):634-53.
26. Mélida H, Sain D, Stajich JE, Bulone V. Deciphering the uniqueness of Mucoromycotina cell walls by combining biochemical and phylogenomic approaches. *Environ Microbiol.* mai 2015;17(5):1649-62.
27. Lamoth F, Calandra T. Early diagnosis of invasive mould infections and disease. *J Antimicrob Chemother.* 01 2017;72(suppl_1):i19-28.

28. Millon L, Larosa F, Lepiller Q, Legrand F, Rocchi S, Daguindau E, et al. Quantitative polymerase chain reaction detection of circulating DNA in serum for early diagnosis of mucormycosis in immunocompromised patients. *Clin Infect Dis.* mai 2013;56(10):e95-101.
29. Millon L, Scherer E, Rocchi S, Bellanger A-P. Molecular Strategies to Diagnose Mucormycosis. *J Fungi (Basel).* 20 mars 2019;5(1).
30. Bourcier J, Heudes P-M, Morio F, Gastinne T, Chevallier P, Rialland-Battisti F, et al. Prevalence of the reversed halo sign in neutropenic patients compared with non-neutropenic patients: Data from a single-centre study involving 27 patients with pulmonary mucormycosis (2003-2016). *Mycoses.* 2017;60(8):526-33.
31. Springer J, Lackner M, Ensinger C, Risslegger B, Morton CO, Nachbaur D, et al. Clinical evaluation of a Mucorales-specific real-time PCR assay in tissue and serum samples. *J Med Microbiol.* déc 2016;65(12):1414-21.
32. Millon L, Herbrecht R, Grenouillet F, Morio F, Alanio A, Letscher-Bru V, et al. Early diagnosis and monitoring of mucormycosis by detection of circulating DNA in serum: retrospective analysis of 44 cases collected through the French Surveillance Network of Invasive Fungal Infections (RESSIF). *Clin Microbiol Infect.* sept 2016;22(9):810.e1-810.e8.
33. Scherer E, Iriart X, Bellanger AP, Dupont D, Guitard J, Gabriel F, et al. Quantitative PCR (qPCR) Detection of Mucorales DNA in Bronchoalveolar Lavage Fluid To Diagnose Pulmonary Mucormycosis. *J Clin Microbiol.* 2018;56(8).
34. Rocchi S, Scherer E, Mengoli C, Alanio A, Botterel F, Bougnoux ME, et al. Interlaboratory evaluation of Mucorales PCR assays for testing serum specimens: A study by the fungal PCR Initiative and the Modimucor study group. *Medical Mycology.* 13 juin 2020;myaa036.
35. Bellanger A-P, Berceanu A, Rocchi S, Valot B, Fontan J, Chauchet A, 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):1180-3.
36. Guegan H, Iriart X, Bougnoux M-E, Berry A, Robert-Gangneux F, Gangneux J-P. Evaluation of MucorGenius® mucorales PCR assay for the diagnosis of pulmonary mucormycosis.. 1 août 2020;81(2):311-7.
37. White PL, Mengoli C, Bretagne S, Cuenca-Estrella M, Finnstrom N, Klingspor L, et al. Evaluation of *Aspergillus* PCR Protocols for Testing Serum Specimens ▽ . *J Clin Microbiol.* nov 2011;49(11):3842-8.
38. Legrand M, Gits-Muselli M, Boutin L, Garcia-Hermoso D, Maurel V, Soussi S, et al. Detection of Circulating Mucorales DNA in Critically Ill Burn Patients: Preliminary Report of a Screening Strategy for Early Diagnosis and Treatment. *Clin Infect Dis.* 15 nov 2016;63(10):1312-7.

Annexes

tableau 1 : Données cliniques et microbiologiques des patients avec au moins une PCR Mucorales connue positive, testés sur Fungiplex® BRUKER et MucorGenius® PathoNostics

Patient	Sexe	Age	Terrain	Localisation de l'infection	Prélèvement	PCR St Louis (Ct)	PCR Poitiers (Ct)	Culture Poitiers	Séquençage	Infection associée	Traitement antifongique	Survie à 3 mois
1	M	62	LAM	Mucormycose disséminée (cutanée et pulmonaire)	Sérum	<i>Rhizomucor</i> (30,74), <i>Rhizopus-Mucor</i> (34,66)	<i>Rhizomucor</i> (35,40), <i>Rhizopus-Mucor</i> (41,94)	NA	NA	Non	Amphotéricine B + Posaconazole puis relais Isavuconazole <i>per os</i>	En vie
					LBA	<i>Rhizomucor</i> (37,12), <i>Rhizopus-Mucor</i> (32,85)	<i>Rhizomucor</i> (37,43), <i>Rhizopus-Mucor</i> (35,93)	Négative				
2	M	76	LLC	Mucormycose disséminée (pulmonaire, cutanée et cérébrale)	Sérum	<i>Lichtheimia</i> (27,71)	<i>Lichtheimia</i> (33,43)	NA	NA	API	Amphotéricine B liposomale + Voriconazole	Décédé
					Biopsie cutanée	NE	NE	Négative	<i>L. ramosa</i>			
3	F	39	Lymphome B de haut grade	Mucormycose pulmonaire	LBA	<i>Rhizomucor</i> (38,46)	<i>Rhizomucor</i> (38,96)	NE	NA	API	Voriconazole	Décédée
					Sérum	NE	<i>Rhizomucor</i> (39,07)	NA	NA			
4	M	79	SMD acutisé	Mucormycose pulmonaire	Sérum	NE	<i>Lichtheimia</i> (36,64)	NA	NA	API	Voriconazole	Décédé
					Sérum	<i>Lichtheimia</i> (31,61)	<i>Lichtheimia</i> (36,36)	NA	NA			
5	F	73	Leucémie à plasmocytes	Mucormycose pulmonaire	Aspiration bronchique	NE	NE	<i>Mucorales</i>	<i>R. pusillus</i>	Pneumocystose + candidémie à <i>Candida kefyr</i>	Caspofungine + Cotrimoxazole	Décédée
					Sérum	NE	<i>Rhizomucor</i> (31,45)	NA	NA			

6	F	61	LAM allogreffée	Mucormycose pulmonaire	Sérum	<i>Rhizomucor</i> (30,28)	<i>Rhizomucor</i> (31,35)	NA	NA	Non	Amphotéricine B liposomale + Cotrimoxazole	Décédée
					LBA	<i>Rhizomucor</i> (27,36)	<i>Rhizomucor</i> (32,20)	<i>Mucorales</i>	<i>R. pusillus</i>			
7	F	65	LAM 1	Mucormycose disséminée (pulmonaire, cutanée, hépatique et cérébrale)	Sérum	<i>Rhizomucor</i> (25,15)	<i>Rhizomucor</i> (26,91)	NA	NA	Non	Voriconazole puis Amphotéricine B liposomale	Décédée
					LBA	<i>Rhizomucor</i> (30,73)	<i>Rhizomucor</i> (29,53)	Négative	NA			
					Biopsie	<i>Rhizomucor</i> (32,88)	NE	<i>Rhizomucor</i> spp.	<i>R. pusillus</i>			
8	M	65	LMMC allogreffé	Mucormycose pulmonaire	Sérum	<i>Rhizomucor</i> (26,64)	<i>Rhizomucor</i> (26,68)	NA	NA	Non	Voriconazole puis Amphotéricine B liposomale	En vie
					LBA	<i>Rhizomucor</i> (33,62)	<i>Rhizomucor</i> (41,65)	Négative	NA			
9	M	10	LAL B	Mucormycose disséminée (pulmonaire, cutanée)	Biopsie jambe	NE	<i>Rhizopus-Mucor</i> (30,00)	<i>Mucor</i> spp.	<i>Mucor circinelloides</i>	Non	Amphotéricine B liposomale	En vie
					Sérum	NE	<i>Rhizopus-Mucor</i> (37,31)	NA	NA			
					LBA*	Négatif	Négatif	Négative	NA			
					Sérum	Négatif	<i>Rhizopus-Mucor</i> (41,34)	NA	NA			

Ct : cycle seuil de détection, NA : non applicable, NE : non effectué, échantillon positif non testé, * : échantillon connu négatif en PCR.

tableau 2 : Composition du mix pour la PCR Mucorales maison

Réactif	Volume/puit
Applied biosystems TaqMan uiversal PCR	12,5 µL
Master mix	
Amorce Reverse EUROGENTEC (10 µM)	0,25 µL
Amorce Forward NS92F EUROGENTEC (10 µM)	0,25 µL
Sonde EUROGENTEC (10 µM)	0,2 µL
Eau	1,8 µL

tableau 3 : Noms et séquences des amorces et sondes utilisées pour la PCR Mucorales maison du CHU de Poitiers

Genre	Réactif	Nom	Séquence
Rhizopus/Mucor spp.	Sonde	MucP1	CCG-ATT-GAA-TGG-TTA-TAG-TGA-GCA-TAT-GGG-ATC
	Amorce R	MucR1	CCT-AGT-TTG-CCA-TAG-TTC-TCA-GCA-G
Lichtheimia spp.	Sonde	AcoryP1	ATG-GCA-CGA-GCA-AGC-ATT-AGG-GAC-G
	Amorce R	AcoryR1	GCA-AAG-CGT-TCC-GAA-GGA-CA
Rhizomucor spp.	Sonde	RmucP1	TTG-AAT-GGC-TAT-AGT-GAG-CAT-ATG-GGA-GGC-T
	Amorce R	RmucR1	GTA-GTT-TGC-CAT-AGT-TCG-GCT-A
Amorce F commune		NS92F	CAC-CGC-CCG-TCG-CTA-C

tableau 4 : Programme des cycles de PCR Mucorales maison

Durée	Température	Fonction	
10 minutes	95°C	Dénaturation initiale	
15 secondes	95°C	Dénaturation	} 50 cycles de PCR
1 minute	60°C	Hybridation et élongation	

tableau 5 : Composition du mix de PCR pour Fungiplex® Mucorales

Réactif	Volume/puit (µL)
Mix PCR	10,0
Mucorales mix	1,5
Eau pour PCR	2,5
Contrôle d'inhibition	1,0

tableau 6 : Programme des cycles de PCR Fungiplex® Mucorales

Durée	Température	Fonction	
15 minutes	95°C	Taq activation	
5 secondes	95°C	Dénaturation	} 45 cycles de PCR
30 secondes	60°C	Hybridation et élongation	

tableau 7 : Répartition des canaux de détection du kit PCR Fungiplex® Mucorales

Canal 1 (FAM)	Canal 2 (VIC)	Canal 3 (ROX)	Canal 4 (Cy5)
Contrôle d'inhibition	<i>Lichtheimia spp.</i> <i>Syncephalastrum spp.</i>	<i>Rhizopus spp.</i> <i>Mucor spp.</i> <i>Cunninghamella spp.</i> <i>Actinomucor spp.</i> <i>Apophysomyces spp.</i> <i>Saksenaia spp.</i>	<i>Rhizomucor spp.</i>

tableau 8 : Composition du mix de PCR pour MucorGenius®

Réactif	Volume/puit (µL)
MucorGenius® Mix PCR	10
Taq polymérase	1
Tampon de dilution	9

tableau 9 : Programme des cycles de PCR MucorGenius®

Durée	Température	Fonction	
2 minutes	95°C	Taq activation/dénaturation initiale	
15 secondes	94°C	Dénaturation	} 45 cycles de PCR
60 secondes	58°C	Hybridation et élongation	

tableau 10 : Comparaison des résultats PCR Fungiplex® Mucorales et MucorGenius® à la PCR maison du CHU de Poitiers et la PCR de l'Hôpital Saint-Louis (AP-HP)

N° échantillon	N° patient	Prélèvement	Résultats PCR St-Louis (Ct)	Résultats PCR Poitiers (Ct)	Résultats PCR Fungiplex® Mucorales (Ct)	Résultats PCR MucorGenius® (Ct)
12	1	Sérum	<i>Rhizomucor</i> (30,74), <i>Rhizopus-Mucor</i> (34,66)	<i>Rhizomucor</i> (35,40), <i>Rhizopus-Mucor</i> (41,94)	<i>Rhizomucor</i> (37,86)	Positif (31,12)
13		LBA	<i>Rhizomucor</i> (37,12), <i>Rhizopus-Mucor</i> (32,85)	<i>Rhizomucor</i> (37,43), <i>Rhizopus-Mucor</i> (35,93)	<i>Rhizopus-Mucor</i> (35,76)	Positif (30,00)
17	2	Sérum	<i>Lichtheimia</i> (27,71)	<i>Lichtheimia</i> (33,43)	Négatif	Positif (28,67)
20	3	LBA	<i>Rhizomucor</i> (38,46)	<i>Rhizomucor</i> (38,96)	Négatif	Négatif (43,26)
21		Sérum	NE	<i>Rhizomucor</i> (39,07)	Négatif	Positif (35,12)
22	4	Sérum	NE	<i>Lichtheimia</i> (36,64)	Négatif	Positif (33,75)
23		Sérum	<i>Lichtheimia</i> (31,61)	<i>Lichtheimia</i> (36,36)	Négatif	Positif (30,60)
25	5	Sérum	NE	<i>Rhizomucor</i> (31,45)	<i>Rhizomucor</i> (33,33)	Positif (29,60)
26	6	Sérum	<i>Rhizomucor</i> (30,28)	<i>Rhizomucor</i> (31,35)	<i>Rhizomucor</i> (33,01)	Positif (29,23)
27		LBA	<i>Rhizomucor</i> (27,36)	<i>Rhizomucor</i> (32,20)	<i>Rhizomucor</i> (32,25)	Positif (30,11)
28	7	Sérum	<i>Rhizomucor</i> (25,15)	<i>Rhizomucor</i> (26,91)	<i>Rhizomucor</i> (30,20)	Positif (26,30)
29		LBA	<i>Rhizomucor</i> (30,73)	<i>Rhizomucor</i> (29,53)	<i>Rhizomucor</i> (33,68)	Positif (29,11)
31	8	Sérum	<i>Rhizomucor</i> (26,64)	<i>Rhizomucor</i> (26,68)	<i>Rhizomucor</i> (28,39)	Positif (25,24)
32		LBA	<i>Rhizomucor</i> (33,62)	<i>Rhizomucor</i> (41,65)	<i>Rhizomucor</i> (37,69)	Positif (35,43)
33	9	Biopsie jambe	NE	<i>Rhizopus-Mucor</i> (30,00)	<i>Rhizopus-Mucor</i> (13,97)	Positif (10,37)
34		Sérum	NE	<i>Rhizopus-Mucor</i> (37,31)	Invalide	Négatif
35		LBA	Négatif	Négatif	Négatif	Négatif
36		Sérum	Négatif	<i>Rhizopus-Mucor</i> (41,34)	Invalide	Négatif

tableau 11 : Performances de Fungiplex® Mucorales et MucorGenius® par comparaison à la technique de PCR maison

	Nombre d'échantillons détectés positifs en :			Sensibilité par genre et par test PCR	
	PCR maison (référence)	PCR Fungiplex® Mucorales	PCR MucorGenius® ^a	PCR Fungiplex® Mucorales	PCR MucorGenius®
Rhizomucor spp.	11	8	10	72,7%	90,9%
Rhizopus-Mucor spp.	5	2	3	40,0%	60,0%
Lichtheimia spp.	3	0	3	0,0%	100,0%
Toutes espèces confondues	17 ^b	10	14 ^b	58,8%	82,4%

^a MucorGenius® ne différencie pas les *Mucorales* selon leur genre. Les genres sont déduits de ceux détectés par la PCR de référence

^b 2 échantillons (12 et 13) sont positifs à *Rhizopus-Mucor* et *Rhizomucor* à la fois

tableau 12 : Performances diagnostiques des kits commerciaux de PCR Mucorales par rapport à la culture

Echantillon	Prélèvement	Culture	PCR Fungiplex® Mucorales	PCR MucorGenius®
13	LBA	Négative	Positive	Positive
27	LBA	Positive	Positive	Positive
29	LBA	Négative	Positive	Positive
32	LBA	Négative	Positive	Positive
33	Biopsie cutanée	Positive	Positive	Positive

Tableaux

<i>tableau 1 : Données cliniques et microbiologiques des patients avec au moins une PCR Mucorales connue positive, testés sur Fungiplex® BRUKER et MucorGenius® PathoNostics</i>	25
<i>tableau 2 : Composition du mix pour la PCR Mucorales maison</i>	27
<i>tableau 3 : Noms et séquences des amorces et sondes utilisées pour la PCR Mucorales maison du CHU de Poitiers</i>	27
<i>tableau 4 : Programme des cycles de PCR Mucorales maison</i>	27
<i>tableau 5 : Composition du mix de PCR pour Fungiplex® Mucorales</i>	28
<i>tableau 6 : Programme des cycles de PCR Fungiplex® Mucorales</i>	28
<i>tableau 7 : Répartition des canaux de détection du kit PCR Fungiplex® Mucorales</i>	28
<i>tableau 8 : Composition du mix de PCR pour MucorGenius®</i>	29
<i>tableau 9 : Programme des cycles de PCR MucorGenius®</i>	29
<i>tableau 10 : Comparaison des résultats PCR Fungiplex® Mucorales et MucorGenius® à la PCR maison du CHU de Poitiers et la PCR de l'Hôpital Saint-Louis (AP-HP)</i>	30
<i>tableau 11 : Performances de Fungiplex® Mucorales et MucorGenius® par comparaison à la technique de PCR maison</i>	31
<i>tableau 12 : Performances diagnostiques des kits commerciaux de PCR Mucorales par rapport à la culture</i>	31

Résumé

Introduction

Les mucormycoses sont des pathologies difficiles à diagnostiquer. Le taux de mortalité est élevé, et une prise en charge précoce est essentielle pour améliorer les chances de survie. Récemment, différentes PCR permettant de détecter l'ADN des *Mucorales* ont été développées. L'objectif de cette étude est d'évaluer les performances de deux kits de PCR multiplexe : Fungiplex® *Mucorales* (Bruker) et MucorGenius® (PathoNostics) et de les comparer aux performances de la PCR *Mucorales* maison actuellement en place au CHU de Poitiers.

Méthode

Afin d'évaluer les performances des deux kits de PCR *Mucorales* multiplexées, 25 échantillons identiques provenant de patients immunodéprimés à risque d'infection fongique invasive ont été testés de manière rétrospective. Dix-sept échantillons de LBA, sérum ou biopsie étaient connus avec une PCR *Mucorales* positive. Les huit autres étaient positifs à d'autres champignons filamenteux, levures ou bactéries. Les résultats ont été comparés à ceux obtenus avec la technique de PCR maison actuellement utilisée au CHU de Poitiers.

Résultats

Les tests PCR réalisés avec les kits Fungiplex® *Mucorales* et MucorGenius® étaient positifs pour 10/17 et 14/17 échantillons respectivement. Les kits Fungiplex® *Mucorales* et MucorGenius® montrent ainsi sur ces échantillons une sensibilité respective de 58,8% et 82,4%, et une spécificité identique de 100% par rapport à la PCR maison.

Conclusion

Le kit MucorGenius® obtient des performances comparables à la technique de PCR maison, satisfaisantes pour contribuer au diagnostic des mucormycoses. En revanche, le kit Fungiplex® *Mucorales* souffre d'un manque de sensibilité.

Mots clés : mucormycoses, *Mucorales*, PCR, MucorGenius®, Fungiplex® *Mucorales*, infections fongiques invasives



SERMENT DE GALIEN

En présence des Maîtres de la Faculté, je fais le serment :

Je honorer ceux qui m'ont instruit(e) dans les préceptes de mon art et de leur témoigner ma reconnaissance en restant fidèle aux principes qui m'ont été enseignés et d'actualiser mes connaissances,

Je exercer, dans l'intérêt de la santé publique, ma profession avec conscience et de respecter non seulement la législation en vigueur, mais aussi les règles de Déontologie, de l'honneur, de la probité et du désintéressement,

Je ne jamais oublier ma responsabilité et mes devoirs envers la personne humaine et sa dignité,

Je ne dévoiler à personne les secrets qui m'auraient été confiés ou dont j'aurais eu connaissance dans l'exercice de ma profession,

Je faire preuve de loyauté et de solidarité envers mes collègues pharmaciens,

Je coopérer avec les autres professionnels de santé.

En aucun cas, je ne consentirai à utiliser mes connaissances et mon état pour corrompre les mœurs et favoriser des actes criminels.

Que les Hommes m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses. Que je sois couvert(e) d'opprobre et méprisé(e) de mes confrères si j'y manque.

Signature de l'étudiant

Nom : ESNAULT DEFFOIS

Prénom : Émilie

du Président du jury

Nom :

Prénom :

Résumé

Introduction

Les mucormycoses sont des pathologies difficiles à diagnostiquer. Le taux de mortalité est élevé, et une prise en charge précoce est essentielle pour améliorer les chances de survie. Récemment, différentes PCR permettant de détecter l'ADN des *Mucorales* ont été développées. L'objectif de cette étude est d'évaluer les performances de deux kits de PCR multiplexe : Fungiplex® *Mucorales* (Bruker) et MucorGenius® (PathoNostics) et de les comparer aux performances de la PCR *Mucorales* maison actuellement en place au CHU de Poitiers.

Méthode

Afin d'évaluer les performances des deux kits de PCR *Mucorales* multiplexées, 25 échantillons identiques provenant de patients immunodéprimés à risque d'infection fongique invasive ont été testés de manière rétrospective. Dix-sept échantillons de LBA, sérum ou biopsie étaient connus avec une PCR *Mucorales* positive. Les huit autres étaient positifs à d'autres champignons filamenteux, levures ou bactéries. Les résultats ont été comparés à ceux obtenus avec la technique de PCR maison actuellement utilisée au CHU de Poitiers.

Résultats

Les tests PCR réalisés avec les kits Fungiplex® *Mucorales* et MucorGenius® étaient positifs pour 10/17 et 14/17 échantillons respectivement. Les kits Fungiplex® *Mucorales* et MucorGenius® montrent ainsi sur ces échantillons une sensibilité respective de 58,8% et 82,4%, et une spécificité identique de 100% par rapport à la PCR maison.

Conclusion

Le kit MucorGenius® obtient des performances comparables à la technique de PCR maison, satisfaisantes pour contribuer au diagnostic des mucormycoses. En revanche, le kit Fungiplex® *Mucorales* souffre d'un manque de sensibilité.

Mots clés : mucormycoses, *Mucorales*, PCR, MucorGenius®, Fungiplex® *Mucorales*, infections fongiques invasives