

**MÉMOIRE DE DIPLÔME D'ÉTUDES
SPÉCIALISÉES TENANT LIEU DE THÈSE
D'EXERCICE POUR LE DIPLÔME D'ÉTAT DE
DOCTEUR EN PHARMACIE**

Soutenu et présenté publiquement le vendredi 11 décembre 2015

Par Alida MINOZA, née le 21/12/1986 à Ouagadougou

Conformément aux dispositions du Décret n° 2012-172 du 3 février

**Apport de la détection du (1-3) β -D-glucane
au diagnostic de l'aspergillose invasive
pulmonaire : expérience nantaise.**

Composition de jury :

Présidente : Mme le Professeur Berthe-Marie IMBERT

Directeur de thèse : Mr le Professeur Patrice LE PAPE

Membres du jury : Mme le Professeur Marie-Hélène RODIER

Mr le Docteur Thomas GASTINNE

REMERCIEMENTS

Je remercie Madame le Professeur Berthe-Marie IMBERT de m'avoir fait l'honneur d'accepter la Présidence de cette thèse.

Je remercie Madame le Professeur Marie-Hélène RODIER de m'avoir accueillie avec bienveillance dans son service plusieurs semestres et d'avoir accepté de se déplacer spécialement de Poitiers malgré son emploi du temps chargé.

Je remercie Monsieur le Docteur Thomas GASTINNE d'avoir accepté sans hésitation de faire partie de mon jury.

Je remercie Monsieur le Professeur Patrice LE PAPE qui, malgré ses nombreuses occupations, a accepté de prendre la Direction de cette thèse. J'ai particulièrement apprécié la confiance qu'il a su garder en ma capacité à mener ce projet à terme.

Je remercie Mme CURAT pour l'aide apportée à la mise en place de la technique de dosage du β -D-glucane et la société CapeCod[®] pour le prêt de l'appareil nécessaire à ce dosage.

Je suis redevable à l'équipe de Parasitologie-Mycologie de Poitiers, qui m'a ménagée durant ce dernier semestre d'internat afin que je mène à terme ma grossesse et l'écriture de ma thèse. Je remercie particulièrement mes co-internes, Thibault et Kévin pour m'avoir laissé « squatter » autant l'ordinateur et Damien pour avoir toujours pris le temps de répondre à mes questions.

Cette étude n'aurait pas été possible sans l'aide des internes nantais : Sophie et Ronan, qui ont accepté de reprendre, non sans mal, les manipulations de dosage du β -D-glucane.

Je suis grandement reconnaissante à mes relecteurs et relectrices pour leurs commentaires, toujours judicieux et rigoureux.

J'adresse des remerciements à ma mère et mon père, qui m'ont constamment encouragée et soutenue tout au long de mes études. Un clin d'œil particulier à ma conductrice et nounou (oui maman, je parle bien de toi). Je ne saurai passer sous silence l'apport inestimable de ma sœur Fanny et mon frère Gaël qui m'ont soutenue, de près ou de loin.

Les mots me manquent pour remercier, à sa juste valeur, mon amoureux, David, pour son soutien moral et psychologique indispensable pour maintenir ce projet à flot et pour avoir cru en mes capacités intellectuelles et à mon sens de l'organisation pour le réaliser.

Je ne pourrai finir sans remercier mon petit Loulou, qui m'a accompagnée tout au long de cette thèse, avant et après sa naissance.

LISTE DES ABREVIATIONS :

ADN : Acide DésoxyriboNucléique

AEG : Altération de l'Etat Général

AI : Aspergillose Invasive

API : Aspergilloses Pulmonaires Invasives

BDG : (1-3)- β -D-Glucane

CHU : Centre Hospitalier Universitaire

CMI : Concentration minimales inhibitrice

CNIL : Commission National de l'Informatique et des Libertés

CSH : Cellule Souche Hématopoïétique

CYP : Cytochrome

ECIL: European Conference on Infections in Leukaemia.

ELISA : Enzyme-Linked Immunosorbent Assay

EF: Episode Fébrile

EORTC : European Organization for Research and Treatment of Cancer

FDA : Food and Drug Administration

GM : Galactomannane

GVH : Greffon Versus Hôte

IDSA : Infectious Diseases Society of America

IFI : Infection Fongique Invasive

Ig : Immunoglobuline

IL : InterLeukine

LA : Leucémie Aigue

LAL : Leucémie Aigüe Lymphoïdes

LAM : Leucémie Aigüe Myéloïdes

LBA : Lavage Broncho-Alvéolaire

LCR : Liquide Céphalo-Rachidien

LLC : Leucémie Lymphoïde Chronique

MSG : Mycoses Study Group

NET : Neutrophil Extracellular Traps

ORL : Oto-Rhino-Larynx

PCR : Polymerase Chain Réaction

PNN : PolyNucléaire Neutrophile

RESSIF : RESeau de Surveillance des Infections Fongiques

SAIF : Surveillance des Aspergilloses Invasives en France

SIDA : Syndrome d'ImmunoDéficiency Acquis

TLR : Toll Like Receptor

TNF : Tumor Necrosis Factor

TR : Tandem Repeat

VPN : Valeur Prédictive Négative

VPP : Valeur Prédictive Positive

LISTE DES TABLEAUX :

Tableau I : Critères de classification des infections aspergillaires invasives selon les critères de l'EORTC /MSG.

Tableau II : Impact des infections fongiques aspergillaires dans le monde.

Tableau III : Sensibilité et spécificité de l'antigène GM dans les cas d'AI prouvées en fonction de la population étudiée.

Tableau IV : Différence de performance de la PCR en temps réel en fonction du volume d'échantillon.

Tableau V : Sensibilité, Spécificité, VPN, VPP du BDG. Revue de la littérature.

Tableau VI : Recommandation pour le traitement empirique.

Tableau IIII : Recommandation pour le traitement prophylactique.

Tableau III : Recommandation pour le traitement curatif.

Tableau IX : Nombre de cas et moment de positivité du BDG en fonction de la culture, de l'imagerie et du GM.

Tableau X : Répartition des 42 patients du protocole multicentrique.

Tableau XI : Valeurs intrinsèques du test au BDG : partie nantaise de l'étude multicentrique et de l'étude rétrospective.

LISTE DES FIGURES :

Figure 1 : Position taxonomique de quelques nouvelles espèces d'*Aspergillus* section *Fumigati*.

Figure 2 : Quelques exemples de profils de sensibilité aux antifongiques dans la section *Fumigati*.

Figure 3 : Aspect macroscopique d'*Aspergillus fumigatus*.

Figure 4 : Têtes aspergillaires.

Figure 5 : Aspect microscopique d'*Aspergillus fumigatus*.

Figure 6 : Schéma de la paroi fongique d'*Aspergillus*.

Figure 7 : Pathogénèse de l'infection invasive à *Aspergillus*.

Figure 8 : Expression clinique de l'aspergillose en fonction de la réponse immunitaire.

Figure 9 : Invasion capillaire et hématogène, avec dissémination des filaments mycéliens, du galactomannane et autres molécules.

Figure 10 : Répartition des infections fongiques en fonction de leurs populations cibles.

Figure 11 : Répartition du taux de prévalence par an de l'aspergillose pulmonaire chronique dans le monde.

Figure 12 : Répartition des infections fongiques invasives en France, 2012-2013-2014.

Figure 13 : Répartition des populations à risque d'infection fongique, étude RESSIF.

Figure 14 : Répartition des populations à risque d'infection fongique, étude SAIF.

Figure 15 : L'espèce aspergillaire en fonction des facteurs de risque.

Figure 16 : Comparaison des courbes de survie en fonction du facteur de risque identifié.

Figure 17 : Images de tomodynamométrie thoracique observée lors d'une API.

Figure 18 : Filaments mycéliens d'*Aspergillus fumigatus* dans un LBA.

Figure 19 : Structure du galactomannane.

Figure 20 : Test immuno-chromatographique.

Figure 21 : Molécule de (1-3) β -D-glucane.

Figure 22 : Photo de *Limulus polyphemus*.

Figure 23 : Anatomie d'une limule.

Figure 24 : Cascade de coagulation du lysat de limule.

Figure 25 : Structures chimiques des triazolés.

Figure 26 : Voie de synthèse de l'ergostérol.

Figure 27 : Molécule d'amphotéricine B.

Figure 28 : Structures chimiques des échinocandines.

Figure 29 : Contenu du kit Fungitell[®].

Figure 30 : Réaction enzymatique.

Figure 31 : Variation du substrat et du produit en fonction du temps.

Figure 32 : Exemple des résultats bruts obtenus.

Figure 33 : Exemple d'une droite d'étalonnage et son tableau de valeurs.

Figure 34 : Suivi de l'antigénémie aspergillaire et du taux de BDG du patient n°1.

Figure 35 : Suivi de l'antigénémie aspergillaire et du taux de BDG du patient n°2.

Figure 36 : Suivi de l'antigénémie aspergillaire et du taux de BDG du patient n°3.

Figure 37 : Suivi de l'antigénémie aspergillaire et du taux de BDG du patient n°4.

Figure 38 : Suivi de l'antigénémie aspergillaire et du taux de BDG du patient n°5.

Figure 39 : Suivi de l'antigénémie aspergillaire et du taux de BDG du patient n°6.

Figure 40 : Suivi de l'antigénémie aspergillaire et du taux de BDG du patient n°7.

Figure 41 : Suivi de l'antigénémie aspergillaire et du taux de BDG du patient n°8.

Figure 42 : Suivi de l'antigénémie aspergillaire et du taux de BDG du patient n°9.

Figure 43 : Suivi de l'antigénémie aspergillaire et du taux de BDG du patient n°10.

Figure 44 : Suivi de l'antigénémie aspergillaire et du taux de BDG du patient n°11.

Figure 45 : Courbe de corrélation entre les valeurs de BDG et GM : partie nantaise de l'étude multicentrique et de l'étude rétrospective.

TABLE DES MATIERES :

Introduction	10
L'Aspergillose	12
1. Aspergillus et aspergillose	12
1.1. L'agent responsable	12
1.2. Pouvoir pathogène d' <i>Aspergillus fumigatus</i>	16
1.3. Pathogénèse	19
1.4. Les différentes formes cliniques de l'aspergillose pulmonaire.	20
2. Epidémiologie de L'aspergillose	25
2.1. Epidémiologie mondiale.....	25
2.2. Epidémiologie nationale	27
3. Facteurs de risques de l'aspergillose en hématologie	30
4. Le diagnostic de l'aspergillose invasive	31
4.1. Diagnostic clinique	31
4.2. Diagnostic radiologique.....	32
4.3. Diagnostic biologique.....	33
5. Le (1-3)-β-D-glucane	40
5.1. Historique de découverte et principe	41
5.2. Outil diagnostique.....	42
6. La prise en charge thérapeutique	46
6.1. Les molécules thérapeutiques utilisables.....	46
6.2. Le traitement empirique.....	50
6.3. Le traitement prophylactique	51
6.4. Le traitement préemptif et curatif	52
Matériels et méthodes	54
1. Etude rétrospective	54
1.1. Déroulement de l'étude :	54
1.2. Sélection des patients.....	54
1.3. Dosage du 1-3 β -D glucan sérique	55
1.4. Validation de la technique de dosage	59
1.5. Recueil des données.....	59
2. Etude multicentrique	60
2.1. Déroulement de l'étude :	60
2.2. Sélection des patients.....	61
2.3. Dosage du 1-3 β -D glucan sérique	61
2.4. Recueil des données.....	61

<i>Résultats-Discussion</i>	63
1. L'étude rétrospective	63
1.1. BDG plus performant que le GM.	63
1.2. BDG similaire au GM.....	68
1.3. BDG moins performant que le GM	73
1.4. BDG dans un contexte de candidémie.....	76
2. L'étude multicentrique	77
2.1. Au niveau national.....	77
2.2. Au niveau nantais	77
<i>Discussion générale</i>	81
<i>Conclusion</i>	85
<i>Bibliographie</i>	86
<i>Annexes</i>	97

Ces dix dernières années l'aspergillus, moisissure saprophyte de l'environnement, s'est imposé comme le premier pathogène fongique à transmission aérienne dans les pays développés avec une nette augmentation de son incidence.

Pathogènes opportunistes, les aspergillus sont responsables dans certaines circonstances d'atteintes de la sphère oto-rhino-larynx (ORL), de mycoses pulmonaires ou d'infections disséminées. Les aspergilloses pulmonaires se répartissent en 3 entités cliniques : les aspergilloses localisés, les aspergilloses immuno-allergiques et les aspergilloses pulmonaires invasives (API).

L'API est la manifestation clinique la plus grave. Elle est de mauvais pronostic, en partie parce qu'elle touche des patients sévèrement immunodéprimés. Les patients atteints d'hémopathie maligne représentent la population « cible » par excellence en raison de l'emploi de thérapeutiques fortement et durablement cytotoxiques pour la moelle. La neutropénie profonde reste le facteur de risque majeur de cette infection suivie de la corticothérapie au long cours et de l'utilisation de thérapeutiques immunosuppressives.

L'émergence de cette pathologie est cohérente avec l'évolution des pratiques médicales. En effet, d'autres facteurs concourent à l'augmentation de son incidence tels que : l'intensification des régimes de chimiothérapie pour les tumeurs solides, l'augmentation de la pratique des transplantations d'organes, le développement des thérapeutiques immunomodulatrices en matière de maladies auto-immunes et les progrès de prise en charge des malades graves admis en réanimation médico-chirurgicale.

Cette infection est associée à une mortalité variant de 30 à 70 % selon les études (1). Ces chiffres sont en diminution depuis la mise sur le marché du voriconazole et des échinocandines (2) et depuis l'administration du posaconazole en prophylaxie chez les populations à risques (3).

Le diagnostic de l'API est un diagnostic difficile portant sur un faisceau d'arguments à la fois épidémiologiques, cliniques, radiologiques et biologiques. D'un point de vue biologique, il repose premièrement sur un diagnostic mycologique composé d'un examen direct, une culture et un examen anatomopathologique ; deuxièmement sur un diagnostic immunologique faisant appel à la détection d'antigènes circulants : le galactomannane (GM) et le (1-3)- β -D-glucane (BDG). La place de la biologie moléculaire reste actuellement à discuter.

Dans le cadre du dépistage des pathologies infectieuses fongiques invasives et notamment de l'API chez les patients atteints d'hémopathie maligne, il est intéressant d'évaluer les performances d'un test de dépistage sérique déjà commercialisé mais encore peu utilisé en France : le test Fungitell[®] de la société CapeCod[®]. Ce test permettant le dosage du BDG, composant majeur de la paroi de la plupart des champignons, est un outil de diagnostic immunologique des infections fongiques invasives (IFI). Il est considéré comme un critère

diagnostique dans la classification révisée de l'EORTC/MSG (European Organization for Research and Treatment of Cancer/ Mycoses Study Group) (4).

Sachant qu'une intervention thérapeutique précoce est essentielle pour améliorer la survie des patients atteints d'API, il est nécessaire de connaître l'efficacité (précocité et fiabilité) des marqueurs utilisés dans le diagnostic de l'API. Deux études seront menées.

La première a pour but de comparer l'évolution du taux du BDG à celui du GM, lors d'une étude rétrospective réalisée chez des patients du service d'hématologie du Centre Hospitalier Universitaire (CHU) de Nantes ayant présenté une API probable.

La seconde étude s'inscrit dans un projet multicentrique national visant à évaluer l'intérêt du dosage du BDG lors d'une étude prospective chez le patient en phase d'induction thérapeutique pour une leucémie aigüe (LA). Les résultats présentés ici concernent le volet nantais de l'étude. Ce protocole est toujours en cours actuellement.

1. ASPERGILLUS ET ASPERGILLOSE

1.1. L'AGENT RESPONSABLE

1.1.1. ENVIRONNEMENT

Les aspergillus sont des champignons saprophytes de l'environnement qui se développent aux dépens des végétaux en décomposition. Le mycélium (thalle végétatif formé de filaments mycéliens hyalins, de diamètre fin et régulier, septés et ramifiés à 45°) forme des conidiophores produisant une grande quantité de conidies. Ces dernières, grâce à leur petite taille de 2 à 3 μm et leur paroi hydrophobe, sont efficacement dispersées par voie aérienne (5). Les spores aspergillaires se situent au 4^{ème} rang des spores fongiques de l'air, après les spores d'*Alternaria spp.*, de *Cladosporium spp.* et de *Penicillium spp.*(6).

Les moisissures du genre *Aspergillus* sont rencontrées aussi bien en milieu rural (principalement sur des végétaux en décomposition ou le fumier) qu'en milieu urbain, en particulier dans les habitats où l'on note une augmentation importante de sa présence depuis ces dernières années (7). Ceci peut être expliqué par une meilleure isolation des habitations augmentant le taux d'humidité. En intérieur, ce sont les poussières qui contiennent habituellement les aspergillus en particulier derrière les meubles ou les cadres, dans les faux plafonds et les conduits d'aération mais aussi dans la terre des plantes en pots.

1.1.2. CLASSIFICATION

Les aspergillus peuvent se présenter soit sous formes sexuées appelées cleistothèces soit sous formes asexuées dites anamorphes. Il existe environ 190 espèces d'*Aspergillus* mais seule une vingtaine est impliquée en pathologie humaine. La classification est différente selon les stades sexués ou asexués. La nomenclature nous impose d'utiliser le nom d'espèce de la forme sexuée lorsqu'elle existe mais en pratique clinique on utilise plus volontiers le nom de la forme asexuée. La classification des formes asexuées est la suivante : règne : *Fungi* ; phylum : *Deuteromycotina* ; classe : Hyphomycètes ; ordre : Moniliales ; famille : *Monoliliaceae* ; genre : *Aspergillus*.

En ce qui concerne les espèces, elles ont longtemps été décrites uniquement grâce à la macroscopie et la microscopie du champignon. De nos jours, grâce à la biologie moléculaire, de nouvelles espèces sont décrites et difficilement identifiables et différenciables microscopiquement et macroscopiquement. Sans biologie moléculaire on ne peut plus rendre un *Aspergillus* au rang de l'espèce. On parle maintenant de section d'espèce.

Ainsi le complexe d'espèce *Fumigati* appartient aux *Aspergillus* unisériés de la section *Fumigati* du sous-genre *Fumigati*. Il regroupe plus de 20 espèces morphologiquement très proches. Le chef de fil de cette section est *Aspergillus fumigatus*.

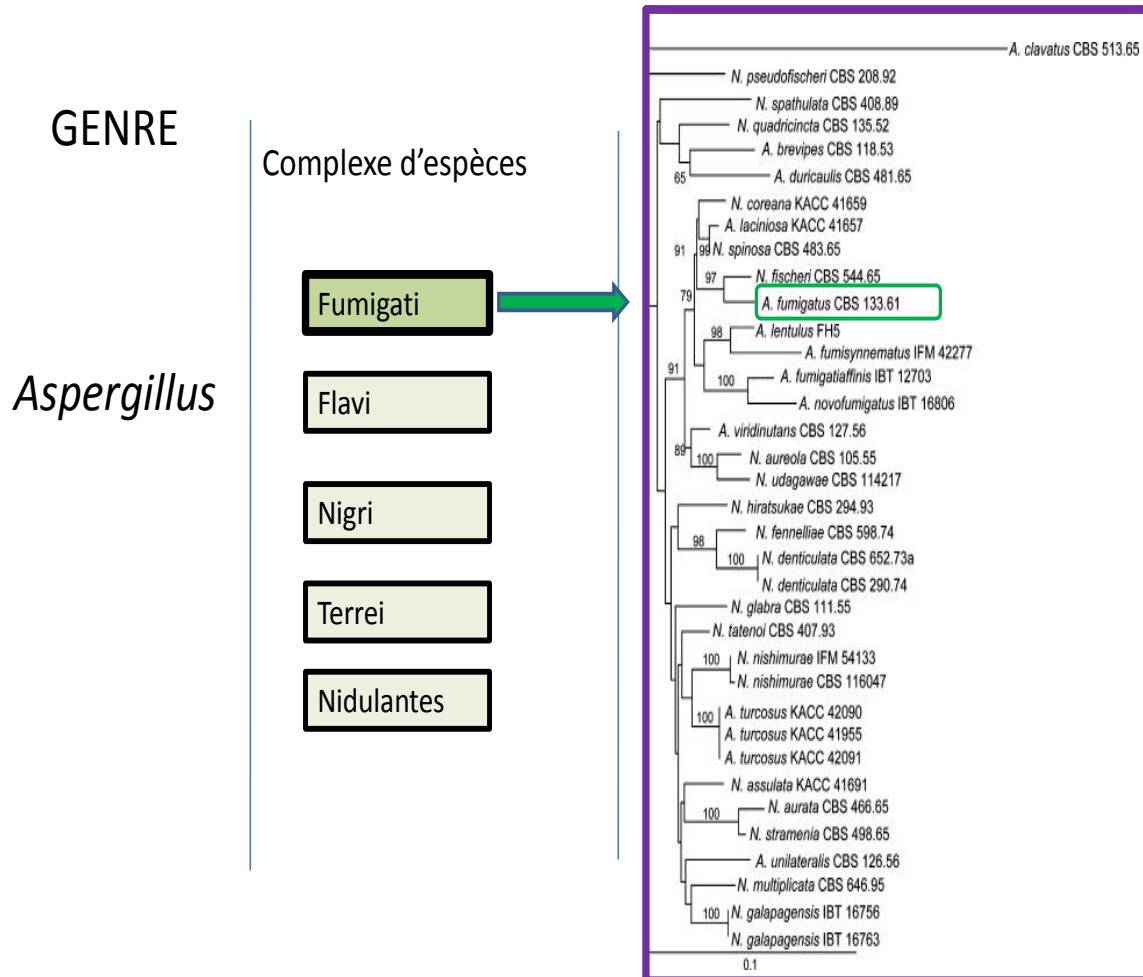
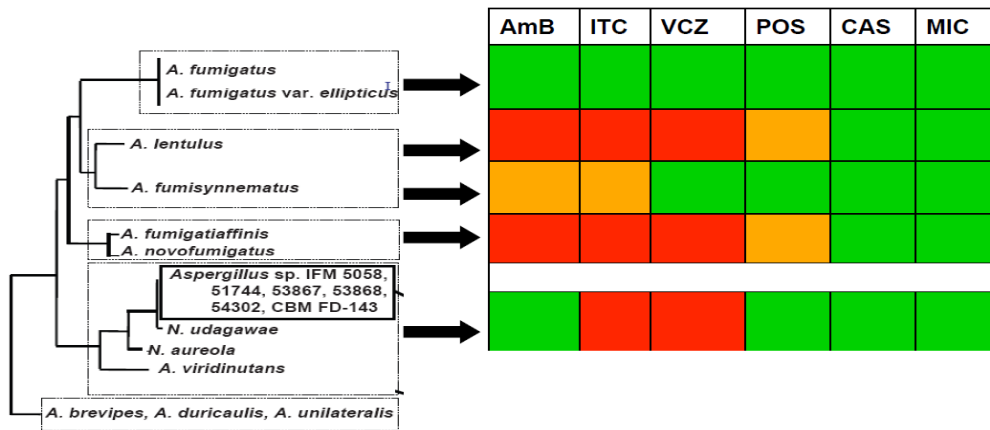


Figure 1 : Position taxonomique de quelques nouvelles espèces d'*Aspergillus* section *Fumigati* (8).

Dans certaines situations, la détermination de l'espèce des *Aspergillus* grâce à la biologie moléculaire est importante car les profils de résistance ne sont pas les mêmes au sein d'un complexe d'espèces.



Vert : sensible ; Orange : sensibilité diminuée ; Rouge : résistant.

Figure 2 : Quelques exemples de profils de sensibilité aux antifongiques dans la section *Fumigati* (9).

1.1.3. MORPHOLOGIE

1.1.3.1 CARACTÉRISTIQUE MACROSCOPIQUE

Les aspergillus ont une croissance rapide sur milieu de Sabouraud additionné d'antibiotiques (notamment le chloramphénicol). Ils sont pour la plupart inhibés par le cycloheximide (Actidione®). Après 24 à 48 heures de culture, on observe des colonies plates formées de courts filaments aériens blancs. Par la maturation des structures conidiogènes (48 à 96 heures selon les espèces) les colonies vont prendre une teinte caractéristique. La couleur de la colonie permet une orientation rapide sur la section. Le milieu de référence est le milieu de Czapek (milieu pauvre en nutriments) qui stimule l'apparition de fructifications. La température optimale de culture est de 22 à 25°C selon les espèces sauf pour *A. fumigatus* qui est une espèce thermotolérante poussant mieux à 37°C et jusqu'à 55°C.



Figure 3 : Aspect macroscopique d'*Aspergillus fumigatus* (image personnelle).

Par exemple *A. fumigatus* prend une teinte blanche puis verte, verte-grise puis verte foncée à grise-noirâtre. Au verso, il prend une teinte incolore, jaune, verte ou brune-rouge.

1.1.3.2. CARACTERISTIQUE MICROSCOPIQUE

Sur le mycélium d'*Aspergillus spp.* naissent des filaments dressés non cloisonnés, appelés conidiophores. Ils se terminent par une vésicule de forme variable sur laquelle s'accrochent des petits articles appelés métules. Ces métules portent des cellules conidiogènes appelées phialides. La conidiogénèse correspondant à une reproduction asexuée, s'effectue sur le mode blastique-phialidique, par bourgeonnement à l'apex des phialides. Les conidies restent accolées les unes aux autres en chaîne ramifiée, la plus jeune étant à la base de la chaîne, à côté de la phialide. L'ensemble conidiophore – vésicule – métules – phialides – conidies est appelé tête aspergillaire. Sans les métules, ces têtes sont dites unisériées alors qu'elles sont dites bisériées en présence de ces dernières. Les caractéristiques microscopiques telles que la longueur du conidiophore, la forme de la vésicule, la présence ou non de métules... sont des éléments d'orientations vers un complexe d'espèces précis.

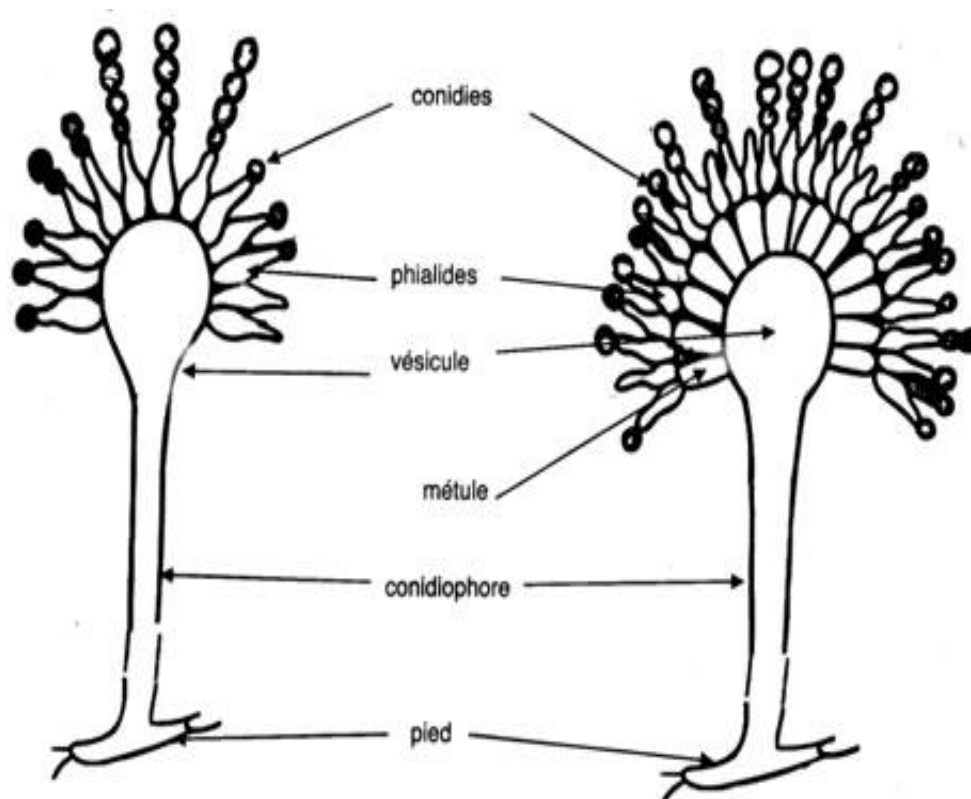


Figure 4 : Têtes aspergillaires (10).

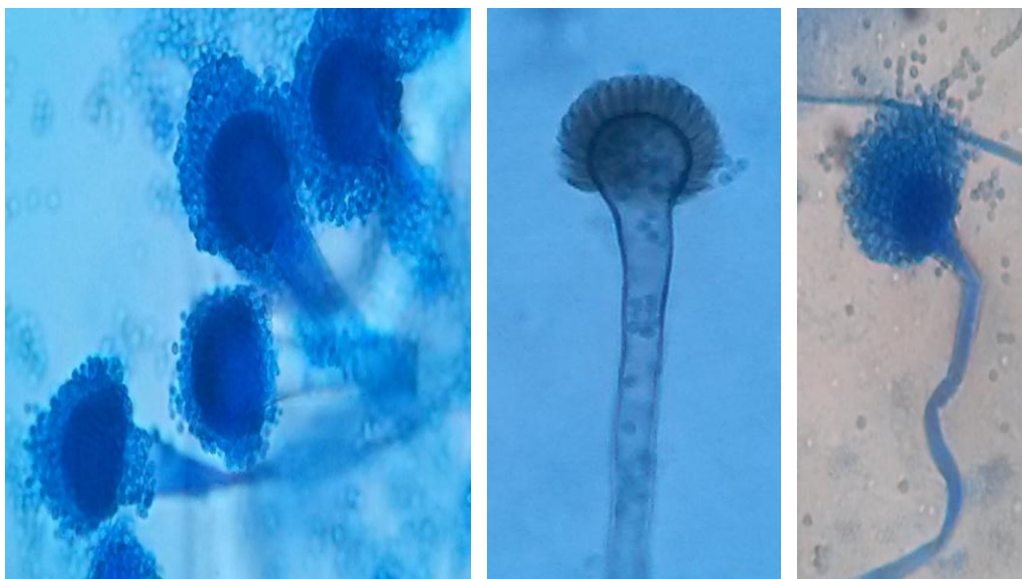


Figure 5 : Aspect microscopique d'*Aspergillus fumigatus* (image personnelle).

Pour *A. fumigatus*, la tête est unisériée en colonne. Le conidiophore est court (300µm), lisse, incolore, avec un évasement progressif au sommet (aspect en massue). Les conidies sont rondes, vertes, échinulées ou lisses de 2.5 à 3 µm de diamètre.

1.2. POUVOIR PATHOGENE D'*ASPERGILLUS FUMIGATUS*

Les espèces responsables d'aspergillose invasive (AI) sont principalement : *A. fumigatus*, *A. flavus*, *A. nidulans*, *A. niger*, *A. candidus*, *A. glaucus*, *A. terreus* et *A. versicolor*.

A. fumigatus, pourtant minoritaire parmi les spores présentes dans l'air, est responsable d'environ 90% des infections aspergillaires chez l'Homme. Ce paradoxe trouve son explication dans la biologie de cette espèce mettant en évidence de nombreux facteurs pouvant expliquer sa survie et son développement chez l'homme (11).

En effet la virulence d'*A. fumigatus* est liée à la structure du champignon, à sa thermotolérance, à ses mécanismes d'échappement vis-à-vis du système immunitaire, à sa capacité d'invasion, à son potentiel de résistance aux traitements antifongiques et à ses propriétés allergisantes.

La paroi assure la protection de la cellule fongique à l'intérieur de l'hôte et participe à la virulence du champignon. La croissance polaire du mycélium, associée à la haute rigidité de la paroi (conférée par sa structure), explique la capacité du champignon à franchir les

barrières anatomiques. La paroi assure les principales interactions avec l'hôte (structures exposées par le champignon) et représente la cible principale du système immunitaire. Elle est principalement composée de polysaccharides (plus de 90% de la paroi) et de protéines. Les polysaccharides sont représentés par : les (1-3)- β -D-glucanes (20 à 35% de la paroi), les galactomannanes (20 à 25%), les α -1,3-glucanes (35 à 46%) et la chitine.

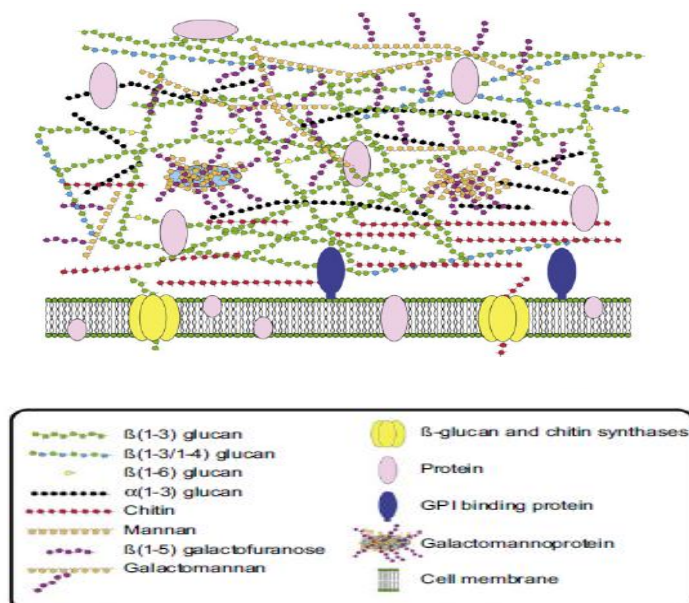


Figure 6 : Schéma de la paroi fongique d'*Aspergillus* (11).

A.fumigatus est un champignon capable de pousser jusqu'à une température de 55°C et de survivre jusqu'à une température de 75°C. Cette caractéristique essentielle lui permet donc de se développer aisément chez l'Homme à 37°C. Certaines études montrent une corrélation entre la capacité des espèces d'*Aspergillus* à se développer à 37°C et leur prévalence en santé humaine (12).

Les conidies verruqueuses, de par leur petite taille sont capables d'atteindre directement les alvéoles pulmonaires en évitant d'être capturées par l'épithélium cilié des voies respiratoires. Par ailleurs, en cas de phagocytose par les cellules épithéliales, ces dernières ne semblent pas en mesure de les détruire correctement, créant un point de départ pour la dissémination. De plus, l'épaisse paroi fongique est également un frein à l'immunité innée puisqu'elle résiste aux complexes d'attaque membranaire formés lors de l'activation du complément (11).

La mélanine est l'un des facteurs importants de virulence du champignon : la pigmentation de la surface des conidies permet au champignon de limiter le dépôt des fractions C3 du complément et d'inhiber l'activation des polynucléaires neutrophiles (PNN) (11). Elle protège le champignon contre les espèces réactives de l'oxygène et elle est capable de masquer les β -D-glucanes vis-à-vis du système immunitaire et donc de limiter l'initiation d'une réponse anti-aspergillaire.

La couche hydrophobe présente sur la paroi fongique permet également au champignon de lutter contre le stress oxydant, notamment au niveau des macrophages alvéolaires : cette couche est constituée principalement de protéines appelées hydrophobines.

Le champignon est également capable de produire diverses enzymes lui permettant de lutter contre les espèces réactives de l'oxygène : les catalases, les superoxydes dismutases, les glutathions transférases.

Le champignon, lors de la croissance des hyphes fongiques, produit diverses toxines appelées mycotoxines. Elles peuvent être soit sécrétées par celui-ci soit relarguées après sa mort. Elles peuvent également être incorporées aux conidies lors de la conidiogenèse. Ces toxines sont responsables de lésions chez l'hôte. La toxine majeure d'*A. fumigatus* est la gliotoxine. Elle a plusieurs rôles immunosuppresseurs (11) :

- l'inhibition de la phagocytose par les macrophages alvéolaires
- l'inhibition de la prolifération des lymphocytes T
- la capacité d'induire l'apoptose des monocytes
- l'altération du fonctionnement des PNN en inhibant la formation de réactifs oxygénés.

Par ailleurs, il a été démontré que la gliotoxine est un facteur anti-angiogénique majeur d'*A. fumigatus*, ce qui renforce la virulence du champignon dans les situations invasives (13). Cette toxine est produite lors d'AI chez l'homme. Elle pourrait être un futur marqueur de l'infection (14). D'autres toxines sont retrouvées chez le genre *Aspergillus* mais elles ne semblent pas impliquées dans la virulence du champignon en cas d'AI : la mitogilline (surtout impliquée dans les phénomènes allergiques), l'hémolysine, les aflatoxines ou encore la fumagilline.

Le champignon possède des propriétés d'invasion grâce à son angiotropisme et sa croissance polaire. L'angiotropisme d'*A. fumigatus* est basé sur l'existence d'un gradient en oxygène et en sucre entre le tissu pulmonaire et le sang. Ce gradient stimule la croissance fongique en direction du compartiment sanguin (15).

Il a été mis en avant récemment qu'*A. fumigatus* est capable de former des biofilms (16). Il s'agit d'un enchevêtrement de mycélium dans une matrice extracellulaire complexe faite de composants de paroi fongique, d'hydrophobines et de systèmes enzymatiques de résistance aux antifongiques. Cette structure participe à la virulence du champignon et apporte à celui-ci une certaine résistance aux thérapeutiques antifongiques en particulier aux azolés (17).

A. fumigatus est capable de synthétiser des protéines, responsables de réponses immunitaires de type Th-1 chez certains patients, numérotées de Asp f-1 à Asp f-34 (11). Ces allergènes peuvent engendrer des réactions démesurées et être à l'origine des aspergilloses allergiques développées dans le chapitre des différentes entités cliniques de l'aspergillose.

Des spores d'*Aspergillus spp.* sont inhalées en permanence sans pour autant être à l'origine d'infections fongiques aspergillaires. Lorsqu'elles sont inhalées, elles sont reconnues par les macrophages et les cellules dendritiques présentatrices d'antigènes qui ont un double rôle : fongicide et activateur de la réponse immunitaire.

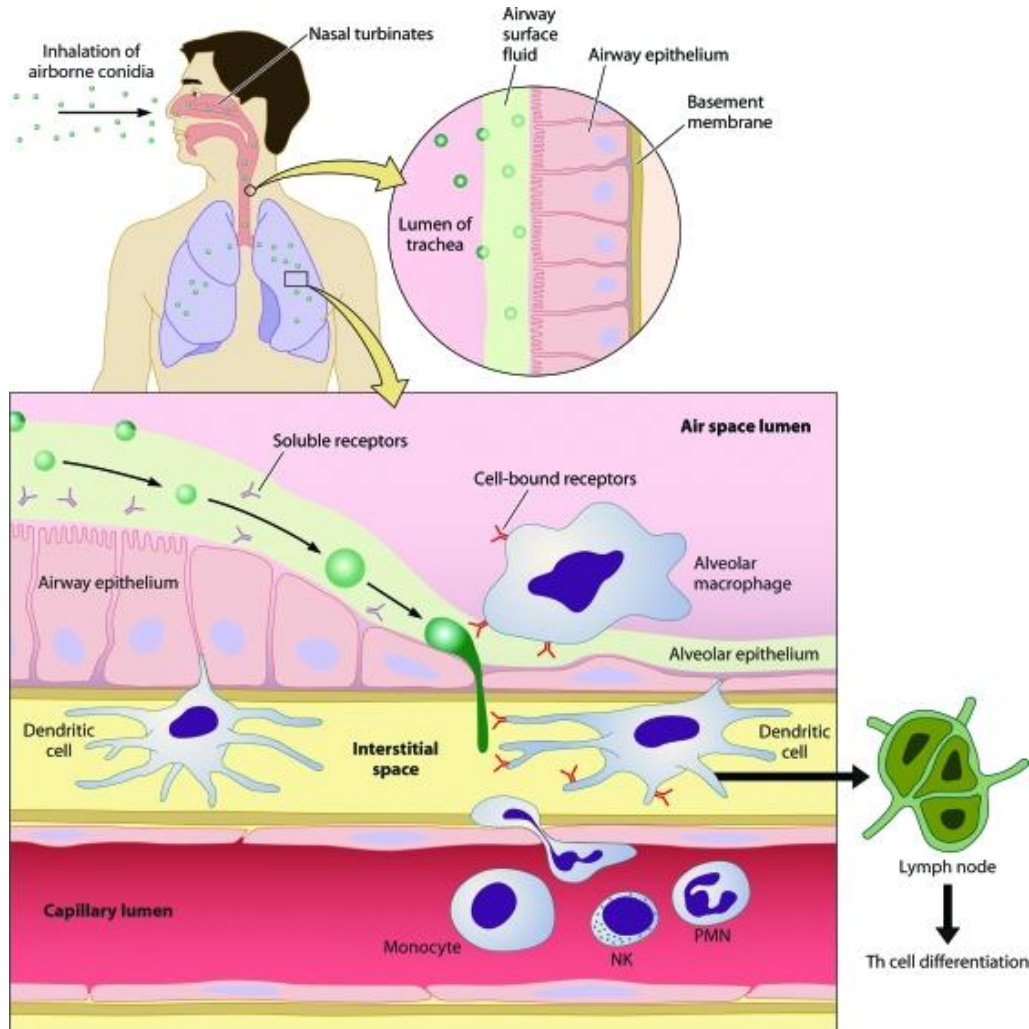


Figure 7 : Pathogenèse de l'infection invasive à *Aspergillus* (5).

Concernant le rôle fongicide, il y a d'abord une reconnaissance et une adhésion des conidies qui semble être sous la dépendance de certains facteurs du complément (notamment C3) et de récepteurs lectiniques pour le mannose et le fucose (18). Ensuite, une internalisation active par les macrophages (phagocytoses) assure l'élimination des spores. Malgré une inhalation continue, la clairance assurée par la première barrière de défense du système immunitaire inné empêche le passage à une forme invasive (5).

Concernant l'activation du système immunitaire, la présence de ligands spécifiques sur le champignon active les récepteurs TLR (toll like receptor) 2 et 4 à la surface des macrophages

et des cellules dendritiques, ce qui engendre la production de cytokines telles que le TNF- α (Tumor Necrosis Factor α) et l'interleukine 1- β , à l'origine de la réponse inflammatoire (19).

Une altération du tapis muco-ciliaire (tabagisme, mucoviscidose, grippe...) facilite la colonisation en profondeur de l'arbre respiratoire et augmente le pouvoir d'adhérence des spores. S'il y a une anomalie de la phagocytose, les spores subissent un processus de germination qui donne naissance à des filaments mycéliens.

Ce sont alors les PNN qui assurent l'élimination des formes filamenteuses aspergillaires, associés aux plaquettes activées et l'immunité adaptative. Les PNN prennent en charge les filaments par un phénomène d'endocytose faisant appel à des mécanismes oxydatifs. Si le filament est trop grand il peut mettre en place une mise à mort extracellulaires tel que le NET : neutrophil extracellular traps (20). Les PNN libèrent alors des fibres extracellulaires constituées d'ADN nucléaire et de protéines fongicides. Chez le sujet sain, normalement, on ne doit pas retrouver de colonisation aspergillaire puisque les spores sont éradiquées de façon continue. Cependant une neutropénie aura pour conséquence la prolifération de formes filamenteuses à l'origine du développement de la maladie invasive.

Ainsi, l'altération du tapis mucociliaire accroît la pénétration et l'adhérence des spores. Le déficit macrophagique permet la colonisation par les formes filamenteuses qui doivent être normalement prises en charge par les PNN et les lymphocytes. Tout déficit qualitatif et/ou quantitatif de ces derniers altère la barrière défensive protégeant du stade invasif.

C'est le déficit surtout quantitatif en PNN lié à la chimiothérapie aplasante qui explique le risque accru d'aspergillose invasive chez les patients d'hématologie.

1.4. LES DIFFERENTES FORMES CLINIQUES DE L'ASPERGILLOSE PULMONAIRE.

Les aspergillus sont des champignons omniprésents dans notre environnement quotidien. Bien qu'ils n'engendrent que rarement des pathologies chez l'Homme sain (cf Pathogenèse page 19), on peut retrouver des tableaux cliniques différents qui dépendent du terrain sur lequel elles se développent. Les aspergilloses peuvent ainsi être classées en 3 grandes catégories représentées sur la figure ci-dessous. Les aspergilloses localisées que l'on retrouve chez les patients immunocompétents, les aspergilloses allergiques chez les patients ayant une exacerbation de leur réponse immunitaire et pour finir les aspergilloses invasives chez les patients présentant un déficit de l'immunité (21).

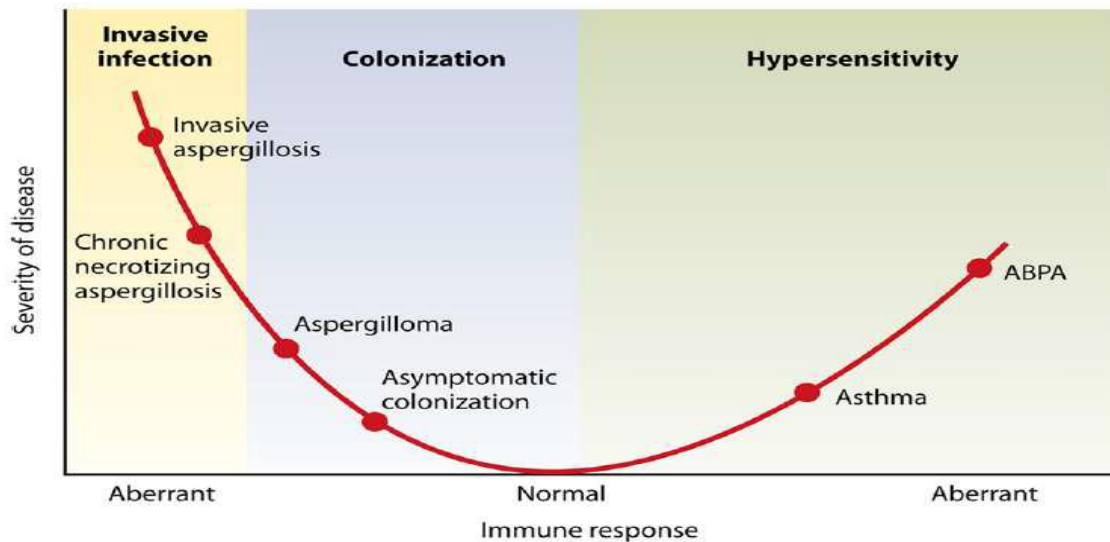


Figure 8 : Expression clinique de l'aspergillose en fonction de la réponse immunitaire (5).

1.4.1. LES ASPERGILLOSES LOCALISEES

1.4.1.1. L'ASPERGILLOME

L'aspergillome résulte de la colonisation d'une cavité préformée, le plus souvent secondaire à une tuberculose ou une sarcoïdose, ayant perdu ses défenses phagocytaires. Un amas de mycélium, appelé balle fongique ou truffe aspergillaire, envahit toute la cavité en laissant un espace clair au niveau du sommet. Au niveau de la clinique on retrouve : toux, expectoration, fièvre résistante aux antibiotiques, asthénie et amaigrissement. La sécrétion d'une toxine nécrosante (la gliotoxine) est responsable d'hémoptysies récidivantes, parfois cataclysmiques. Ce pouvoir nécrosant du champignon et sa localisation peut menacer le pronostic vital.

1.4.1.2. LES AUTRES FORMES LOCALISEES

En général de pronostic favorable, elles peuvent se produire à différents niveaux :

- Au niveau des sinus : fréquemment d'origine dentaire, elle peut évoluer en aspergillose invasive, notamment loco-régionale (sinus para-nasaux, orbites, cerveau) chez le patient neutropénique ou sous corticothérapie.
- Au niveau bronchique : en particulier chez les enfants atteints de mucoviscidose.
- Au niveau pleural : soit par contiguïté à un point de départ pulmonaire ; soit suite à un drainage ou à un acte chirurgical.

Dans des contextes d'immunodépression la surinfection broncho-pulmonaire chronique peut évoluer progressivement vers une nécrose parenchymateuse locale, d'où le terme

d'aspergillose chronique nécrosante, ou aspergillose semi-invasive. Le diagnostic associe des signes cliniques locaux (toux, dyspnée, douleur thoracique, hémoptysie) et généraux (fièvre, altération de l'état général), des signes radiologiques, et des arguments biologiques (mycologie et sérologie positives). Le pronostic peut être péjoratif en fonction du terrain, mais l'évolution est chronique (sur plusieurs mois) et généralement sans invasion vasculaire ni dissémination à distance, contrairement à l'aspergillose invasive.

1.4.2. LES ASPERGILLOSES IMMUNO-ALLERGIQUES

Le champignon filamenteux se comporte comme un allergène et peut entraîner quatre tableaux principaux.

L'aspergillose broncho-pulmonaire allergique (ABPA ou maladie de Hinson-Pepys) qui se développe le plus souvent sur un terrain propice : asthme, atopie, ou mucoviscidose par exemple. Il s'agit d'une réponse immunitaire locale à une colonisation trachéo-bronchique aspergillaire chronique. Le diagnostic repose sur l'association d'une dyspnée fébrile avec infiltrats pulmonaires et de signes biologiques de réaction d'hypersensibilité immédiate (hyperéosinophilie sanguine) et semi-retardée (synthèse d'anticorps précipitants anti-aspergillaires et augmentation des titres des anticorps réaginique spécifiques : immunoglobuline E (IgE), immunoglobuline A (IgA) et immunoglobuline G (IgG).

L'asthme aspergillaire se traduit par un asthme (sans infection pulmonaire) qui survient et s'aggrave dans des conditions de forte exposition aux spores aspergillaires. Il est accompagné d'une hyperéosinophilie sanguine et d'une augmentation des IgE spécifiques anti-aspergillaires, mais sans précipitines.

L'alvéolite allergique extrinsèque est une alvéolite lymphocytaire provoquée par l'inhalation massive et répétée de spores fongiques chez des sujets non atopiques. L'exposition est essentiellement liée à des risques professionnels (manipulation de grain ou de foin moisi), et l'affection dite « poumon du fermier » en est l'exemple type. Cette atteinte évolue avec des épisodes de toux, dyspnée, fièvre, et râles crépitants pulmonaires à chaque exposition à l'allergène. La répétition des accès peut conduire à la chronicité avec un tableau d'insuffisance respiratoire chronique par fibrose interstitielle, ou à la bronchite chronique. La détection de précipitines en l'absence de tout terrain atopique contribue au diagnostic.

La sinusite fongique allergique quant à elle survient habituellement chez des sujets jeunes et associe sinusite persistante, obstruction nasale, polype nasal et hyperéosinophilie sanguine. Les champignons les plus souvent incriminés appartiennent au genre *Aspergillus*, mais d'autres moisissures peuvent également être en cause.

1.4.3. L'ASPERGILLOSE PULMONAIRE INVASIVE (API)

Cette forme clinique est de très mauvais pronostic. Le facteur majeur favorisant est la neutropénie profonde et prolongée (PNN inférieurs à 0.5 G/l pendant plus de 10 jours), mais d'autres immunosuppressions profondes thérapeutiques notamment une corticothérapie prolongée à forte dose (posologie > 0.3 mg/kg/j équivalent prednisone pendant plus de 3 semaines) peuvent favoriser une API. Les nouveaux traitements immunosuppresseurs tels que les anti-TNF sont également des facteurs favorisant l'API.

Ainsi, plusieurs catégories de patients sont considérées à haut risque : les patients atteints d'hémopathie maligne, les transplantés de cellules souches hématopoïétiques (CSH) et d'organes solides mais aussi les patients sous corticothérapie et/ou chimiothérapie prolongées et les patients atteints de déficit immunitaire congénital.

L'examen clinique peut retrouver : toux, dyspnée, hypoxie, hémoptysies et douleurs thoraciques.

L'API est caractérisée par une évolution rapidement péjorative, du fait de l'envahissement local avec nécrose mais aussi de l'invasion des capillaires permettant une diffusion hématogène de l'infection. Lors de l'API il y a une libération dans la circulation sanguine d'éléments fongiques tels que le GM et le BDG qui sont deux marqueurs utilisés dans le diagnostic de cette forme clinique.

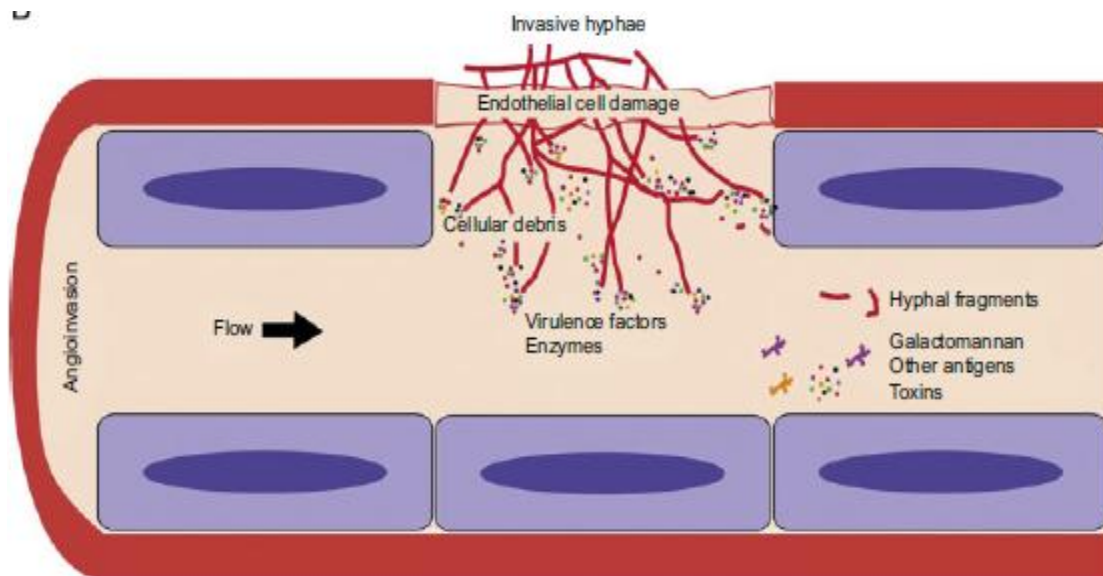


Figure 9 : Invasion capillaire et hématogène, avec dissémination des filaments mycéliens, du galactomannane et autres molécules (11).

L'API reste de diagnostic difficile, l'évoquer avec certitude n'est pas évident, il a donc été établi différents degrés de diagnostic : "possible", "probable" ou "prouvé" en fonction des arguments épidémiologiques, cliniques, radiologiques et biologiques dont on dispose.

Les critères de classification ont été élaborés par un groupe de travail international composé de membres de l'EORTC et du MSG et ont été publiés en 2002 puis révisés en 2008. Il faut noter que ces critères ne sont pas adaptés à toutes les populations pouvant développer des API, notamment les patients des soins intensifs qui sont exclus de cette classification (4).

Tableau I: Critères de classification des infections aspergillaires invasives selon les critères de l'EORTC /MSG.

Critères d'hôtes	Critères cliniques	Critères mycologiques
-Neutropénie < 500/mm ³ pendant plus de 10 jours.	Infection pulmonaire = 1 des 3 signes suivants au scanner:	→ Probable Examen direct ou culture positive dans: crachats, LBA, brosse...
-Allogreffes de CSH.	- Lésion dense, bien limitée, avec ou sans halo.	Tests indirects :
-Corticoïdes > 0.3 mg/kg/j pendant plus de 3 semaines.	- Croissant gazeux.	Antigène galactomannane dans le sérum, plasma, LBA, LCR et/ou le dosage du BDG sérique.
-Autres immunosuppresseurs dans les 90 j avant (ciclosporine, anti TNF, Anticorps monoclonaux...)	- Cavité.	→ Prouvé Histologie et/ou culture sur site stérile ex : Biopsie pulmonaire.
-Déficit immunitaire constitutionnel		

De façon générale, l'association d'un critère d'hôte à un critère clinique ou mycologique fait de l'API une infection fongique invasive possible.

L'association d'un critère d'hôte à un critère clinique et mycologique fait de l'API une infection fongique invasive probable.

Si le critère mycologique (culture et/ou histologie) provient d'un site profond normalement stérile, on classe l'API en une infection fongique invasive prouvée.

Cette classification est élaborée pour toutes les infections fongiques invasives. Elle permet de s'accorder internationalement sur le niveau de preuve des infections et de faciliter la prise en charge thérapeutique.



L'aspergillose est due dans 90% des cas à *Aspergillus fumigatus* qui possède des facteurs de virulence particuliers. Elle se présente sous trois formes cliniques dont l'API est la plus grave car de très mauvais pronostic. L'API se développe sur des terrains d'immunodépressions qui favorisent l'invasion du champignon. Ainsi le patient d'hématologie est une cible privilégiée.

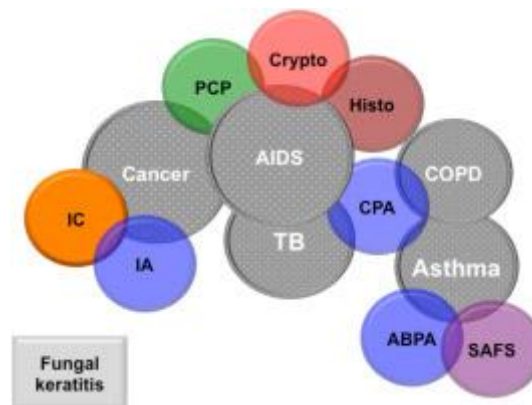
2. EPIDEMIOLOGIE DE L'ASPERGILLOSE

2.1. EPIDEMIOLOGIE MONDIALE

Les infections fongiques sont des problèmes d'ordre mondial. Globalement, plus de 300 millions de personnes de tous âges souffrent d'une infection fongique grave chaque année. Parmi ceux-ci, il est estimé que plus de 1,35 millions des personnes vont en mourir. En comparaison, les décès dus au paludisme et la tuberculose sont de 0,6 millions et 1,54 millions respectivement (22).

Certaines maladies fongiques sont aiguës et graves comme la cryptococcose méningée, d'autres sont récurrentes comme les vaginites à *Candida* et d'autres maladies sont chroniques comme l'aspergillose pulmonaire chronique.

La « Global Action Fund for Fungal Infections » : GAFFI, a pour mission de combattre les affections d'origine fongique à travers le monde. Elle cible les infections fongiques les plus graves qui se développent le plus souvent sur des terrains à risques tels que le SIDA (syndrome d'immunodéficience humaine acquise), la tuberculose ou encore les hémopathies.



(ABPA : aspergillose broncho-pulmonaire allergique ; AIDS : SIDA ; COPD : BPCO : broncho-pneumopathie chronique obstructive; CPA : aspergillose pulmonaire chronique ; Crypto : cryptococcose ; Histo : histoplasmose ; IA : aspergillose invasive ; IC : candidose invasive ; PCP : pneumocystose ; SAFS : asthme aspergillaire sévère; TB : tuberculose)

Figure 10 : Répartition des infections fongiques en fonction de leurs populations cibles (22).

Ainsi des estimations des infections fongiques mondiales dans 33 pays ont pu être réalisées, représentant 50% de la population mondiale.

En ce qui concerne l'aspergillose, l'aspergillose pulmonaire chronique est la forme clinique la plus répandue dans le monde.

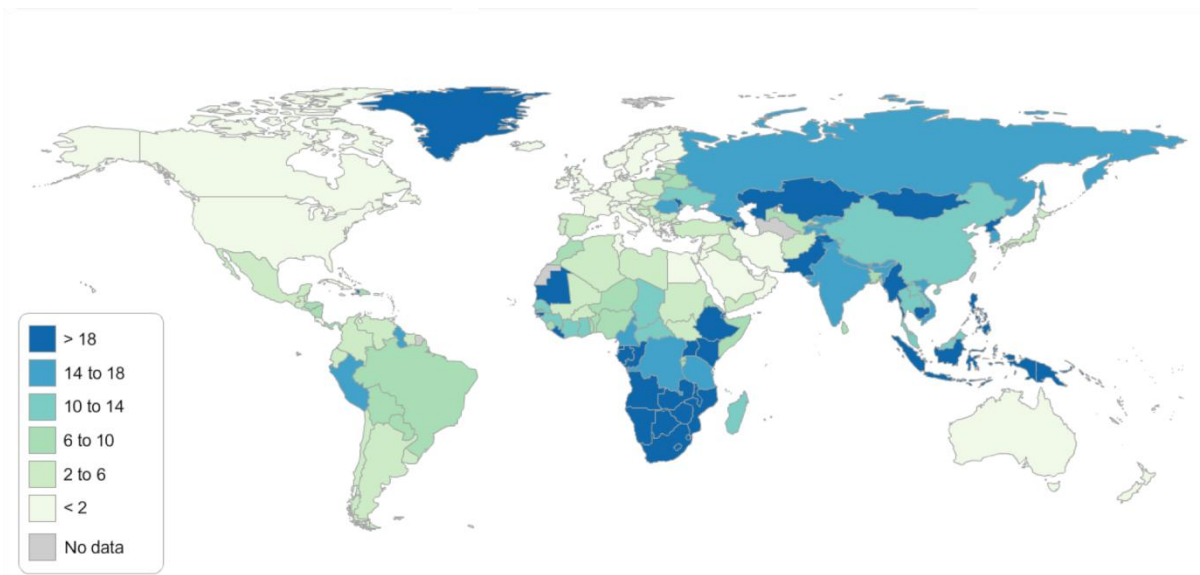


Figure 11 : Répartition du taux de prévalence par an de l'aspergillose pulmonaire chronique dans le monde (22).

Cependant le taux de létalité lié à l'aspergillose pulmonaire invasive reste supérieur aux autres formes cliniques de l'aspergillose.

Tableau II: Impact des infections fongiques aspergillaires dans le monde (22) :

Infection fongique	Taux de létalité	Décès estimés	Commentaires
Aspergillose invasive	~50% (dans les pays développés si elle est traitée)	>100.000	Manque de nombreuses données diagnostiques à l'échelle mondiale
Aspergillose pulmonaire chronique	~15% (dans les pays développés)	>450.000	Sous diagnostiqué et masqué par la tuberculose
Aspergillose allergique : Asthme	<1% (peu de donnée)	~100.000 de décès par asthme dont 50% en relation avec l'asthme aspergillaire.	Donnés incertaines

L'aspergillose pulmonaire invasive est un problème majeur dans les infections fongiques. Des réseaux de surveillance des IFI ont été mis en place tels que SAIF (Surveillance des Aspergilloses Invasives en France) et RESSIF (RESeau de Surveillance des Infections Fongiques).

SAIF est un réseau ponctuel de surveillance qui a eu lieu sur la période de 2005 à 2007 concernant 12 CHU en France (23). Il a inclus 424 cas d'AI prouvées ou probables selon les critères EORTC/MSG de 2002.

RESSIF est un réseau de surveillance Français qui s'appuie sur un ensemble de laboratoires, au nombre de 25 en 2014 (dont celui du CHU de Nantes). Ces laboratoires ont souhaité participer de façon active et pérenne à la surveillance des infections fongiques invasives en France. Ils déclarent de façon exhaustive tous les cas de mycoses invasives prouvées et probables diagnostiqués dans leurs centres grâce à un serveur sécurisé dédié. Ce réseau est toujours en place de nos jours.

Ainsi on peut mettre en avant que l'aspergillose invasive est la 3^{ème} infection fongique invasive déclarée dans le réseau RESSIF (24,25).

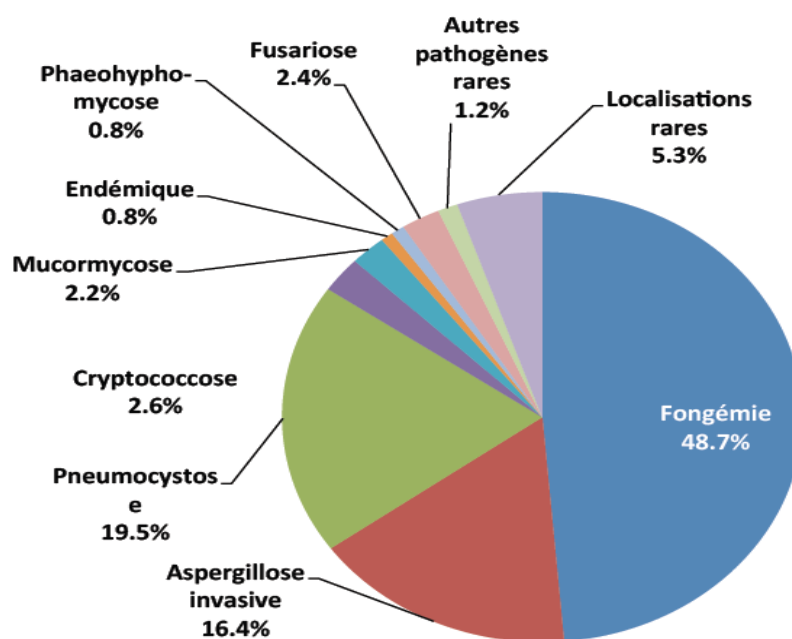


Figure 12 : Répartition des infections fongiques invasives en France, 2012-2013-2014 (25).

Ces surveillances ont permis également de mettre en avant des populations à risque et le secteur de l'hématologie est particulièrement touché. Trois grands groupes ressortent: les patients leucémiques, les patients allogreffés de cellules souches et les patients atteints de syndrome lymphoprolifératif (notamment de lymphomes). Ces derniers représentent un nouveau groupe à risque émergent.

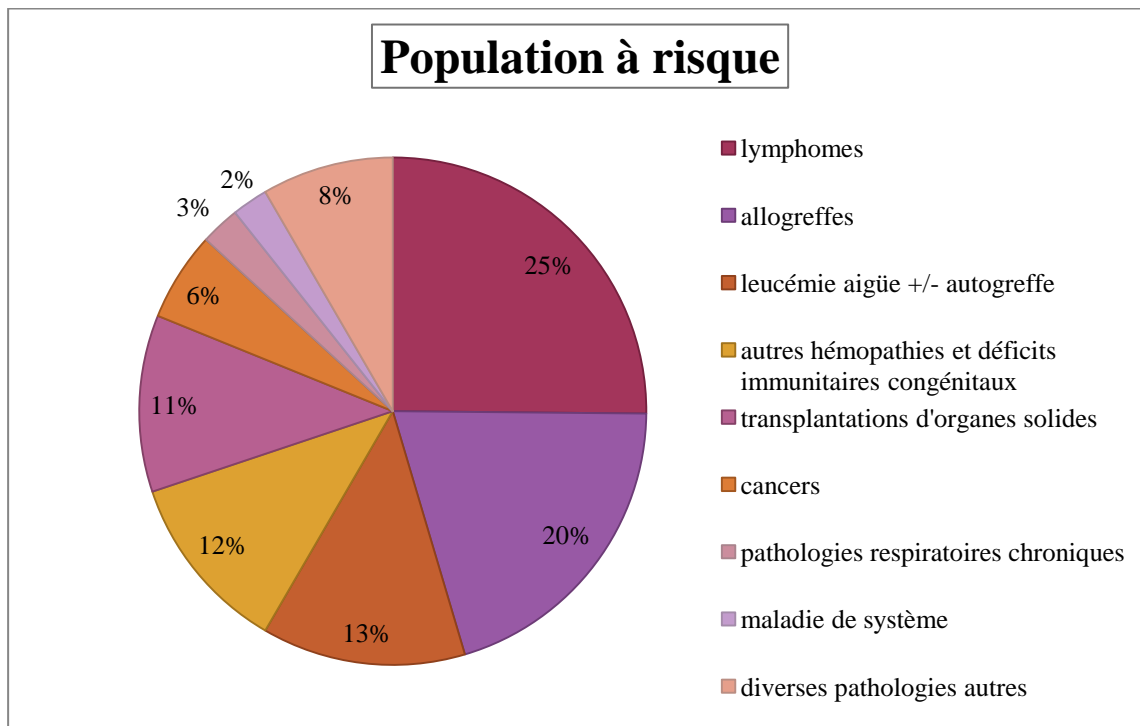


Figure 13 : Répartition des populations à risque d'infection fongique, étude RESSIF(25).

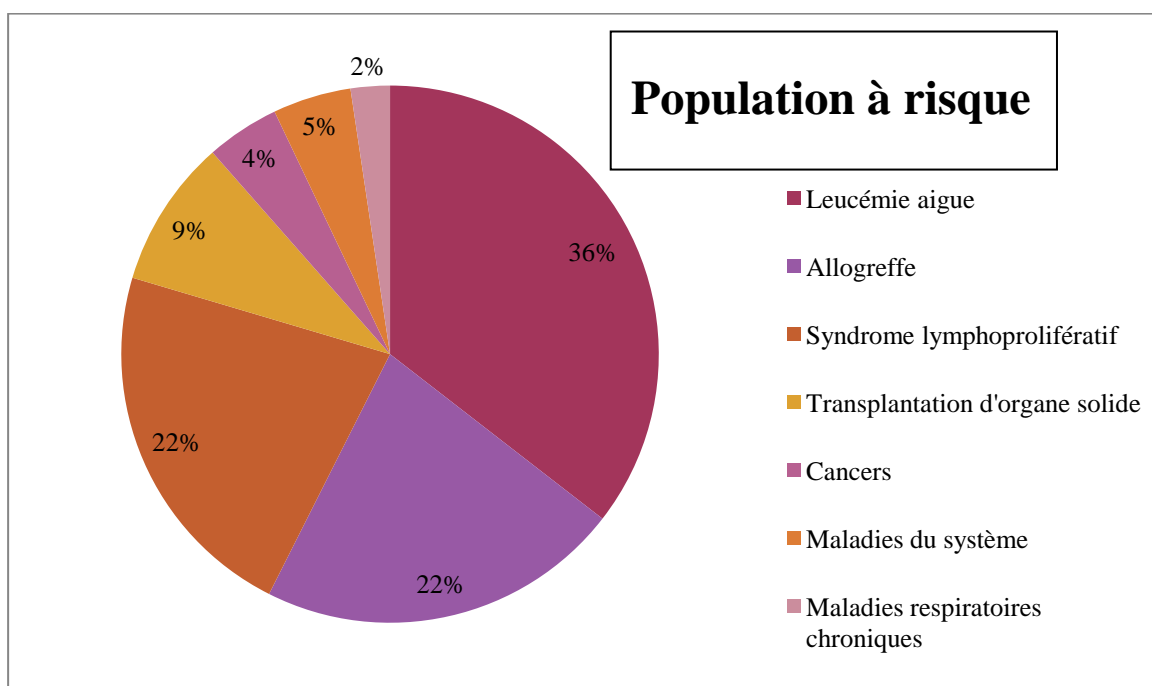


Figure 14: Répartition des populations à risque d'infection fongique, étude SAIF (23).

Selon les données RESSIF, les aspergillus de la section *Fumigati* sont isolés en majorité (79,8% des cas où une culture a été réalisée).

Il a été constaté que la répartition des facteurs de risque différait selon que l'espèce isolée était *A. fumigatus* ou une autre espèce. Mais des données complémentaires sont nécessaires pour savoir s'il s'agit d'une réelle différence ou d'un simple biais d'interprétation des résultats de la culture.

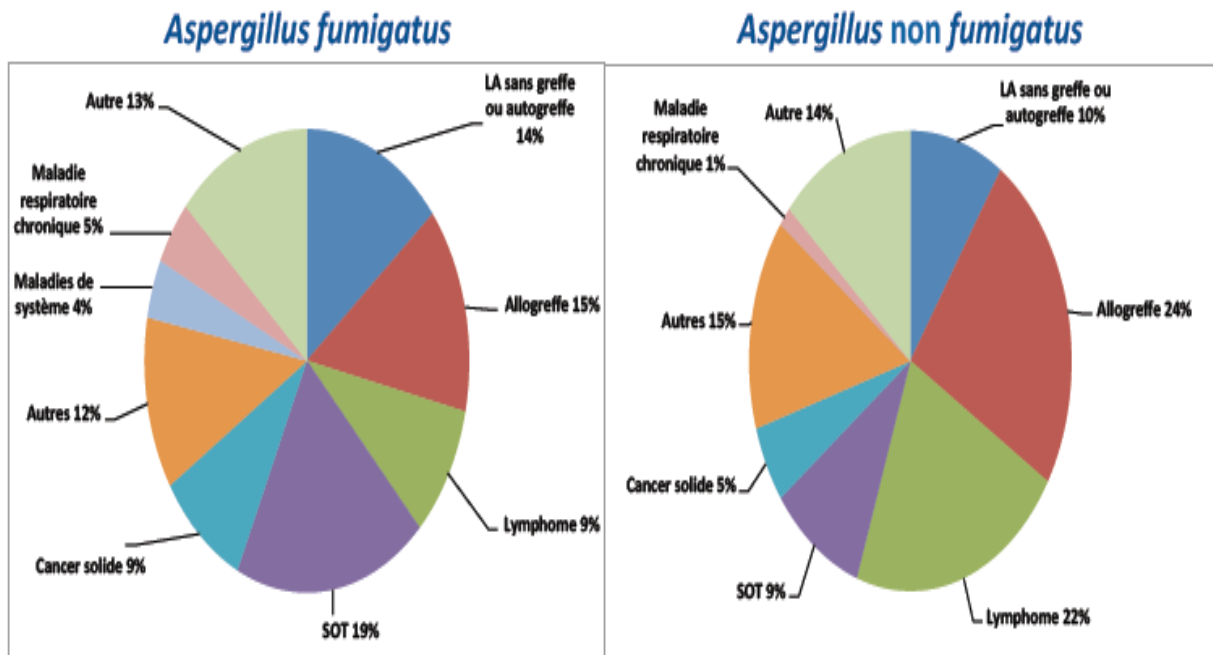


Figure 15 : L'espèce aspergillaire en fonction des facteurs de risque (25).

Des études de survie ont pu être menées par le biais de RESSIF, notamment en fonction des terrains à risque. Par exemple les patients atteints de lymphome développant une AI, ont une meilleure survie que les patients atteints d'autres hémopathies.

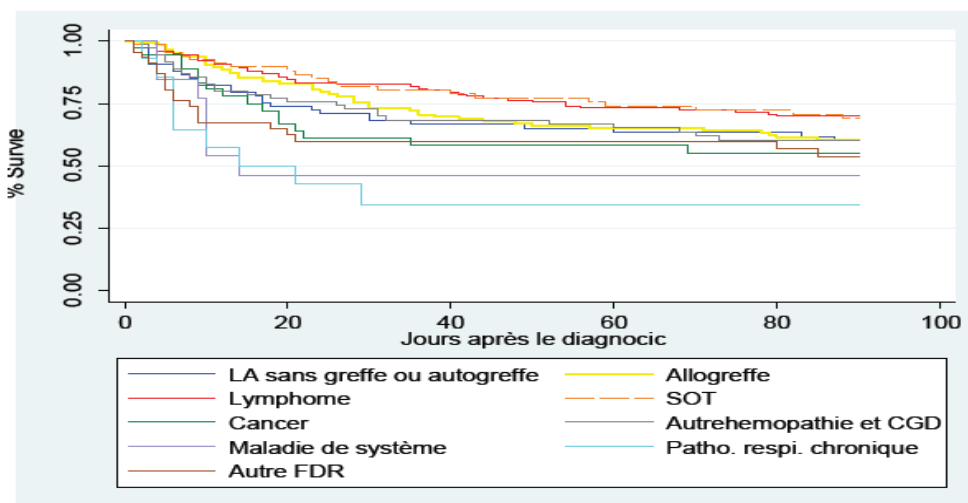


Figure 16 : Comparaison des courbes de survie en fonction du facteur de risque identifié (25).

☞ Les infections fongiques sont un réel problème de santé publique. L'AI est la 3^{ème} cause d'infection fongique grave en France, après les candidémies et la pneumocystose. Dans le secteur de l'hématologie trois populations sont concernées : les patients leucémiques, les patients allogreffés de cellules souches et les patients atteints de syndrome lymphoprolifératif.

3. FACTEURS DE RISQUES DE L'ASPERGILLOSE EN HEMATOLOGIE

Le secteur de l'hématologie est celui le plus touché par l'API de par la population qu'il héberge. Cette population est la cible des AI pour différents facteurs de risques.

Il existe un risque initial lié à l'immunosuppression associée à l'hémopathie en elle-même. Cette dernière peut engendrer des facteurs de risques d'apparition d'API tels qu'une aplasie médullaire, une myélodysplasie, une neutropénie...

Pendant la prise en charge thérapeutique on retrouve trois facteurs de risques importants : la neutropénie, la corticothérapie et l'immunosuppression liées aux molécules immunosuppressives. Ces facteurs font d'ailleurs partie des critères d'hôtes qui permettent de classer les aspergilloses en différents degrés de certitude selon les critères de l'EORTC/MSG comme évoqué précédemment.

La neutropénie concerne surtout les patients atteints de leucémie aigüe, en phase d'induction-consolidation-intensification thérapeutique ou en phase d'aplasie dans un contexte de greffe de cellule souche hématopoïétique. Comme décrit lors de la pathogenèse, une neutropénie longue et profonde (PNN inférieurs à 0.5 G/l pendant plus de 10 jours) est favorable au développement d'infections fongiques notamment aspergillaires.

Au cours de la greffe de cellules souches hématopoïétiques, deux périodes sont considérées comme particulièrement à risque :

- la période post-greffe immédiate exposant à une neutropénie profonde, due au conditionnement.
- la période plus tardive (généralement entre les 50^{ème} et 80^{ème} jours) correspondant au risque de réaction du greffon contre l'hôte (GVH) qui nécessite une corticothérapie à forte dose (> 0.3 mg/kg/j équivalent prednisone pendant plus de 3 semaines) en prophylaxie.

En effet les glucocorticoïdes diminuent l'immunité cellulaire. Ils agissent par inhibition de gènes codant pour des cytokines (notamment l'interleukine 2). Une production diminuée de cytokines a pour conséquence la réduction de la prolifération des lymphocytes T. Les glucocorticoïdes diminuent également l'immunité humorale. Comme les lymphocytes T, les lymphocytes B expriment également de plus faibles quantités d'interleukine 2 et de récepteurs à cette dernière. L'expansion clonale des lymphocytes B est réduite et en conséquence la synthèse d'immunoglobulines est diminuée.

De plus la corticothérapie diminue la capacité des macrophages à éliminer les conidies et altère la production de réactifs oxygénés nécessaires à la destruction du champignon (5).

Le risque de développer une aspergillose invasive est aussi associé à l'évolution des pratiques d'allogreffe de ces dernières années, avec des greffes chez des patients plus âgés, ayant plus de comorbidités associées.

L'utilisation de nouvelles molécules immunosuppressives joue un rôle dans le risque d'apparition d'IFI notamment lors des syndromes de lymphoprolifération. Par exemple les

anticorps monoclonaux, tels que l'alemtuzumab (anti-CD52) ou le rituximab (anti-CD20) car ils ont pour cibles des cellules effectrices de l'immunité anti-infectieuse (26,27). De plus certaines molécules qui ont pour but de détruire les cellules responsables de l'hémopathie, peuvent par un manque de spécificité attaquer des cellules saines de l'immunité, c'est le cas du méthotrexate ou des analogues des purines (Fludarabine, Cladribine) utilisés dans le traitement des leucémies lymphoïdes chroniques (LLC) par exemple. Des molécules immunomodulatrices telles que la ciclosporine ou le tacrolimus utilisé dans la lutte contre la réaction du greffon contre l'hôte au même titre que les corticoïdes entraînent une immunodépression. Des antagonistes du TNF α causent également des immunodépressions profondes majorant le risque infectieux (28).

Les conditions environnementales sont un autre facteur de risques important. Les réservoirs de spores aspergillaires dans le milieu hospitalier sont multiples : système de ventilation, faux-plafonds, boîte de store, plantes d'ornement... Il est donc important d'isoler les patients de ces sources de contamination. L'isolement se fera en fonction du niveau d'immunodépression du patient. Par exemple plus la neutropénie sera longue plus l'isolement protecteur sera élevé avec un système de traitement de l'eau et de l'air. De même lors de la phase initiale d'une allogreffe de CSH ou lors d'un GVH aigüe qui sont des situations engendrant des immunodépressions sévères (29).



Les facteurs de risque dans le secteur de l'hématologie sont les immunodépressions, engendrées par l'hémopathie en elle-même et la prise en charge thérapeutique, associées aux conditions environnementales.

4. LE DIAGNOSTIC DE L'ASPERGILLOSE INVASIVE

Le diagnostic doit être évoqué chez tout patient immunodéprimé présentant une fièvre résistante depuis plus de 48 heures à une antibiothérapie à large spectre. La documentation du diagnostic se fait par l'utilisation précoce du scanner thoracique et par les recherches mycologiques (cultures et biomarqueurs), sans qu'aucun de ces éléments ne permette à lui seul le diagnostic.

4.1. DIAGNOSTIC CLINIQUE

La clinique se caractérise le plus souvent par une fièvre persistante sous antibiotique, une toux, une dyspnée, une hypoxie, une hémoptysie et des douleurs thoraciques (Cf chapitre aspergillose pulmonaire invasive page 23).

4.2. DIAGNOSTIC RADIOLOGIQUE

Les lésions recherchées traduisent la physiopathologie de la maladie. Elles peuvent être simples ou multiples. Le scanner thoracique est préféré à la radiographie pulmonaire car plus sensible pour la détection des API précoces (30). Il est indiqué chez le patient neutropénique depuis 10 à 14 jours présentant une fièvre résistante aux antibiotiques et une symptomatologie pulmonaire.

Utilisé précocement il permet l'observation précoce d'un infiltrat pulmonaire associé au signe du halo. Il s'agit d'un nodule (> 1 cm en règle générale, correspondant au foyer infectieux) entouré par une plage en verre dépoli correspondant à la limite entre les zones de thrombose et d'hémorragie (extravasation d'exsudat hémorragique péri-lésionnel). Cette image reste fugace, visible quelques jours pendant la phase d'aplasie. Chez le patient immunodéprimé, l'API est la principale cause de signe du halo. Cependant, il peut être observé dans d'autres situations pathologiques comme dans les mycoses non aspergillaires (candidoses, coccidiomycoses), la tuberculose et des causes néoplasiques (adénocarcinome pulmonaire, carcinome bronchiolo-alvéolaire...). La sensibilité de ce signe reste cependant élevée essentiellement chez les patients neutropéniques (31).

On observe plus tardivement, le signe du croissant gazeux. Il s'agit d'un nodule contenant une poche d'air en forme de croissant entourant la zone de nécrose. Il s'agit d'un séquestre parenchymateux qui correspond à la détersion du foyer infectieux par la neutrophilie de sortie d'aplasie. Ce signe n'est quasiment jamais observé en dehors des patients hématologiques même si l'évolution naturelle des foyers de condensation est la nécrose et l'excavation. Le signe du croissant gazeux apparaît tardivement avec la fin de la neutropénie il ne peut donc pas être utilisé pour le diagnostic précoce d'une API.

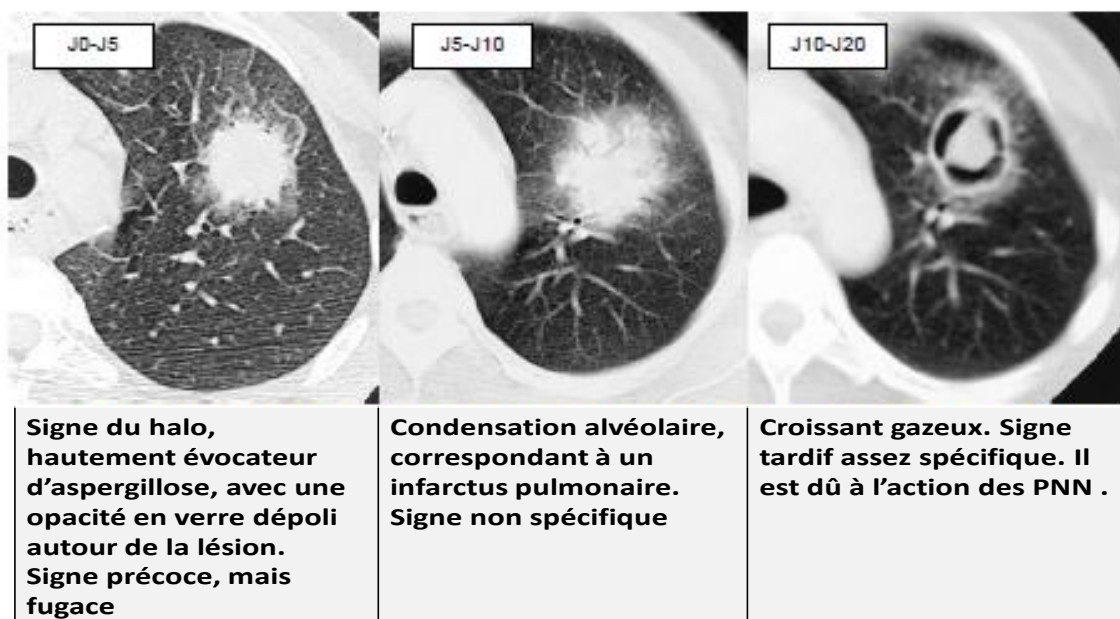


Figure 17 : Images de tomodynamométrie thoracique observée lors d'une API (31,32).

Compte tenu du contexte immunologique des patients d'hématologie, le diagnostic biologique d'une aspergillose invasive ne peut se faire qu'à l'aide de méthode de diagnostic direct. En effet leur immunodépression empêche une réaction immunologique normale avec synthèse d'anticorps, ce qui rend le diagnostic indirect ininterprétable.

Le diagnostic direct peut être effectué de deux façons :

-mise en évidence du champignon directement dans les échantillons biologiques appropriés (culture et microscopie).

-mise en évidence du champignon par l'intermédiaire de ses antigènes de paroi (GM ou BDG) ou ses composants génomiques (diagnostic moléculaire par amplification du génome fongique).

4.3.1. DIAGNOSTIC MYCOLOGIQUE

Le diagnostic mycologique peut se faire sur différents types de prélèvements :

- Sur sang total même si les hémocultures sont rarement positives en cas d'AI. Néanmoins, elles ont un intérêt pour le diagnostic différentiel des autres causes d'IFI chez les patients profondément immunodéprimés (candidose, fusariose, mucormycose) ainsi que des autres causes d'infections (33).
- Sur des prélèvements respiratoires, notamment le lavage broncho-alvéolaire (LBA) qui est le prélèvement de choix. Il reste cependant un acte invasif qui n'est pas systématiquement réalisé si la clinique, la cinétique de l'antigénémie aspergillaire et les images scannographiques sont d'un bon apport diagnostique.
- Sur le liquide céphalo-rachidien (LCR) mais les cultures du LCR sont exceptionnellement positives (34). Une recherche mycologique sur le LCR est néanmoins indispensable en cas de signes neurologiques chez le patient.

L'examen direct est la première étape du diagnostic mycologique. Il ne permet pas un diagnostic de genre ou d'espèce car de nombreux champignons filamenteux peuvent donner le même aspect. Cependant l'identification de filaments évocateurs d'un *Aspergillus* (filament septé et ramifié avec un angle à 45°) sera un argument décisif pour avancer un diagnostic et décider de la mise en route du traitement.

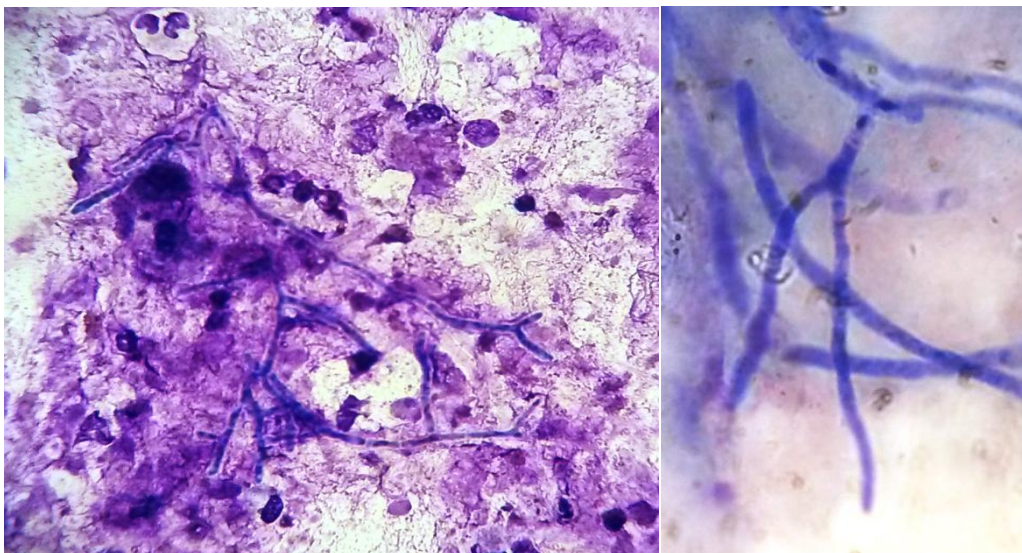


Figure 18 : Filaments mycéliens d'*Aspergillus fumigatus* dans un LBA. (Images personnelles).

Attention : Cet aspect n'est cependant pas spécifique d'*Aspergillus spp.* Il peut notamment être retrouvé en présence de : *Scedosporium spp.*, *Fusarium spp.*, *Scopulariopsis spp.* et autres champignons.

La culture est la deuxième étape importante du diagnostic. En cas d'isolement d'un *Aspergillus spp.* issu d'un site normalement stérile, la culture apporte la preuve de l'infection. De plus, elle permet le diagnostic d'espèce et ensuite la réalisation d'un antifongogramme. En routine pour réaliser l'antifongogramme à partir de la culture, on utilise essentiellement des E-tests correspondant à des bandelettes imprégnées de l'antifongique à tester avec un gradient de concentration. Cela permet de déterminer les concentrations minimales inhibitrices afin d'évaluer la sensibilité ou pas du champignon à l'antifongique.

La culture est de meilleure sensibilité que l'examen direct mais on peut noter que cette dernière dépend du contexte clinique. En effet, dans les aspergilloses broncho-invasives la culture est positive dans 83% des cas tandis que dans les aspergilloses angioinvasives elle le sera que dans 18% des cas. Ceci est facilement expliqué par la physiopathologie de ces formes. Dans les formes broncho-invasives, le champignon se développe plus superficiellement au niveau de la muqueuse bronchique alors que dans les formes angioinvasives celui-ci a déjà envahi la circulation sanguine (35).

Il est à noter que les cultures peuvent être faussement positives lors d'une contamination aérienne par des spores aspergillaires ce qui nécessite une vigilance importante du moment de prélèvement à la mise en culture. De plus un traitement prophylactique antifongique peut empêcher la pousse du champignon.

4.3.2. DIAGNOSTIC HISTOLOGIE

L'analyse d'une biopsie tissulaire est un examen réalisé par les anatomo-pathologistes. Il consiste à mettre en évidence par un examen microscopique la présence du champignon. Le diagnostic de l'aspergillose invasive nécessite donc la mise en évidence de filaments mycéliens évocateurs de filaments aspergillaires dans un échantillon provenant d'un site normalement stérile. C'est un examen qui ne permet pas le diagnostic de genre ni d'espèce et ne permet pas la réalisation d'un antifongigramme.

4.3.3. DIAGNOSTIC IMMUNOLOGIQUE

4.3.3.1. DETECTION DU GALACTOMANNANE

Le GM est un polysaccharide composé d'une chaîne principale constituée de mannoses branchés latéralement par des courtes chaînes de galactoses. Cette structure est présente au niveau de la paroi des champignons et est libérée dans l'organisme lors de la croissance du champignon dans un contexte d'API.

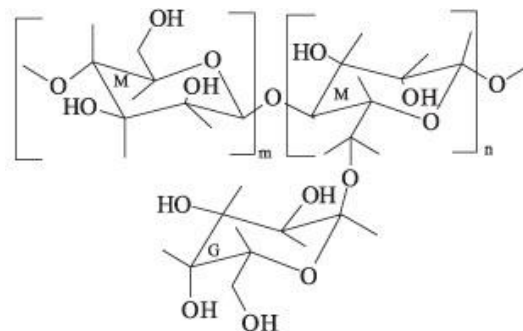


Figure 19 : Structure du galactomannane (36).

Il est dosé par une technique ELISA (Enzyme-Linked Immuno sorbent Assay) utilisant un anticorps monoclonal de rat de type IgM. Le kit « Platelia[®] *Aspergillus* » commercialisé par BioRad[®] est utilisable sur le sérum et le LBA.

Ce test diagnostique n'est validé que chez les patients d'hématologie et le dosage de l'antigène GM est fortement recommandé par les conduites à suivre de l'ECIL (European Conférence on Infections in Leukaemia) (37,38). Il est à noter que la clairance de l'antigène dans le sang est rapide ce qui implique de répéter les dosages fréquemment (39). C'est pour cela qu'il est recommandé de suivre l'antigénémie deux fois par semaine chez les patients à risque d'hématologie.

Les dernières valeurs seuils retenues sont pour le sérum : un seul dosage supérieur à 0.7 ou deux dosages consécutifs supérieurs à 0.5 pour affirmer la positivité du test (à cause des faux positifs éventuels abordés ci-dessous) (40).

Pour le LBA le test est considéré positif si le seuil est supérieur à 0.5 mais ce seuil reste encore à discuter.

Une méta-analyse rapporte les performances du test en fonction de la population étudiée (37). Pour les patients d'hématologie, on retrouve une sensibilité de 70% et une spécificité de 92% dans les cas d'aspergillose invasive prouvée.

Tableau III : Sensibilité et spécificité de l'antigène GM dans les cas d'AI prouvées en fonction de la population étudiée (37).

	Globale	Pathologie hématologiques	Patients greffés de moelle osseuse	Patients transplantés d'organes solides
Sensibilité %	71	70	82	22
Spécificité %	89	92	86	84

Cependant, l'existence de nombreux faux positifs diminue fortement la spécificité de ce test diagnostique tel que :

- Les traitements par certains antibiotiques d'origine fongique : l'association pipéracilline-tazobactam a été incriminée mais une modification probable de la fabrication a fait disparaître ces cas de faux positifs (41). L'ampicilline ou l'association amoxicilline-acide clavulanique sont parfois mises en cause (42).
- Les infections invasives liées à d'autres champignons libérant du GM (ou un antigène proche) dans le sang tel que l'histoplasmosse (118).
- Les perfusions de solutions glucosées (telles que le « Plasma-Lyte ») contenant du gluconate de sodium (43).
- Les transfusions de plasma frais congelé ou de concentrés plaquettaires sur certains types de poches (44).
- Les translocations digestives de GM d'origine alimentaire en cas d'altération des muqueuses rencontrées souvent chez le jeune enfant lors d'alimentation lactée (45).
- Les réactions croisées avec l'acide lipotéichoïque de *Bifidobacterium*.
- Les immunoglobulines polyvalentes contenant du saccharose.

Il existe également des risques de faux négatifs retrouvés :

- Dans les populations non neutropéniques, ceci étant lié à la physiopathologie de la maladie chez ces patients. L'angioinvasion moins marquée chez ces patients n'aboutit pas à un relargage sérique de GM.

- Dans les aspergilloses bronchoinvasives où il n'y a pas de passage de GM entre les compartiments pulmonaire et sanguin (46).
- En cas de prophylaxie ou de traitement antifongique entraînant une diminution de la charge fongique et une progression limitée de la maladie (47).

Vu le risque plus élevé de fausse positivité, ce test possède une valeur prédictive négative (VPN) plus élevée que sa valeur prédictive positive (VPP). On retrouve ainsi une VPP de 72.7% et 73% dans les études de Jarque *et al* et Pazos *et al* respectivement, alors que la VPN est de 96.7% et 98% respectivement (48,49).

L'antigénémie GM est considérée comme un critère diagnostique d'API dans la classification révisée de l'EORTC/MSG (4). Sa positivité doit être interprétée en fonction des facteurs d'hôtes, de la clinique et de l'imagerie. C'est un très bon marqueur dans le secteur hématologique mais les performances (notamment la sensibilité) sont moins intéressantes dans les autres populations (37).

La production de GM serait proportionnelle à la charge fongique dans les tissus et la cinétique des taux sériques présente un intérêt. Le GM indique un mauvais pronostic s'il est initialement élevé et une régression de son taux est corrélée à une meilleure survie des patients (50). En effet une diminution précoce du marqueur dans les deux semaines serait en faveur d'une évolution favorable et vice versa (51). De plus il permet par exemple de distinguer une aggravation d'une API (augmentation de l'antigénémie) d'un syndrome inflammatoire de reconstitution immunitaire (diminution de l'antigénémie), pourtant cliniquement proche (33).

Il a été démontré que le moment d'apparition du GM dans le compartiment sanguin a lieu après le passage de la barrière endothéliale, c'est-à-dire au moment de l'invasion du compartiment sanguin (46). De plus, le GM seul ne traverse pas les barrières entre le compartiment sanguin et le compartiment pulmonaire. Ces deux compartiments sont donc distincts. Cela montre bien que le GM dans le sérum est un bon marqueur d'angioinvasion et qu'il est donc intéressant de rechercher le GM dans ces deux compartiments de façons indépendantes. Le dosage de l'antigène dans le LBA est recommandé depuis peu suite à des études montrant ses bénéfices. D'après Paugam *et al*, la sensibilité du GM dans le LBA comparé à l'examen direct et la culture sont respectivement de 64% contre 29% et 57% (52). La même étude montre une bonne spécificité à 98% faisant de ce test un bon examen de diagnostic chez les patients à risque. Cependant l'étude de Zhang *et al* montre que la détection du GM dans le LBA est plus sensible (85.4% contre 62.4%) et moins spécifique (67.9% contre 93.5%) comparée à la détection dans le sérum (53).

Même si elle n'est pas de pratique courante, la recherche d'antigène GM peut être réalisée sur le LCR dans des contextes particuliers car il existe une synthèse intrathécale de GM lors d'aspergilloses cérébro-spinales. La décroissance des valeurs du GM dans le LCR est de bon pronostic (54).

4.3.3.2. DETECTION D'UNE GLYCOPROTEINE

Un test immuno-chromatographique spécifique d'*Aspergillus spp.* (*Aspergillus* lateral-flowdevice) permet la détection d'une glycoprotéine extracellulaire sécrétée uniquement en phase de croissance directement dans le sérum ou dans le LBA grâce à un anticorps monoclonal: MAb-JF (55,56). Ce test a été inventé par le Professeur THORNTON de l'université d'Exeter UK.

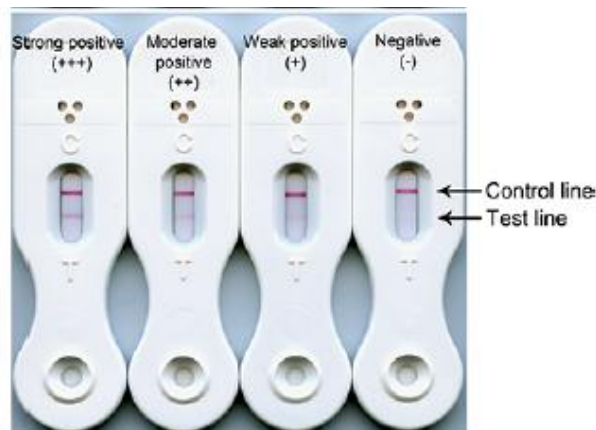


Figure 20 : Test immuno-chromatographique (56).

Les avantages sont surtout techniques : simplicité et rapidité d'exécution. On n'observe pas de faux positifs lié à la contamination par les spores aspergillaires. Les performances sur sérum semblent similaires à celles du GM en termes de sensibilité et de spécificité chez le patient allogreffé de cellules souches (57). Les performances sur LBA montrent une bonne sensibilité et spécificité pour des patients atteints d'AI dans une population atteinte de pathologies hématologiques et de transplantations d'organes solides (58). La limite majeure du test est l'utilisation d'une faible quantité de sérum pouvant être à l'origine de faux négatifs (56). Toutefois, jusqu'à présent les études restent difficiles à commenter compte tenu du faible nombre de patients inclus.

4.3.4. DIAGNOSTIC PAR BIOLOGIE MOLECULAIRE

La biologie moléculaire permet de mettre en évidence la présence d'ADN (Acide DésoxyriboNucléique) fongique au sein de différents prélèvements : le sang (sérum, plasma, sang total), les prélèvements respiratoires (expectorations, aspiration bronchique, LBA) ou encore le liquide céphalo-rachidien.

Elle permet un diagnostic beaucoup plus précoce que la culture fongique cependant ce gain en précocité doit être pondéré par la capacité du laboratoire à répondre aux demandes d'examens car c'est une recherche qui n'est pas réalisée en routine dans tous les laboratoires.

Les cibles mitochondriales et ribosomales sont les plus intéressantes car le nombre élevé de répétitions des gènes est favorable à la sensibilité de la technique moléculaire. Cependant en raison d'un manque de standardisation (diversité des cibles), la PCR (Polymerase Chain Reaction) n'est pas un critère diagnostique actuellement retenu par la classification révisée de l'EORTC/MSK. En effet, si travailler sur sérum et sur un grand volume d'échantillons semble donner de meilleurs résultats, le choix de la cible moléculaire, la technique d'extraction, la technique d'amplification et le type de PCR ne font pas l'unanimité (59).

Tableau IV : Différence de performance de la PCR en temps réel en fonction du volume d'échantillon (59).

	PCR (1 ml)	PCR (100µl)	GM
Sensitivité %	100	76.5	88.2
Spécificité %	96.7	96.7	95.8
VPP %	81	81.3	75
VPN %	100	95.6	98.3

Comme pour le dosage sérique des biomarqueurs on retrouve, lors des techniques de PCR, des faux positifs liés à :

- Une contamination de laboratoire par des spores aspergillaires ou par de l'ADN amplifiée lors d'expériences précédentes.
- Une contamination d'antibiotiques intraveineux par de l'ADN fongique.
- Une translocation digestive d'ADN fongique : un cas de ce type a été démontré chez un patient atteint de GVH digestive avec une mucite importante (60).


La PCR permettrait une détection plus précoce que les marqueurs sériques tels que le BDG, mais sa sensibilité n'est pas supérieure aux biomarqueurs (61–63).

La PCR peut être réalisée sur divers prélèvements respiratoires (LBA, expectorations...). Cependant l'interprétation d'un résultat positif est difficile quant à la distinction entre une infection, une colonisation et une contamination. Récemment, une PCR ciblant le gène codant pour l'hémolysine d'*A. fumigatus* (aspHS) a été mise au point. Le principal intérêt est que ce gène est surexprimé en cas d'AI et l'utilisation d'une telle cible permettrait potentiellement de distinguer les infections véritables des colonisations (63).

De nos jours, grâce au développement de nouveaux outils de diagnostic commercialisés tels que le kit : MycoGENIE® de la société Ademtech, il est possible de détecter à la fois l'ADN d'*A.fumigatus* et l'un des marqueurs génomique de résistance environnementale aux azolés

(TR34/L98H Cyp51A) (64). Avec une spécificité de 90.9% et une sensibilité de 92.6% ce kit pourrait être utilisé pour le diagnostic précoce des AI et optimiser la mise en place d'un traitement antifongique. De plus une PCR multipathogène : Septifast[®] de chez Roche[®] est en cours d'évaluation dans les neutropénies fébriles. Elle est capable de détecter 40 genres et espèces de bactéries et de champignons dont *Aspergillus fumigatus*, elle pourrait donc représenter une nouvelle aide pour un diagnostic précoce (65).

D'autre part une étude portant sur l'intérêt des marqueurs dans le pronostic des AI n'a pas démontré de lien entre l'évolution de la charge fongique (estimée par PCR) dans le sang et le pronostic de l'AI (50). Ce n'est donc pas un marqueur de suivi d'efficacité thérapeutique.

 **Le diagnostic de l'API repose sur plusieurs éléments cliniques, radiologiques et mycologiques. L'examen direct et la culture, bien qu'indispensables pour l'identification et l'antifongogramme, ont une sensibilité plus faible que le dosage du GM. Ce dernier est devenu incontournable dans le diagnostic de l'API. De nouvelles techniques voient le jour (test immuno-chromatographique, PCR) mais restent encore à évaluer.**

5. LE (1-3)-B-D-GLUCANE

Les β -D-glucanes sont des polymères entièrement constitués de D-glucose. Structuellement, ils ont une base (colonne vertébrale) linéaire de D-glucose reliée par des liaisons β (1-3), avec des branches reliées par des liaisons β (1-6) comme sur l'image ci-dessous ou en β (1-4). Plus le polymère est branché plus il est insoluble dans l'eau (66).

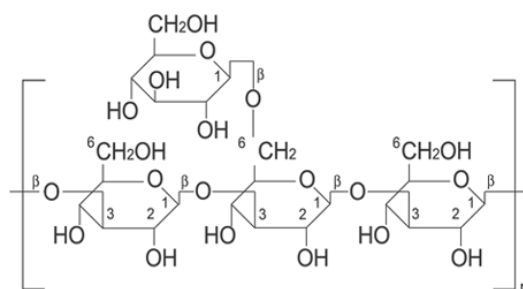


Figure 21 : Molécule de (1-3) β -D-glucane (67).

Diététiquement parlant le BDG se trouve essentiellement dans la cellulose des plantes, le son des céréales et la levure de boulanger. Des produits naturels contenant des β -D-glucanes fongiques ont longtemps été consommés en Chine et au Japon pour leur rôle dans l'amélioration de l'état général, notamment l'orge et l'avoine. Ils joueraient un rôle majeur dans la stimulation de la réponse immunitaire (68).

D'un point de vue mycologique, les β -D-glucanes sont les principaux constituants de l'exosquelette de la paroi des champignons et sont synthétisés par la (1-3)- β -D-glucane synthétase. C'est sur ces composants que se fixent par liaison covalente les autres constituants de la paroi (chitine, mannane, galactomannane,...).

5.1. HISTORIQUE DE DECOUVERTE ET PRINCIPE

En 1956 un laboratoire de biologie marine dans le Massachusetts a observé une réaction de coagulation dans le système sanguin du *Limulus polyphemus* (69). C'est un arthropode marin ressemblant à un crabe ayant une forme de fer à cheval (d'où le surnom de « crabe fer à cheval »).

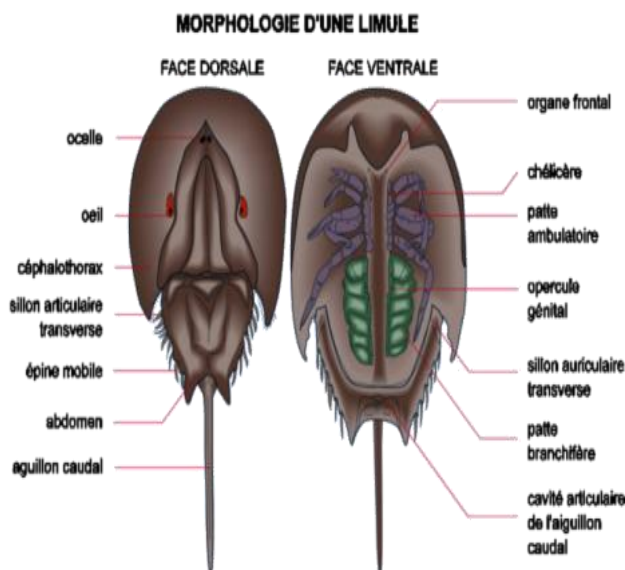


Figure 22 : Photo de *Limulus polyphemus* (70). Figure 23 : Anatomie d'une limule (71).

Cette réaction de coagulation a eu lieu lors de l'injection d'endotoxines bactériennes. Des amebocytes, semblables à une amibe, analogue à un phagocyte, présent dans la circulation sanguine de cet arthropode, contiennent un facteur C. Ce facteur est capable d'amorcer la cascade de coagulation après activation par une endotoxine. Ce facteur C est obtenu en lysant les amebocytes de l'hémolymphe bleue, on parle du lysat d'amebocyte de limule.

Plus tard une seconde pré-enzyme, le facteur G, a été découverte comme étant un facteur capable d'amorcer une deuxième voie de coagulation et ce grâce à une activation par le (1-3)- β -D-glucane. Cette deuxième voie d'activation va être mise à profit dans l'élaboration d'un mécanisme de dosage de cette molécule activatrice.

Le dosage des BDG a d'abord été utilisé dans le domaine de l'industrie alimentaire où il est utilisé comme agent texturant mais surtout pour la détection des toxines bactériennes dans les aliments. La libération de ce dernier lors d'infections fongiques invasives dans la circulation sanguine a donné l'idée d'utiliser cet outil dans un contexte médical. La corrélation entre la concentration de BDG dans le sang et les infections fongiques invasives a été démontrée dans les études de Obayashi *et al* (72,73).

Leur présence chez la plupart des champignons en fait un marqueur panfongique qui n'est donc pas spécifique d'une pathologie fongique invasive en particulier.

Il existe actuellement 4 tests commercialisés. En mai 2004, la FDA (Food and Drug Administration) aux Etats-Unis, a donné son accord pour classer le kit Fungitell[®] de la société CapeCod[®] comme réactif de détection du (1-3) β -D-glucane dans le diagnostic des infections fongiques invasives.

5.2. OUTIL DIAGNOSTIC

Ils composent la paroi de la majorité des champignons responsables de pathologies humaines (dont *Aspergillus spp.*) à l'exception de *Cryptococcus neoformans*, *Blastomyces dermatidis* et des zygomycètes. Ils sont libérés lors d'infection invasive dans la circulation sanguine avec une cinétique et une concentration différentes selon les champignons. Leur libération se fait lors de la destruction du champignon par les cellules de l'immunité.

5.2.1. PRINCIPE DU DOSAGE :

Incorporé dans la paroi cellulaire fongique, le (1-3)- β -D-glucane est dans une structure insoluble. En présence de sang ou de liquide il se transforme en composé soluble dosable (74). La cinétique de transformation en composé soluble dans le milieu liquide lors d'IFI n'est pas encore bien élucidée.

Le dosage dans le sérum est réalisé grâce à des méthodes utilisant la cascade de coagulation du lysat d'amebocyte de limule. Ce lysat subit une modification afin de le rendre exempt de facteur C et inhiber ainsi la voie de coagulation qui en découle. Un pré-traitement du sérum par une solution alcaline sera nécessaire pour permettre l'inactivation des protéases sériques et de leurs inhibiteurs évitant ainsi les faux positifs et négatifs.

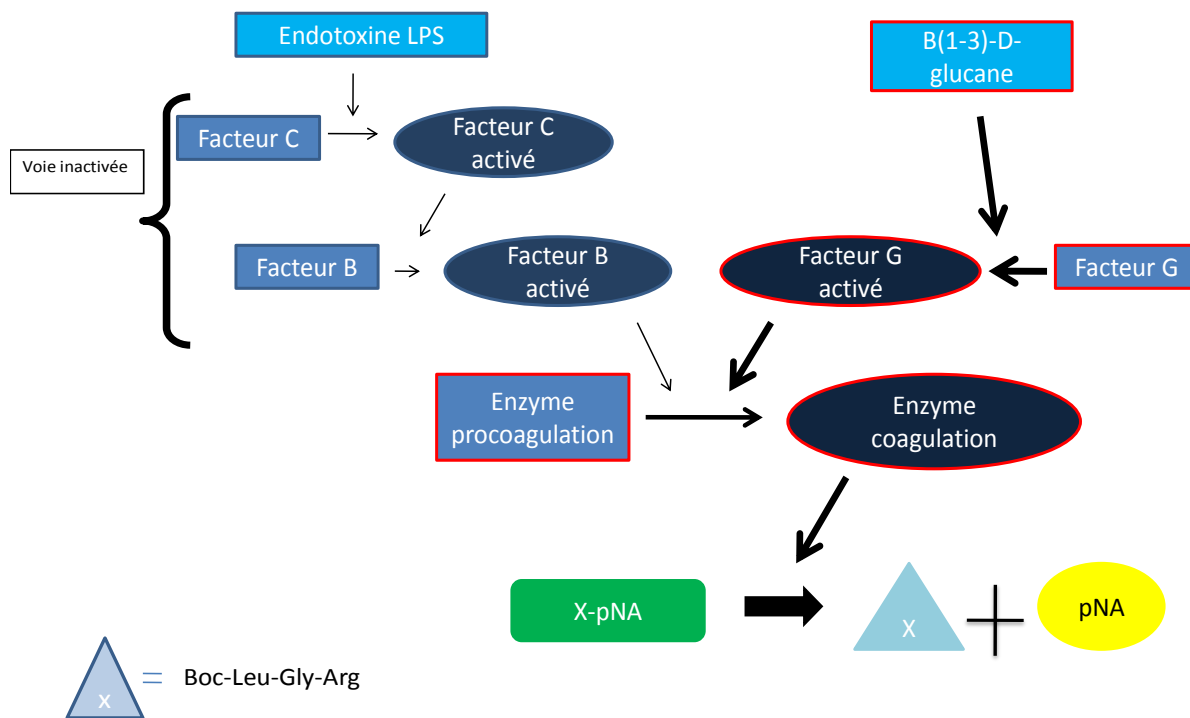


Figure 24 : Cascade de coagulation du lysat de limule.

Ainsi, le sérum des patients prétraités sera mis en contact avec le facteur G. En présence de BDG dans le sérum la réaction est amorcée permettant la formation d'une enzyme de coagulation. Cette enzyme à 37°C va cliver un peptide chromogène : Boc-Leu-Gly-Arg-pNA en pNA libre, créant ainsi un chromophore qui absorbe à 405 nm, mesurable par spectrophotométrie. Le principe de mesure et de calcul de la concentration en BDG de notre kit Fungitell® sera détaillé dans la partie matériel et méthode.

5.2.2. VALEURS INTRINSÈQUES DU TEST:

La détermination du seuil du test Fungitell® afin d'obtenir la meilleure sensibilité et spécificité a été discutée dans l'étude d'Ostrosky-Zeichner *et al* (75). Elle conclut à une sensibilité et une spécificité optimale pour un seuil à 80 pg/ml et une zone grise entre 60 pg/ml et 80 pg/ml. Cela est en adéquation également avec l'étude de Koo *et al.* (76). C'est le seuil de positivité qui a été retenu par le kit Fungitell® utilisé pour notre étude.

Ci-après un tableau des valeurs intrinsèques des études récentes utilisant le kit Fungitell®.

Tableau V : Sensibilité, Spécificité, VPN, VPP du BDG. Revue de la littérature.

	Ostrosky-Zeichner 2005 (75)		Pickering 2005 (77)	Hachem 2008 (78)	Persat 2008 (1)	Ellis 2008 (79)	Koo 2009 (76)	Racil 2010 (80)		Lamoth 2012 (81)
Spé %	92.4	87.1	69	90	73	81.3	84	32.56	55.81	98.9
S %	64.4	69.9	97	67	68.6	86.8	64	88.89	44.44	49.6
VPP %	89	83.8	51.9	88	64	76.7	/	12.12	9.52	83.5
VPN %	73	75.1	97.8	69	60	86.5	/	96.55	90.57	94.6
Kit	F		F	F	F	F	F	F	F	Les 4
Seuil pg/ml	80	60	80	80	80	80	80	80	80	/
Rq :	Groupe AI ; 1 test +		Groupe AI ; 1 test +	Groupe AI ; 1 test +	Groupe AI ; 1 test +	IFI ; 2 tests +	IFI ; 1 test +	IFI ; 1 test +	IFI ; 2 tests +	IFI ; 2 tests +

Rq : remarques ; Spé : spécificité ; S : sensibilité ; IFI : infections fongiques invasives ; les 4 : les 4 techniques commercialisées ; AI : aspergillose invasive ; F : Fungitell ; 2 tests : considérations de 2 tests positifs consécutifs.

La sensibilité et la spécificité du test varient de 44% à 89% et de 33% à 92% respectivement selon les études, avec une VPP allant de 52% à 89% à l'exception de l'étude de Racil et al. Cette étude a pris en compte des AI possibles, contrairement à l'ensemble des autres études et se remet elle-même en question quant à la présence de fausse positivité clinique.

Il a été montré que la force de ce test est sa très bonne valeur prédictive négative (VPN). Cette dernière varie de 60 à 96.55%.

Comme le GM, il existe de nombreuses causes différentes de faux positifs dans le dosage du BDG (75,82) :

- L'hémodialyse sur membrane de cellulose ou apparentée (la cellulose étant constituée de β -D-glucane) (83).
- L'injection intraveineuse d'immunoglobulines, d'albumine ou d'autres médicaments (lentinan, crestin...) (66).

- L'utilisation de produits dérivés du sang préparés industriellement.
- L'administration de certains antibiotiques tels que l'amoxicilline-acide clavulanique par voie intraveineuse (84).
- L'utilisation de gazes dans des contextes chirurgicaux.
- Une bactériémie concomitante (77,85).
- Une contamination technique au sein du laboratoire, car le β -D-glucane peut être présent dans l'air ambiant.

Les causes de faux négatifs sont peu décrites. Ils peuvent être dus à des erreurs de manipulation ou un sérum non dosable (ictérique, lipémique ou hémolysé).

Le dosage du BDG est considéré comme un critère diagnostique d'API dans la classification de l'EORTC/MSG depuis 2008 (4). Cependant il n'y a aucune recommandation à ce jour, ni sur le moment, ni sur la fréquence de dosage du BDG chez les patients d'hématologie. La cinétique du marqueur est actuellement peu connue et sa valeur pronostic est controversée.

5.2.3. DETECTION DANS LES AUTRES LIQUIDES BIOLOGIQUES

Une possible utilisation autre que dans le sérum est envisageable. Dans le LBA l'étude de Stacayet *al* (86) montre que lors d'AI pour un même seuil de 80 pg/ml dans le LBA, le dosage du BDG est plus sensible mais moins spécifique que le dosage du GM.

Dans le LCR, Lyons *et al* (87) ont étudié 3 groupes de patients : les patients avec des infections fongiques sans atteinte cérébrale qui n'ont pas de taux de BDG détectable, les patients avec une atteinte cérébrale fongique qui ont un taux de BDG détectable plus élevé que dans le sérum et les patients atteints de méningite à cryptocoque qui ont des taux faibles de BDG liés à la structure même du champignon. Les résultats sont prometteurs pour le diagnostic des infections fongiques cérébrales autres qu'à cryptocoque. Il faudra cependant faire attention à la spécificité du test car un taux positif de BDG a été détecté lors d'une nocardiose cérébrale dans le LCR (88).



Le dosage du BDG est un outil diagnostique encore peu utilisé. Même s'il est controversé quant à sa cinétique, sa forte VPN en fait un bon marqueur d'exclusion d'infection fongique. Il peut être intéressant pour une prise en charge thérapeutique optimale et peut aider à la mise en place ou non d'un traitement empirique.

6. LA PRISE EN CHARGE THERAPEUTIQUE

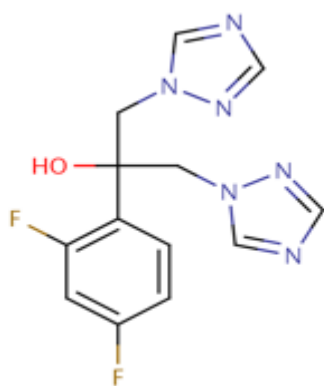
La prise en charge thérapeutique des aspergilloses des patients d'hématologie fait appel à différents types de traitements. Le traitement prophylactique, le traitement empirique, le traitement préemptif (AI possible) et le traitement curatif (AI probable et prouvé).

Ces traitements reposent sur les recommandations de l'ECIL et de l'IDSA (Infectious Diseases Society of America) (38,89). Elles se basent sur une analyse de la littérature réalisée par un groupe d'experts. Chaque proposition a été évaluée selon le niveau de preuve et la qualité de celle-ci. Ainsi, 3 niveaux de preuve ont été décrits de I à III et la force des recommandations a ainsi été établie du GRADE A (recommandation forte pour l'utilisation), au GRADE C (pour l'IDSA) ou E (pour l'ECIL) (recommandation forte contre l'utilisation).

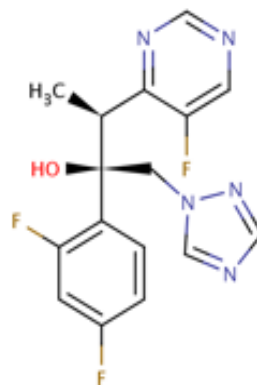
6.1. LES MOLECULES THERAPEUTIQUES UTILISABLES

6.1.1. LES TRIAZOLES

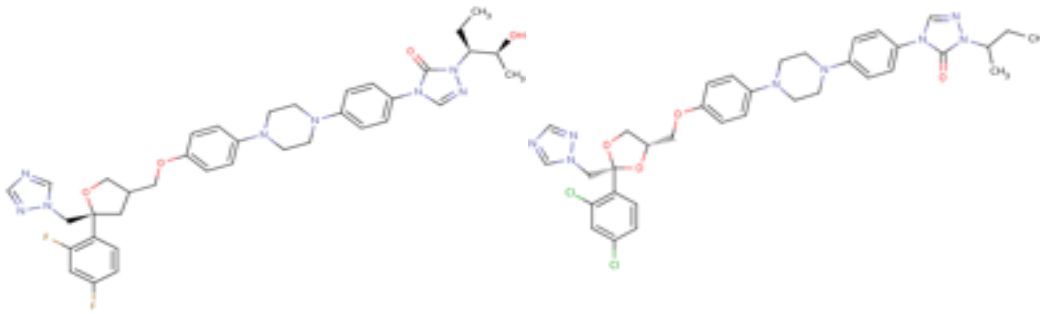
Les triazolés ont des structures chimiques très différentes qui entraînent une hétérogénéité vis à vis de la spécificité du site d'action. Cela leur confère des propriétés pharmacocinétiques et des spectres d'action différents.



Fluconazole : Triflucan®



Voriconazole : Vfend®



Posaconazole : Noxafil®

Itraconazole : Sporanox®

Figure 25 : Structures chimiques des triazolés (90).

Les azolés inhibent la voie de biosynthèse de l'ergostérol (stérol majoritaire de la membrane fongique) par interaction avec une enzyme du Cytochrome P450 : la lanostérol 14- α déméthylase. Les azolés se fixent au sein de cette enzyme et entraînent une modification de l'intégrité structurale et fonctionnelle de la membrane fongique ainsi qu'une accumulation de stérols méthylés toxiques. L'itraconazole à une action fongistatique tandis que le voriconazole est fongicide sur les aspergillus.

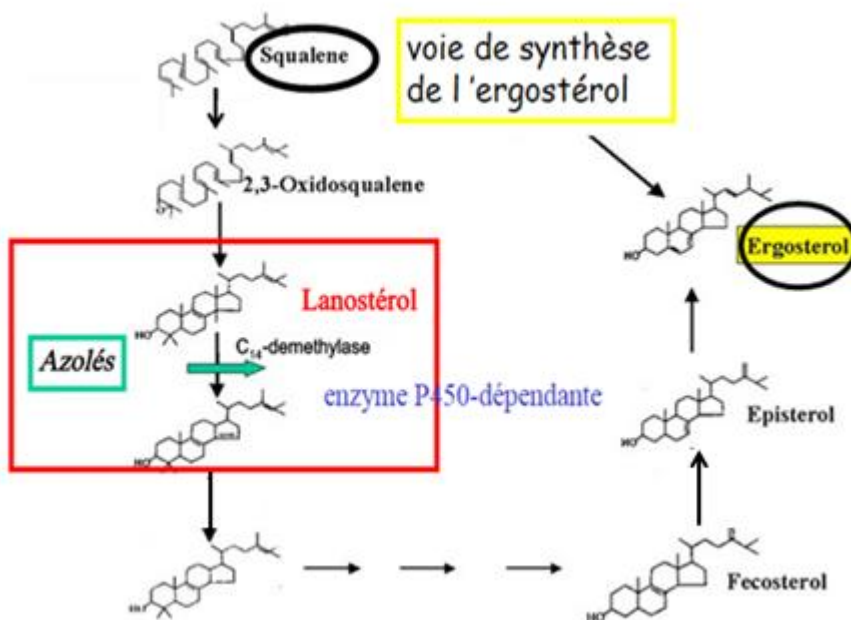


Figure 26 : Voie de synthèse de l'ergostérol (91).

La résistance aux antifongiques triazolés est apparue récemment chez *A. fumigatus* et augmente de manière importante depuis ces dix dernières années (92). Le principal mécanisme de résistance est une mutation du cytochrome P51A (CYP51A), gène codant pour la 14 α -stérol déméthylase, enzyme cible des antifongiques triazolés.

Une résistance innée aux azolés est décrite chez *A. lentulus*, appartenant à la section *Fumigati* et d'autres espèces d'*Aspergillus* (93).

Les résistances acquises concernent tout d'abord les patients recevant ces thérapeutiques au long cours dans le cadre d'aspergilloses chroniques ou d'aspergilloses allergiques (94). Dans ce cas les mutations G54, G138, et M220 décrites sont dues essentiellement à des substitutions d'acides aminés (95).

Des résistances sont également constatées chez des patients naïfs n'ayant jamais reçu de traitement azolé (96). Ce deuxième cas de figure suggère une présence environnementale des souches résistantes. En effet, il est rapporté des souches issues de l'agriculture où l'usage massif des antifongiques azolés comme pesticide a abouti à la sélection de souches résistantes posant un problème de santé publique (96,97). Ces résistances correspondent à un mécanisme particulier de type TR34/L98H. Il s'agit d'une séquence répétée (« tandem repeat » : TR) de 34 paires de base dans la zone du promoteur et d'un remplacement d'un acide aminé, la lysine par l'histidine. Depuis peu, une nouvelle mutation est apparue en Europe et en France de type TR46/Y121F/T289A (séquence répétée de 46 paires de base, mutation tyrosine/phénylalanine et une mutation thréonine/alanine) (98,99). Le premier type de mutation est caractérisé par des CMI élevées à l'itraconazole comparé au voriconazole, et l'inverse pour le deuxième type de mutation.

Une vigilance quant à la possible émergence et dispersion de ces souches résistantes dans les populations à risque (hémopathie, mucoviscidose...) est à surveiller.

6.1.2. LES POLYENES : L'AMPHOTERICINE B

Il existe différentes formes physiques d'amphotéricine B conférant des propriétés pharmacodynamiques et pharmacocinétiques différentes:

- La forme desoxycholate : Fungizone[®]
- La forme liposomale : AmBisome[®]
- La forme rubanée lipidique : Abelcet[®]
- La forme en disque lipidique : Amphocil[®] (non commercialisée en France)

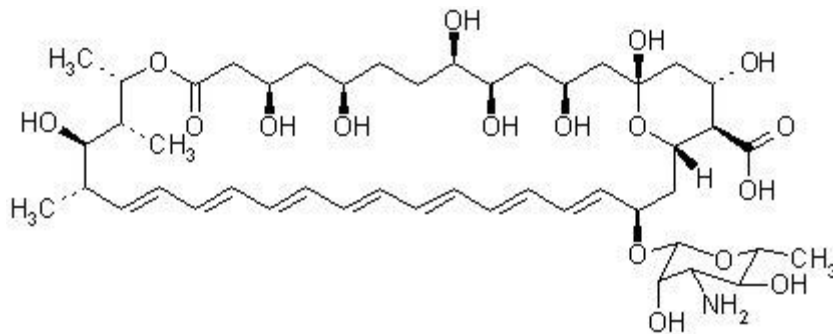


Figure 27 : Molécule d'amphotéricine B (100).

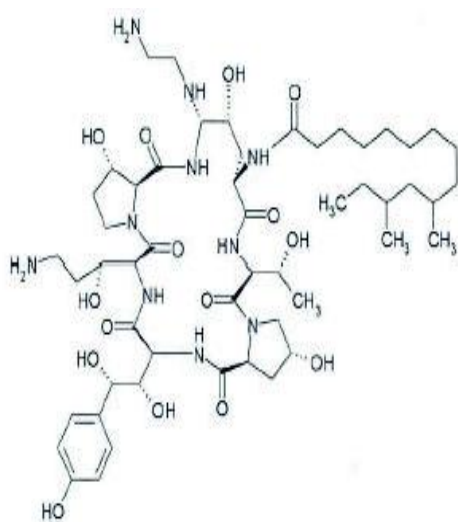
L'amphotéricine B se fixe par des liaisons de type van der waals à l'ergostérol. Cela engendre une perte de fluidité membranaire, la formation de pores et des échanges incontrôlés d'électrolytes. L'amphotéricine B a une action fongicide et un spectre large.

Il a été observé en clinique et *in vitro* des résistances primaires d'*A.terreus* (101). Le mécanisme de résistance n'est pas encore bien élucidé. La faible teneur intracellulaire de la molécule ne semble pas liée à la teneur en ergostérol mais plutôt aux défenses oxydatives des souches résistantes (102).

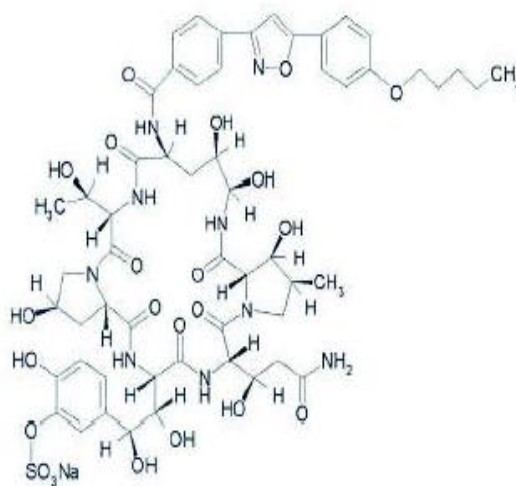
Il n'a pour lors pas été détecté de résistance secondaire des *Aspergillus* à l'amphotéricine B (103,104).

6.1.3. LES ECHINOCANDINES

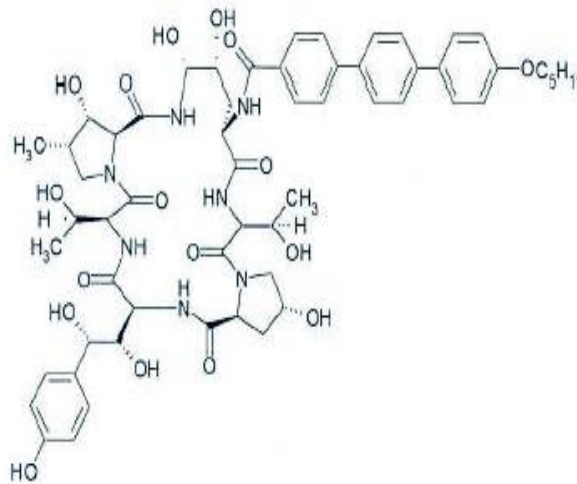
Les échinocandines ont des structures lipopeptidiques semi-synthétiques.



Caspofungine : Cancidas®



Micafungine : Micamine®



Anidulafungine : Ecalta[®]

Figure 28 : Structures chimiques des échinocandines (105).

Elles agissent par inhibition non compétitive de la β -D-glucane synthase, enzyme synthétisant le β -D-glucane de la paroi fongique. Cela entraîne une modification cytologique et ultra-structurale de la cellule fongique conduisant à une lyse cellulaire. Les échinocandines sont fongistatiques sur les *Aspergillus*.

Le complexe glucane synthase (cible thérapeutique) est composé de deux sous-unités membranaires : Fks1 et Fks2. Des mutations au sein des gènes codant pour ces sous-unités sont à l'origine de résistances fongiques. Il a été isolé des souches d'*A. fumigatus* résistantes aux échinocandines du fait d'une mutation dans le gène codant pour la sous-unité Fks1(106).

6.2. LE TRAITEMENT EMPIRIQUE

Le traitement empirique est initié lors d'un épisode fébrile sans documentation microbiologique ou radiologique, il doit donc avoir un champ d'action large. L'amphotéricine B est la plus communément utilisée.

Tableau VI: Recommandation pour le traitement empirique.

	ECIL	IDSA
Indication :	Indication du traitement empirique: B2	Recommandé chez les patients à risque: neutropénie prolongée et fièvre persistante sous antibiotiques : A1 Non recommandé si la neutropénie attendue est inférieure à 10j : B3
Molécules :	Ambisome® A1 Caspofungine A1 Abelcet® B1 Amphocil® B1 Voriconazole B1 Itraconazole B1	Amphotéricine B Itraconazole Voriconazole Caspofungine

6.3. LE TRAITEMENT PROPHYLACTIQUE

Pour la prophylaxie primaire il est recommandé d'utiliser du posaconazole à la posologie de 200 mg trois fois par jour. Cela nécessite un bon monitoring et une surveillance des potentiels effets indésirables, cutanés notamment. Il a été démontré une efficacité et une diminution de l'incidence des aspergilloses dans les populations neutropéniques grâce à la prophylaxie par posaconazole contre celle par fluconazole et itraconazole (3).

Une prophylaxie secondaire, pour les patients ayant eu une IFI au cours de leur pathologie, est possible par l'utilisation d'antifongiques triazolés ou de l'Ambisome®. Elle est indiquée chez les patients souffrant de leucémie aigüe (pendant les cures de chimiothérapie) et chez les patients allogreffés pendant au moins 6 mois et plus en cas de GVH digestive chronique. Cette prophylaxie secondaire limite les récurrences d'API et permet la poursuite du traitement anticancéreux.

L'isolement du patient dans des chambres à atmosphère contrôlée (ex : chambre à flux laminaire) permet de diminuer de manière très importante le nombre de spores aspergillaires présentes dans l'environnement (24). Un contrôle strict de l'alimentation, des linges, des déplacements du patient, des visites, évitent également une exposition aux champignons responsables d'IFI.

Lors de travaux dans l'enceinte de l'hôpital des mesures contre la dissémination des spores doivent être prises (travaux en environnement clos).

Tableau IIIX: Recommandations pour le traitement prophylactique.

	ECIL	IDSA
Prophylaxie I^{aire}	<u>Allogreffe</u> Posaconazole: AI Itraconazole : BI Echinocandine ou polyène CI <u>Induction de leucémie aigue</u> Posaconazole: AI Itraconazole : CI Polyène iv : CI	<u>Allogreffe médullaire et GVH</u> : AI <u>LAM et SMD à haut risque</u> : AI Posaconazole
Prophylaxie II^{aire}	Pas de recommandations en l'absence d'essai randomisé contrôlé.	Si une nouvelle période d'immunodépression : A3 Voriconazole Posaconazole Itraconazole Ambisome®

6.4. LE TRAITEMENT PREEMPTIF ET CURATIF

Le traitement préemptif est à mi-chemin entre le traitement empirique et le traitement curatif. Tous les éléments cliniques et microbiologiques ne sont pas réunis pour être sûr du diagnostic. On est le plus souvent dans le cadre de l'aspergillose invasive possible. On parlera de traitement curatif, une fois que le diagnostic est posé, dans le cadre de l'aspergillose invasive probable ou prouvée.

Le traitement de première intention de l'AI recommandé est le voriconazole en intraveineux (IV) à la posologie de 6 mg/kg/12h le premier jour puis 4 mg/kg/12h les jours suivant. Le relai per os est possible.

L'alternative thérapeutique est l'amphotéricine B liposomale en IV (niveau de preuve B1). Elle est surtout utilisée si l'aspergillose se développe sous prophylaxie par posaconazole et/ou si l'on suspecte une coïnfection fongique.

En cas d'intolérance aux molécules de première intention ou de non réponse, un traitement de sauvetage est possible par d'autres molécules : caspofungine, itraconazole...


Les associations d'antifongiques ne sont pas recommandées en première intention. Elles restent possibles en traitement de sauvetage en cas d'AI réfractaire. Ces associations peuvent être : caspofungine et amphotéricine B ou caspofungine et voriconazole comme dans l'étude de Marr K *et al* (107) où elles montrent une meilleure survie à 3 mois.

Tableau IIX : Recommandations pour le traitement curatif.

ECIL	IDSA
Voriconazole AI	Voriconazole AI
Ambisome BI	Ambisome BI
Caspofungine C3	Caspofungine C3
Itraconazole C3	Itraconazole C3
Association	Association

Il est également mis en place des mesures associatives au traitement. Le but est d'éviter les facteurs de risques d'apparition de l'API liés à l'immunosuppression par diminution des doses de corticoïdes si possible, ou par la récupération d'une neutropénie grâce aux facteurs de croissance hématopoïétiques.

La chirurgie n'est indiquée que dans certains cas : en cas de lésions pulmonaires proches de gros vaisseaux ou du péricarde, en cas d'hémoptysie avec un seul foyer infectieux et en cas de lésion extra-pulmonaire (par exemple atteinte du système nerveux central).

 Une prise en charge thérapeutique optimale de l'API repose sur un diagnostic précoce, mais également sur le choix du type de traitement antifongique et des molécules à utiliser en tenant compte des profils de résistance.

1. ETUDE RETROSPECTIVE

1.1. DEROULEMENT DE L'ETUDE :

Il s'agit d'une étude rétrospective réalisée au sein du laboratoire de Parasitologie Mycologie du CHU de Nantes. Elle concerne les patients d'hématologie ayant fait une aspergillose pulmonaire invasive probable ou prouvée selon les critères de l'EORTC/MSG. L'étude couvre une période de 17 mois, du 01/01/2014 au 01/06/2015. Elle utilise un test déjà commercialisé et reconnu comme critère de diagnostic d'infection fongique invasive (IFI) par l'EORTC/MSG : le kit Fungitell®.

Elle a pour but d'évaluer, la cinétique d'apparition du (1-3) β -D-glucane (BDG) sérique chez les patients ayant présenté une aspergillose pulmonaire invasive et la précocité d'apparition de ce biomarqueur par rapport à un autre biomarqueur : le galactomananne. Cette évaluation se fera en tenant compte du contexte clinique et thérapeutique de chaque patient.

1.2. SELECTION DES PATIENTS

La sélection des patients s'est faite grâce au registre tenu au sein du laboratoire de Parasitologie-mycologie, répertoriant l'ensemble des infections fongiques et notamment aspergillaires déclarées au réseau RESSIF.

Les critères d'inclusion :

- ✓ Les patients hospitalisés durant la période du 01/01/2014 au 01/06/2015.
- ✓ Les patients adultes d'hématologie tous secteurs confondus.
- ✓ Il n'a pas été mis de restriction en ce qui concerne l'hémoopathie et le stade de la prise en charge thérapeutique des patients.
- ✓ Les patients ayant bénéficié de traitements par allogreffes et autogreffes de CSH (cellule souche hématopoïétique) ont été inclus.
- ✓ L'aspergillose invasive devait faire partie du groupe des aspergilloses invasives probables ou prouvées selon les critères de l'EORTC/MSG.
- ✓ La présence dans notre sérothèque des sérums prélevés ($n \geq 3$) durant l'épisode d'hospitalisation ayant révélé le diagnostic d'aspergillose invasive.

Les critères d'exclusion :

- ✓ Aspergilloses invasives possibles selon les critères de l'EORTC/MSG.
- ✓ Absence de sérum dans la sérothèque (quantité insuffisante, envoi extérieur).

1.3. DOSAGE DU 1-3 B-D GLUCAN SÉRIQUE

1.3.1. RECHERCHE DES SERUMS

Lors de la réalisation du dosage du galactomannane (GM) (Platelia® *Aspergillus*, BioRad®), un aliquot de sérum sera systématiquement congelé pour chaque patient. Pour les patients d'hématologie à risque de faire une aspergillose invasive, en accord avec les recommandations de suivi du risque infectieux, leurs taux de GM sont évalués régulièrement (en moyenne 2 fois par semaine) (40). Ces sérums seront conservés pour doser le BDG sérique et ce, de manière rétrospective par série de 7 ou 20 patients.

Il a été démontré une stabilité du taux de BDG dans le sérum après avoir été conservé jusqu'à 2 ans après congélation à -80°C et après 4 cycles de réfrigération sans altération du dosage du BDG (75). Les sérums de l'étude après dosage du GM, sont initialement rangés à -20°C avant d'être mis à -80°C.

1.3.2. REALISATION DU DOSAGE

Pour le dosage du BDG, le kit Fungitell® de la société CapeCod® sera utilisé. Le kit contient : le réactif Fungitell® (qui renferme sous forme lyophilisé le lysat d'amebocytes modifié et le substrat chromogénique) ; le tampon de reconstitution au Pyrosol ; le « Glucan standard » (pour la gamme d'étalonnage) ; de l'eau pure pour analyse (EPA) ; du KCL et KOH (pour réaliser la solution de prétraitement) ; des plaques de titration et la notice.

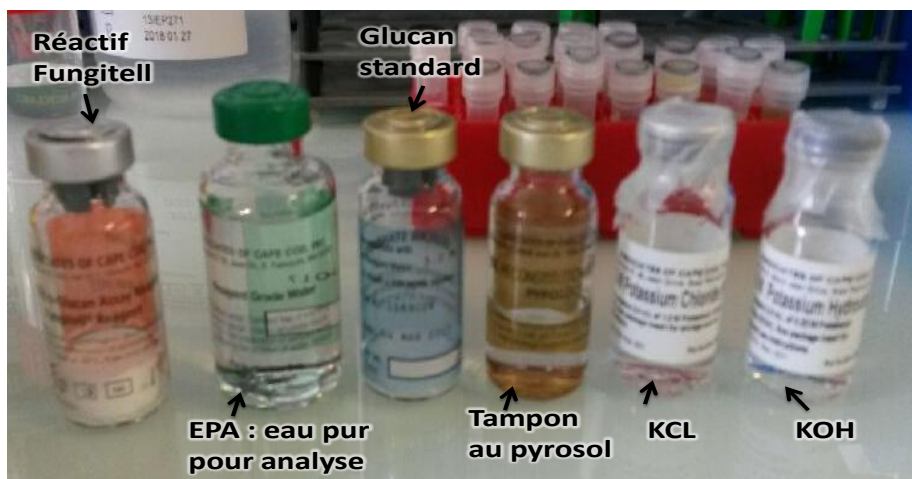


Figure 29 : Contenu du kit Fungitell® (image personnelle).

Hormis le « Glucan standard » l'ensemble du matériel doit être « glucan free », notamment celui non fourni par le kit (cônes, pipettes, verrerie, ...).

1.3.2.1. MANIPULATION :

Pour chaque série une gamme d'étalonnage sera réalisée variant de 31 à 500 pg/ml.

Les dosages des sérums de nos patients seront réalisés en duplicata selon les recommandations du fournisseur.

Un témoin positif sera constitué pour valider la manipulation en utilisant un sérum de patient atteint de pneumocystose et en diluant ce dernier pour être dans une fourchette de valeur entre 100 et 200 pg/ml. En effet les infections pulmonaires à *Pneumocystis jiroveci* sont reconnues pour donner des taux élevés de BDG dans le sérum (108). Le témoin négatif sera l'eau pure pour analyse fourni par le kit.

Lors de la manipulation, 5µl du sérum du patient seront mis en contact avec 20µl de solution de prétraitement pour inactiver les protéases sériques et les inhibiteurs de protéase sériques potentiellement présents dans le sérum. Après 10 min d'incubation à 37°C, le réactif Fungitell® reconstitué sera ajouté.

La lecture de la densité optique à 405nm sera alors faite immédiatement après car la réaction débute instantanément et sera répétée plusieurs fois pendant 40 minutes.

Le protocole de la manipulation spécifique au laboratoire est décrit en annexe (annexe 1). Il est basé sur la notice du fournisseur (annexe 2), agrémenté de recommandations pour de meilleurs résultats, grâce à l'expérience acquise au fur et à mesure des manipulations.

1.3.2.2. REACTION ENZYMATIQUE ET LECTURE SPECTROPHOTOMETRIQUE

Comme décrit dans le chapitre sur le BDG (outil de diagnostic, principe de base), le dosage du BDG repose sur une réaction enzymatique. Il s'agit de la transformation d'un substrat [S] en un produit [P] coloré détectable par spectrophotométrie.

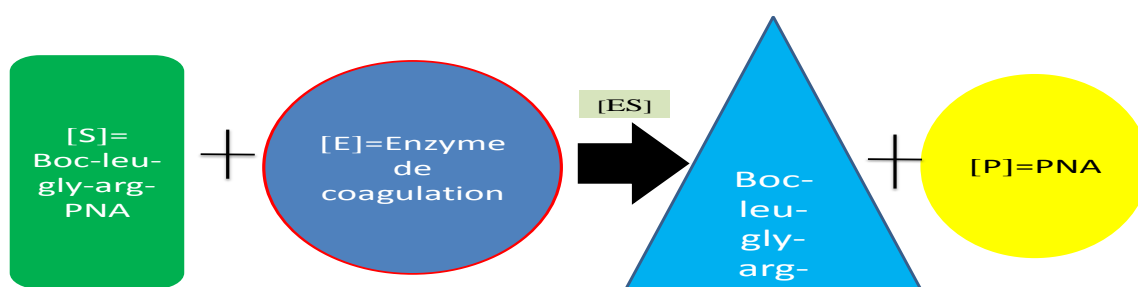


Figure 30 : Réaction enzymatique (image personnelle).

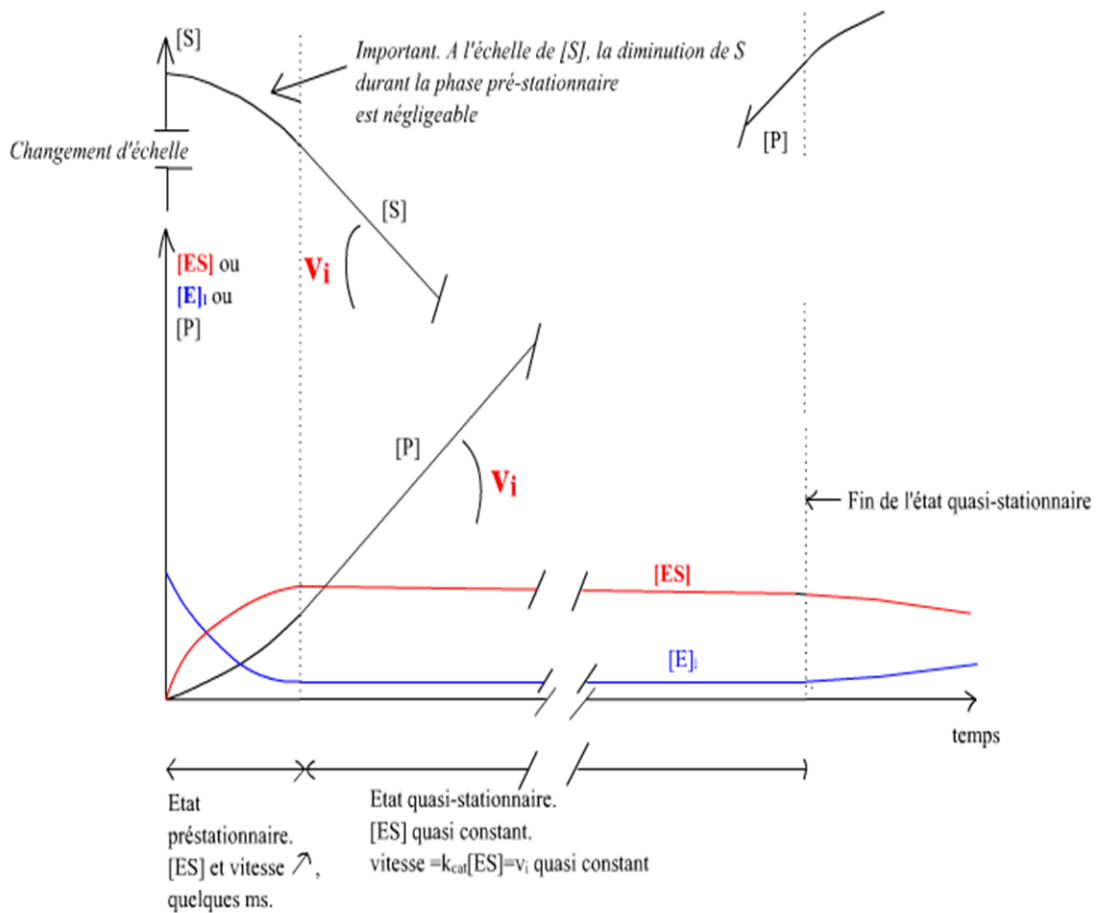


Figure 31 : Variation du substrat et du produit en fonction du temps (109).

La vitesse enzymatique varie au cours de la réaction. Lorsque toutes les molécules de l'enzyme sont occupées par des molécules du substrat la vitesse de la réaction est maximale : V_{max} (phase stationnaire). C'est cette V_{max} qui est mesurée par l'automate, grâce à la spectrophotométrie. Plus la concentration en substrat est élevée, plus la V_{max} sera élevée car la concentration en produit augmentera plus rapidement (la coloration sera plus forte).

On obtient tout d'abord des résultats bruts de V_{max} en absorbance par minute.

Puis grâce à la réalisation de la gamme d'étalonnage, on pourra déterminer la concentration en BDG d'un patient par report de la V_{max} sur la droite d'étalonnage.

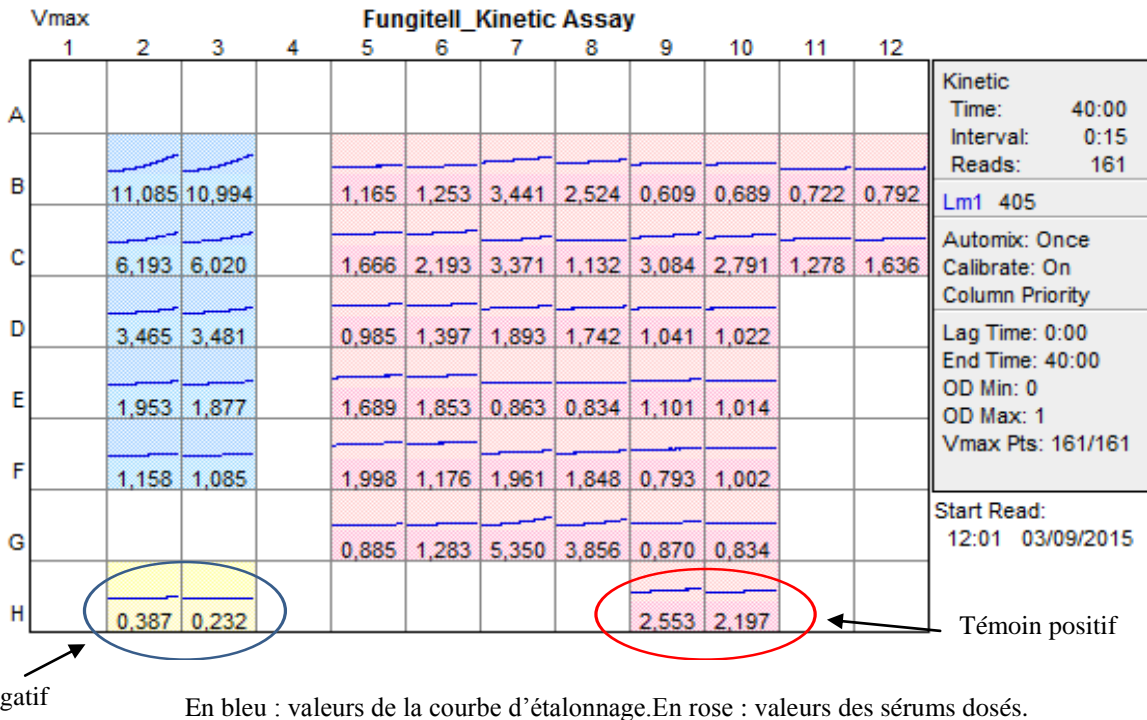
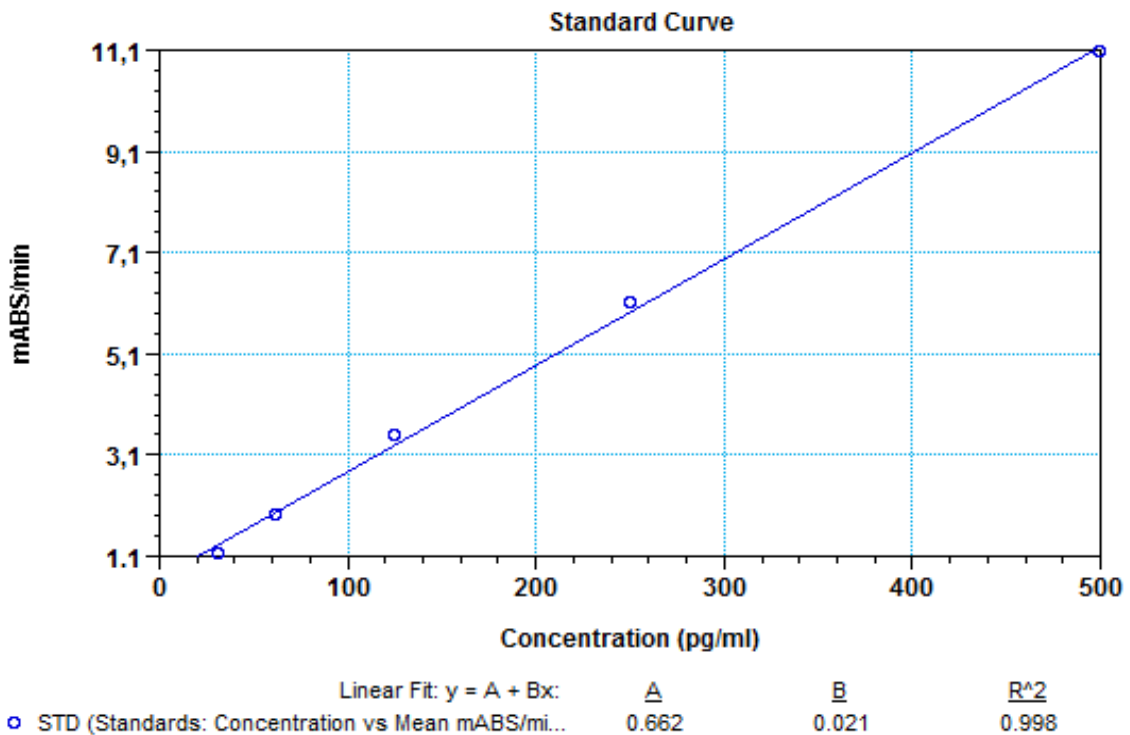


Figure 32: Exemple des résultats bruts obtenus.



Standards (pg/ml)

Standard	Wells	Concentration	Units	mABS/min	Mean mABS/min	Std. Dev.	C.V.%	Calc. Values	Mean Value
St01	B2	500	pg/ml	11,085	11,040	0,06	0,6	496	494
	B3			10,994				492	
St02	C2	250	pg/ml	6,193	6,106	0,12	2,0	263	259
	C3			6,020				255	
St03	D2	125	pg/ml	3,465	3,473	0,01	0,3	133	134
	D3			3,481				134	
St04	E2	63	pg/ml	1,953	1,915	0,05	2,8	61	60
	E3			1,877				58	
St05	F2	31	pg/ml	1,158	1,122	0,05	4,6	24	22
	F3			1,085				20	

Figure 33 : Exemple d'une droite d'étalonnage et son tableau de valeurs.

1.4. VALIDATION DE LA TECHNIQUE DE DOSAGE

Les seuils définis par le fournisseur sont :

- ✓ Résultat négatif : <60 pg/ml
- ✓ Résultat positif : >80 pg/ml
- ✓ Résultat douteux : 60-79 pg/ml : ces résultats suggèrent une possible infection fongique, des prélèvements et des tests supplémentaires sont recommandés.

Des critères sont nécessaires à la validation de la manipulation:

- ✓ Le coefficient de corrélation (r) de la courbe standard doit être < 0.980.
- ✓ Les témoins négatifs doivent avoir des valeurs de taux de densité optique réelle ($V_{moyenne}$) inférieures de 50% au standard le plus faible.
- ✓ La positivité de notre témoin interne positif. Cela afin de vérifier que les réactifs et la technique de dosage fonctionnent correctement.
- ✓ Une faible différence entre les duplicatas d'un même patient, se traduisant par un coefficient de variation inférieur à 10%.

1.5. RECUEIL DES DONNEES

Les données seront récupérées de façon rétrospective. Pendant cette période chaque patient sera suivi sur le plan clinique, biologique et radiologique (si besoin) à la recherche d'une mycose invasive. Tous les éléments de cette surveillance font partie de la procédure habituelle de suivi de ces patients à très haut risque infectieux.

Sur le plan mycologique, cette surveillance va inclure : le prélèvement d'hémocultures sur flacon Mycosis[®] si indication ; des prélèvements mycologiques périphériques (écouvillonnage du nez et de la gorge, prélèvements de selles et d'urines) à la recherche de levures colonisantes et le dosage du GM sérique (Platelia[®] *Aspergillus*, BioRad[®]) en moyenne deux fois par semaine.

Concernant les données biologiques (leucocytes, PNN,...), elles seront récupérées grâce au logiciel spécifique du laboratoire « dxlab ». Les données cliniques seront récupérées grâce aux comptes rendus d'hospitalisation, correspondant à l'épisode de l'infection fongique, présents sur le logiciel « clinicom ». L'ensemble de ces données seront colligées dans des tableaux (annexes 3 et 4).

2. ETUDE MULTICENTRIQUE

Il s'agit d'une étude réalisée au sein du laboratoire de Parasitologie Mycologie du CHU de Nantes, intégrée à un protocole multicentrique national. En effet l'étude se déroule dans 7 services d'Hématologie et de Mycologie de France : le CHU de Bordeaux-Pessac, de Nantes, de Grenoble, de Strasbourg, de Paris St Antoine, de Paris Necker et de Dijon. Le promoteur de l'étude est le Professeur DALLE à Dijon.

L'étude a pour but d'évaluer, chez des patients atteints de leucémies aiguës, les performances (sensibilité, spécificité, VPN, VPP) du test Fungitell[®] dans le dépistage de l'AI et d'évaluer sa précocité de positivité par rapport aux tests actuellement disponibles.

Les objectifs secondaires sont d'une part de préciser les sources de faux positifs du test chez des patients neutropéniques ; et d'autre part de préciser la place du test dans la stratégie de prise en charge des infections fongiques possibles autre que l'aspergillose.

2.1. DEROULEMENT DE L'ETUDE :

L'étude a débuté le 1^{er} novembre 2013 au niveau national et le 14 février 2014 au CHU de Nantes. Ce décalage est lié à la mise en place du protocole en association avec le service clinique d'hématologie et le délai de livraison du matériel spécifique « glucan free » non fournis par le kit.

C'est une étude observationnelle non interventionnelle (faisant appel aux soins courants habituellement délivrés à ce type de patient). Cela ne demande aucune prise de sang supplémentaire chez le patient. Il a pour cela été remis une note d'information aux patients (qui n'est pas un consentement éclairé) (annexe 5). Cette procédure simplifiée a nécessité une

notification à la Commission National de l'Informatique et des Libertés (CNIL) faite par l'investigateur principal dans le cadre de la loi « informatiques et libertés ».

2.2. SELECTION DES PATIENTS

Les critères d'inclusion :

- ✓ Il s'agit de patients adultes.
- ✓ Les patients sont atteints de leucémies aigües (LA).
- ✓ Les patients ont reçu une chimiothérapie aplasante à visée curative. A noter qu'un patient peut être inclus dans l'étude à chaque nouveau cycle de chimiothérapie intensive induisant une aplasie profonde.

Les critères d'exclusion :

- ✓ Les patients bénéficiant de traitements par allogreffes et autogreffes de CSH ont été exclus.

2.3. DOSAGE DU 1-3 B-D GLUCAN SERIQUE

Pour chaque patient inclus, le dosage du BDG sérique est réalisé en parallèle du dosage du GM sérique par série de 7 ou 20 patients. Il a pour cela été convenu avec le service d'hématologie d'une annotation spécifique sur le bon de prescription du dosage du galactomannane et sur le tube de prélèvement.

La manipulation s'est déroulée comme décrit ci-dessus dans l'étude rétrospective.

2.4. RECUEIL DES DONNEES

Chaque centre enregistre de façon prospective et chronologique tous les épisodes d'aplasies chimio-induits pour les LA qui sont prises en charge dans leur centre.

Deux types de recueil de données sont remplis : l'un spécifique aux épisodes d'aplasies associées à une AI et l'autre pour le recueil de données des aplasies non compliquées d'une AI.

Concernant les épisodes fébriles non aspergillaires le recueil est simplifié tandis que concernant les aspergilloses il fait appel à plus de données clinico-biologiques selon des fiches types.

La répartition des épisodes fébriles (EF) au cours des aplasies chimio-induites de LA va se faire en 4 groupes:

- ✓ EF avec une AI.
- ✓ EF à type de bactériémies.
- ✓ EF à type de foyers infectieux documentés ou non (pneumopathie documentée ou non, foyers digestifs, cutanés, ORL (oro-rhino-pharyngé), mucite fébrile sévère, etc....) mais après exclusion d'une AI.
- ✓ EF sans foyer clinique/radiologique (fièvre d'origine inconnue, sepsis sévère non documenté).

Par la suite, chaque cas d'AI sera appareillé avec : 2 à 3 patients ayant fait une bactériémie, 1 à 2 patients ayant eu des foyers infectieux documentés ou non (mais non aspergillaire) et 2 à 3 patients ayant eu un EF sans foyer clinique/radiologique. Cet appareillement a pour but de déterminer le pourcentage de faux positifs et négatifs.

Les données seront centralisées au laboratoire de mycologie du CHU de Dijon (Pr F. Dalle) à la fin de l'étude.

1. L'ETUDE RETROSPECTIVE

Sur les 17 mois de l'étude, 11 patients (2 femmes et 9 hommes) ont été inclus avec 4 leucémies aiguës (LA), 4 lymphomes, 2 leucémies lymphoïdes chroniques (LLC) et une leucémie à tricholeucocytes.

Il a été répertorié 15 cas d'aspergilloses invasives probables ou prouvées durant cette période avec 12 cas concernant des patients d'hématologie. Parmi ces cas il y avait 11 cas d'aspergillose pulmonaire invasive (API) probable et 1 seul cas d'aspergillose pulmonaire invasive prouvée. Les sérums du patient ayant eu une aspergillose invasive prouvée, ont été envoyés dans des laboratoires extérieurs pour des analyses complémentaires et n'ont donc pas pu être exploités. En moyenne 7 dosages de (1-3) β -D-glucane (BDG) ont été réalisés par patient sur l'épisode d'hospitalisation.

Pour une meilleure analyse, les résultats obtenus pour chaque cas ont été représentés par des graphiques, afin d'évaluer la cinétique de notre marqueur en fonction de la clinique, de la prise en charge thérapeutique et des valeurs de l'antigène galactomannane (GM).

Selon la notice du fournisseur et la gamme d'étalonnage, les résultats entre 31 et 500 pg/ml peuvent être rendus tel quels. Toutefois pour les résultats supérieurs à 500 pg/ml une dilution dans de l'eau pure est possible pour avoir des taux plus précis. Dans le cadre de l'étude, cette dilution a été faite de façon systématique. Pour les résultats inférieurs à 31 pg/ml, qui correspondent à des taux non détectables, selon la notice ils doivent être rendus : < 31 pg/ml. Pour une meilleure lisibilité graphique, la valeur de 0 pg/ml a été attribuée aux résultats inférieurs à 31 pg/ml.

Les résultats du GM et du BDG, aux différentes dates sont présentés dans les tableaux de données biologiques de chaque patient (annexe 4).

Les 11 cas ont été répartis en fonction de la précocité d'apparition du BDG par rapport au GM. Ainsi il y a 3 cas avec un BDG plus précoce que le GM, 4 cas avec des résultats similaires au GM et 3 cas où le BDG est moins performant que le GM. Un cas particulier parmi les 11 ne rentre dans aucune catégorie.

1.1. BDG PLUS PERFORMANT QUE LE GM.

CAS N°1

Il s'agit d'un patient de 59 ans, en phase d'induction d'une leucémie aiguë myéloïde (LAM). Ce patient a bénéficié d'une prophylaxie par posaconazole. Lors de l'épisode d'aplasie fébrile

(du 12/06 au 21/07), un premier pic de l'antigène GM est observé induisant une prise en charge thérapeutique initiale par amphotéricine B liposomale (Ambisome®) qui est « switchée » par de la caspofungine du fait d'une insuffisance rénale. L'antigène GM repasse par la suite à des taux inférieurs au seuil alors que l'imagerie en faveur d'une aspergillose entraîne une modification du traitement par du voriconazole. En présence du traitement, l'antigène GM va de nouveau être positif avant de devenir négatif 11 jours plus tard avec une évolution favorable du patient.

Le diagnostic d'API probable est posé sur la présence de facteurs d'hôtes : une aplasie fébrile avec une neutropénie profonde supérieure à 10 jours et un traitement d'induction ; de facteurs cliniques : altération de l'état général (AEG), dyspnée d'effort, signe radiologique initialement aspécifique mais ultérieurement compatible avec une API et de facteurs microbiologiques : des antigénémies GM positives (2 supérieures à 0.7).

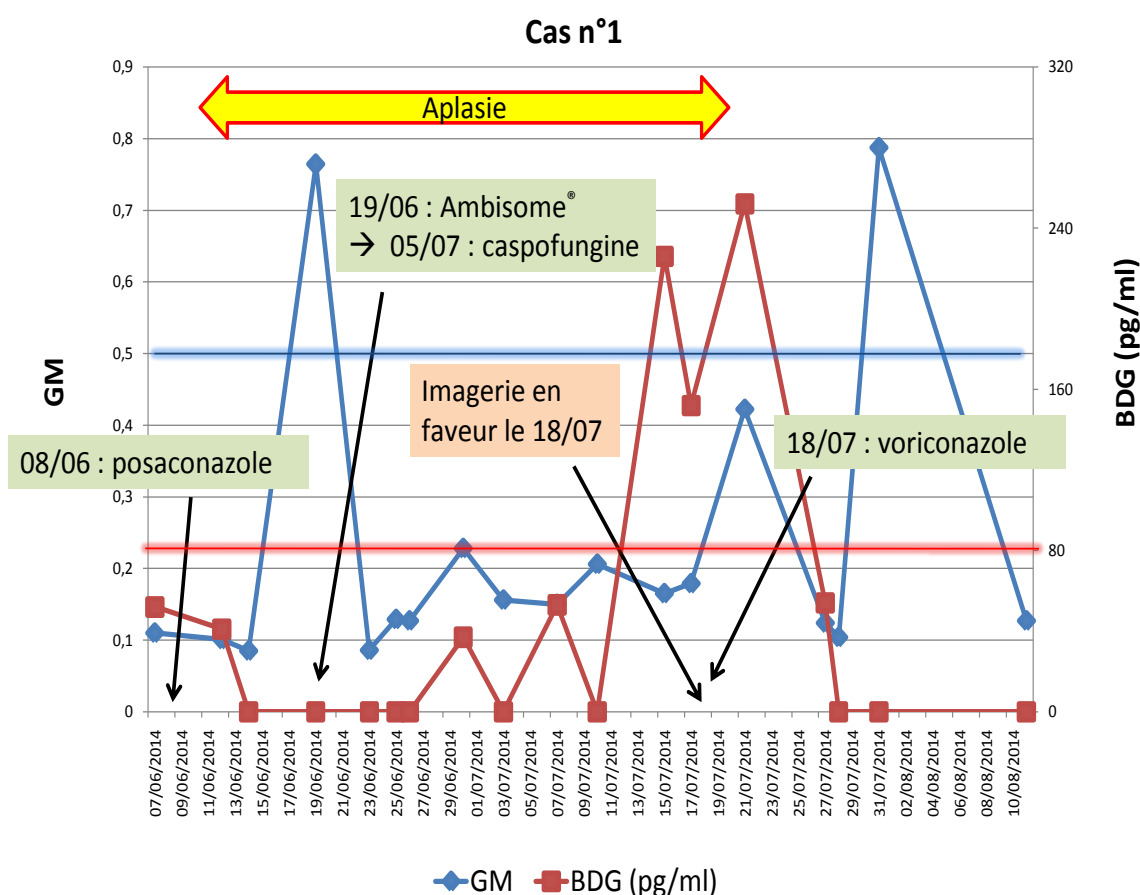


Figure 34 : Suivi de l'antigénémie aspergillaire et du taux de BDG du patient n°1.

Sur le graphique on observe un premier pic de l'antigène GM pendant la période d'aplasie (du 12/06 au 21/07) qui peut être lié soit à une fausse positivité non documentée (l'imagerie antérieure réalisée le 07/06 n'était pas en faveur d'une API) soit à une libération transitoire du

marqueur. Il est difficile de conclure sur l'impact éventuel du traitement sur la diminution rapide (le 23/06) du GM due à la prise en charge thérapeutique.

Si l'on ne tient compte que de l'épisode de juillet, on observe une augmentation de la concentration en BDG plus précoce de 15 jours par rapport à la deuxième valeur positive du GM et de 3 jours par rapport à l'imagerie. Cela est en faveur d'une cinétique précoce du BDG dans un contexte d'API (aucune autre co-infection fongique n'a été rapportée).

Par contre, durant l'hospitalisation, il est rapporté la présence d'une bactériémie à *Corynebacterium jeikeium* concomitante à l'élévation du taux de BDG. Les bactéries du genre *Corynebacterium* sont des commensales de la peau, ainsi l'unique hémoculture positive est certainement liée à une contamination plus qu'à une réelle bactériémie. Aucun cas de fausse positivité lié à une bactériémie à *Corynebacterium jeikeium* n'a été décrit et de façon générale les faux positifs dus à une bactériémie semblent peu fréquents (110).

On constate également que malgré le traitement antifongique par caspofungine l'élévation du BDG a été détectable. Il est en effet noté que l'utilisation d'échinocandines pourrait, par leur mécanisme d'action, interférer sur la synthèse du BDG et avoir un impact sur le taux de BDG détectable (111).

Enfin, l'évolution favorable du patient est associée à une diminution du taux de BDG observable sur une période de 2 semaines. Comme le montrent certaines études, une diminution du marqueur peut être associée à une réponse favorable au traitement (112,113). Il en est de même pour la diminution du GM à 2 semaines (51). Cela est donc en faveur d'une utilisation du BDG comme marqueur pronostique de l'évolution clinique.

CAS N°2

Il s'agit d'un patient de 83 ans, atteint d'une leucémie à tricholeucocytes. En période d'aplasie fébrile (15/07 au 29/07) le premier dosage de GM est négatif. Il ne se positivera qu'une semaine plus tard en parallèle de la pousse en culture d'un *Aspergillus* section *fumigati*. Il est alors instauré un traitement par de la caspofungine devant l'impossibilité d'une prise en charge par voriconazole (cytolyse et cholestase majeure) ou amphotéricine B liposomale (insuffisance rénale).

Le diagnostic d'API probable est posé sur la présence de facteurs d'hôtes : une aplasie avec une neutropénie profonde supérieure à 10 jours et un traitement immunosuppresseur comprenant de la Cladribine® (analogue nucléosidique purique agissant comme anti-métabolite) ; de facteurs cliniques : AEG, fièvre, dyspnée, signe radiologique compatible avec une API et de facteurs microbiologiques : des antigénémies GM positives (2 supérieures à 0.7 et 1 supérieure à 0.5) associées à un crachat qui pousse en culture à *Aspergillus* section *Fumigati* (en 1 jour). La dégradation rapide de l'état général du patient conduit à une prise en charge palliative et au décès de ce dernier.

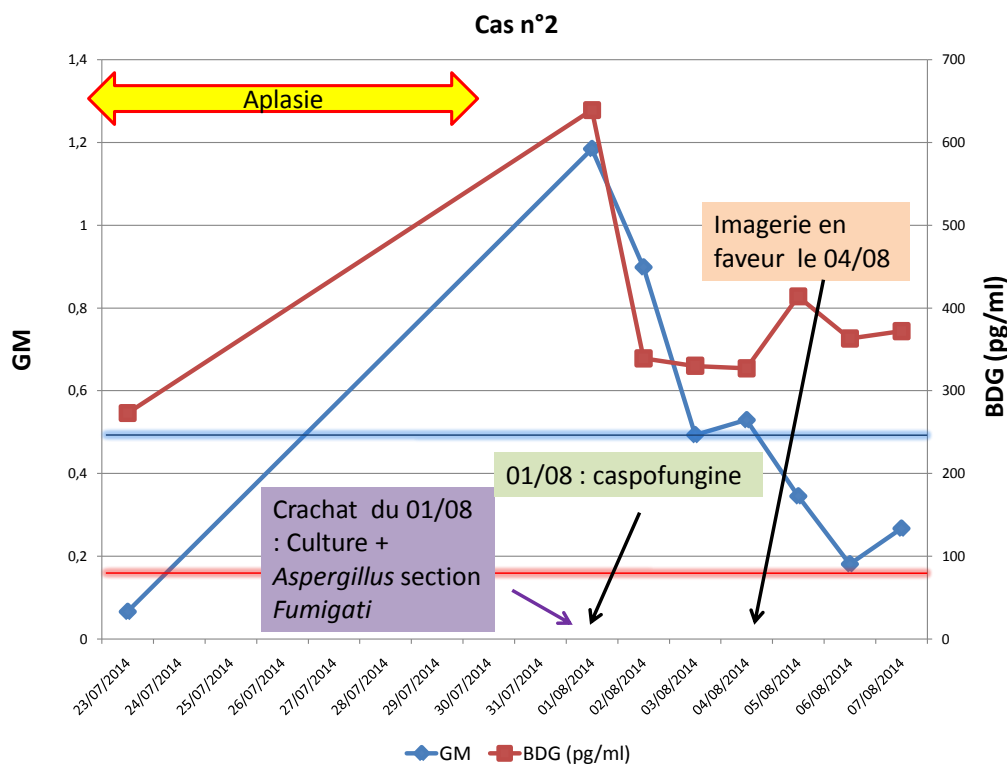


Figure 35 : Suivi de l'antigénémie aspergillaire et du taux de BDG du patient n°2.

En ce qui concerne le BDG, il est positif dès le premier dosage (273 pg/ml), contrairement au GM. Il n'a pas été mis en avant d'infection fongique autre que celle de l'API probable, ce qui est en faveur d'une précocité de détection du BDG. Une semaine plus tard, au moment de l'isolement de l'aspergillus, des taux élevés de BDG sont mesurés probablement liés à un relargage important du marqueur.

Alors que l'on constate une diminution puis une persistance du taux de BDG (sur 5 jours), l'antigène GM se négative. Une diminution de l'antigène GM dans les 2 semaines suivant le traitement est généralement en faveur d'une évolution favorable du patient sur le plan fongique ce qui n'est pas le cas ici (51). Pour Koo *et al*, le taux de BDG peut rester positif longtemps chez des patients guéris, ne trouvant pas d'intérêt dans l'évaluation de la réponse thérapeutique ou du pronostic, au contraire du dosage du GM (114). Cependant l'étude de Neofytos *et al* montre une corrélation entre la diminution du taux de BDG dans les 6 semaines qui suivent le traitement et la réponse clinique. Elle montre également, que durant les deux premières semaines de traitement, une diminution du BDG est associée à une survie à 12 semaines (113). Dans notre cas, l'évolution rapidement défavorable du patient ne permet pas de conclure sur la persistance du BDG en tant que marqueur de mauvais pronostic.

CAS N°3

Il s'agit d'un patient de 65 ans dans les suites du conditionnement d'une autogreffe dans un contexte de lymphome. Lors de l'aplasie fébrile (du 08/06 au 18/06) malgré des antigénémies

GM qui restent négatives une prise en charge thérapeutique initiale est faite par amphotéricine B liposomale. Devant les signes radiologiques en faveur d'une API, l'amphotéricine B liposomale est relayée par du voriconazole. L'hypothèse d'une API sera confortée par la culture positive de la sécrétion bronchique.

Le diagnostic d'API probable est posé sur la présence de facteurs d'hôtes : une autogreffe, une aplasie fébrile avec une neutropénie profonde et le traitement de conditionnement immunosuppresseur ; de facteurs cliniques : AEG, fièvre et signe radiologique compatible avec une API et d'un facteur microbiologique : culture d'une sécrétion bronchique positive à *Aspergillus* section *Nidulantes* (en 2 jours). L'évolution du patient est favorable.

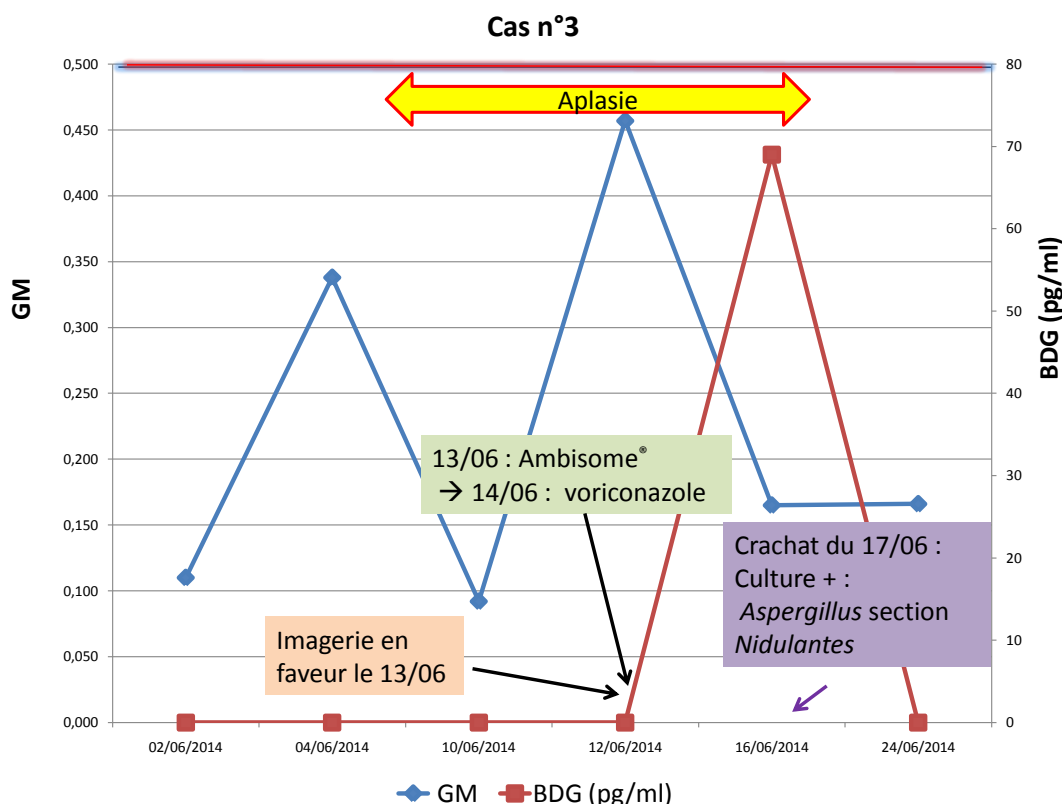


Figure 36 : Suivis de l'antigénémie aspergillaire et du taux de BDG du patient n°3.

L'antigène GM ne s'est pas positivé et le BDG est seulement à un taux douteux (69 pg/ml). La capacité de détection des biomarqueurs peut varier en fonction des espèces fongiques. Il est connu que le taux de sensibilité du BDG varie en fonction de l'espèce de *Candida*. Par exemple il est de 80.6% pour *Candida albicans* et de 61.1% pour *Candida parapsilosis* (75).

En ce qui concerne les aspergillus, une seule étude à ce jour montre que le dosage de l'antigène GM a une meilleure sensibilité pour les aspergillus n'appartenant pas à l'espèce *fumigatus* (ce qui n'est pas le cas ici) et qu'il n'y a pas de différence en ce qui concerne le dosage du BDG (78). On n'a donc pour le moment pas assez de recul pour évaluer l'influence de l'espèce sur le taux de BDG.

Durant l'épisode d'hospitalisation, une bactériémie à *Escherichia coli* a été diagnostiquée (10/06) sans influence sur le taux de BDG. Même si la réaction croisée avec des bactériémies reste controversée, des faux positifs liés à des bactériémies à *Escherichia coli* ont déjà été décrits notamment par Sulahian *et al* (85). Cette étude montre également une absence de différence entre les bactériémies à gram positif ou à gram négatif, contrairement à l'étude de Pickering *et al* qui note un lien plus fréquent avec des bactériémies à gram positif (77).

1.2. BDG SIMILAIRE AU GM

CAS N°4

Il s'agit d'un patient de 46 ans, atteint d'une leucémie aigüe lymphoïde (LAL), traitée par radio-immunothérapie comprenant de l'ibrutinib (anti-CD 22). Ce patient a bénéficié d'un traitement empirique par caspofungine face à une fièvre persistante (aplasie fébrile du 07/03 au 04/04). Le 26/03 alors que le premier dosage de l'antigène GM est négatif, les signes radiologiques sont en faveur d'une API. Le traitement par caspofungine est remplacé par du voriconazole, qui sera relayé rapidement par de l'amphotéricine B liposomale en raison d'une toxidermie. L'antigène GM se négative rapidement 4 jours plus tard au moment de la pousse en culture du crachat d'un *Aspergillus* section *Fumigati*.

Le diagnostic d'API probable est posé sur la présence de facteurs d'hôtes : aplasie fébrile avec une neutropénie profonde supérieure à 10 jours et une biothérapie par des anticorps monoclonaux ; de facteurs cliniques : AEG, aplasie fébrile à point de départ pulmonaire, signe radiologique suspectant une API et de facteurs microbiologiques : une antigénémie GM positive (supérieure à 0.7) associée à la pousse en culture du crachat d'un *Aspergillus* section *Fumigati* (en 4 jours). L'évolution du patient est favorable.

L'interprétation du graphique est limitée car le sérum du 26/03/2014 n'a pas pu être dosé rétrospectivement (quantité de sérum épuisée), ce qui ne permet pas d'évaluer la précocité du test au BDG. Cependant ce dernier est faiblement positif (88 pg/ml) à la même date que l'antigène GM ; le dosage du BDG semble donc efficace dans la détection d'une API. La cinétique post thérapeutique du BDG est similaire à celle du GM. Comme le décrit l'étude de Chai *et al* pour le GM et l'étude de Pazos *et al* pour le BDG, les deux marqueurs pourraient servir de marqueurs pronostiques avec une diminution de ces derniers lors d'une évolution clinique favorable (51,112). Cependant une décroissance des marqueurs sur une période si courte (4 jours) ne permet pas de conclure sur la diminution du BDG en tant que marqueur de bon pronostic.

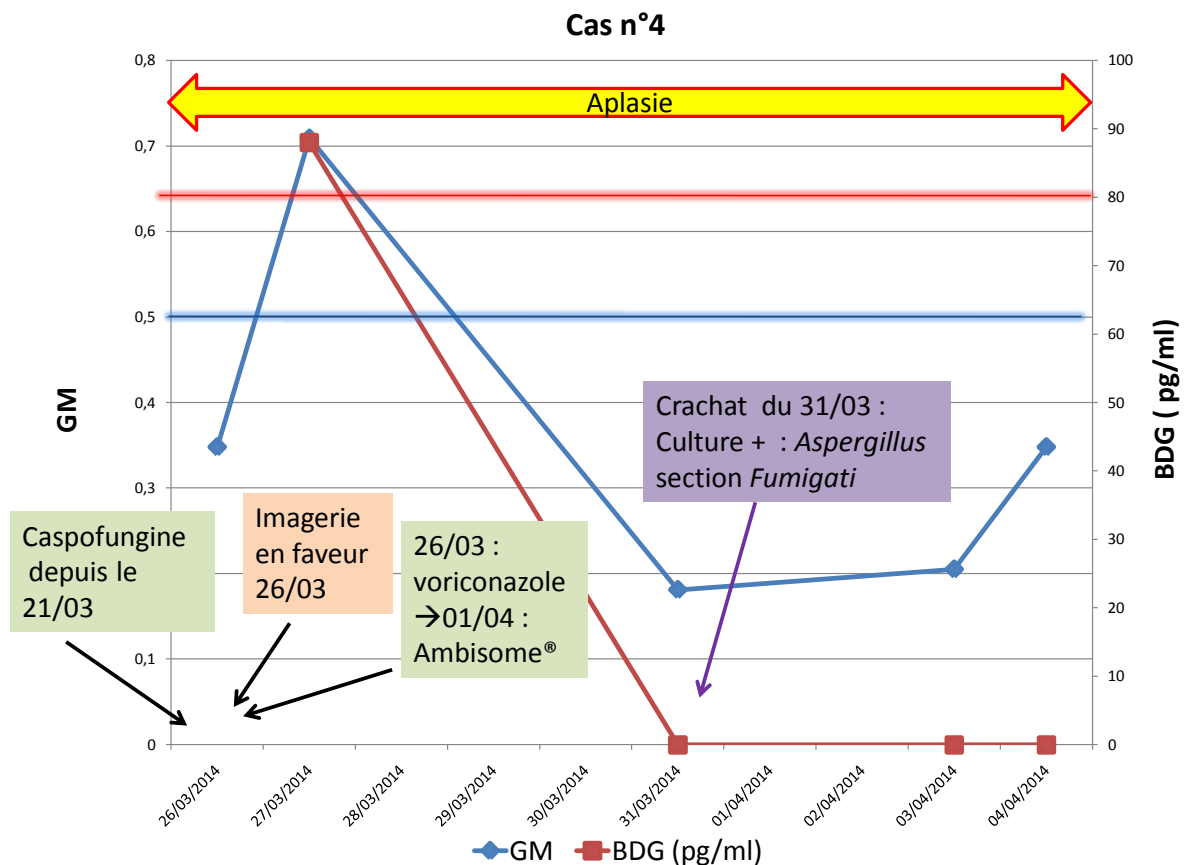


Figure 37 : Suivi de l'antigénémie aspergillaire et du taux de BDG du patient n°4.

CAS N°5

Il s'agit d'une patiente de 70 ans, atteinte d'une LAL dans l'attente d'une seconde allogreffe.

La patiente a eu un traitement prophylactique par posaconazole. Devant une fièvre persistante sous antibiotique (du 12/02 au 12/04) et la première antigénémie positive, un traitement par amphotéricine B liposomale est instauré. L'hypothèse d'une API est confortée par l'imagerie. Devant l'absence d'amélioration clinique et une augmentation de l'antigène GM, une association amphotéricine B liposomale/ posaconazole est initiée.

Le diagnostic d'API probable est posé sur la présence de facteurs d'hôtes : une allogreffe, une neutropénie profonde supérieure à 10 jours et un traitement de conditionnement immunosuppresseur ; de facteurs cliniques : AEG, fièvre, toux, signe radiologique compatible avec une API et de facteurs microbiologiques : des antigénémies GM positives (toutes supérieures à 0.7). L'évolution clinique est défavorable avec une aspergillose disséminée et le décès de la patiente.

Lors de la phase d'induction de cette patiente on retrouve un premier taux de BDG faiblement positif (83 pg/ml) non documenté par une infection fongique et non confirmé par les prélèvements ultérieurs. On a cependant une antibiothérapie par tazocilline le 12/02 et

Augmentin® le 14/02. Il a été décrit de possible faux positifs liés à la prise de ces antibiotiques en intraveineux pouvant contenir du BDG (80)(78). La patiente développe également une bactériémie le 03/03 à *Citrobacter braakii* et *Enterococcus faecium* sans influence sur le taux de BDG. Cela va dans le sens de l'étude récente menée à l'hôpital Necker par Desjardins A. *et al* où le taux de BDG reste négatif même en cas de bactériémie (115).

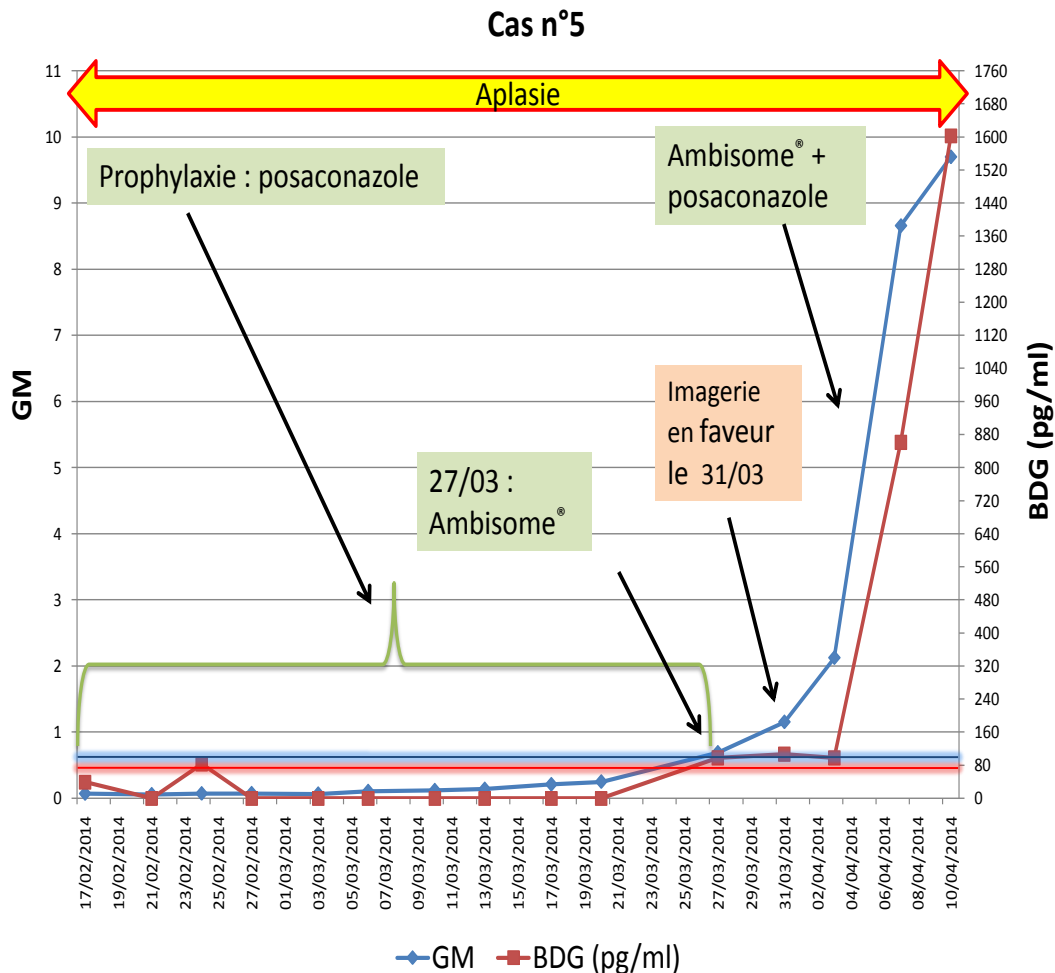


Figure 38 : Suivi de l'antigénémie aspergillaire et du taux de BDG du patient n°5.

Lors de la phase de consolidation on observe une positivité simultanée des deux biomarqueurs avec une cinétique comparable. L'augmentation des 2 marqueurs à des taux élevés est en adéquation avec l'évolution défavorable de la patiente et la dissémination de l'aspergillome.

Dans ce cas, la cinétique observée sur une période de 13 jours est favorable à une utilisation des deux paramètres comme marqueurs de mauvais pronostic lors de l'augmentation de ces derniers.

Il s'agit d'un patient de 76 ans, atteint d'une leucémie lymphoïde chronique. Lors de sa phase d'aplasie le patient a bénéficié d'un traitement empirique par caspofungine. La positivité de l'antigène GM dans le sérum (0.631) et dans le LBA le 06/05 sera confirmée dès le lendemain dans le sérum (4.252). Ces taux, associés à une imagerie en faveur d'une API entraînent une prise en charge thérapeutique par voriconazole.

Le diagnostic d'API probable est posé sur la présence de facteurs d'hôtes : aplasie associée à une neutropénie profonde ; de facteurs cliniques : AEG, toux, dyspnée, signe radiologique compatible avec une API et de facteurs microbiologiques : antigénémie GM positif dans le sérum et dans le LBA. L'évolution du patient est rapidement défavorable, il décède moins de 48h après l'initiation du traitement par voriconazole.

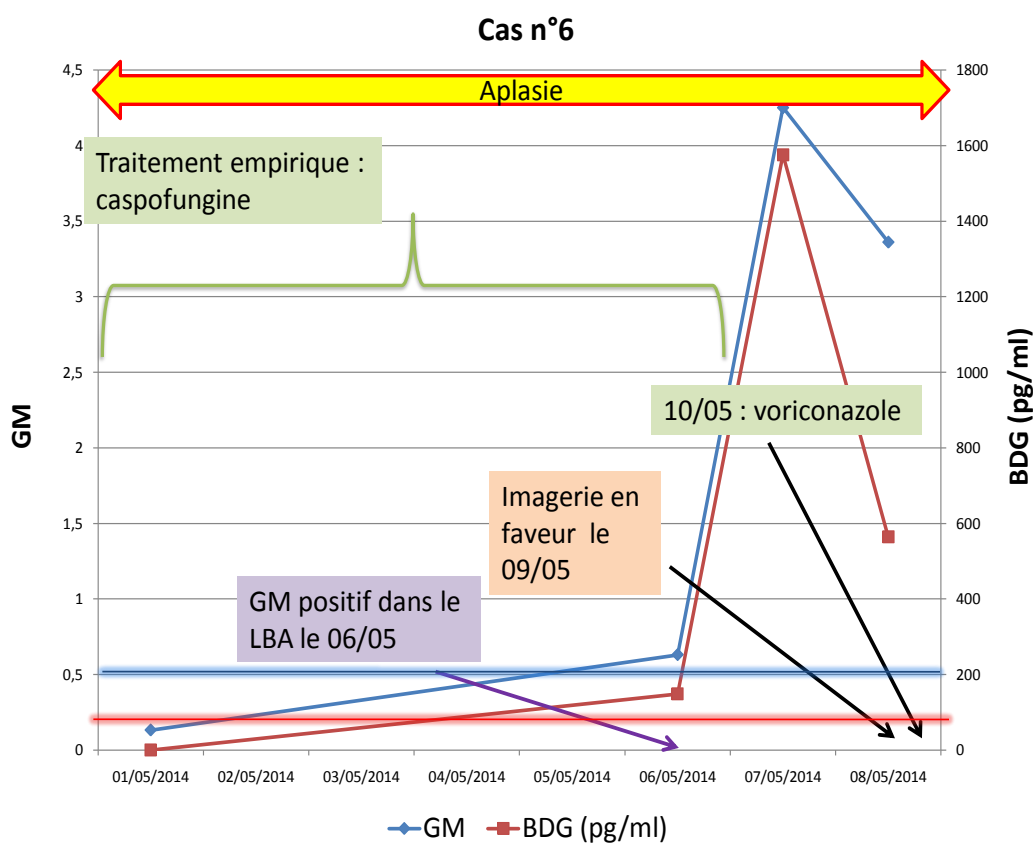


Figure 39 : Suivi de l'antigénémie aspergillaire et du taux de BDG du patient n°6.

On observe une cinétique et une positivité identique pour les deux marqueurs. Le dosage du BDG semble contributif dans la détection de l'API.

Les taux de BDG sont élevés comme dans le cas n°2 et n°5 avec une persistance des deux marqueurs. Cependant cette deuxième positivité du BDG sur une période si courte (1 jour) ne permet pas de conclure sur les capacités pronostiques de ce dernier.

Il s'agit d'un patient de 69 ans, atteint d'un lymphome en 5^{ème} ligne thérapeutique par brentuximab (anticorps anti-CD30). Ce patient a été traité par voriconazole suite à deux antigènes GM positifs (supérieurs à 0.7) et une imagerie compatible avec une API.

Le diagnostic d'API probable est posé sur la présence de facteurs d'hôtes : une autogreffe et une biothérapie par des anticorps monoclonaux ; de facteurs cliniques : AEG, fièvre, toux, signe radiologique compatible avec une API et de facteurs microbiologiques : des antigénémies GM positives et une culture positive à *Aspergillus* section *Fumigati* dans le LBA (en 2 jours). L'évolution de l'aspergillose est favorable mais le patient décèdera 5 mois plus tard sans lien avec l'infection aspergillaire.

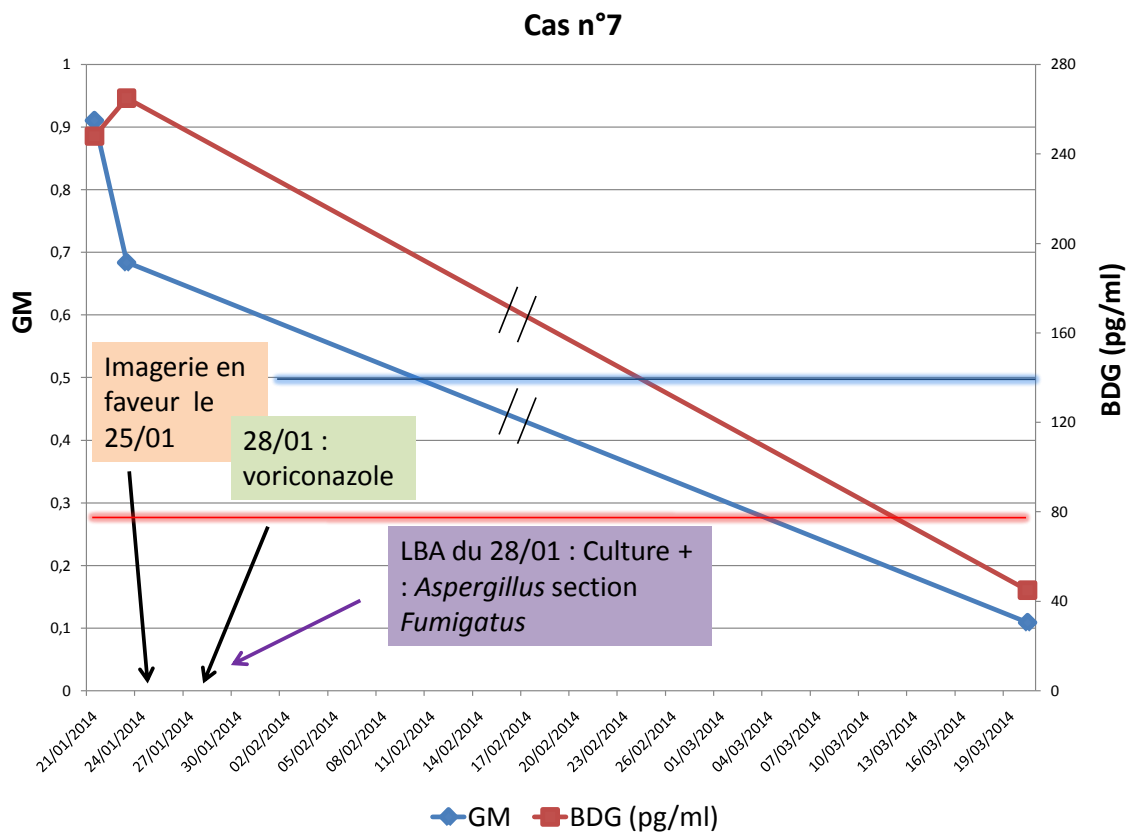


Figure 40 : Suivi de l'antigénémie aspergillaire et du taux de BDG du patient n°7.

On observe une cinétique similaire des deux biomarqueurs. Cependant l'absence de sérum antérieur et postérieur à ceux positifs ne permet pas de conclure sur la précocité, ni sur l'évolution post-thérapeutique du taux de BDG. Les deux marqueurs sont négatifs 3 mois plus tard en accord avec l'évolution favorable du patient en ce qui concerne l'API. L'absence de donnée entre janvier et mars ne permet pas de conclure sur l'utilisation du BDG comme marqueur de bon pronostic.

CAS N°8

Il s'agit d'un patient de 70 ans, en phase de consolidation d'une LAM. Lors de l'aplasie fébrile les taux de GM sont initialement négatifs, mais face à la persistance de la fièvre un traitement par caspofungine est instauré. Ce dernier va rapidement être relayé par du voriconazole dès le 2^{ème} antigène GM positif.

Le diagnostic d'API probable est posé sur la présence de facteurs d'hôtes : une aplasie avec une neutropénie profonde supérieure à 10 jours et un traitement de consolidation ; de facteurs cliniques : AEG, fièvre, douleur thoracique, signe radiologique compatible avec une API et de facteurs microbiologiques : 2 antigénémies GM positives (1^{ère} supérieure à 0.7, 2^{ème} supérieure à 0.5). L'évolution du patient est favorable.

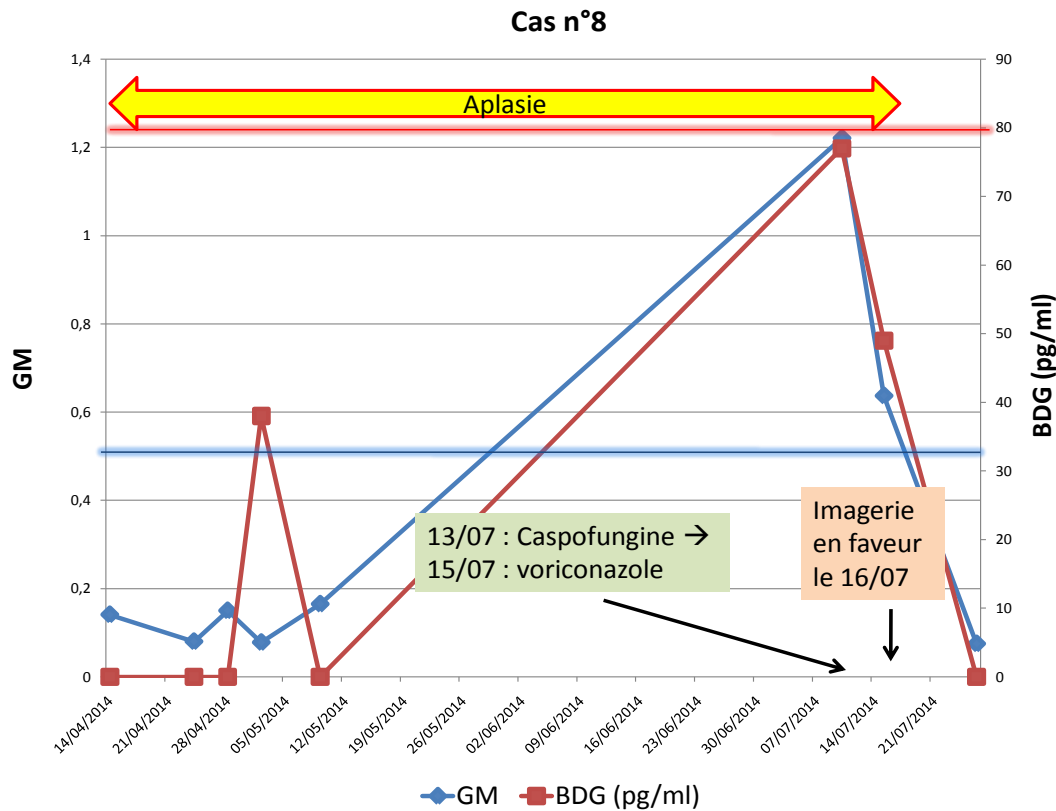


Figure 41 : Suivi de l'antigénémie aspergillaire et du taux de BDG du patient n°8.

Pour ce cas, le taux de BDG reste dans la zone douteuse d'interprétation malgré une antigénémie GM fortement positive et une imagerie en faveur d'une API. La libération du marqueur n'a probablement pas été assez significative. Même si le taux de BDG n'est pas positif chez ce patient on peut constater une évolution des courbes similaires pour les deux

marqueurs avec une négatification rapide des deux antigènes sur 15 jours. Ainsi dans ce cas, une diminution du BDG est en faveur de son utilisation comme marqueur de bon pronostic.

CAS N°9

Il s'agit d'un patient de 45 ans, atteint d'un lymphome récidivant ayant bénéficié d'une autogreffe puis d'une allogreffe. Actuellement sous corticoïdes et méthotrexate dans le cadre d'une GVH cutanée. Ce patient a profité d'une prophylaxie par posaconazole. Un seul antigène GM est positif le 17/03 entraînant une prise en charge curative par amphotéricine B liposomale.

Le diagnostic d'API probable est posé sur la présence de facteurs d'hôtes : une allogreffe et une GVH cutanée ; de facteurs cliniques : AEG, symptômes pulmonaires, signe radiologique compatible avec une API et d'un facteur microbiologique : une antigénémie GM positive (supérieure à 0.7). L'évolution du patient est favorable.

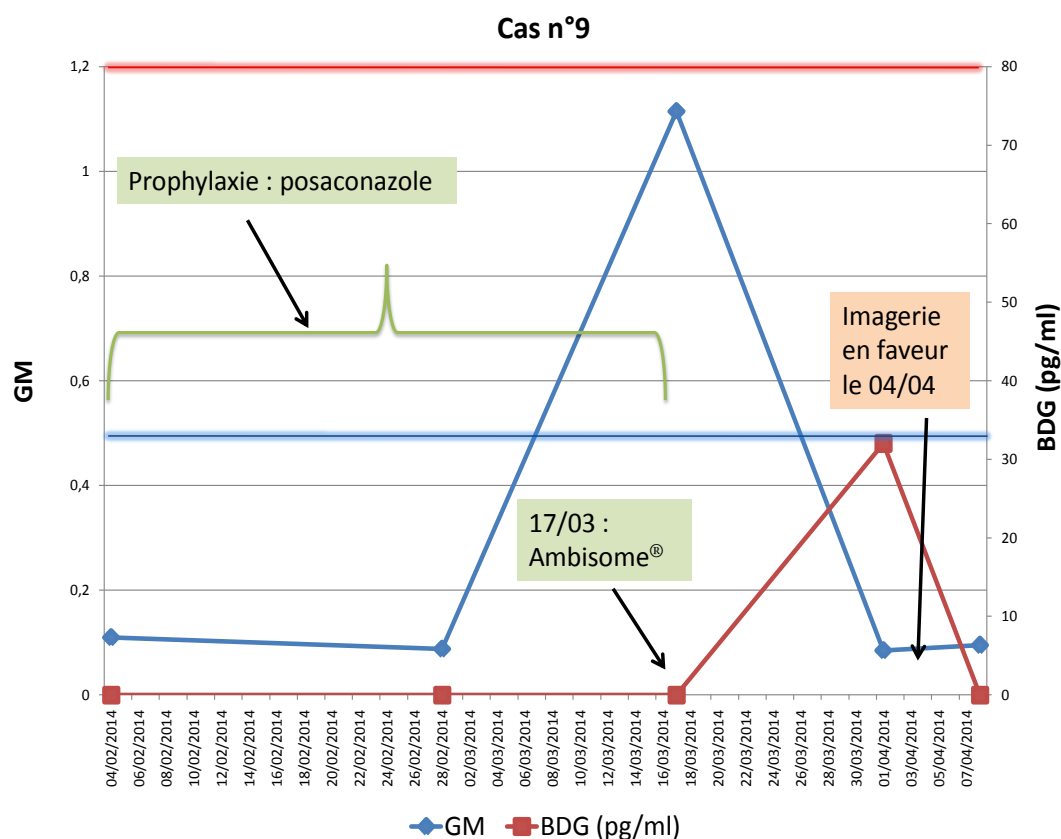


Figure 42 : Suivi de l'antigénémie aspergillaire et du taux de BDG du patient n°9.

En absence d'aplasie profonde, on a un antigène GM positif sans présence de BDG. L'imagerie étant fortement en faveur d'une API ce cas illustre la possibilité malgré une VPN forte que le BDG reste négatif. La négativité du test peut être due à une interférence inconnue sur le dosage (les causes connues ayant été éliminées) ou une quantité de BDG dosable

insuffisante liée à l'hôte (filtration glomérulaire et vitesse de dégradation hépatique de la molécule) (116).

CAS N°10

Il s'agit d'une patiente de 65 ans, atteinte d'une LLC, allogreffée, traité par Rituximab (anti-CD 20). Cette patiente a profité d'une prophylaxie par posaconazole. Dès le premier antigène GM positif le 01/04 un traitement par voriconazole est instauré.

Le diagnostic d'API probable est posé sur la présence de facteurs d'hôtes : une allogreffe, une GVH cutanée traitée par dermocorticoïdes et ciclosporine et une biothérapie par des anticorps monoclonaux ; de facteurs cliniques : AEG, signe radiologique compatible avec une API et de facteurs microbiologiques : des antigénémies GM fortement positives (toutes supérieures à 0.7).

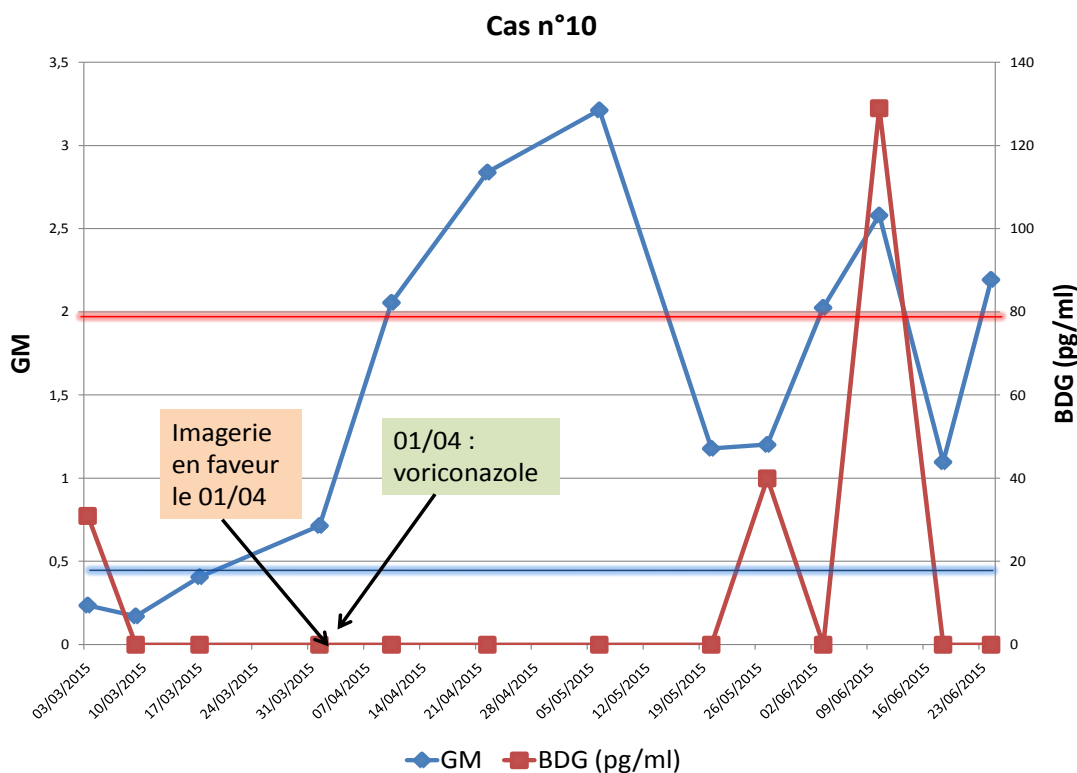


Figure 43 : Suivi de l'antigénémie aspergillaire et du taux de BDG du patient n°10.

Les taux élevés de GM et l'imagerie du 01/04 sont en adéquation avec une API. En ce qui concerne le BDG, il est positif de façon isolé et tardif (2 mois après le diagnostic initial d'API) ce qui est en faveur d'une fausse positivité non documentée. Après finalisation de l'étude on note chez cette patiente une régression des signes cliniques et radiologiques (17/07) mais une persistance de l'antigène GM à des valeurs élevées sans cause retrouvée de fausse positivité.

CAS N°11

Il s'agit d'une découverte d'un lymphome chez un patient de 82 ans. Une candidémie à *Candida tropicalis* est diagnostiquée entraînant une prise en charge initiale par caspofungine, relayée par du fluconazole. Le patient présente un premier antigène GM négatif qui se positiviera fortement par la suite.

Le diagnostic d'API probable est posé sur la présence de facteurs d'hôtes : une neutropénie profonde supérieure à 10 jours et un premier cycle de chimiothérapie débuté le 11/07 ; de facteurs cliniques : AEG, détresse respiratoire, signe radiologique compatible avec une API et de facteurs microbiologiques : des antigénémies GM positives (1 supérieure à 0.5 et 4 supérieures à 0.7). Face à l'évolution défavorable, une prise en charge palliative est instaurée jusqu'au décès rapide du patient.

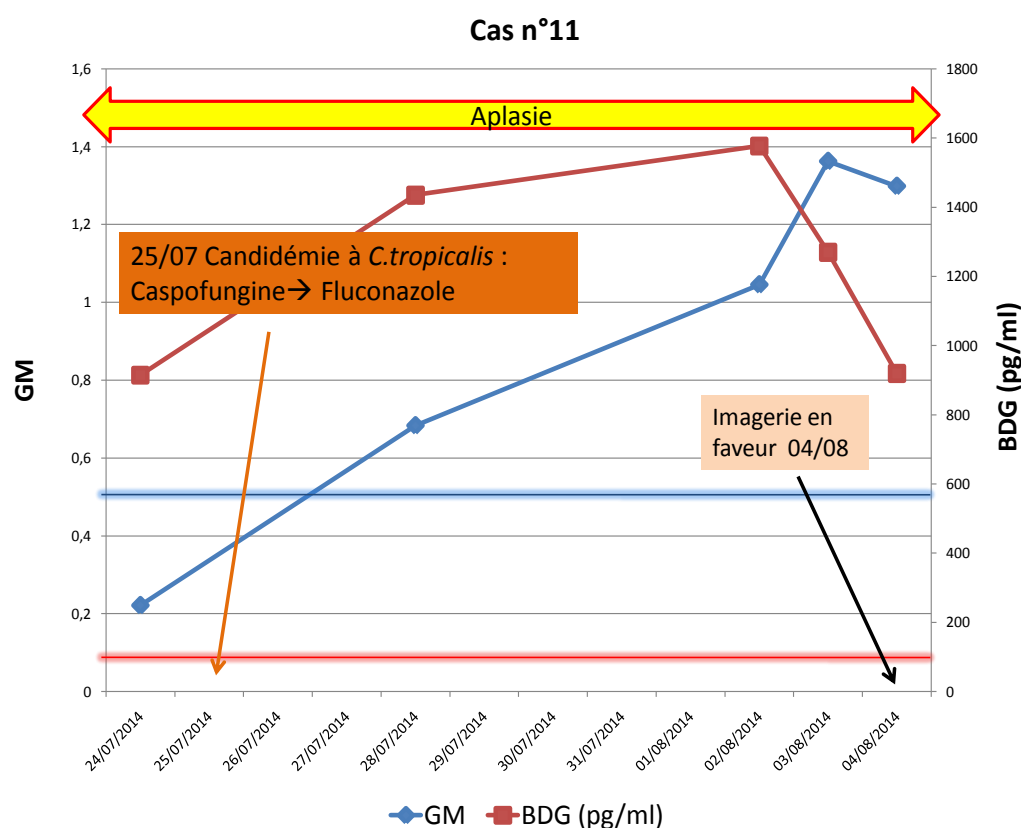


Figure 44 : Suivi de l'antigénémie aspergillaire et du taux de BDG du patient n°11.

Dans ce cas le patient présente une candidémie à *Candida tropicalis* concomitante. Cela rend inexploitable le taux de BDG vis-à-vis de l'API. En effet le fort taux de BDG est probablement lié à la candidémie déjà présente associé à l'API probable.

Ainsi dans l'étude, sans tenir compte du cas n°11 (candidémie), le dosage du BDG semble être un outil de diagnostic précoce qui peut participer à la détection de l'API.

Tableau IX : Nombre de cas et moment de positivité du BDG en fonction de la culture, de l'imagerie et du GM.

	Jamais positif	Avant	En même temps	Après
Culture¹ (prélèvement respiratoire)	1 culture positive	3 cultures positives 2 cultures négatives	1 culture négative	
Imagerie²	3	5	0	1
GM	3	2	4	1

¹ Sept cultures ont été réalisées. ²Dans un cas il manque un sérum ne permettant pas de conclure (cas n°4).

En effet, sur l'ensemble des cultures positives réalisées dans 75% des cas le dosage du BDG est plus précoce que la culture. Cela s'explique par le délai de pousse des prélèvements (en moyenne 2.2 jours) et le temps d'identification. Lorsque le taux de BDG est positif, dans 67% des cas cela a lieu avant la réalisation d'une imagerie en faveur d'une API. Enfin, en ce qui concerne la comparaison avec l'antigène GM, le BDG s'est positivé avant ou en même temps, dans 6 cas sur 10.

2. L'ETUDE MULTICENTRIQUE

2.1. AU NIVEAU NATIONAL

Concernant le projet multicentrique, le dosage de BDG a débuté au CHU de Dijon en février 2011. Les dosages réalisés sur la population cible a permis de recruter 71 AI. Pour les autres centres inclus dans l'étude multicentrique, le dosage a débuté fin 2013 et le niveau d'inclusion est très variable en fonction du type d'activité et de l'existence d'une prophylaxie plus ou moins généralisée. A ce jour, 23 AI ont été déclaré dans ces centres.

L'objectif fixé à une centaine d'AI nécessite donc de poursuivre le projet jusqu'à fin mars 2016.

2.2. AU NIVEAU NANTAIS

L'ensemble des sérums collectés par le laboratoire d'hématologie a bénéficié d'un dosage du BDG, qu'ils soient intégrés ou pas par la suite au protocole et à un groupe déterminé de patients. Ainsi une entrée dans le protocole a été signalée pour 48 patients. Cependant 6

patients ne répondaient pas aux critères d'inclusions : 5 patients étaient dans un contexte de greffe et un patient ne présentait pas de LA. Cela pouvant s'expliquer par la mise en place depuis peu d'envois extérieurs du dosage du BDG vers le CHU de Dijon entraînant une possible confusion.

Ainsi au 1^{er} juin 2015, 42 patients sont inclus dans le protocole : 21 femmes et 21 hommes, avec une moyenne d'âge de 51 ans. Il y avait 24 LAM, 17 LAL, et 1 leucémie à cellules dendritiques. En moyenne 5 dosages du BDG ont été disponibles par patient.

Grâce aux données cliniques présentes dans les courriers d'hospitalisation et les données biologiques, l'ensemble des patients est réparti dans les différents groupes en fonction de l'origine de l'état fébrile. Ces groupes permettront ultérieurement l'appariement des patients.

Tableau X : Répartition des 42 patients du protocole multicentrique.

API probable	Sépticémies/ bactériémies	Foyer infectieux	Sans foyer clinique/radio logique	Dans aucun groupe	
1 cas répondant aux critères d'inclusion	2 cas hors critères d'inclusion	8 cas	9 cas	6 cas	16 cas

Pour les patients ayant présenté une API probable pendant la durée d'étude, un seul patient répond aux critères d'inclusion (cas n°1 de l'étude rétrospective).

Deux autres patients ne peuvent pas être inclus dans le groupe car dans un cas l'API probable a eu lieu en phase de consolidation (cas n°9 de l'étude rétrospective), et dans l'autre cas lors d'une radio-immunothérapie en traitement de première intention (cas n°4 de l'étude rétrospective). Pour ces cas d'API probable, les valeurs du BDG et sa cinétique ont été présentées lors de l'étude rétrospective.

Dans le groupe des 8 patients ayant présenté une bactériémie lors de la période d'inclusion, on retrouve des bactériémies à gram positif : *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Streptococcus mitis/oralis*, et des bactériémies à gram négatif : *Klebsiella pneumoniae*, *Leptotrichia buccalis*, *Bacteroides ovatus*, *Fusobacterium nucleatum*, *Stenotrophomonas maltophilia*.

Sur l'ensemble de ces patients, un seul patient a eu 1 dosage douteux (66 pg/ml) confirmé lors de la reprise du sérum et un dosage positif (91 pg/ml). Aucune infection fongique n'a été diagnostiquée en parallèle. Ce patient atteint d'une LAL a fait une bactériémie diagnostiquée en ville à *Leptotrichia buccalis* (bactérie de la flore buccale) 2 semaines avant le dosage positif. Il est difficile de mettre en cause cette bactériémie dans la positivité du BDG car il n'a pas été décrit de cas de faux positif lié à une bactériémie par cet agent infectieux et la période

entre la bactériémie et le dosage positif semble important. Le patient sera traité par céfépime pendant toute la période d'aplasie.

Dans le groupe des patients ayant présenté un état fébrile avec un foyer infectieux documenté ou non, après exclusion d'une API, il y a 9 patients.

Chez 7 patients, il n'y a pas de taux de BDG positif. Dans les différents types de foyers infectieux on retrouve des atteintes cutanées : un érysipèle et une cellulite mandibulaire sans documentation microbiologique et une lésion cutanée à *Staphylococcus aureus* ; deux atteintes pulmonaires de type pleuro-pneumopathie objectivées par l'imagerie ; une infection dentaire non documentée et une infection sur matériel (stérilet) à *Enterococcus faecium*.

Chez 2 patients, on retrouve des taux de BDG positifs. Dans un premier cas, on retrouve un taux de BDG positif à 351 pg/ml chez un patient présentant un sepsis sur érysipèle du membre inférieur gauche en phase d'induction. Les hémocultures prélevées resteront négatives mais la biopsie cutanée poussera en culture à *Fusarium spp.* Le BDG s'est positivé sur le premier sérum prélevé lors de la prise en charge de l'érysipèle et cela une semaine avant la biopsie. Le BDG, marqueur panfongique, se positive lors d'infection à *Fusarium spp.* comme cela a déjà été décrit dans les études d'Odabasi *et al* et Ostrosky-Zeichner *et al* (75,117). Une étude plus récente mettant en avant l'intérêt du dosage du BDG dans les IFI autres qu'à *Candida* et *Aspergillus*, rapporte un cas de fusariose cutanée disséminée associée à des taux positifs de BDG et des hémocultures positives (118). Dans le cas de notre étude il n'y a pas d'hémoculture positive mais ces dernières ne sont positives que dans 50 % des cas (119). L'évolution de notre patient sera favorable sous voriconazole. Il est à noter que chez ce patient, il a été observé un pic de GM (0.967) isolé et non documenté un mois plus tôt, les causes de fausses positivités ayant été exclues.

Dans le second cas, le patient a eu deux dosages positifs (198 et 104 pg/ml) dans un contexte de pneumopathie. Il n'y avait aucune documentation infectieuse hormis une pousse en culture de *Candida albicans* dans le LBA et les selles. Cependant d'après Pazos *et al* une colonisation à *Candida spp* sur plusieurs sites n'entraîne pas de taux positif de BDG (112). D'autres causes de fausses positivités n'ont pas été décelées.

Sur les 6 patients rentrant dans le groupe des états fébriles sans foyer clinique et radiologique, 2 patients ont présentés des taux de BDG positifs.

Pour ces 2 patients un dosage de BDG était positif de façon isolé, sans documentation infectieuse et sans confirmation sur les sérums suivants. La fausse positivité n'a pas pu être documentée.

Quant aux 16 patients ne rentrant dans aucun groupe (absence d'aplasie fébrile) on ne retrouve aucun dosage de BDG positif.

Au final, avec un seul cas d'API correspondant au critère d'inclusion, la partie nantaise de l'étude multicentrique est pour le moment peu concluante. Au total chez les 5 patients pour lesquels aucune API n'est documentée et possédant un BDG faussement positif, on retrouve une bactériémie et une fusariose cutanée. Pour les 3 autres cas l'origine de la fausse positivité n'est pas identifiée. On souligne également que sur les 39 patients sans API probable, 1 seul patient a présenté une fausse positivité au GM.

Tableau XI : Valeurs intrinsèques du test au BDG : partie nantaise de l'étude multicentrique et de l'étude rétrospective.

Sensibilité	Spécificité	VPP	VPN
72.7%	87.2%	61.5%	89.5%

Sur l'ensemble des deux études, avec 8 tests positifs sur 11 cas d'API probable et 5 tests positifs sur les 39 cas sans API probable ou prouvée, le test de dosage du BDG à une sensibilité de 72.7% et une spécificité de 87.2%. Ces résultats sont en accord avec ceux rapportés dans les études multicentriques d'Ostrosky-Zeichner *et al* et de Lamoth *et al* (75,81).

La valeur prédictive négative est forte (97.1 %) confortant l'intérêt d'utiliser ce test pour exclure une infection fongique. Cependant la VPP du test n'est que de 61.5%. Il est donc nécessaire d'associer ce test à la clinique, la radiologie, et la microbiologie pour le diagnostic de l'API comme le suggère l'étude de Lamoth *et al* (81). Ces valeurs prédictives ne sont qu'à titre indicatif, car notre mode de sélection des patients dans les deux études est non seulement différent, mais aussi non représentatif de la prévalence de l'API en hématologie.

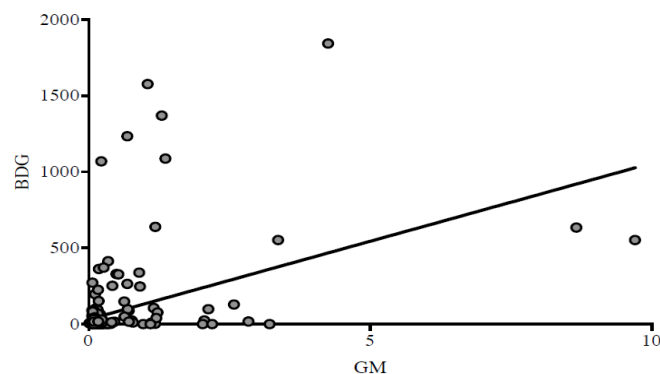


Figure 45 : Courbe de corrélation entre les valeurs de BDG et GM : partie nantaise de l'étude multicentrique et de l'étude rétrospective.

Sur l'ensemble des dosages, une comparaison des valeurs du BDG et du GM a été réalisée. La figure montre une absence de corrélation entre les deux marqueurs avec un coefficient r de 0.2510 ($p < 0.001$). La quantité d'antigènes libérés lors de l'API semble différente en fonction du marqueur. Leur différence de localisation dans la structure pariétale du champignon pourrait expliquer la variation de quantité relarguée. De plus l'absence de corrélation peut être liée au cas n°10 de l'étude rétrospective qui présente des taux élevés et persistants de GM à distance du diagnostic d'API. Ces taux n'ont pas été documentés et ce, même après finalisation de l'étude. Ainsi ces faux positifs concourent à diminuer le coefficient de corrélation.

DISCUSSION GENERALE

Le diagnostic biologique d'une aspergillose invasive, compte tenu du contexte immunologique des patients d'hématologie ne peut se faire qu'à l'aide de méthodes de diagnostic direct. Il repose sur un diagnostic mycologique (examen direct et une culture), un examen anatomopathologique et sur un diagnostic immunologique faisant appel à la détection d'antigènes circulants : le galactomannane (GM) et le (1-3)- β -D-glucane (BDG).

Le BDG, marqueur panfongique, fait sa place dans une démarche diagnostique de l'API en hématologie, essentiellement comme outil complémentaire. L'étude rétrospective associée à l'étude multicentrique avec 11 cas d'API probable, permet de se faire une idée de l'apport diagnostique du dosage du BDG sur le centre nantais.

En termes de technique, les avantages majeurs sont comme pour le GM : le caractère non invasif (simple prise de sang) et le résultat rapide (si le test est réalisé sur place et plusieurs fois par semaine). Cependant il existe quelques inconvénients. Tout d'abord la procédure est manuelle, minutieuse et demande une bonne prise en main de la technique. Ensuite le dosage par série nécessite une forte demande et les prélèvements de sang lipidique, ictérique et hémolysé ne peuvent pas être testés (66,120). De plus, on peut être confronté à de faux positifs liés à la technique en elle-même.

Il est rapporté pour le test Fungitell[®] des sensibilités et spécificités différentes selon les études (Cf tableau V, page 44). Les résultats de notre étude sont en accord avec les études multicentriques d'Ostrosky-Zeichner *et al* et de Lamoth *et al*, puisque le test possède une meilleure spécificité (87.2%) comparée à la sensibilité (72.7%) (75,81). Par ailleurs les résultats des valeurs intrinsèques du test doivent être évalués sur les différentes populations à risque d'AI car, comme pour l'antigène GM, on peut suspecter d'importantes variations de sensibilité et spécificité en fonction du terrain. En effet il y a une meilleure sensibilité chez le patient neutropénique que chez le transplanté d'organe ou que chez le non-neutropénique (86,121). La VPN de notre étude est élevée (89.5%) comme dans les études les plus récentes, ce qui en fait un bon marqueur d'exclusion d'infection fongique (80,81).

Selon les études de Wiliam F *et al*, Furfaro *et al* et Lamoth *et al* on obtiendrait une meilleure spécificité si on se basait sur 2 tests consécutifs comme pour l'antigène GM (65,80,109). Ainsi 2 tests consécutifs supérieurs au seuil seraient fortement en faveur d'une IFI. On remarque que l'étude de Racil *et al* est en contradiction avec cette hypothèse avec une spécificité plus faible (80). Cela peut s'expliquer par le fait que l'étude a pris en compte des AI possibles, contrairement à l'ensemble des autres études. En prenant en compte deux valeurs positives de BDG dans nos études, il y a effectivement un gain en spécificité (97%) mais au détriment de la sensibilité qui diminue fortement (55%).

L'influence d'un traitement empirique ou prophylactique sur le dosage du BDG semble différente selon les études. Selon Racil *et al* on aurait une diminution de la sensibilité si un traitement antifongique est administré avant le dosage (80). Cependant cette variation de sensibilité ne semble pas significative d'après Ostrosky-Zeichner *et al* (75).

Il a été évoqué le possible impact de l'utilisation des échinocandines avant le dosage sur la détection du BDG (111). En effet dans l'étude de Persat *et al* sur 10 patients traités par

échinocandines ayant fait une API, uniquement 4 patients ont eu un dosage de BDG positif (1). Cela est surtout démontré dans les candidémies où l'on observe un taux plus faible de BDG quand une échinocandine est administrée (75). La question d'un éventuel lien peut se poser entre la faible sensibilité du BDG pour l'espèce *C. parapsilosis* et le fait que cette espèce a tendance à présenter des CMI élevées aux échinocandines.

Dans notre étude rétrospective, la présence d'un traitement avant le dosage ne semble pas avoir d'influence. Malgré l'utilisation de caspofungine chez 2 patients en amont du diagnostic (cas n°4 et n°6), il n'y a pas d'absence de positivité du BDG. Les taux de BDG qui auraient pu être mesurés sans traitement par échinocandine dans ces deux cas sont inconnus. La moyenne des taux de BDG chez ces deux patients est de 658 pg/ml alors que pour les autres patients la moyenne est de 277 pg/ml. Il est nécessaire de réaliser d'autres études pour évaluer l'impact réel d'un traitement par les échinocandines.

Lors d'une API, des molécules de BDG sont libérées dans la circulation sanguine. Les études ne sont pas d'accord quant à la précocité, la cinétique et l'évolution post thérapeutique du marqueur.

Au vu des études actuelles, la précocité du marqueur reste difficile à évaluer même si certaines d'entre elles sont en faveur d'une précocité de détection lors d'API notamment vis-à-vis du GM (120,122). Dans l'étude rétrospective le BDG est positif dans 6 cas sur 7 avant ou en même temps que la culture lorsqu'elle est réalisée. Lorsque le taux de BDG est positif, dans 67% des cas cela a lieu avant la réalisation d'une imagerie en faveur d'une API. Enfin, en ce qui concerne la comparaison avec l'antigène GM, le BDG s'est positivé avant ou en même temps, dans 6 cas sur 10.

En ce qui concerne l'évolution cinétique, les études de Mikulska *et al* (123), Koga *et al* (108) et Koo *et al* (114) sont en faveur d'une cinétique de décroissance lente du marqueur après une positivité, malgré une amélioration clinique. Cependant, malgré un suivi réalisé sur une courte période, l'étude rétrospective montre que l'évolution du marqueur semble être en adéquation avec l'évolution clinique. Il y a une négativation du marqueur dans les cas n°1 et 4 avec une évolution favorable, par contre une persistance ou une augmentation du marqueur dans les cas n°2, 5 et 6 est observée lorsque l'évolution est défavorable. Ces résultats sont en faveur d'une utilisation du BDG comme marqueur pronostique de l'évolution clinique.

A ce titre, Koo *et al* montre une absence de différence du taux du BDG lorsque le traitement est instauré, suggérant une clairance lente du marqueur et donc une difficulté d'utilisation de ce dernier comme marqueur pronostic de l'évolution post thérapeutique (76). A contrario, en faveur d'une diminution du taux de BDG en post thérapeutique il y a l'étude de Neofytos *et al*, qui montre une corrélation entre la diminution du BDG et du GM dans les 6 semaines qui suivent le traitement et la réponse clinique. Ils montrent également qu'une diminution durant les deux premières semaines de traitement est associée à une survie à 12 semaines (113). Selon Pazos *et al* il y a également une diminution du taux de BDG dans le sérum lorsqu'il y a une réponse favorable au traitement (112). Au vu de ces résultats et de l'étude d'Ellis *et al*, qui montre une évolution variable du taux de BDG en réponse au traitement, son utilisation comme marqueur pronostique de la réponse thérapeutique des API reste encore à discuter.

En effet le taux de BDG et sa cinétique dépendrait de plusieurs facteurs : du champignon, du poids moléculaire du BDG, du type d'infection, des facteurs d'hôtes, de la filtration glomérulaire et de la vitesse de dégradation hépatique de la molécule (116).

Sur les 6 cultures réalisées à partir de prélèvements pulmonaires il n'a été isolé que 3 souches ne permettant pas de comparer les différentes espèces d'*Aspergillus* et la production d'antigènes circulants. De plus à l'instar du GM, il est possible qu'en cas d'aspergillose non invasive il n'y ait pas de passage du BDG entre les compartiments pulmonaire et sanguin (46). Cela pourrait expliquer l'absence de GM positif et un taux douteux de BDG dans le cas n°3 malgré la présence d'une culture positive sur le crachat. Cependant aucune étude n'a démontré cette hypothèse.

Le principal défaut de ce test est le risque de faux positifs. En ce qui concerne les faux positifs liés à une bactériémie, décrits dans plusieurs articles, une étude récente menée à l'hôpital Necker à Paris par Desjardins A. *et al* donne des résultats différents. En effet dans cette étude sur 21 patients avec une bactériémie, le taux de BDG reste toujours négatif (66,77,115). Pour Fufaro *et al* et Racil *et al*, les faux positifs liés à la bactériémie sont rares mais ne peuvent être exclus (110,124). Il est à noter que dans un contexte de bactériémie, les auteurs observent que les taux de BDG sont faiblement positifs mais surtout non confirmés par un deuxième prélèvement. Cela renforce l'idée d'avoir 2 taux positifs de BDG pour être en faveur d'une IFI. De plus, vis-à-vis des faux positifs, une association avec le GM permettrait une complémentarité car ces deux marqueurs n'ont pas les mêmes types de fausses positivité. Ainsi dans le contexte d'un antigène GM positif où l'on suspecte une fausse positivité, le dosage négatif du BDG permettrait d'exclure la présence d'une IFI et potentiellement d'une API (112).

Pour Persat *et al*, le BDG serait plus efficace que le GM dans la détection des API, alors que pour Racil *et al*, l'utilité du BDG dans la détection des IFI en général reste limitée du fait de sa faible VPP. Par rapport au dosage du GM dans l'étude rétrospective, 3 cas montrent un BDG plus performant que le GM, 4 cas ont une cinétique similaire et 3 cas sont en faveur d'un BDG moins efficace que le GM. Les résultats sont donc mitigés tout comme les différentes études à ce sujet. Sulahian *et al* montrent que le GM est plus spécifique que le BDG (97% contre 82%, respectivement) et le BDG est plus sensible que le GM (81% contre 49%, respectivement) (85). Ils décrivent également une forte VPN du test et préconisent une association des deux biomarqueurs. Les études plus récentes sont de plus en plus en faveur d'une association du GM avec le BDG pour un meilleur diagnostic de l'API (1,77,78). En effet dans notre étude l'association des deux marqueurs permet d'augmenter la sensibilité du test de 72.7% à 90.90% avec une spécificité qui diminue légèrement de 87.2% à 84.6%.

L'utilisation du BDG dans le LBA semble ne pas être très contributive pour le moment. Le BDG aurait une spécificité plus faible que le dosage du GM dans le LBA d'après l'étude de Rose *et al* (86). En effet la colonisation potentielle par des levures donne au test une faible spécificité (125).

Les résultats de l'étude rétrospective ont permis d'évaluer la capacité de mise en place du test dans le laboratoire et d'appréhender les contraintes liées à ce test. Il s'agit d'une étude préliminaire qui possède les limites suivantes : un seul centre est concerné, elle n'a pas de groupe contrôle et le nombre de cas n'est pas élevé. Par contre, il faut souligner que contrairement à de nombreuses études rétrospectives évaluant l'intérêt du BDG dans le cadre

des IFI en général et incluant peu d'API, notre étude repose sur 11 dossiers. L'aspect rétrospectif entraîne une perte d'information et la capacité de récupérer des sérums complémentaires. Quant à l'étude multicentrique, les résultats peu concluants sont peut-être liés aux critères de sélection restreints des patients. En effet au vu des populations à risque actuelles, élargir la population cible en prenant en compte d'autres hémopathies telles que les syndromes lymphoprolifératifs permettrait d'augmenter le nombre d'inclusions. De même pour le choix de la phase thérapeutique, même si la phase d'induction est la phase la plus critique dans les LA.

CONCLUSION

Un diagnostic précoce permet une meilleure prise en charge thérapeutique mais le diagnostic microbiologique et l'imagerie peuvent être limitants (81). Il est donc important d'avoir des outils de diagnostic performants pour mettre en place ou non un traitement, le maintenir ou l'arrêter.

Les premières études sur le BDG ont été d'emblées prometteuses (49) alors que celles plus récentes émettent des réserves. Le dosage de BDG est pourtant un outil diagnostique utile pour le dépistage des IFI et des API. Il est rapide, non invasif et d'un coût accessible à la majorité des structures (23 euros/test). L'identification des interférences et leur impact sur le dosage du BDG permet une meilleure interprétation des résultats et une prescription rationnelle des examens. L'excellente valeur prédictive négative de ce marqueur permet une meilleure prise en charge des patients à haut risque en essayant de réduire l'utilisation des traitements empiriques.

Par contre, en tant que marqueur panfongique, sa positivité ne permet pas de connaître la nature de l'IFI en cours. Il nécessite l'association à d'autres outils diagnostiques pour identifier le fongique en cause. En effet sa positivité doit être interprétée en fonction des facteurs d'hôte, de la clinique, de l'imagerie et du résultat du GM car le manque de spécificité pour une espèce fongique complique l'interprétation. Dans ce contexte, l'association avec la détection du GM pourrait être pertinente afin d'augmenter la sensibilité et la spécificité du test.

Par ailleurs, la commercialisation de tests de biologie moléculaire permettant la détection d'ADN aspergillaire dans le sérum pourrait révolutionner le diagnostic. En effet, en cours d'évaluation, la PCR multipathogène Septifast[®] de chez Roche[®], serait capable de détecter 40 genres et espèces de bactéries et de champignons dont *Aspergillus fumigatus* (65). De plus, le kit MycoGENIE[®] de la société Ademtech[®] pourrait détecter à la fois l'ADN d'*A. fumigatus* et l'un des marqueurs génomique de résistance environnementale aux azolés (TR34/L98H Cyp51A) (64). Cependant la place de ces nouveaux tests parmi l'arsenal diagnostique doit être évaluée.

1. Persat F, Ranque S, Derouin F, Michel-Nguyen A, Picot S, Sulahian A. Contribution of the (1->3)-beta-D-glucan assay for diagnosis of invasive fungal infections. *J Clin Microbiol.* 2008 Mar;46(3):1009–13.
2. Pagano L, Caira M, Picardi M, Candoni A, Melillo L, Fianchi L, et al. Invasive Aspergillosis in patients with acute leukemia: update on morbidity and mortality--SEIFEM-C Report. *Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am.* 2007 Jun 1;44(11):1524–5.
3. Cornely OA, Maertens J, Winston DJ, Perfect J, Ullmann AJ, Walsh TJ, et al. Posaconazole vs. fluconazole or itraconazole prophylaxis in patients with neutropenia. *N Engl J Med.* 2007 Jan 25;356(4):348–59.
4. De Pauw B, Walsh TJ, Donnelly JP, Stevens DA, Edwards JE, Calandra T, et al. Revised definitions of invasive fungal disease from the European Organization for Research and Treatment of Cancer/Invasive Fungal Infections Cooperative Group and the National Institute of Allergy and Infectious Diseases Mycoses Study Group (EORTC/MSG) Consensus Group. *Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am.* 2008 Jun 15;46(12):1813–21.
5. Park SJ, Mehrad B. Innate immunity to *Aspergillus* species. *Clin Microbiol Rev.* 2009 Oct;22(4):535–51.
6. Chabasse D, et al. Les moisissures d'intérêt médical. *BIOFORMA* 2002.
7. Reboux G, Bellanger A-P, Roussel S, Grenouillet F, Millon L. [Moulds in dwellings: health risks and involved species]. *Rev Mal Respir.* 2010 Feb;27(2):169–79.
8. Hong S-B, Shin H-D, Hong J, Frisvad JC, Nielsen PV, Varga J, et al. New taxa of *Neosartorya* and *Aspergillus* in *Aspergillus* section *Fumigati*. *Antonie Van Leeuwenhoek.* 2008 Feb;93(1-2):87–98.
9. Alcazar-Fuoli L, Mellado E, Alastruey-Izquierdo A, Cuenca-Estrella M, Rodriguez-Tudela JL. *Aspergillus* section *Fumigati*: antifungal susceptibility patterns and sequence-based identification. *Antimicrob Agents Chemother.* 2008 Apr;52(4):1244–51.
10. <http://www.microbiologie-medicale.fr/mycologie/identificationchampignons.htm>.
11. Abad A, Fernández-Molina JV, Bikandi J, Ramírez A, Margareto J, Sendino J, et al. What makes *Aspergillus fumigatus* a successful pathogen? Genes and molecules involved in invasive aspergillosis. *Rev Iberoam Micol.* 2010 Dec;27(4):155–82.
12. Dagenais TRT, Keller NP. Pathogenesis of *Aspergillus fumigatus* in Invasive Aspergillosis. *Clin Microbiol Rev.* 2009 Jul;22(3):447–65.

13. Ben-Ami R, Lewis RE, Leventakos K, Kontoyiannis DP. *Aspergillus fumigatus* inhibits angiogenesis through the production of gliotoxin and other secondary metabolites. *Blood*. 2009 Dec 17;114(26):5393–9.
14. Lewis RE, Wiederhold NP, Chi J, Han XY, Komanduri KV, Kontoyiannis DP, et al. Detection of gliotoxin in experimental and human aspergillosis. *Infect Immun*. 2005 Jan;73(1):635–7.
15. McCormick A, Loeffler J, Ebel F. *Aspergillus fumigatus*: contours of an opportunistic human pathogen. *Cell Microbiol*. 2010 Nov;12(11):1535–43.
16. Kaur S, Singh S. Biofilm formation by *Aspergillus fumigatus*. *Med Mycol*. 2014 Jan;52(1):2–9.
17. Seidler MJ, Salvenmoser S, Müller F-MC. *Aspergillus fumigatus* forms biofilms with reduced antifungal drug susceptibility on bronchial epithelial cells. *Antimicrob Agents Chemother*. 2008 Nov;52(11):4130–6.
18. Sturtevant JE, Latgé JP. Interactions between conidia of *Aspergillus fumigatus* and human complement component C3. *Infect Immun*. 1992 May;60(5):1913–8.
19. Mambula SS, Sau K, Henneke P, Golenbock DT, Levitz SM. Toll-like receptor (TLR) signaling in response to *Aspergillus fumigatus*. *J Biol Chem*. 2002 Oct 18;277(42):39320–6.
20. Bruns S, Kniemeyer O, Hasenberg M, Aimanianda V, Nietzsche S, Thywissen A, et al. Production of extracellular traps against *Aspergillus fumigatus* in vitro and in infected lung tissue is dependent on invading neutrophils and influenced by hydrophobin RodA. *PLoS Pathog*. 2010 Apr;6(4):e1000873.
21. Parasitoses et mycoses des régions tempérées et tropicales. ANOFEL. 3e édition. ELSEVIER MASSON.
22. <http://www.gaffi.org/>.
23. Lortholary O, Gangneux J-P, Sitbon K, Lebeau B, de Monbrison F, Le Strat Y, et al. Epidemiological trends in invasive aspergillosis in France: the SAIF network (2005-2007). *Clin Microbiol Infect Off Publ Eur Soc Clin Microbiol Infect Dis*. 2011 Dec;17(12):1882–9.
24. Cornet M, Levy V, Fleury L, Lortholary J, Barquins S, Coureul MH, et al. Efficacy of prevention by high-efficiency particulate air filtration or laminar airflow against *Aspergillus* airborne contamination during hospital renovation. *Infect Control Hosp Epidemiol*. 1999 Jul;20(7):508–13.
25. Compte rendu RESSIF mars 2015 - Institut Pasteur.

26. Nosari A. Infectious complications in chronic lymphocytic leukemia. *Mediterr J Hematol Infect Dis*. 2012;4(1):e2012070.
27. Nedel WL, Kontoyiannis DP, Pasqualotto AC. Aspergillosis in patients treated with monoclonal antibodies. *Rev Iberoam Micol*. 2009 Sep 30;26(3):175–83.
28. Rigal E, Gateault P, Lebranchu Y, Hoarau C. [Therapeutic monoclonal antibodies: update on the risk of opportunistic infections]. *Médecine Sci MS*. 2009 Dec;25(12):1135–40.
29. Tomblyn M, Chiller T, Einsele H, Gress R, Sepkowitz K, Storek J, et al. Guidelines for Preventing Infectious Complications among Hematopoietic Cell Transplant Recipients: A Global Perspective. *Biol Blood Marrow Transplant J Am Soc Blood Marrow Transplant*. 2009 Oct;15(10):1143–238.
30. Sherif R, Segal BH. Pulmonary aspergillosis: clinical presentation, diagnostic tests, management and complications. *Curr Opin Pulm Med*. 2010 May;16(3):242–50.
31. Georgiadou SP, Sipsas NV, Marom EM, Kontoyiannis DP. The diagnostic value of halo and reversed halo signs for invasive mold infections in compromised hosts. *Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am*. 2011 May;52(9):1144–55.
32. Caillot D, Couaillier JF, Bernard A, Casasnovas O, Denning DW, Mannone L, et al. Increasing volume and changing characteristics of invasive pulmonary aspergillosis on sequential thoracic computed tomography scans in patients with neutropenia. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*. 2001 Jan 1;19(1):253–9.
33. Perfect JR. Fungal diagnosis: how do we do it and can we do better? *Curr Med Res Opin*. 2013 Apr;29 Suppl 4:3–11.
34. Reinwald M, Buchheidt D, Hummel M, Duerken M, Bertz H, Schwerdtfeger R, et al. Diagnostic performance of an Aspergillus-specific nested PCR assay in cerebrospinal fluid samples of immunocompromised patients for detection of central nervous system aspergillosis. *PloS One*. 2013;8(2):e56706.
35. Bergeron A, Porcher R, Sulahian A, de Bazelaire C, Chagnon K, Raffoux E, et al. The strategy for the diagnosis of invasive pulmonary aspergillosis should depend on both the underlying condition and the leukocyte count of patients with hematologic malignancies. *Blood*. 2012 Feb 23;119(8):1831–7; quiz 1956.
36. http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-40422011000200023.
37. Pfeiffer CD, Fine JP, Safdar N. Diagnosis of invasive aspergillosis using a galactomannan assay: a meta-analysis. *Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am*. 2006 May 15;42(10):1417–27.

38. Maertens J, Marchetti O, Herbrecht R, Cornely OA, Flückiger U, Frère P, et al. European guidelines for antifungal management in leukemia and hematopoietic stem cell transplant recipients: summary of the ECIL 3--2009 update. *Bone Marrow Transplant.* 2011 May;46(5):709–18.
39. Pinel C, Fricker-Hidalgo H, Lebeau B, Garban F, Hamidfar R, Ambroise-Thomas P, et al. Detection of circulating *Aspergillus fumigatus* galactomannan: value and limits of the Platelia test for diagnosing invasive aspergillosis. *J Clin Microbiol.* 2003 May;41(5):2184–6.
40. Marchetti O, Lamoth F, Mikulska M, Viscoli C, Verweij P, Bretagne S, et al. ECIL recommendations for the use of biological markers for the diagnosis of invasive fungal diseases in leukemic patients and hematopoietic SCT recipients. *Bone Marrow Transplant.* 2012 Jun;47(6):846–54.
41. Mikulska M, Furfaro E, Del Bono V, Raiola AM, Ratto S, Bacigalupo A, et al. Piperacillin/tazobactam (Tazocin™) seems to be no longer responsible for false-positive results of the galactomannan assay. *J Antimicrob Chemother.* 2012 Jul;67(7):1746–8.
42. Zandijk E, Mewis A, Magerman K, Cartuyvels R. False-positive results by the platelia *Aspergillus* galactomannan antigen test for patients treated with amoxicillin-clavulanate. *Clin Vaccine Immunol CVI.* 2008 Jul;15(7):1132–3.
43. Petraitiene R, Petraitis V, Witt JR, Durkin MM, Bacher JD, Wheat LJ, et al. Galactomannan antigenemia after infusion of gluconate-containing Plasma-Lyte. *J Clin Microbiol.* 2011 Dec;49(12):4330–2.
44. Martín-Rabadán P, Gijón P, Alonso Fernández R, Ballesteros M, Anguita J, Bouza E. False-positive *Aspergillus* antigenemia due to blood product conditioning fluids. *Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am.* 2012 Aug;55(4):e22–7.
45. Roilides E, Pana Z-D. Application of diagnostic markers to invasive aspergillosis in children. *Ann N Y Acad Sci.* 2012 Dec;1272:1–8.
46. Hope WW, Kruhlak MJ, Lyman CA, Petraitiene R, Petraitis V, Francesconi A, et al. Pathogenesis of *Aspergillus fumigatus* and the kinetics of galactomannan in an in vitro model of early invasive pulmonary aspergillosis: implications for antifungal therapy. *J Infect Dis.* 2007 Feb 1;195(3):455–66.
47. Marr KA, Laverdiere M, Gugel A, Leisenring W. Antifungal therapy decreases sensitivity of the *Aspergillus* galactomannan enzyme immunoassay. *Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am.* 2005 Jun 15;40(12):1762–9.
48. Jarque I, Andreu R, Salavert M, Gómez D, Pemán J, Gobernado M, et al. [Value of *Aspergillus* galactomannan antigen detection in the diagnosis and follow-up of invasive aspergillosis in hematological patients]. *Rev Iberoam Micol.* 2003 Sep;20(3):116–8.

49. Pazos C, del Palacio A. [Early diagnosis of invasive aspergillosis in neutropenic patients with bi-weekly serial screening of circulating galactomannan by Platelia Aspergillus]. *Rev Iberoam Micol.* 2003 Sep;20(3):99–102.
50. Bergeron A, Porcher R, Menotti J, Poirot JL, Chagnon K, Vekhoff A, et al. Prospective evaluation of clinical and biological markers to predict the outcome of invasive pulmonary aspergillosis in hematological patients. *J Clin Microbiol.* 2012 Mar;50(3):823–30.
51. Chai LYA, Kullberg B-J, Johnson EM, Teerenstra S, Khin LW, Vonk AG, et al. Early serum galactomannan trend as a predictor of outcome of invasive aspergillosis. *J Clin Microbiol.* 2012 Jul;50(7):2330–6.
52. Paugam A, Baixench M-T, Lebuissou A, Dupouy-Camet J. [Diagnosis of invasive pulmonary aspergillosis: value of bronchoalveolar lavage galactomannan for immunocompromised patients]. *Pathol Biol (Paris).* 2010 Feb;58(1):100–3.
53. Zhang S, Wang S, Wan Z, Li R, Yu J. The diagnosis of invasive and noninvasive pulmonary aspergillosis by serum and bronchoalveolar lavage fluid galactomannan assay. *BioMed Res Int.* 2015;2015:943691.
54. Viscoli C, Machetti M, Gazzola P, De Maria A, Paola D, Van Lint MT, et al. Aspergillus galactomannan antigen in the cerebrospinal fluid of bone marrow transplant recipients with probable cerebral aspergillosis. *J Clin Microbiol.* 2002 Apr;40(4):1496–9.
55. Thornton CR. Development of an immunochromatographic lateral-flow device for rapid serodiagnosis of invasive aspergillosis. *Clin Vaccine Immunol CVI.* 2008 Jul;15(7):1095–105.
56. Thornton C, Johnson G, Agrawal S. Detection of invasive pulmonary aspergillosis in haematological malignancy patients by using lateral-flow technology. *J Vis Exp JoVE.* 2012;(61).
57. Held J, Schmidt T, Thornton CR, Kotter E, Bertz H. Comparison of a novel Aspergillus lateral-flow device and the Platelia® galactomannan assay for the diagnosis of invasive aspergillosis following haematopoietic stem cell transplantation. *Infection.* 2013 Dec;41(6):1163–9.
58. Hoenigl M, Koidl C, Duettmann W, Seeber K, Wagner J, Buzina W, et al. Bronchoalveolar lavage lateral-flow device test for invasive pulmonary aspergillosis diagnosis in haematological malignancy and solid organ transplant patients. *J Infect.* 2012 Dec;65(6):588–91.
59. Suarez F, Lortholary O, Buland S, Rubio MT, Ghez D, Mahé V, et al. Detection of circulating Aspergillus fumigatus DNA by real-time PCR assay of large serum volumes improves early diagnosis of invasive aspergillosis in high-risk adult patients under hematologic surveillance. *J Clin Microbiol.* 2008 Nov;46(11):3772–7.

60. Millon L, Grenouillet F, Crouzet J, Larosa F, Loewert S, Bellanger AP, et al. False-positive *Aspergillus* real-time PCR assay due to a nutritional supplement in a bone marrow transplant recipient with GVH disease. *Med Mycol*. 2010 Jun;48(4):661–4.
61. Schwarzinger M, Sagaon-Teyssier L, Cabaret O, Bretagne S, Cordonnier C, PREVERT Investigators. Performance of serum biomarkers for the early detection of invasive aspergillosis in febrile, neutropenic patients: a multi-state model. *PloS One*. 2013;8(6):e65776.
62. White PL, Wingard JR, Bretagne S, Löffler J, Patterson TF, Slavin MA, et al. *Aspergillus* Polymerase Chain Reaction: Systematic Review of Evidence for Clinical Use in Comparison With Antigen Testing. *Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am*. 2015 Jun 25;
63. Abad-Diaz-De-Cerio A, Fernandez-Molina JV, Ramirez-Garcia A, Sendino J, Hernando FL, Pemán J, et al. The aspHS gene as a new target for detecting *Aspergillus fumigatus* during infections by quantitative real-time PCR. *Med Mycol*. 2013 Jul;51(5):545–54.
64. <http://www.aspergillus.org.uk/sites/default/files/pictures/Posters/P1091-poster.pdf>.
65. Warhurst G, Dunn G, Chadwick P, Blackwood B, McAuley D, Perkins GD, et al. Rapid detection of health-care-associated bloodstream infection in critical care using multipathogen real-time polymerase chain reaction technology: a diagnostic accuracy study and systematic review. *Health Technol Assess Winch Engl*. 2015 May;19(35):1–142.
66. William F. Wright. (1-3)-b-D-Glucan Assay: A review of its laboratory and Clinical Application. *LABMEDICINE*. 2011 Nov;42(11).
67. <http://medecine-douce-champignons-mycotherapie.e-monsite.com/pages/scientifique/quelle-est-la-substance-capable-de-soigner.html>.
68. Brown GD, Gordon S. Immune recognition of fungal beta-glucans. *Cell Microbiol*. 2005 Apr;7(4):471–9.
69. Ketchum PA, Novitsky TJ. Assay of endotoxin by limulus amebocyte lysate. *Methods Mol Med*. 2000;36:3–12.
70. <http://www.futura-sciences.com/magazines/nature/infos/qr/d/nature-sang-animaux-il-toujours-rouge-1188/>.
71. <http://leslimules.free.fr/morphologie.html>.
72. Obayashi T, Yoshida M, Mori T, Goto H, Yasuoka A, Iwasaki H, et al. Plasma (1-->3)-beta-D-glucan measurement in diagnosis of invasive deep mycosis and fungal febrile episodes. *Lancet*. 1995 Jan 7;345(8941):17–20.

73. Obayashi T, Yoshida M, Tamura H, Aketagawa J, Tanaka S, Kawai T. Determination of plasma (1 \rightarrow 3)-beta-D-glucan: a new diagnostic aid to deep mycosis. *J Med Vet Mycol Bi-Mon Publ Int Soc Hum Anim Mycol*. 1992;30(4):275–80.
74. Latgé J-P. The cell wall: a carbohydrate armour for the fungal cell. *Mol Microbiol*. 2007 Oct;66(2):279–90.
75. Ostrosky-Zeichner L, Alexander BD, Kett DH, Vazquez J, Pappas PG, Saeki F, et al. Multicenter clinical evaluation of the (1 \rightarrow 3) beta-D-glucan assay as an aid to diagnosis of fungal infections in humans. *Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am*. 2005 Sep 1;41(5):654–9.
76. Koo S, Bryar JM, Page JH, Baden LR, Marty FM. Diagnostic performance of the (1 \rightarrow 3)-beta-D-glucan assay for invasive fungal disease. *Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am*. 2009 Dec 1;49(11):1650–9.
77. Pickering JW, Sant HW, Bowles CAP, Roberts WL, Woods GL. Evaluation of a (1 \rightarrow 3)-beta-D-glucan assay for diagnosis of invasive fungal infections. *J Clin Microbiol*. 2005 Dec;43(12):5957–62.
78. Hachem RY, Kontoyiannis DP, Chemaly RF, Jiang Y, Reitzel R, Raad I. Utility of galactomannan enzyme immunoassay and (1,3) beta-D-glucan in diagnosis of invasive fungal infections: low sensitivity for *Aspergillus fumigatus* infection in hematologic malignancy patients. *J Clin Microbiol*. 2009 Jan;47(1):129–33.
79. Ellis M, Al-Ramadi B, Finkelman M, Hedstrom U, Kristensen J, Ali-Zadeh H, et al. Assessment of the clinical utility of serial beta-D-glucan concentrations in patients with persistent neutropenic fever. *J Med Microbiol*. 2008 Mar;57(Pt 3):287–95.
80. Racil Z, Kocmanova I, Lengerova M, Weinbergerova B, Buresova L, Toskova M, et al. Difficulties in using 1,3-{beta}-D-glucan as the screening test for the early diagnosis of invasive fungal infections in patients with haematological malignancies--high frequency of false-positive results and their analysis. *J Med Microbiol*. 2010 Sep;59(Pt 9):1016–22.
81. Lamoth F, Cruciani M, Mengoli C, Castagnola E, Lortholary O, Richardson M, et al. β -Glucan antigenemia assay for the diagnosis of invasive fungal infections in patients with hematological malignancies: a systematic review and meta-analysis of cohort studies from the Third European Conference on Infections in Leukemia (ECIL-3). *Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am*. 2012 Mar 1;54(5):633–43.
82. Ostrosky-Zeichner L. Invasive mycoses: diagnostic challenges. *Am J Med*. 2012 Jan;125(1 Suppl):S14–24.
83. Kanda H, Kubo K, Hamasaki K, Kanda Y, Nakao A, Kitamura T, et al. Influence of various hemodialysis membranes on the plasma (1 \rightarrow 3)-beta-D-glucan level. *Kidney Int*. 2001 Jul;60(1):319–23.

84. Mennink-Kersten MASH, Warris A, Verweij PE. 1,3-beta-D-glucan in patients receiving intravenous amoxicillin-clavulanic acid. *N Engl J Med*. 2006 Jun 29;354(26):2834–5.
85. Sulahian A, Porcher R, Bergeron A, Touratier S, Raffoux E, Menotti J, et al. Use and limits of (1-3)- β -d-glucan assay (Fungitell), compared to galactomannan determination (Platelia Aspergillus), for diagnosis of invasive aspergillosis. *J Clin Microbiol*. 2014 Jul;52(7):2328–33.
86. Rose SR, Vallabhajosyula S, Velez MG, Fedorko DP, VanRaden MJ, Gea-Banacloche JC, et al. The utility of bronchoalveolar lavage beta-D-glucan testing for the diagnosis of invasive fungal infections. *J Infect*. 2014 Sep;69(3):278–83.
87. Lyons JL, Thakur KT, Lee R, Watkins T, Pardo CA, Carson KA, et al. Utility of measuring (1,3)- β -d-glucan in cerebrospinal fluid for diagnosis of fungal central nervous system infection. *J Clin Microbiol*. 2015 Jan;53(1):319–22.
88. Koncan R, Favuzzi V, Ligozzi M, Sorrentino A, Cornaglia G, Cascio GL. Cross-reactivity of *Nocardia* spp. in the fungal (1-3)- β -d-glucan assay performed on cerebral spinal fluid. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2015 Feb;81(2):94–5.
89. Walsh TJ, Anaissie EJ, Denning DW, Herbrecht R, Kontoyiannis DP, Marr KA, et al. Treatment of aspergillosis: clinical practice guidelines of the Infectious Diseases Society of America. *Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am*. 2008 Feb 1;46(3):327–60.
90. http://pharmaweb.univ-lille2.fr/apache2-default/aides_pedagogiques/parasito.
91. <http://slideplayer.fr/slide/508791/>.
92. Lelièvre L, Groh M, Angebault C, Maherault A-C, Didier E, Bougnoux M-E. Azole resistant *Aspergillus fumigatus*: an emerging problem. *Médecine Mal Infect*. 2013 Apr;43(4):139–45.
93. Mellado E, Alcazar-Fuoli L, Cuenca-Estrella M, Rodriguez-Tudela JL. Role of *Aspergillus lentulus* 14- α sterol demethylase (Cyp51A) in azole drug susceptibility. *Antimicrob Agents Chemother*. 2011 Dec;55(12):5459–68.
94. Howard SJ, Cerar D, Anderson MJ, Albarrag A, Fisher MC, Pasqualotto AC, et al. Frequency and evolution of Azole resistance in *Aspergillus fumigatus* associated with treatment failure. *Emerg Infect Dis*. 2009 Jul;15(7):1068–76.
95. Snelders E, Karawajczyk A, Schaftenaar G, Verweij PE, Melchers WJG. Azole Resistance Profile of Amino Acid Changes in *Aspergillus fumigatus* CYP51A Based on Protein Homology Modeling. *Antimicrob Agents Chemother*. 2010 Jun;54(6):2425–30.
96. Snelders E, van der Lee HAL, Kuijpers J, Rijs AJMM, Varga J, Samson RA, et al. Emergence of azole resistance in *Aspergillus fumigatus* and spread of a single resistance mechanism. *PLoS Med*. 2008 Nov 11;5(11):e219.

97. Verweij PE, Figuerola J, Van Burik J, Holdom MD, Dei-Cas E, Gómez BL, et al. Clinical applications of non-culture based methods for the diagnosis and management of opportunistic and endemic mycoses. *Med Mycol.* 2000;38 Suppl 1:161–71.
98. Vermeulen E, Maertens J, Schoemans H, Lagrou K. Azole-resistant *Aspergillus fumigatus* due to TR46/Y121F/T289A mutation emerging in Belgium, July 2012. *Euro Surveill Bull Eur Sur Mal Transm Eur Commun Dis Bull.* 2012;17(48).
99. Lavergne R-A, Morio F, Favennec L, Dominique S, Meis JF, Gargala G, et al. First Description of Azole-Resistant *Aspergillus fumigatus* Due to TR46/Y121F/T289A Mutation in France. *Antimicrob Agents Chemother.* 2015 Jul;59(7):4331–5.
100. http://pharmaweb.univ-lille2.fr/aides_pedagogiques/parasito/Internat/imagesmol/ampho_b.jpg.
101. Hachem RY, Kontoyiannis DP, Boktour MR, Afif C, Cooksley C, Bodey GP, et al. *Aspergillus terreus*: an emerging amphotericin B-resistant opportunistic mold in patients with hematologic malignancies. *Cancer.* 2004 Oct 1;101(7):1594–600.
102. Blum G, Hörtnagl C, Jukic E, Erbeznik T, Pümpel T, Dietrich H, et al. New insight into amphotericin B resistance in *Aspergillus terreus*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2013 Apr;57(4):1583–8.
103. Moosa M-YS, Alangaden GJ, Manavathu E, Chandrasekar PH. Resistance to amphotericin B does not emerge during treatment for invasive aspergillosis. *J Antimicrob Chemother.* 2002 Jan;49(1):209–13.
104. Dannaoui E, Meletiadis J, Tortorano A-M, Symoens F, Nolard N, Viviani M-A, et al. Susceptibility testing of sequential isolates of *Aspergillus fumigatus* recovered from treated patients. *J Med Microbiol.* 2004 Feb;53(Pt 2):129–34.
105. <http://www.antimicrobe.org/d35.htm>.
106. Arendrup MC, Perkhofer S, Howard SJ, Garcia-Effron G, Vishukumar A, Perlin D, et al. Establishing in vitro-in vivo correlations for *Aspergillus fumigatus*: the challenge of azoles versus echinocandins. *Antimicrob Agents Chemother.* 2008 Oct;52(10):3504–11.
107. Marr K. Combination antifungal therapy: where are we now, and where are we going? *Oncol Williston Park N.* 2004 Nov;18(13 Suppl 7):24–9.
108. Koga M, Koibuchi T, Kikuchi T, Nakamura H, Miura T, Iwamoto A, et al. Kinetics of serum β -D-glucan after *Pneumocystis pneumonia* treatment in patients with AIDS. *Intern Med Tokyo Jpn.* 2011;50(13):1397–401.
109. <http://www.perrin33.com/enzym/etatstationnaire.png>.

110. Furfaro E, Mikulska M, Bono VD, Guolo F, Minetto P, Gobbi M, et al. Bloodstream Infections Are an Improbable Cause of Positive Serum (1,3)- β -d-Glucan in Hematology Patients. *Clin Vaccine Immunol CVI*. 2014 Sep;21(9):1357.
111. Karageorgopoulos DE, Vouloumanou EK, Ntziora F, Michalopoulos A, Rafailidis PI, Falagas ME. β -D-glucan assay for the diagnosis of invasive fungal infections: a meta-analysis. *Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am*. 2011 Mar 15;52(6):750–70.
112. Pazos C, Pontón J, Del Palacio A. Contribution of (1->3)-beta-D-glucan chromogenic assay to diagnosis and therapeutic monitoring of invasive aspergillosis in neutropenic adult patients: a comparison with serial screening for circulating galactomannan. *J Clin Microbiol*. 2005 Jan;43(1):299–305.
113. Neofytos D, Railkar R, Mullane KM, Fredricks DN, Granwehr B, Marr KA, et al. Correlation between Circulating Fungal Biomarkers and Clinical Outcome in Invasive Aspergillosis. *PLoS ONE [Internet]*. 2015 Jun 24 [cited 2015 Aug 29];10(6). Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4480423/>
114. Koo S, Baden LR, Marty FM. Post-diagnostic kinetics of the (1 \rightarrow 3)- β -D-glucan assay in invasive aspergillosis, invasive candidiasis and *Pneumocystis jirovecii* pneumonia. *Clin Microbiol Infect Off Publ Eur Soc Clin Microbiol Infect Dis*. 2012 May;18(5):E122–7.
115. Desjardins A, Parize P, Angebault C, Lécuyer H, Lortholary O, Bougnoux M-E. Lack of 1-3-B-D-glucan detection in adults with bacteraemia. *Med Mycol*. 2015 May;53(4):405–8.
116. Marty FM, Koo S. Role of (1->3)-beta-D-glucan in the diagnosis of invasive aspergillosis. *Med Mycol*. 2009;47 Suppl 1:S233–40.
117. Odabasi Z, Mattiuzzi G, Estey E, Kantarjian H, Saeki F, Ridge RJ, et al. Beta-D-glucan as a diagnostic adjunct for invasive fungal infections: validation, cutoff development, and performance in patients with acute myelogenous leukemia and myelodysplastic syndrome. *Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am*. 2004 Jul 15;39(2):199–205.
118. Cuétara MS, Alhambra A, Moragues MD, González-Elorza E, Pontón J, del Palacio A. Detection of (1->3)-beta-D-glucan as an adjunct to diagnosis in a mixed population with uncommon proven invasive fungal diseases or with an unusual clinical presentation. *Clin Vaccine Immunol CVI*. 2009 Mar;16(3):423–6.
119. Nucci M, Anaissie E. Cutaneous infection by *Fusarium* species in healthy and immunocompromised hosts: implications for diagnosis and management. *Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am*. 2002 Oct 15;35(8):909–20.
120. Fontana C, Gaziano R, Favaro M, Casalnuovo I, Pistoia E, Di Francesco P. (1-3)- β -D-Glucan vs Galactomannan Antigen in Diagnosing Invasive Fungal Infections (IFIs). *Open Microbiol J*. 2012;6:70–3.

121. Cai X, Ni W, Wei C, Cui J. Diagnostic value of the serum galactomannan and (1, 3)- β -D-glucan assays for invasive pulmonary aspergillosis in non-neutropenic patients. *Intern Med Tokyo Jpn.* 2014;53(21):2433–7.
122. Bellanger A-P, Grenouillet F, Henon T, Skana F, Legrand F, Deconinck E, et al. Retrospective assessment of β -D-(1,3)-glucan for presumptive diagnosis of fungal infections. *APMIS Acta Pathol Microbiol Immunol Scand.* 2011 Apr;119(4-5):280–6.
123. Mikulska M, Furfaro E, Del Bono V, Gualandi F, Van Lint MT, Miletich F, et al. Persistence of a positive (1,3)-beta-D-glucan test after clearance of candidemia in hematopoietic stem cell transplant recipients. *Clin Vaccine Immunol CVI.* 2011 Mar;18(3):518–9.
124. Racil Z, Kocmanova I, Toskova M, Winterova J, Lengerova M, Timilsina S, et al. Reactivity of the 1,3- β -D-glucan assay during bacteraemia: limited evidence from a prospective study. *Mycoses.* 2013 Mar;56(2):101–4.
125. Hoenigl M, Prattes J, Spiess B, Wagner J, Pruellner F, Raggam RB, 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 Jun;52(6):2039–45.

Annexe 1 : Protocole interne du laboratoire de Parasitologie-mycologie de Nantes



Matériels :

- | | | | |
|---------------|-----------------------------|---------------|------------------------|
| Dans le Kit : | -Réactif Fungitell | Hors du Kit : | -Pipeteurs |
| | -Tampon au Pyrosol | | -Pipette à répétition |
| | -Glucan standard | | -Embout de pipette |
| | -Eau pur pour analyse (EPA) | | -Tube à essai en verre |
| | -KCL | | -Tube endorf |
| | -KOH | | -Parafilm®. |
| | -Microplaques | | |

Manipulation:

-Mettre les échantillons à décongeler sur la paillasse à température ambiante. Bien vortexer chaque échantillons pour les homogénéiser.

-Allumer l'appareil de mesure : bouton à l'arrière de l'automate.

-Mettre à chauffer l'appareil à 37°C : touche TEMP sur l'automate.

-Ouvrir le logiciel « Soft max », après la mise en marche de l'appareil.
→Protocole/ Protocole par défaut.

-Définir son plan de travail : le plan de travail pour une série de 20 patients est déjà prédéfini.

Si l'on souhaite faire une série plus petite (de 7 patients) :

→Sélectionner l'onglet Template : 

→Sélectionner les cases à effacer / Clear / OK.

-Découper du Parafilm® (Ce qui permettra de ne pas toucher les bouchons des réactifs, et de refermer les tubes entre chaque manipulation). On utilisera la face de Parafilm® qui adhère au papier.

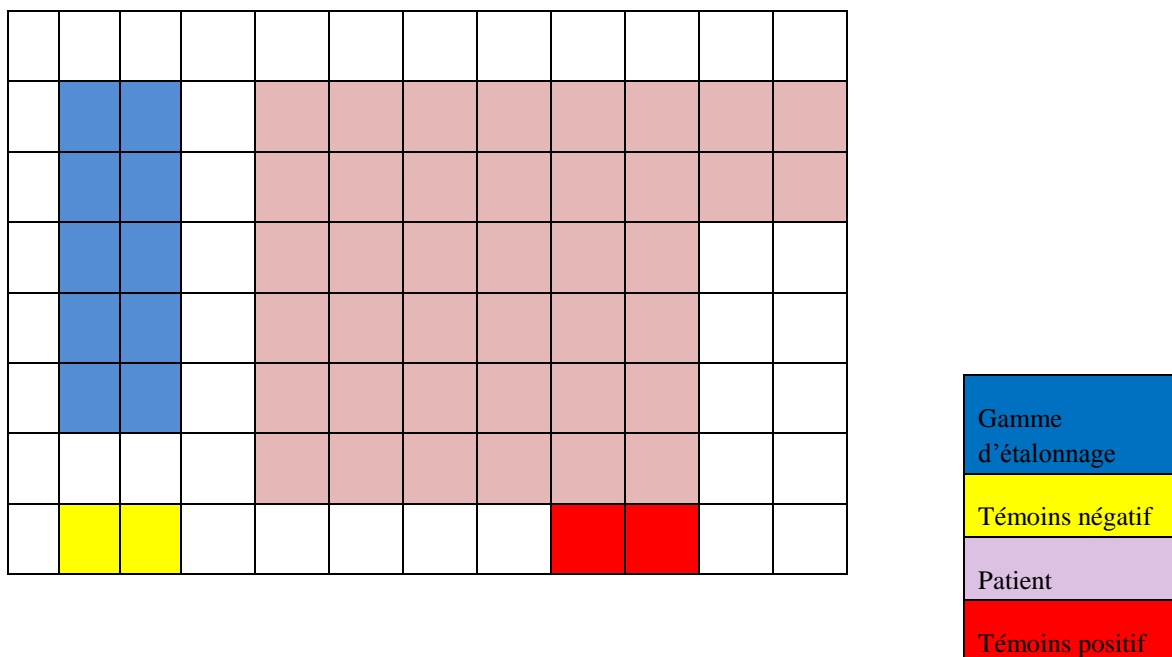


Figure 1 : Plan de travail prédéfini

-Reconstituer le « Glucan Standard » avec l'eau du kit (EPA). Vortexer 1mn.

Le volume nécessaire est indiqué sur le flacon. (Attention cela change en fonction des lots)

Conseil : changer de cône à chaque prise d'eau pour éviter les contaminations.

On peut le conserver 3 jours au frigo. (Si on souhaite réaliser 2 petites séries, elles sont réalisables dans un intervalle maximum de 3 jours pour un même flacon de « Glucan Standard » reconstitué)

-Préparer la gamme d'étalonnage à partir du « Glucan Standard » reconstitué: à partir de la solution mère, préparer une série de 4 tubes pour effectuer des dilutions au demi en cascade. (500µl d'EPA dans chaque tube. Puis 500 µl de la solution mère dans le 1^{er} tube. Puis 500µl du 1^{er} tube dans le 2^{ème} ...). On obtient une gamme en 5 Points 500-250-125-61.5-31 pg/ml.

Conseil : ne pas toucher le haut des tubes et les reboucher systématiquement avec du Parafilm[®]

-Préparer la solution de « prétraitement » : mélanger en quantité égale le KOH et KCL.

Quantité à préparer en fonction du nombre de puits à remplir (20µl/puits)

Ex : 20 patients et le témoin positif : 42 puits : 840 µl

=> soit environ 430 µl de KOH + 430µl KCL

Ex : 7 patients et le témoin positif : 16 puits : 320µl


=> soit environ 170 µl de KOH + 170 µL KCL

Reboucher la solution de prétraitement avec du Parafilm[®].

-Déposer 5µL de sérum à tester dans chaque puits patient et témoin positif (toujours en double). Changer de cône pour chaque patient.

Conseil : déposer au niveau d'un angle, au fond du puits.

-Déposer 20µl de la solution de « prétraitement » dans chaque puits patient et témoin positif (toujours en double).

-Mettre la plaque dans l'automate avec le couvercle pour agiter 5 secondes (utiliser le mode agitation de l'appareil : ). Sortir la plaque pour retirer le couvercle.

Laisser incuber 10 min à 37°C à l'intérieur de l'automate sans le couvercle (risque de condensation).

-Pendant ce temps : reconstituer le flacon de Fungitell : introduire 2.8ml de tampon pyrosol et 2.8 ml d'EPA. Agiter doucement. **Surtout ne pas vortexer.**

Conseil : changer de cône à chaque prise d'eau.

A conserver entre 2 et 8 °C et à utiliser dans les 2 heures. Si on souhaite réaliser 2 petites séries, elles sont réalisables dans un intervalle maximum de 20 jours pour un même flacon de Fungitell reconstitué à condition que celui-ci ait été conservé au congélateur.

-A la fin des 10 min d'incubation, déposer 25µl d'EPA pour le contrôle négatif.

-Déposer 25µl de notre gamme d'étalonnage selon le plan de travail de la plaque.

Conseil : commencer des dilutions les plus faibles au plus concentrées.


-Déposer dans tout les puits 100µl de Fungitell. Utiliser un pipeteur à répétition avec un embout adapté.

❗ A réaliser rapidement car la réaction enzymatique commence directement.

Conseil : commencer par le témoin négatif, les patients, la gamme d'étalonnage et le témoin positif en dernier.

Conseil : pour la fin du flacon, terminer la distribution avec un pipeteur classique pour éviter la formation de bulles.

-Mettre la plaque avec le couvercle dans l'automate, agiter 5-10 secondes. Retirer la plaque pour enlever le couvercle puis remettre la plaque.

-Lancer la lecture en appuyant sur l'onglet Read (40 min) : 

-Une fois la lecture terminée, enregistrer les données : →File/ Save as/ Dossier Résultats

Validation de la technique :

-Vérifier la droite d'étalonnage : le coefficient de corrélation (r) de la courbe standard doit être < 0.980 .

-Vérifier les témoins : les témoins négatifs doivent avoir des valeurs de taux de densité optique réelle ($V_{moyenne}$) inférieures de 50% au standard le plus faible. Les témoins positifs doivent être autour de la valeur attendue en fonction du patient témoin utilisé.

-Vérifier les duplicatas pour chaque patient : le coefficient de variation doit être inférieur à 10%.

Fin de manipulation :

Fermer le logiciel.

Enlever la plaque et éteindre l'automate.


Remettre les sérums au congélateur et remettre au réfrigérateur les réactifs restants.

Annexe 2 : Notice du kit Fungitell®

Dosage de (1→3)-β-D-Glucane sérique

FUNGITELL®


Mode d'emploi



**ASSOCIATES OF
CAPE COD
INCORPORATED**

124 Bernard E. Saint Jean Drive • E. Falmouth, MA 02536 USA

Téléphone : +1 508 540-3444
Numéro gratuit : +1 888 395-2221
Fax : +1 508 540-8680
Assistance technique : +1 800 848-3248
Service client : +1 800 525-8378



42

PN001268-fr Rev 1 Révisé en février 2011

USAGE PRÉVU

Le dosage Fungitell est un dosage colorimétrique basé sur la réaction protéase – zymogène pour la détection qualitative de (1→3)-β-D-Glucane dans le sérum de patients présentant des symptômes ou des conditions médicales prédisposant les patients à une infection fongique invasive. La concentration sérique de (1→3)-β-D-Glucane, composant majeur de la paroi cellulaire de différents champignons médicalement importants (1), peut faciliter le diagnostic de mycoses profondes et fongémies (2). Un résultat positif n'indique pas quelle classe de champignon peut provoquer l'infection.

Fungitell doit être utilisé en association avec d'autres méthodes diagnostiques comme une culture microbiologique, un examen histologique d'échantillons biopsiques et un examen radiologique.

Important - il est recommandé de fournir les informations suivantes au médecin prescripteur :

Le dosage Fungitell ne détecte pas certaines espèces fongiques comme l'espèce *Cryptococcus* qui produit de très faibles taux de (1→3)-β-D-Glucane (3,4). Le dosage ne détecte pas les zygomycètes comme *Absidia*, *Mucor* et *Rhizopus* (1,4) qui ne sont pas connus pour produire du (1→3)-β-D-Glucane. En outre, la phase de levure du *Blastomyces dermatitidis* produit peu de (1→3)-β-D-Glucane et peut ne pas être détectée par le dosage (5).

Cette mention doit figurer dans les résultats des tests du Dosage du Glucane.

RÉSUMÉ ET EXPLICATION

On observe une incidence accrue des infections fongiques par des pathogènes opportunistes, en particulier chez les patients présentant un déficit immunitaire (6,7,8). Les maladies fongiques invasives, comme les infections opportunistes, sont courantes parmi les affections hématologiques malignes et chez les patients atteints du SIDA, et représentent un nombre croissant d'infections nosocomiales, en particulier chez les patients transplantés et ceux recevant des traitements immunosuppresseurs (9,10). De nombreuses maladies fongiques sont acquises par inhalation de spores fongiques du sol, de débris de plantes, de systèmes de traitement de l'air et/ou de surfaces exposées. Certains champignons opportunistes sont présents dans/sur la peau humaine, le tractus intestinal et les muqueuses (11,12). Le diagnostic des mycoses invasives et des fongémies est généralement basé sur des techniques diagnostiques ou radiologiques non spécifiques. Récemment, les marqueurs biologiques de l'infection fongique ont été ajoutés aux méthodes de diagnostic disponibles (2).

Les pathogènes fongiques opportunistes incluent *Candida spp.*, *Aspergillus spp.*, *Fusarium spp.*, *Trichosporon spp.*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Acremonium spp.*, *Coccidioides immitis*, *Histoplasma capsulatum*, *Sporothrix schenckii* et *Pneumocystis jirovecii*. Le (1→3)-β-D-Glucane produit par ces organismes et d'autres peut être détecté par le dosage Fungitell (1,8,13).

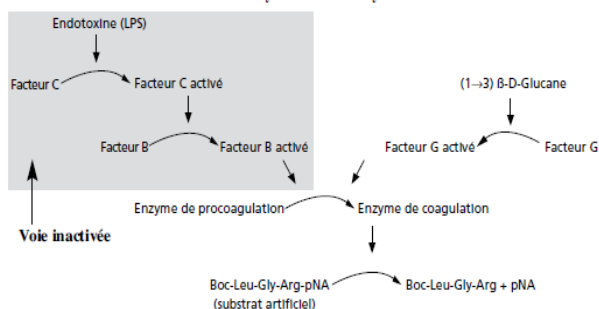
PRINCIPES DE LA PROCÉDURE

Le dosage Fungitell mesure les taux de (1→3)-β-D-Glucane. Le dosage est basé sur une modification du mécanisme du lysat d'améboocyte de limule (*Limulus Amebocyte Lysate*, LAL) (14,15,16,17), Figure 1. Le réactif Fungitell est modifié pour éliminer le Facteur C et ainsi ne réagir qu'au (1→3)-β-D-Glucane, par la voie du Facteur G de ce mécanisme.

(1→3)-β-D-Glucane active le facteur G, un zymogène à sérine protéase. Le Facteur G activé convertit l'enzyme inactif de procoagulation en enzyme de coagulation actif qui coupe la protéine pNA du substrat peptidique chromogénique, Boc-Leu-Gly-Arg-pNA, créant un chromophore qui absorbe à 405 nm. Le dosage cinétique Fungitell, décrit ci-dessous, est basé sur la détermination de l'augmentation du taux de densité optique produite par un échantillon. Ce taux est interprété au regard d'une courbe standard pour donner des estimations de la concentration de (1→3)-β-D-Glucane dans l'échantillon.

FIGURE 1

Mécanisme du lysat d'améboocyte de limule



MATÉRIEL FOURNI AVEC LE KIT FUNGITELL

Le kit Fungitell est à usage diagnostique *in vitro*. Le matériel suivant fourni avec chaque kit est suffisant pour doser 110 puits sur deux plaques de microtitration (55 puits chacune) :

1. Réactif Fungitell®, LAL spécifique (1→3)-β-D-Glucane lyophilisé (deux flacons)
2. Tampon de reconstitution au Pyrosol®, Tris HCl 0,2 M pH 7,4 (deux flacons). Des flacons supplémentaires de tampon de reconstitution au Pyrosol (numéro de catalogue BC051) peuvent être achetés séparément.
3. Glucane standard, pachyman lyophilisé et complément inerte avec la teneur en (1→3)-β-D-Glucane stipulée sur l'étiquette (deux flacons)
4. Eau pure pour analyse (EPA) (deux flacons)
5. Pyroplates : microplaques non enduites de 96 puits à fond plat avec couvercles, sans interférence de Glucanes (deux)
6. KCl 1,2 M (un flacon)
7. KOH 0,25 M (un flacon)

Tout le matériel ci-dessus, à l'exception du standard, ne présente pas de taux de (1→3)-β-D-Glucane pouvant interférer avec le dosage.

MATÉRIEL NÉCESSAIRE (NON FOURNI)

Tout le matériel doit être exempt de taux de Glucane pouvant interférer avec le dosage. Le matériel en verre doit être dépyrogéné par chaleur sèche à au moins 235° C pendant 7 heures (ou un équivalent valide) pour être considéré convenir à l'emploi.

1. Embouts de pipette* (250 µl – Réf. PPT25, 1000 µl – Réf. PPT10)
2. Pipeteurs capables de délivrer des volumes de 5-25 µl et 100-1000 µl
3. Pipette à répétition, avec embouts de seringue, capable de délivrer 100 µl
4. Tubes à essai* pour la préparation de la gamme d'étalonnage et les mélanges réactionnels du traitement du sérum. (13 x 100 mm verre de borosilicate – Réf. TB013)
5. Lecteur de plaques thermostaté (37° C) capable de fonctionner à deux longueurs d'onde, 405 et 490 nm, ayant une plage dynamique d'au moins 2,0 unités d'absorbance, associé à un ordinateur exécutant un logiciel de dosage cinétique approprié.
6. Tubes stériles sans glucane à bouchon à vis pour aliquoter les échantillons (la plupart des tubes certifiés sans ARNase, ADNase et pyrogène sont exempts de taux de (1→3)-β-D-Glucane pouvant interférer avec le dosage.
7. Parafilm*

* Ces produits, fournis par Associates of Cape Cod, Inc. (ACC), sont certifiés sans interférence avec le dosage des Glucanes.

Attention : les pipettes avec bouchons en coton sont des sources potentielles de contamination au Glucane.

MISES EN GARDE ET PRÉCAUTIONS D'EMPLOI

Ce produit est réservé au DIAGNOSTIC IN VITRO

Le dosage Fungitell requiert une attention rigoureuse à la technique et à l'environnement de test. Une formation approfondie du technicien à la méthode de dosage et à la prévention de la contamination est essentielle pour l'efficacité du dosage

1. Certaines espèces fongiques produisent de très faibles taux de (1→3)-β-D-Glucane et ne sont généralement pas détectées par le dosage Fungitell. Celles-ci incluent le genre *Cryptococcus* (3,4) ainsi que les zygomycètes comme *Absidia*, *Mucor* et *Rhizopus* (1,4). En outre, *Blastomyces dermatitidis*, dans sa forme levure, produit de faibles taux de (1→3)-β-D-Glucane et n'est donc généralement pas détecté par le dosage Fungitell (5).
2. Ne pas pipeter une substance avec la bouche. Ne pas fumer, manger ni boire dans les zones de manipulation des spécimens ou des réactifs du kit.
3. Établir un environnement propre dans lequel effectuer le dosage. Utiliser des matériels et réactifs certifiés sans interférence avec les taux de (1→3)-β-D-Glucane. Noter que le Glucane ainsi qu'une contamination fongique en provenance du corps humain, de vêtements, de récipients, de poussières aériennes ou aquatiques peut provoquer une interférence avec le dosage Fungitell.
4. Ne pas utiliser les réactifs au-delà de la date de péremption.

- Des échantillons décolorés ou troubles comme ceux grossièrement hémolysés, lipémiques ou contenant trop de bilirubine peuvent provoquer des interférences. Si de tels échantillons sont dosés, les résultats doivent être analysés en recherchant une preuve d'interférence optique et/ou des schémas cinétiques inhabituels.
- Utiliser des vêtements de protection appropriés et des gants sans talc lors de la manipulation des prélèvements de patients.
- Le sérum des patients hémodialysés peuvent contenir des taux de (1→3)-β-D-Glucane élevés lorsque certaines membranes de dialyse en cellulose sont utilisées (18,19). L'hémodialyse avec des membranes en triacétate de cellulose ou des membranes en méthacrylate de polyméthyl ne semble pas affecter le dosage.
- Les gazes et éponges chirurgicales peuvent provoquer une libération de taux élevés (1→3)-β-D-Glucane susceptibles de contribuer à un résultat positif transitoire d'une contamination pour le dosage Fungitell comme cela a été observé chez des patients post-chirurgicaux (20,21).
- Les kits dont le contenu est endommagé ne doivent pas être utilisés.
- Les matériels exposés à des liquides potentiellement contaminés (contenant des pathogènes) doivent être éliminés en conformité avec la réglementation locale.

Conservation des réactifs

Conserver tous les réactifs, tels que fournis, à l'abri de la lumière, entre 2 et 8 °C. Le réactif Fungitell reconstitué doit être conservé entre 2 et 8 °C et utilisé dans les 2 heures. Par ailleurs, le réactif Fungitell reconstitué peut être congelé à -20 °C pendant 20 jours puis décongelé une seule fois avant utilisation.

Manipulation des spécimens

- Collecte des spécimens : les échantillons de sérum doivent être collectés dans des tubes à vide stériles (bouchons rouges) ou des tubes séparateurs de sérum (SST), et laissés coaguler. Le sérum est alors séparé du caillot et décanté dans un récipient approprié sans taux de (1→3)-β-D-Glucane pouvant interférer avec le dosage.
- Conservation des spécimens : les échantillons de sérum peuvent être conservés entre 2 et 8 °C avant dosage ou à -20 °C ou une température plus froide. Le test doit être effectué rapidement pour éviter une dégradation possible de l'échantillon.
- Étiquetage des spécimens : les spécimens doivent être clairement étiquetés conformément aux pratiques approuvées de l'établissement.

PROCÉDURE

Remarque : les réglages peuvent varier en fonction des différents instruments et logiciels. En général la méthode suivante est applicable : paramétrer le logiciel du lecteur pour collecter les données en mode $V_{moyenne}$. Vérifier les réglages corrects dans le manuel du logiciel pour s'assurer que la valeur calculée est le taux moyen de variation de densité optique pour tous les points de données recueillis. Définir l'intervalle entre les « lectures » de l'instrument au minimum autorisé par le logiciel et instrumenter pendant la période de 40 minutes du test. Les paramètres de longueur d'onde du logiciel doivent être de 405 nm moins le bruit de fond à 490 nm. Si une lecture à double longueur d'onde n'est pas disponible, lire à 405 nm. La température d'incubation doit être réglée à 37 °C. L'agitation des plaques doit intervenir pendant 5 à 10 secondes, avant le début de la lecture. Le mode choisi pour la courbe doit être « linéaire/linéaire » ou équivalent. La lecture doit commencer sans délai.

- Préparation du standard Glucane fourni avec le kit.
 - Dissoudre un flacon du standard Glucane avec le volume d'EPA stipulé sur le flacon, pour obtenir une solution de 100 pg/ml. Vortexer au moins 30 secondes pour remettre en suspension (solution 1). La solution de Glucane doit être conservée entre 2 et 8 °C puis utilisée dans les 3 jours. Les étapes b à e ci-dessous illustrent un exemple de préparation d'une gamme d'étalonnage.
 - Préparer 50 pg/ml de standard en mélangeant 500 µl d'EPA et 500 µl de solution 1 dans un tube sans Glucane (solution 2). Vortexer pendant au moins 10 secondes.
 - Préparer 25 pg/ml de standard en mélangeant 500 µl d'EPA et 500 µl de solution 2 dans un tube sans Glucane (solution 3). Vortexer pendant au moins 10 secondes.
 - Préparer 12,5 pg/ml de standard en mélangeant 500 µl d'EPA et 500 µl de solution 3 dans un tube sans Glucane (solution 4). Vortexer pendant au moins 10 secondes.
 - Préparer 6,25 pg/ml de standard en mélangeant 500 µl d'EPA et 500 µl de solution 4 dans un tube sans Glucane (solution 5). Vortexer pendant au moins 10 secondes.
- Préparation de réactif de prétraitement du sérum. Le réactif alcalin de prétraitement du sérum convertit les Glucanes à triple hélice en Glucanes monobrins (16,17) qui sont plus réactifs dans le dosage. Le pH élevé inactive aussi les sérines protéases et les inhibiteurs de sérines protéases dans le sérum qui peuvent donner respectivement un résultat faux positif ou un résultat faux négatif (22).
 - Préparer le réactif de prétraitement du sérum en combinant des volumes égaux de 0,25 M de KOH et 1,2 de M KCl et bien agiter. Les volumes recommandés sont jusqu'à 900 µl de chaque réactif, permettant deux préparations. Couvrir les flacons avec du Parafilm pour utilisation avec la seconde plaque. Couvrir le flacon avec du Parafilm en utilisant la face du Parafilm qui adhérerait au papier.
 - Remarque : lors du tracé de la courbe standard, multiplier la concentration des standards par 5 pour que la plage soit de 500 à 31 pg/ml. Saisir les standards dans les paramètres du logiciels comme étant respectivement 500, 250, 125, 62,5 et 31 pg/ml.

Le volume de standard dans le dosage est 25 µl par puits ou cinq fois le volume de l'échantillon de sérum. La plaque de microtitration avec les standards (St), les témoins négatifs (Neg), et 21 inconnus (Uk) étant chacun dosé en double et disposé comme suit :

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B		St1	St1		Uk1	Uk4	Uk7	Uk10	Uk13	Uk16	Uk19	
C		St2	St2		Uk1	Uk4	Uk7	Uk10	Uk13	Uk16	Uk19	
D		St3	St3		Uk2	Uk5	Uk8	Uk11	Uk14	Uk17	Uk20	
E		St4	St4		Uk2	Uk5	Uk8	Uk11	Uk14	Uk17	Uk20	
F		St5	St5		Uk3	Uk6	Uk9	Uk12	Uk15	Uk18	Uk21	
G		Neg	Neg		Uk3	Uk6	Uk9	Uk12	Uk15	Uk18	Uk21	
H												

Remarque 1 : les puits externes peuvent être utilisés, s'il a été démontré que la performance de ces puits est comparable à celle des puits internes.

Remarque 2 : pour éviter une contamination accidentelle, remettre en place le couvercle de la microplaque après l'ajout des échantillons et des réactifs dans les puits. Retirer le couvercle avant de placer la plaque dans le lecteur pour éviter une interférence optique due à la condensation.

- Ajout du sérum et du réactif de prétraitement.
 - Décongeler les échantillons de sérum à température ambiante. Bien vortexer tous les échantillons.
 - Transférer 5 µl d'échantillon de sérum dans chacun des puits désignés (Uk) au moins en double. Répéter la manipulation pour chaque échantillon de sérum.
 - Ajouter 20 µl de réactif de prétraitement de sérum à chaque puits contenant du sérum. Remarque : les étapes b et c peuvent être conduites dans l'ordre inverse selon la préférence du technicien.
 - Agiter la plaque pendant 5 à 10 secondes pour mélanger les contenus du puits (la fonction agitation du lecteur de plaque peut être utilisée), puis laisser incubé pendant 10 minutes à 37 °C dans le lecteur de plaque en incubation.
- Reconstitution du réactif Fungitell. Remarque : cela peut être effectué pendant l'incubation de prétraitement pour des raisons pratiques.
 - Reconstituer un flacon de réactif Fungitell, en ajoutant 2,8 ml d'EPA, puis 2,8 ml de tampon de reconstitution Pyrosol au moyen d'un pipeteur de 1000 µl. Couvrir le flacon avec du Parafilm en utilisant la face du Parafilm. Agiter doucement le flacon pour dissoudre complètement, ne pas vortexer.
- Ajout de témoins négatifs et de standards Glucane. À la fin de l'incubation de prétraitement du sérum (étape 3.d), retirer la plaque du lecteur de plaque en incubation et ajouter les standards et les témoins négatifs à la plaque.
 - Ajouter 25 µl d'EPA aux puits G2 et G3.
 - Ajouter 25 µl aux 6,25 pg/ml de solution standard 5 aux puits F2 et F3.
 - Ajouter 25 µl aux 12,5 pg/ml de solution standard 4 aux puits E2 et E3.
 - Ajouter 25 µl aux 25 pg/ml de solution standard 3 aux puits D2 et D3.
 - Ajouter 25 µl aux 50 pg/ml de solution standard 2 aux puits C2 et C3.
 - Ajouter 25 µl aux 100 pg/ml de solution standard 1 aux puits B2 et B3.
- Ajout du réactif Fungitell et procédure d'incubation de la plaque.
 - Ajouter 100 µl de réactif Fungitell à chaque puits (contenant témoins négatifs, standards et échantillons) au moyen du pipeteur à répétition.
 - Introduire la plaque dans le lecteur de microplaque (équilibré à 37 °C) avec le couvercle et remuer pendant 5 à 10 secondes. Lire la plaque sans le couvercle à 405 nm moins 490 nm, pendant 40 minutes à 37 °C. Si la soustraction du bruit de fond (à 490 nm) n'est pas disponible, une lecture à 405 nm est acceptable. En l'absence de fonction d'agitation sur le lecteur de microplaque on peut utiliser un agitateur de microplaque externe.
 - Collecter les données et les analyser comme suit : examiner les parcelles de densité optique des échantillons à analyser et vérifier les modèles de trace cinétique autres qu'une augmentation homogène comparable à celles des normes. Les parcelles non valides indiquent une interférence optique. Calculer le taux moyen de variation de densité optique (unités de milli-absorbance par minute) pour tous les points entre 0 et 40 minutes.

INTERPRÉTATION DES RÉSULTATS

Les résultats de tests Fungitell doivent être utilisés comme aide au diagnostic d'une infection fongique. Les résultats sont exprimés en pg/ml de sérum et vont du non détectable (<31 pg/ml) à >500 pg/ml et sont imprimés par le logiciel ou lus sur la courbe standard. Les valeurs précises supérieures à 500 pg/ml nécessitent une dilution de l'échantillon dans de l'EPA et un nouveau test.

Le laboratoire réalisant le test doit informer le médecin prescripteur que le test Fungitell ne détecte pas certaines espèces fongiques comme l'espèce *Cryptococcus* (3,4) qui produit de très faibles taux de (1→3)-β-D-Glucane. Le dosage ne détecte pas les zygomycètes comme *Absidia*, *Mucor* et *Rhizopus* (1,4) qui ne sont pas connus pour produire du (1→3)-β-D-Glucane. De même, *Blastomyces dermatitidis*, en phase de levure, produit peu de (1→3)-β-D-Glucane, et est généralement indétectable (5).

RÉSULTAT NÉGATIF

Des valeurs de (1→3)-β-D-Glucane < 60 pg/ml sont interprétées comme étant des résultats négatifs.

RÉSULTAT POSITIF

Des valeurs ≥ 80 pg/ml sont interprétées comme étant positives. Un résultat positif signifie que du (1→3)-β-D-Glucane a été détecté. Un résultat positif n'indique pas la présence d'une maladie et ne doit pas être associé aux autres signes cliniques pour établir un diagnostic.

RÉSULTAT INDÉTERMINÉS

Des valeurs comprises entre 60 et 79 pg/ml suggèrent une possible infection fongique. Des prélèvements et tests de sérum supplémentaires sont recommandés. Les prélèvements et tests fréquents améliorent l'utilité du diagnostic.

CONTRÔLE DE QUALITÉ

- Le coefficient de corrélation (r) de la courbe standard (linéaire contre linéaire) doit être > 0,980.
- Les puits (25 µl d'EPA) sont des témoins négatifs. Les témoins négatifs doivent avoir des valeurs de taux de densité optique réelle (V_{moyenne}) inférieures de 50 % au standard le plus faible. Dans le cas contraire, le dosage doit être répété avec de nouveaux réactifs.
- Gestion des échantillons à problème. Si le biologiste observe des cinétiques de densité optique inhabituelle dans un test d'échantillon qui sont floconneux, décolorés ou troubles (tels ceux grossièrement hémolysés, lipémiques ou contenant trop de bilirubine), l'échantillon doit être dilué dans de l'EPA et retesté. La dilution doit être prise en compte dans la mention du résultat en multipliant le résultat par le facteur de dilution. Généralement, le facteur de dilution est saisi dans la configuration du logiciel pour l'échantillon et la correction est appliquée automatiquement.
- Les échantillons témoins à des niveaux limites et hautement positifs, doivent être analysés pour vérifier que les réactifs et le dosage fonctionnent correctement. Chaque utilisateur du test doit établir un programme de contrôle qualité pour assurer la qualification dans les réalisations du test.

LIMITES DU TEST

- La localisation dans les tissus de l'infection fongique (10), l'encapsulation et la quantité de (1→3)-β-D-Glucane produite par certains champignons peuvent affecter la concentration sérique de cet analyte. La capacité réduite de contribution du (1→3)-β-D-Glucane au flux sanguin peut réduire la capacité de détecter certaines infections fongiques. *Cryptococcus spp.* produit de faibles taux de (1→3)-β-D-Glucane (3,4). Les zygomycètes, dont *Absidia spp.*, *Mucor spp.* et *Rhizopus spp.*, ne sont pas connus pour produire du (1→3)-β-D-Glucane (1,4). *Blastomyces dermatitidis* en phase de levure, produit peu de (1→3)-β-D-Glucane, et les résultats du test sont généralement négatifs (5).
- Certains individus ont des taux élevés de (1→3)-β-D-Glucane qui tombent dans la zone indéterminée. Dans de tels cas, des tests supplémentaires sont recommandés.
- La fréquence des tests patients dépend du risque relatif d'infection fongique. Des fréquences de prélèvements d'au moins deux à trois fois par semaine sont recommandées pour les patients à risque.
- Des résultats positifs ont été observés chez des patients en hémodialyse (18,19), des sujets traités avec certains produits sanguins fractionnés comme l'albumine sérique et les immunoglobulines (23) et chez les spécimens ou sujets exposés à des gazes contenant du glucane. Les patients nécessitent 3 à 4 jours pour la restauration des taux initiaux de (1→3)-β-D-Glucane après une exposition chirurgicale à des éponges et gazes contenant du (1→3)-β-D-Glucane (20,21). En conséquence la chronologie des prélèvements chez des patients chirurgicaux doit prendre cet aspect en compte.
- Les échantillons obtenus par des méthodes de ponction au talon ou au doigt ne sont pas acceptables car le tampon alcoolisé pour préparer le site (et, potentiellement, la surface cutanée de prise de sang) s'est avéré contaminer les spécimens.
- Les taux de (1→3)-β-D-Glucane ont été établis chez des sujets adultes. Les taux normaux chez le nourrisson et l'enfant approchent ceux des adultes (24). On ne dispose pas de données pour les nouveaux-nés et les nourrissons de moins de 6 mois.
- La zone de mesure est de 31 pg/ml à 500 pg/ml. Les valeurs < 31 pg/ml doivent être mentionnées comme étant < 31 pg/ml. Les valeurs > 500 pg/ml doivent être mentionnées comme étant > 500 pg/ml, sauf si l'échantillon a été dilué.

SUBSTANCES CRÉANT DES INTERFÉRENCES

Les conditions suivantes des échantillons peuvent créer une interférence avec un résultat précis de dosage Fungitell :

- Hémolyse
- Turbidité de l'échantillon provoquée par une lipémie
- Présence visible de bilirubine
- Sérum trouble

RÉSULTATS ATTENDUS

Les valeurs de β-D-Glucane sont élevées dans différentes infections fongiques. Quand des signes et symptômes sont présents à des taux de 80 pg/ml ou plus, la valeur prédictive positive du test pour une infection fongique est comprise entre 74,4 et 91,7 % (Tableau 2). En l'absence de signes et symptômes à moins de 60 pg/ml, les valeurs prédictives négatives sont comprises entre 65,1 % et 85,1 %.

PERFORMANCES ET CARACTERISTIQUES

Test de comparaison

Une étude prospective multicentrique a été conduite pour valider les performances du dosage Fungitell (25). Le test a été comparé à d'autres méthodes standard de détection (c'est-à-dire, hémoculture biopsique et examen radiologiques) pour détecter des mycoses et fongémies.

Trois cent cinquante neuf (359) patients ont été testés avec le dosage. Un échantillon unique a été obtenu de chaque patient. Les sujets à faible risque ont inclus des individus apparemment sains et des patients de sites cliniques hospitalisés pour des raisons autres que des infections fongiques. Le recrutement des sujets a été conduit dans six centres médicaux des États-Unis. Quatre de ces centres ont réalisé le dosage et testé un total de 285 échantillons. ACC a testé l'ensemble des 359 échantillons deux fois, mais n'a utilisé que le second jeu de résultats pour établir les performances du dosage. Les résultats de deuxième jeu d'analyses n'ont pas été statistiquement différents de ceux du premier jeu.

La sensibilité de l'ensemble de la population des sujets (359) y compris *Cryptococcus* a été de 65,0 % (intervalle de confiance (I.C.) de 60,1 à 70,0 %). La spécificité a été de 81,1 % (I.C. de 77,1 % à 85,2 %) (Tableau 1). Les résultats des tests obtenus dans les quatre centres ont montré une plage de sensibilité de 50,0 % à 66,7 %. La spécificité a été comprise entre 70,0 % et 93,0 % sur les 285 échantillons testés (Tableau 2).

Tableau 1 Résultats des tests réalisés par ACC pour des valeurs seuil de 60-80 pg/ml par site

Site	Prouvé/Probable Sensibilité ≥ 80 pg/ml			Spécificité < 60 pg/ml			Équivoque 60 ≤ X < 80	Total
	Pos/Clin. Pos	Sensibilité	Valeur prédictive positive	Nég/Clin. Nég	Spécificité	Valeur prédictive négative		
1	32/50	64,0	97,0	39/40	97,5	69,6	1	90
2	14/24	58,3	93,3	17/20	85,0	70,8	5	44
3	14/19	73,7	46,7	36/54	66,7	90,0	3	73
4	25/33	75,8	92,6	37/43	86,0	86,0	6	76
5	21/36	58,3	80,8	30/39	76,9	69,8	6	75
6	0/1	0,0	S/O	0/0	S/O	0,0	0	1
Total*	106/163	65,0	80,9	159/196	81,1	76,8	21	359

*inclut un échantillon du Site 6.

Lorsque les résultats obtenus par ACC (359 échantillons) et par les centres médicaux (285 échantillons) sont comparés au diagnostic clinique, la sensibilité est de 64,3 % (IC de 58,8 % à 69,9 %) pour ACC et de 61,5 % (IC de 55,9 % à 67,2 %) pour les centres médicaux. La spécificité est de 86,6 % (IC de 82,7 % à 90,6 %) pour ACC et de 79,6 % (IC de 74,9 % à 84,3 %) pour les centres médicaux (Tableau 2).

Tableau 2 Résultats des tests réalisés par les centres médicaux pour des valeurs seuil de 60-80 pg/ml par site

Site	Prouvé/Probable Sensibilité ≥ 80 pg/ml			Spécificité < 60 pg/ml			Équivoque 60 ≤ X < 80	Total
	Pos/Clin. Pos	Sensibilité	Valeur prédictive positive	Nég/Clin. Nég	Spécificité	Valeur prédictive négative		
1	32/50	64,0	74,4	28/40	70,0	65,1	4	90
2	12/24	50,0	75,0	15/20	75,0	65,2	5	44
3 *								
4	22/33	66,7	91,7	40/43	93,0	85,1	5	76
5	22/36	61,1	78,6	30/39	76,9	75,0	7	75
6 *								
Total Sites	88/143	61,5	79,3	113/142	79,6	73,9	21	285
ACC	92/143	64,3	91,1	123/142	86,6	74,1	18	285

* Centre n'ayant pas réalisé de test

CANDIDOSE

Il y avait 107 sujets présentant un diagnostic positif de candidose dans l'étude prospective. Quatre-vingt-trois sur 107 ont été retrouvés positifs par le dosage Fungitell.

Une sérothèque de cent soixante quinze échantillons a été fournie à Associates of Cape Cod. Cent quarante cinq sur 175 ont été retrouvés positifs par le dosage Fungitell.

ASPERGILOSE

Un total de 10 sujets présentait une aspergillose. Huit sur 10 ont été retrouvés positifs par le dosage Fungitell.

FUSARIOSE

Trois sujets présentaient une fusariose. Deux sur 3 ont été retrouvés positifs par le dosage Fungitell.

TRAITEMENT MÉDICAMENTEUX ANTI-FONGIQUE

La présence ou l'absence d'un traitement médicamenteux anti-fongique n'a pas eu d'effet statistiquement significatif sur la sensibilité du dosage. Cent dix-huit sujets sous traitement anti-fongique ont été prouvés positifs pour une infection fongique. Quatre-vingt-deux ont été positifs au dosage (sensibilité, 69,5 % ; IC de 61,2 % à 77,8 %). En outre, vingt-quatre (24) sujets ont été positifs, mais pas sous traitement anti-fongique. Dix-huit ont été positifs au dosage (sensibilité, 75 % ; IC de 57,7 % à 92,3 %).

SPÉCIFICITÉ

Au total, 170 sujets ont été retrouvés négatifs pour l'infection fongique et étaient des individus apparemment sains. La spécificité a été de 86,5 % avec le dosage (IC de 82,8 % à 90,1 %). Lorsque les 26 sujets supplémentaires qui étaient négatifs pour l'infection fongique mais présentant d'autres troubles ont été inclus, une spécificité de 81,1 % a été observée (IC de 77,1 à 85,2 %).

CORRÉLATIONS DES TESTS

Quatre des centres médicaux ont dosé un total de 285 échantillons. Les résultats des tests des centres médicaux sont corrélés à 96,4 % avec les résultats des Associates of Cape Cod. Les corrélations entre les résultats retrouvés par Associates of Cape Cod et ceux retrouvés par les centres médicaux sont comprises entre 90,6 et 99,2 %.

EXACTITUDE

Dans les études d'exactitude, dix (10) échantillons différents ont chacun été testés par trois centres médicaux sur trois jours différents. La variation intra-dosage a été comprise entre 0,9 et 28,9 %. La variation inter-dosage a été comprise entre 3,9 et 23,8%. Les quatre (4) échantillons négatifs ont été exclus de ces deux analyses.

RÉFÉRENCES











1. Odabasi, Z., Paetznick, V., Rodriguez, J., Chen, E., McGinnis, M., and Ostrosky-Zeichner, L. 2006. Differences in beta-glucan levels of culture supernatants of a variety of fungi. *Medical Mycology* 44: 267-272.
2. De Pauw, B., Walsh, T.J., Donnelly, J.P. et al. 2008. Revised definitions of invasive fungal disease from the European Organization for Research and Treatment of Cancer/Invasive Fungal Infections Cooperative Group and the National Institutes of Allergy and Infectious Disease Mycosis Study Group (EORTC/MSG) Consensus Group. *Clin. Inf. Dis.* 46: 1813-1821.
3. Miyazaki, T., Kohno, S., Minutake, K., Maesaki, S., Tanaka, K.-I., Ishikawa, N., and Hara, K. 1995. Plasma (1→3)-β-D-Glucan and fungal antigenemia in patients with candidemia, aspergillosis, and cryptococcosis. *J. Clinical Microbiol.* 33: 3115-3118.
4. Mitsuya, M., Wada, K., and Yamaguchi, H. 1994. In vitro studies on the release of G Test-positive (1→3)-β-D-Glucans from various fungal pathogens. In Committee on Organic Dusts, ICOH, Report 1/94, Rylander, R. and Goto, H. editors. pp 29-37.
5. Girouard, G., Lachance, C., and Pelletier, R. 2007. Observations of (1→3)-β-D-Glucan detection as a diagnostic tool in endemic mycosis caused by *Histoplasma* or *Blastomyces*. *J. Med. Mycology* 56: 1001-1002.
6. Walsh, T.J., Groll, A.H. Emerging fungal pathogens: evolving challenges to immunocompromised patients for the twenty-first century. *Transpl. Infectious Dis.* 1999: 1:247-261.
7. Fishman, J.A., Rubin, R.H. Infection in organ-transplant recipients. *New England Journal of Medicine.* 1998: 338:1741-1751.
8. Obayashi, T., Yoshida, M., Mori, T., Goto, H., Yasuoka, A., Iwasaki, H., Teshima, H., Kohno, S., Horichi, A., Ito, A., Yamaguchi, H., Shimada, K., and Kawai, T. 1995. Plasma (1→3)-β-D-Glucan measurement in diagnosis of invasive deep mycosis and fungal febrile episodes. *Lancet.* 345: 17-20.
9. Fridkin, S.K. and Jarvis, W.R. 1996. Epidemiology of nosocomial fungal infections. *Clin. Micro. Rev.* 9: 499-511.
10. Alexander, B. Diagnosis of fungal infection: new technologies for the mycology laboratory. *Transpl Infectious Dis.* 2002: 4 (Suppl. 3):32-37.
11. Lass-Flörl, C. 2009. The changing face of epidemiology of invasive fungal disease in Europe. *Mycoses.* 52: 197-205.
12. Nucci, M. and Anaissie, E. 2009. Fungal infections in hematopoietic stem cell transplantation and solid organ transplantation - Focus on aspergillosis. *Clin. Chest Med.* 30: 295-306.
13. Odabasi, Z., Mattiuzzi, G., Estey, E., Kantarjian, H., Saeki, F., Ridge, R., Ketchum, P., Finkelman, M., Rex, J., and Ostrosky-Zeichner, L. 2004. β-Glucan as a diagnostic adjunct for invasive fungal infections: Validation, cut-off development, and performance in patients with Acute Myelogenous Leukemia and Myelodysplastic Syndrome. *CID* 39: 199-205.
14. Iwanaga, S., Miyata, T., Tokunaga, F., and Muta, T. 1992. Molecular mechanism of hemolymph clotting system in *Limulus*. *Thrombosis Res.* 68: 1-32.
15. Tanaka, S., Aketagawa, J., Takahashi, S., Tsumura, Y., and Hashimoto, Y. 1991. Activation of a *Limulus* coagulation factor G by (13)-β-D-Glucans. *Carbohydrate Res.* 218:167-174.
16. Saito, H., Yoshioka, Y., Uehara, N., Aketagawa, J., Tanaka, S., and Shibata, Y. 1991. Relationship between conformation and biological response for (1→3)-β-D-Glucans in the activation of coagulation factor G from *Limulus* amoebocyte lysate and host-mediated antitumor activity. Demonstration of single-helix conformation as a stimulant. *Carbohydrate Res.* 217:181-190.
17. Aketagawa, J., Tanaka, S., Tamura, H., Shibata, Y., and Saito, H. 1993. Activation of *Limulus* coagulation factor G by several (1→3)-β-D-Glucans: Comparison of the potency of glucans with identical degree of polymerization but different conformations. *J. Biochem* 113:683-686.
18. Kanda, H., Kubo, K., Hamasaki, K., Kanda, Y., Nakao, A., Kitamura, T., Fujita, T., Yamamoto, K., and Mimura, T. 2001. Influence of various hemodialysis membranes on the plasma (1→3)-β-D-Glucan level. *Kidney International* 60: 319-323.
19. Kato, A., Takita, T., Furuhashi, M., Takahashi, T., Maruyama, Y., and Hishida, A. 2001. Elevation of blood (1→3)-β-D-Glucan concentrations in hemodialysis patients. *Nephron* 89:15-19.
20. Kanamori, H., Kanemitsu, K., Miyasaka, T., Ameku, K., Endo, S., Aoyagi, T., Inden, K., Hata, M., Yamamoto, N., Kumishima, H., Yano, H., Kaku, K., Hirakat, Y., and Kaku, M. 2009. Measurement of (1→3)-β-D-Glucan derived from different gauze types. *Tohoku J. Exp. Med.* 217: 117-121.
21. Mohr, J., Paetznick, V., Rodriguez, J., Finkelman, M., Cocanour, C., Rex, J., and Ostrosky-Zeichner, L. 2005. A prospective pilot survey of β-glucan (BG) seropositivity and its relationship to invasive candidiasis (IC) in the surgical ICU (SICU) ICAAC Poster #M-168.

22. Tamura, H., Arimoto, Y., Tanaka, S., Yoshida, M., Obayashi, T., and Kawai, T. 1994. Autom: for endotoxin and (1→3)-β-D-Glucan in human blood. *Clin. Chim. Acta* 226: 109-112.
23. Ogawa, M., Hori, H., Niiguchi, S., Azuma, E., and Komada, Y. 2004. False positive plasma (following immunoglobulin product replacement in adult bone marrow recipient. *Int. J. Hemat*
24. Smith, P.B., Benjamin, D.K., Alexander, B.D., Johnson, M.D., Finkelman, M.A., and Steinba (1→3)-β-D-Glucan levels in pediatric patients: Preliminary data for the use of the beta-glucan *Clin. Vaccine Immunol.* 14: 924-925.
25. Ostrosky-Zeichner, L., Alexander, B.D., Kett, D.H., Vazquez, J., Pappas, P.G., Saeki, F., Kett Wingard, J., Schiff, R., Tamura, H., Finkelman, M.A., Rex, J.H. 2005. Multicenter clinical ev (1→3)-β-D-Glucan assay as an aid to diagnosis of fungal infections in humans. *Clin. Inf. Dis.*

RÉFÉRENCES SUPPLÉMENTAIRES NON CITÉES

- a) Desmet, S., Van Wijngaerden, E., Maertens, J., Verhaegen, J., Verbeken, E., De Munter, P., A W., Van Meensel, B., Van Eldere, J., Lagrou K. 2009. Serum (1→3)-β-D-Glucan as a diagno: *Pneumocystis jirovecii* pneumonia in patients with HIV infection or hematological malignanc; *Microbiol.* 47: 3871-3874.
- b) Koo, S., Bryar, J.M., Page, J.H., Baden, L.R., Marty, F.M. 2009. Diagnostic performance of tl (1→3)-β-D-Glucan assay for invasive fungal disease. *Clin. Infect. Dis.* 49:1650-9.
- c) Ellis, M., Ramadi, B., Finkelman, M., Hedstrom, U., Kristenson, J., Ali-Zadeh, H., and Kling: Assessment of the clinical utility of serial β-D-Glucan concentrations in patients with persiste fever. *J. Med. Microbiol.* 57: 287-95.
- d) Marty, F.M., Lowry, C.M., Lempitski, S.J., Kubiak, D.W., Finkelman, M.A., and Baden, L. R of (1→3)-β-D-Glucan assay with commonly used intravenous antimicrobials. *Antimicrob. Ag* 3450-3453.
- e) Marty, F. M., Koo, S., Bryar, and J., and Baden, L.R. 2007. (1→3)-β-D-Glucan assay positivt *Pneumocystis (carinii) jirovecii* pneumonia. *Ann. Int. Med.* 147: 70-72.
- f) Obayashi, T., Yoshida, M., Tamura, H., Aketagawa, J., Tanaka, S., and Kawai, T. 1992. Dete plasma (1→3)-β-D-Glucan: A new diagnostic aid to deep mycosis. *J. Medical and Vet. Mycol*
- g) Tamura, H., Arimoto, Y., Tanaka, S., Yoshida, M., Obayashi, T., and Kawai, T. 1994. Autom for endotoxin and (1→3)-β-D-Glucan in human blood. *Clínica Chimica Acta* 226: 109-112.
- h) Yasuoka, A., Tachikawa, N., Shimada, K., Kimura, S., and Oka, S. 1996. (1→3)-β-D-Glucan serological marker for *Pneumocystis carinii* pneumonia. *Clinical and Diagnostic. Lab. Immun*
- i) Yoshida, M., Obayashi, T., Iwama, A., Ito, M., Tsunoda, S., Suzuki, T., Muroi, K., Ohta, M., S., and Miura, Y. 1997. Detection of plasma (1→3)-β-D-Glucan in patients with *Fusarium*, *Tr Saccharomyces* and *Acremonium* fungemias. *J. Med. Vet. Mycology* 35:371-374.
- j) Yuasa, K., Goto, H., Iguchi, M., Okamura, T., and Ieki, R. 1996. Evaluation of the diagnostic measurement of (1→3)-β-D-Glucan in patients with pulmonary aspergillosis. *Respiration* 63:

LÉGENDE DES SYMBOLES

	« À utiliser avant »
	« Contenu suffisant pour <n> tests »
	« Code du lot »
	« Dispositif médical pour diagnostic in vitro »
	« Référence n° »
	« Limite de température »
	« Fabricant »
	« Voir mode d'emploi »
	« Représentant agréé »
	« Marque CE »

Annexe 3 : Données cliniques des patients de l'étude rétrospective

Cas	Age	Hémo- pathie	Phase thérapeutique	Facteur de risque	ATF avant diagnostic	ATF après diagnostic	Devenir
n°1	59	LAM	Induction	neutropénie, immunosupp.	posaco	Ambisome® →caspo →vorico	Vivant
n°2	83	LT	Chimiothérapie	neutropénie, immunosupp.	non	caspo	Décédé
n°3	65	Lymphome	Conditionnement d'autogreffe	autogreffe, neutropénie, immunosupp.	non	Ambisome® →vorico	Vivant
n°4	46	LAL B	Radioimmuno- thérapie	neutropénie, immunosupp. Ac monoclonal	caspo, Bactrim®	caspo →vorico →Ambisome®	Vivant
n°5	69	LAL B	En attente d'une seconde allogreffe	allogreffe neutropénie, immunosupp.	posaco	Ambisome® →vorico/ Ambisome®	Décédé
n°6	76	LLC	Découverte	neutropénie	caspo	caspo →vorico	Décédé
n°7	69	Lymphome	5ème ligne de traitement	autogreffe, immunosupp. Ac monoclonal	Bactrim®	vorico	Vivant/ Décédé
n°8	70	LAM	Consolidation	neutropénie, immunosupp.	non	caspo →vorico	Vivant
n°9	45	Lymphome	Post greffe, GVH	allogreffe, immunosupp. GVH	posaco	Ambisome®	Vivant
n° 10	65	LLC	Post greffe, GVH	allogreffe, immunosupp. GVH, Ac monoclonal	posaco	vorico	Vivant
n° 11	82	Lymphome	Prise en charge palliative	neutropénie, immunosupp.		caspo →vorico	Décédé

O : oui ; N : non ; LT : leucémie à tricholeucocytes ; ATF : antifongique ; immunosupp. : Traitements immunosuppresseurs ; caspo : caspofungine ; vorico : voriconazole ; posaco : posaconazole.

Annexe 4 : Données biologiques des patients de l'étude rétrospective.

CAS n°1

Dates	GM	BDG pg/ml	Leucocytes	PNN G/l	Fibrinogène g/l	Hémoc positive	Plvt myc respiratoire
07/06/2014	0,11	52	0.43	Ø	NR		
12/06/2014	0,101	41	0.44	Ø	2.9		
14/06/2014	0,085	< 31	0.52	Ø	NR		
19/06/2014	0,764	< 31	0.52	Ø	NR		
23/06/2014	0,086	< 31	0.29	Ø	5.7		
25/06/2014	0,129	< 31	<0.2	Ø	6		LBA :- ; PJ :-
26/06/2014	0,127	< 31	0.26	Ø	NR		
30/06/2014	0,228	37	0.23	Ø	NR		
03/07/2014	0,156	< 31	<0.2	Ø	3.5		
07/07/2014	0,15	53	<0.2	Ø	4.2		
10/07/2014	0,206	< 31	<0.2	Ø	NR		
15/07/2014	0,165	226	<0.2	Ø	6	C.jeikeyum	
17/07/2014	0,179	152	<0.2	Ø	5.9		
21/07/2014	0,422	252	<0.2	Ø	NR		SB :- ; LBA :-
27/07/2014	0,124	54	2.72	Ø	NR		
28/07/2014	0,104	< 31	3.58	3.39	NR		
31/07/2014	0,787	< 31	4.45	3.39	NR		
11/08/2014	0,127	< 31	2.41	1.86	4.7		

Cas n°2

Dates	GM	BDG pg/ml	Leucocytes	PNN G/l	Fibrinogène g/l	Hémoc positive	Plvt myc respiratoire
23/07/2014	0,066	273	<0.2	Ø	NR		
01/08/2014	1,184	639	0.38	Ø	NR		Crachat : <i>A.fumigatus</i> + <i>C.albican</i>
02/08/2014	0,898	339	0.68	Ø	NR		
03/08/2014	0,493	330	NR	NR	NR		
04/08/2014	0,529	327	5.13	4.67	9.8		
05/08/2014	0,345	414	NR	NR	NR		
06/08/2014	0,181	363	8.31	NR	7.8		
07/08/2014	0,267	372	8.54	NR	7.2		

Cas n°3

Dates	GM	BDG pg/ml	Leucocytes	PNN G/l	Fibrinogène g/l	Hémoc positive	Plvt myc respiratoire
02/06/2014	0,11	< 31	4.41	NR	NR		
04/06/2014	0,338	< 31	2.16	NR	NR		
10/06/2014	0,092	< 31	<0.2	Ø	NR	E.coli	
12/06/2014	0,457	< 31	<0.2	Ø	7.7		
16/06/2014	0,165	69	2.05	Ø	7.7		SB : <i>A.nidulans</i>
24/06/2014	0,166	< 31	4.94	NR	NR		

Cas n°4

Dates	GM	BDG pg/ml	Leucocytes	PNN G/l	Fibrinogène g/l	Hémoc positive	Plvt myc respiratoire
26/03/2014	0,348		<0.2	Ø	NR		
27/03/2014	0,709	88	<0.2	Ø	6.9		
31/03/2014	0,181	< 31	<0.2	Ø	NR		Crachat : <i>A.fumigatus</i>
03/04/2014	0,205	< 31	0.34	Ø	5.7		
04/04/2014	0,348	< 31	<0.2	Ø	NR		

Cas n°5

Dates	GM	BDG pg/ml	Leucocytes	PNN G/l	Fibrinogène g/l	Hémoc positive	Plvt myc respiratoire
17/02/2014	0,071	39	<0.2	Ø	4.7		
21/02/2014	0,06	< 31	<0.2	Ø	NR		
24/02/2014	0,073	83	<0.2	Ø	7.8		
27/02/2014	0,076	< 31	<0.2	Ø	8		
03/03/2014	0,069	< 31	<0.2	Ø	7.3	C.braakii + E.faecium	
06/03/2014	0,108	< 31	<0.2	Ø	6.3		
10/03/2014	0,122	< 31	<0.2	Ø	6.1		
13/03/2014	0,141	< 31	<0.2	Ø	NR		
17/03/2014	0,211	< 31	<0.2	Ø	7.3		
20/03/2014	0,252	< 31	<0.2	Ø	NR		
27/03/2014	0,694	98	<0.2	Ø	9.2		
31/03/2014	1,155	107	<0.2	Ø	NR		LBA :- ;SB :- ;PJ :-
03/04/2014	2,126	98	<0.2	Ø	11.3		
07/04/2014	8,66	635	<0.2	Ø	9.9		
10/04/2014	9,7	553	<0.2	Ø	9.3		

Cas n°6

Dates	GM	BDG pg/ml	Leucocytes	PNN G/l	Fibrinogène g/l	Hémoc positive	Plvt myc respiratoire
01/05/2014	0,132	< 31	NR	NR	Ø		
06/05/2014	0,631	149	NR	NR	Ø		LBA ag : + LBA : -
07/05/2014	4,252	1844	10.17	0.05	Ø		
08/05/2014	3,362	553	11.22	0.02	9.2		

Cas n°7

Dates	GM	BDG pg/ml	Leucocytes	PNN G/l	Fibrinogène g/l	Hémoc positive	Plvt myc respiratoire
21/01/2014	0,911	248	2.73	1.92	NR		
23/01/2014	0,684	265	2.40	NR	NR		28/01 LBA : <i>A.fumigatus</i>
20/03/2014	0,109	45	2.81	NR	5.2		

Cas n°8

Dates	GM	BDG pg/ml	Leucocytes	PNN G/l	Fibrinogène g/l	Hémoc positive	Plvt myc respiratoire
14/04/2014	0,141	< 31	<0.2	Ø	4.5		
24/04/2014	0,08	< 31	0.23	Ø	3.1		
28/04/2014	0,15	< 31	0.22	Ø	3.4		
02/05/2014	0,078	38	0.21	Ø	4		
09/05/2014	0,165	< 31	0.4	Ø	NR		
10/07/2014	1,221	77		Ø	NR		
15/07/2014	0,637	49	<0.2	Ø	NR		
26/07/2014	0,075	< 31	4.17	Ø	NR		

Cas n°9

Dates	GM	BDG pg/ml	Leucocytes	PNN G/l	Fibrinogène g/l	Hémoc positive	Plvt myc respiratoire
04/02/2014	0,11	< 31	1.81	1.12	NR		
28/02/2014	0,088	< 31	2.54	1.37	NR		
17/03/2014	1,115	< 31	2.18	NR	NR		
01/04/2014	0,085	32	4.04	3.03	NR		
08/04/2014	0,095	< 31	3.73	NR	NR		

Cas n°10

Dates	GM	BDG pg/ml	Leucocytes	PNN G/l	Fibrinogène g/l	Hémoc positive	Plvt myc respiratoire
03/03/2014	0,235	< 31	1.70	NR	3.1		
09/03/2014	0,17	< 31	5.32	4.09	3.2		
17/03/2014	0,406	< 31	3.72	NR	NR		
01/04/2014	0,714	< 31	1.74	0.87	2.8		
10/04/2014	2,055	< 31	1.71	0.66	2.3		
22/04/2014	2,838	< 31	1.20	0.48	2.2		
06/05/2014	3,212	< 31	1.34	0.64	NR		
20/05/2014	1,178	< 31	3.51	2.75	NR		
27/05/2014	1,201	40	1.62	0.83	2.8		
03/06/2014	2,025	< 31	1.09	0.28	4.1		
10/06/2014	2,58	129	2.76	1.39	NR		
18/06/2014	1,097	< 31	3.35	2.37	2.8		
24/06/2014	2,193	< 31	1.38	0.19	3.7		

Cas n°11

Dates	GM	BDG pg/ml	Leucocytes	PNN G/l	Fibrinogène g/l	Hémoc positive	Plvt myc respiratoire
24/07/2014	0,222	1070	<0.2	Ø	NR	C.tropicalis	
28/07/2014	0,684	1234	<0.2	Ø	NR		
02/08/2014	1,046	1577	<0.2	Ø	NR		
03/08/2014	1,363	1088	<0.2	Ø	NR		
04/08/2014	1,299	1370	<0.2	Ø	NR		

GM : galactomannane ; BDG : β -D-glucane ; Hémoc : hémoculture ; plvt : prélèvement ; myc : mycologique ; SB : sécrétion bronchique ; LBA : lavage broncho-alvéolaire ; PJ : *Pneumocystis jirovecii* ; LBA ag : antigène galactomannane dans le LBA. NR : non réalisé ; Ø : non réalisable.

Annexe n °5 : Note d'information aux patients.

Etude prospective de l'intérêt du dosage du β 1-3 D Glucan dans le dépistage de la survenue d'aspergilloses invasives chez des patients neutropéniques atteints de leucémies aiguës.

Lettre d'information aux patients

Madame, Monsieur,

Vous êtes actuellement hospitalisés pour la prise en charge et le traitement d'une maladie hématologique à type de leucémie aiguë.

Ce type de maladie hématologique nécessite la réalisation de cures de chimiothérapies. Ces chimiothérapies vont détruire les cellules malignes leucémiques de votre organisme et cela permettra à votre moelle osseuse de reconstituer un stock normal de cellules sanguines (globules blancs, globules rouges et plaquettes).

Après la chimiothérapie et avant la régénération de la moelle osseuse (avec des cellules normales), il va s'écouler une période d'environ 3 semaines où l'organisme ne fabriquera pas encore de cellules sanguines. Pendant cette période (que l'on appelle aplasie), vous recevrez des transfusions de globules rouges ou de plaquettes lorsque les taux de ces cellules dans le sang seront trop bas. Par contre cela n'est pas possible pour les globules blancs.

Lorsque les globules blancs ou leucocytes (et spécialement les polynucléaires qui sont une des familles des globules blancs) sont très bas il n'y a plus de système efficace de défense contre les infections. Pour cette raison des mesures de protection seront prises pendant votre hospitalisation (comme l'isolement par exemple).

Généralement, dans les services d'hématologie, les malades traités pour des leucémies aiguës bénéficient d'une surveillance régulière pour pouvoir dépister la survenue d'un problème infectieux du à l'absence prolongée de globules blancs pour se défendre. Cela permet aux médecins de mettre en route les traitements adaptés (antibiotiques par exemple) quand une infection est suspectée.

La période d'aplasie après la chimiothérapie peut être compliquée d'infections dues soit à des bactéries soit à des champignons (les infections dues à des virus sont plus rares).

Une des infections à champignons qui peut survenir est l'**aspergillose** (due à un champignon nommé *Aspergillus*). L'aspergillose nécessite un traitement spécifique par un antifongique (identique à un antibiotique mais destiné à traiter les champignons).

Il est possible de détecter la survenue précoce d'une aspergillose en recherchant dans le sang des patients la présence d'antigène aspergillaire. Cela se fait environ 2 fois par semaine par étude biologique sur un échantillon sanguin dans tous les services d'hématologie.

Nous vous informons que nous allons réaliser en parallèle, sur l'échantillon de sang prélevé pour la recherche d'antigène aspergillaire, un autre test appelé Fungitell® (test déjà commercialisé en France) qui peut aussi détecter la présence de signes avant coureur d'aspergillose ou d'autres infections à champignons. La réalisation de ce test ne demandera aucune prise de sang supplémentaire pour vous.

Notre objectif est d'évaluer les performances de ce test et de déterminer sa place dans la stratégie de prise en charge de l'aspergillose.

Pr/Dr.....

Service d'Hématologie du CHU de

Vu, le Président du jury,

Mme Berthe-Marie IMBERT

Vu, le Directeur de thèse,

Mr Patrice LE PAPE

Vu, le Directeur de l'UFR,

Mme Virginie FERRE

Nom - Prénoms : MINOZA Alida Passanyégdé

Titre : Apport de la détection du (1-3) β -D-glucane au diagnostic de l'aspergillose invasive pulmonaire : expérience nantaise.

Résumé :

L'aspergillose invasive est la 3^{ème} cause d'infection fongique grave en France. Elle est représentée essentiellement par l'aspergillose pulmonaire invasive (API) qui se développe préférentiellement sur des terrains d'immunodépression. Le diagnostic de l'API est difficile et souvent limité par le diagnostic microbiologique et radiologique. Il est donc important d'avoir des biomarqueurs performants.

Le but de cette thèse est d'évaluer l'apport du (1-3) β -D-glucane (BDG) dans le diagnostic de l'API dans le service d'hématologie du CHU de Nantes. Pour cela deux études sont menées : une rétrospective chez des patients ayant présenté une API et l'autre prospective s'inscrivant dans un projet multicentrique national chez des patients en phase d'induction thérapeutique pour une leucémie aigüe.

Les résultats montrent une précocité du dosage du BDG par rapport à la culture et à l'imagerie. Dans 6 cas sur 10, le BDG est positif avant ou en même temps que le galactomannane (GM). Son évolution cinétique semble en adéquation avec l'évolution clinique même si cela est controversé dans la littérature. Ce test possède une spécificité et une sensibilité de 87.2% et 72.7% respectivement dans les études menées, avec une augmentation de la sensibilité lors d'une association avec le GM.

De plus, sa forte valeur prédictive négative (89.5%) en fait un bon marqueur d'exclusion d'infection fongique.

MOTS CLÉS : B-D-GLUCANE, ASPERGILLOSE PULMONAIRE INVASIVE, HEMATOLOGIE.

Jury :

Présidente : Mme le Professeur Berthe-Marie IMBERT

Assesseurs : Mr le Professeur Patrice LE PAPE

Mme le Professeur Marie-Hélène RODIER

Mr le Docteur Thomas GASTINNE

Adresse de l'auteur : *Alida Minoza, 114 rue de la pierre levée, 86000 Poitiers*

minoza.alida@hotmail.fr