

2020-2021

THÈSE

pour le

DIPLÔME D'ÉTAT DE DOCTEUR EN MÉDECINE

Qualification en Biologie Médicale

Diagnostic des mucormycoses par PCR au CHU d'Angers

Mise en place du kit MucorGenius[®], contextualisation
économique et intégration des enjeux bioclimatiques
et énergétiques du XXI^{ème} siècle

Julien BRUNIER

Né le 1^{er} février 1994 à Le Mans (72)

Sous la direction de M. le Docteur Marc PIHET

Membres du jury

Monsieur le Professeur Jean-Philippe BOUCHARA | Président

Monsieur le Docteur Marc PIHET | Directeur

Madame le Docteur Sophie CHALMIN | Membre

Monsieur le Professeur Nicolas PAPON | Membre

Soutenue publiquement le :
22 octobre 2021



**FACULTÉ
DE SANTÉ**

UNIVERSITÉ D'ANGERS

ENGAGEMENT DE NON PLAGIAT

Je, soussigné BRUNIER Julien
déclare être pleinement conscient que le plagiat de documents ou d'une
partie d'un document publiée sur toutes formes de support, y compris l'internet,
constitue une violation des droits d'auteur ainsi qu'une fraude caractérisée.
En conséquence, je m'engage à citer toutes les sources que j'ai utilisées
pour écrire ce rapport ou mémoire.

signé par l'étudiant le **20/09/2021**

A handwritten signature in black ink, appearing to be 'JB' or similar, enclosed within a large, loopy flourish.

LISTE DES ENSEIGNANTS DE LA FACULTÉ DE SANTÉ D'ANGERS

Doyen de la Faculté : Pr Nicolas Lerolle

Vice-Doyen de la Faculté et directeur du département de pharmacie : Pr Frédéric Lagarce

Directeur du département de médecine : Pr Cédric Annweiler

PROFESSEURS DES UNIVERSITÉS

| | | |
|-----------------------------|---|-----------|
| ABRAHAM Pierre | Physiologie | Médecine |
| ANNWEILER Cédric | Gériatrie et biologie du vieillissement | Médecine |
| ASFAR Pierre | Réanimation | Médecine |
| AUBE Christophe | Radiologie et imagerie médicale | Médecine |
| AUGUSTO Jean-François | Néphrologie | Médecine |
| AZZOUZI Abdel Rahmène | Urologie | Médecine |
| BAUFRETON Christophe | Chirurgie thoracique et cardiovasculaire | Médecine |
| BELLANGER William | Médecine Générale | Médecine |
| BENOIT Jean-Pierre | Pharmacotechnie | Pharmacie |
| BIGOT Pierre | Urologie | Médecine |
| BONNEAU Dominique | Génétique | Médecine |
| BOUCHARA Jean-Philippe | Parasitologie et mycologie | Médecine |
| BOUVARD Béatrice | Rhumatologie | Médecine |
| BOURSIER Jérôme | Gastroentérologie ; hépatologie | Médecine |
| BRIET Marie | Pharmacologie | Médecine |
| CALES Paul | Gastroentérologie ; hépatologie | Médecine |
| CAMPONE Mario | Cancérologie ; radiothérapie | Médecine |
| CAROLI-BOSC François-Xavier | Gastroentérologie ; hépatologie | Médecine |
| CHAPPARD Daniel | Cytologie, embryologie et cytogénétique | Médecine |
| CONNAN Laurent | Médecine générale | Médecine |
| COPIN Marie-Christine | Anatomie et cytologie pathologiques | Médecine |
| COUTANT Régis | Pédiatrie | Médecine |
| CUSTAUD Marc-Antoine | Physiologie | Médecine |
| DE BRUX Jean-Louis | Chirurgie thoracique et cardiovasculaire | Médecine |
| DE CASABIANCA Catherine | Médecine Générale | Médecine |
| DESCAMPS Philippe | Gynécologie-obstétrique | Médecine |
| D'ESCATHA Alexis | Médecine et santé au travail | Médecine |
| DINOMAS Mickaël | Médecine physique et de réadaptation | Médecine |
| DIQUET Bertrand | Pharmacologie | Médecine |
| DUBEE Vincent | Maladies Infectieuses et Tropicales | Médecine |

| | | |
|--------------------------|---|-----------|
| DUCANCELLE Alexandra | Bactériologie-virologie ; hygiène hospitalière | Médecine |
| DUVAL Olivier | Chimie thérapeutique | Pharmacie |
| DUVERGER Philippe | Pédopsychiatrie | Médecine |
| EVEILLARD Mathieu | Bactériologie-virologie | Pharmacie |
| FAURE Sébastien | Pharmacologie physiologie | Pharmacie |
| FOURNIER Henri-Dominique | Anatomie | Médecine |
| FURBER Alain | Cardiologie | Médecine |
| GAGNADOUX Frédéric | Pneumologie | Médecine |
| GARNIER François | Médecine générale | Médecine |
| GASCOIN Géraldine | Pédiatrie | Médecine |
| GOHIER Bénédicte | Psychiatrie d'adultes | Médecine |
| GUARDIOLA Philippe | Hématologie ; transfusion | Médecine |
| GUILLET David | Chimie analytique | Pharmacie |
| HAMY Antoine | Chirurgie générale | Médecine |
| HENNI Samir | Médecine Vasculaire | Médecine |
| HUNAUT-BERGER Mathilde | Hématologie ; transfusion | Médecine |
| IFRAH Norbert | Hématologie ; transfusion | Médecine |
| JEANNIN Pascale | Immunologie | Médecine |
| KEMPF Marie | Bactériologie-virologie ; hygiène hospitalière | Médecine |
| LACCOURREYE Laurent | Oto-rhino-laryngologie | Médecine |
| LAGARCE Frédéric | Biopharmacie | Pharmacie |
| LARCHER Gérald | Biochimie et biologie moléculaires | Pharmacie |
| LASOCKI Sigismond | Anesthésiologie-réanimation | Médecine |
| LEGENDRE Guillaume | Gynécologie-obstétrique | Médecine |
| LEGRAND Erick | Rhumatologie | Médecine |
| LERMITE Emilie | Chirurgie générale | Médecine |
| LEROLLE Nicolas | Réanimation | Médecine |
| LUNEL-FABIANI Françoise | Bactériologie-virologie ; hygiène hospitalière | Médecine |
| MARCHAIS Véronique | Bactériologie-virologie | Pharmacie |
| MARTIN Ludovic | Dermato-vénéréologie | Médecine |
| MAY-PANLOUP Pascale | Biologie et médecine du développement et de la reproduction | Médecine |
| MENEI Philippe | Neurochirurgie | Médecine |
| MERCAT Alain | Réanimation | Médecine |
| PAPON Nicolas | Parasitologie et mycologie médicale | Pharmacie |
| PASSIRANI Catherine | Chimie générale | Pharmacie |
| PELLIER Isabelle | Pédiatrie | Médecine |
| PETIT Audrey | Médecine et Santé au Travail | Médecine |
| PICQUET Jean | Chirurgie vasculaire ; médecine vasculaire | Médecine |
| PODEVIN Guillaume | Chirurgie infantile | Médecine |
| PROCACCIO Vincent | Génétique | Médecine |
| PRUNIER Delphine | Biochimie et Biologie Moléculaire | Médecine |
| PRUNIER Fabrice | Cardiologie | Médecine |

| | | |
|------------------------------|---|-----------|
| REYNIER Pascal | Biochimie et biologie moléculaire | Médecine |
| RICHARD Isabelle | Médecine physique et de réadaptation | Médecine |
| RICHOMME Pascal | Pharmacognosie | Pharmacie |
| RODIEN Patrice | Endocrinologie, diabète et maladies métaboliques | Médecine |
| ROQUELAURE Yves | Médecine et santé au travail | Médecine |
| ROUGE-MAILLART Clotilde | Médecine légale et droit de la santé | Médecine |
| ROUSSEAU Audrey | Anatomie et cytologie pathologiques | Médecine |
| ROUSSEAU Pascal | Chirurgie plastique, reconstructrice et esthétique | Médecine |
| ROUSSELET Marie-Christine | Anatomie et cytologie pathologiques | Médecine |
| ROY Pierre-Marie | Thérapeutique | Médecine |
| SAULNIER Patrick | Biophysique et Biostatistiques | Pharmacie |
| SERAPHIN Denis | Chimie organique | Pharmacie |
| SCHMIDT Aline | Hématologie ; transfusion | Médecine |
| TRZEPIZUR Wojciech | Pneumologie | Médecine |
| UGO Valérie | Hématologie ; transfusion | Médecine |
| URBAN Thierry | Pneumologie | Médecine |
| VAN BOGAERT Patrick | Pédiatrie | Médecine |
| VENIER-JULIENNE Marie-Claire | Pharmacotechnie | Pharmacie |
| VERNY Christophe | Neurologie | Médecine |
| WILLOTEAUX Serge | Radiologie et imagerie médicale | Médecine |

MAÎTRES DE CONFÉRENCES

| | | |
|--------------------|---|-----------|
| ANGOULVANT Cécile | Médecine Générale | Médecine |
| BAGLIN Isabelle | Chimie thérapeutique | Pharmacie |
| BASTIAT Guillaume | Biophysique et Biostatistiques | Pharmacie |
| BEAUVILLAIN Céline | Immunologie | Médecine |
| BEGUE Cyril | Médecine générale | Médecine |
| BELIZNA Cristina | Médecine interne | Médecine |
| BELONCLE François | Réanimation | Médecine |
| BENOIT Jacqueline | Pharmacologie | Pharmacie |
| BIERE Loïc | Cardiologie | Médecine |
| BLANCHET Odile | Hématologie ; transfusion | Médecine |
| BOISARD Séverine | Chimie analytique | Pharmacie |
| BRIET Claire | Endocrinologie, Diabète et maladies métaboliques | Médecine |
| BRIS Céline | Biochimie et biologie moléculaire | Pharmacie |
| CAPITAIN Olivier | Cancérologie ; radiothérapie | Médecine |
| CASSEREAU Julien | Neurologie | Médecine |
| CHEVALIER Sylvie | Biologie cellulaire | Médecine |
| CLERE Nicolas | Pharmacologie / physiologie | Pharmacie |
| COLIN Estelle | Génétique | Médecine |

| | | |
|--------------------------------|--|-----------|
| DERBRE Séverine | Pharmacognosie | Pharmacie |
| DESHAYES Caroline | Bactériologie virologie | Pharmacie |
| FERRE Marc | Biologie moléculaire | Médecine |
| FORTRAT Jacques-Olivier | Physiologie | Médecine |
| HAMEL Jean-François | Biostatistiques, informatique médicale | Médicale |
| HELESBEUX Jean-Jacques | Chimie organique | Pharmacie |
| HINDRE François | Biophysique | Médecine |
| JOUSSET-THULLIER Nathalie | Médecine légale et droit de la santé | Médecine |
| JUDALET-ILLAND Ghislaine | Médecine générale | Médecine |
| KHIATI Salim | Biochimie et biologie moléculaire | Médecine |
| KUN-DARBOIS Daniel | Chirurgie maxillo-faciale et stomatologie | Médecine |
| LACOEUILLE Franck | | Pharmacie |
| LANDREAU Anne | Botanique/ Mycologie | Pharmacie |
| LEBDAI Souhil | Urologie | Médecine |
| LEGEAY Samuel | Pharmacocinétique | Pharmacie |
| LEMEE Jean-Michel | Neurochirurgie | Médecine |
| LE RAY-RICHOMME Anne- Marie | Pharmacognosie | Pharmacie |
| LEPELTIER Elise | Chimie générale | Pharmacie |
| LETOURNEL Franck | Biologie cellulaire | Médecine |
| LIBOUBAN Hélène | Histologie | Médecine |
| LUQUE PAZ Damien | Hématologie biologique | Médecine |
| MABILLEAU Guillaume | Histologie, embryologie et cytogénétique | Médecine |
| MALLET Sabine | Chimie Analytique | Pharmacie |
| MAROT Agnès | Parasitologie et mycologie médicale | Pharmacie |
| MESLIER Nicole | Physiologie | Médecine |
| MIOT Charline | Immunologie | Médecine |
| MOUILLIE Jean-Marc | Philosophie | Médecine |
| NAIL BILLAUD Sandrine | Immunologie | Pharmacie |
| PAILHORIES Hélène | Bactériologie-virologie | Médecine |
| PAPON Xavier | Anatomie | Médecine |
| PASCO-PAPON Anne | Radiologie et imagerie médicale | Médecine |
| PECH Brigitte | Pharmacotechnie | Pharmacie |
| PENCHAUD Anne-Laurence | Sociologie | Médecine |
| PIHET Marc | Parasitologie et mycologie | Médecine |
| PY Thibaut | Médecine Générale | Médecine |
| RAMOND-ROQUIN Aline | Médecine Générale | Médecine |
| RINEAU Emmanuel | Anesthésiologie réanimation | Médecine |
| RIOU Jérémie | Biostatistiques | Pharmacie |
| ROGER Emilie | Pharmacotechnie | Pharmacie |
| SAVARY Camille | Pharmacologie-Toxicologie | Pharmacie |
| SAVARY Dominique | Médecine d'urgence | Médecine |
| SCHMITT Françoise | Chirurgie infantile | Médecine |
| SCHINKOWITZ Andréas | Pharmacognosie | Pharmacie |
| SPIESSER-ROBELET Laurence | Pharmacie Clinique et Education Thérapeutique | Pharmacie |

| | | |
|--------------------------------|-------------------|-----------|
| TESSIER-CAZENEUVE Christine | Médecine Générale | Médecine |
| TEXIER-LEGENDRE Gaëlle | Médecine Générale | Médecine |
| VIAULT Guillaume | Chimie organique | Pharmacie |

AUTRES ENSEIGNANTS

PRCE

| | | |
|-----------------------|--------------|-----------|
| AUTRET Erwan | Anglais | Médecine |
| BARBEROUSSE Michel | Informatique | Médecine |
| BRUNOIS-DEBU Isabelle | Anglais | Pharmacie |
| FISBACH Martine | Anglais | Médecine |
| O'SULLIVAN Kayleigh | Anglais | Médecine |

PAST

| | | |
|--------------------|------------------------|-----------|
| CAVAILLON Pascal | Pharmacie Industrielle | Pharmacie |
| DILÉ Nathalie | Officine | Pharmacie |
| MOAL Frédéric | Pharmacie clinique | Pharmacie |
| PAPIN-PUREN Claire | Officine | Pharmacie |
| POIROUX Laurent | Soins Infirmiers | Médecine |

ATER

| | | |
|-----------------------|----------------|-----------|
| BOUCHENAKI Hichem | Physiologie | Pharmacie |
| MESSAOUDI kHALED | Immunologie | Pharmacie |
| MOUHAJIR Abdelmounaim | Biotechnologie | Pharmacie |

PLP

| | | |
|--------------|------------------|----------|
| CHIKH Yamina | Economie-gestion | Médecine |
|--------------|------------------|----------|

AHU

| | | |
|------------------|-------------------|-----------|
| IFRAH Amélie | Droit de la Santé | Pharmacie |
| LEBRETON Vincent | Pharmacotechnie | Pharmacie |

Mise à jour 27/08/2020

REMERCIEMENTS

À **Monsieur le Professeur Jean-Philippe Bouchara**, merci de présider ce jury et de renouveler votre gentillesse depuis ce premier semestre angevin au laboratoire. Merci pour l'accueil chaleureux et le partage de vos points de vue sur notre métier.

À **Madame le Docteur Sophie Chalmin**, merci pour l'opportunité qui m'a été offerte d'ouvrir mon champs de vision. Ces nouvelles perspectives m'ont été utiles tant pour ma pratique professionnelle que pour mes engagements personnels. Merci pour l'accompagnement dans ce travail et la participation au jury de sa soutenance.

À **Monsieur le Professeur Nicolas Papon**, merci d'apporter un œil scientifique à ce travail et une critique extérieure. Merci pour le partage de quelques intérêts plus fondamentaux qui sont venus compléter mon intérêt pour ces thématiques.

À **Monsieur le Docteur Marc Pihet**, merci pour l'encadrement et l'accompagnement continu, du début de mon stage jusqu'à la soutenance de ce travail. Merci pour ton accessibilité et l'ouverture de nos conversations, pour avoir canalisé parfois ma dispersion et pour le soutien à l'originalité de ce travail.

À **Stéphanie, Nadine, Claire, Maud, Julie et Arnaud**, merci pour m'avoir accompagné en paillasse durant tout le semestre, pour m'avoir transmis vos connaissances et pour avoir rendu ce travail possible.

À **Madame le Professeur Marie Briet** et **Madame le Professeur Cécile Bébéar**, à **Madame Nathalie Ehret** et **Monsieur Eric Teillay**, merci pour votre compréhension, votre humanité et votre soutien à ma démarche de changement de subdivision, qui m'a permis de me rapprocher de ma famille. Merci d'avoir tout mis en œuvre pour que cette démarche soit possible et se concrétise au plus vite. Merci pour votre gentillesse maintenue des mois durant.

À **Monsieur le Docteur Ludovic de Gentile**, merci pour les anecdotes, pour avoir partagé votre passion et pour avoir ravivé l'intérêt à « briser les vases clos ».

REMERCIEMENTS

À **ma maman**, merci d'avoir tout donné de toi, toujours, pour moi. Merci d'avoir tout rendu possible, d'avoir répondu à toutes mes questions et d'avoir toujours été présente. Merci de m'avoir appris l'importance des émotions et de la bienveillance, ainsi que le sens du soin.

À **Amandine**, merci d'être présente à mes côtés tous les jours et de partager mes rêves, de les bâtir et les magnifier. Merci d'être l'espoir et la joie, le rire et la confiance. Merci d'être un repère et un guide, d'être aujourd'hui comme demain.

À **mes grands-parents**, merci de m'avoir pris sous votre aile depuis tout petit, de m'avoir offert de si belles vacances et d'éternelles leçons. Merci de m'accompagner toujours aujourd'hui et de me rappeler certaines réalités.

À **mes oncles, Franck et Mickaël**, merci de m'avoir emmené avec vous, d'avoir cru en moi et de m'avoir soutenu. Merci pour votre sens de la famille et pour accompagner hier, aujourd'hui et demain tous ses membres.

À **Quentin**, merci d'être revenu d'un pays qui t'est si cher, de nous transmettre ton énergie, ton espoir, ta gentillesse et ton humanité. Merci de nous rappeler à l'ouverture et de nous proposer un autre chemin.

À **Paul**, merci pour l'éveil, pour le partage et l'amitié. Merci pour les rencontres, avec l'humain et les paysages. Merci pour l'ambition libératrice, passée et à venir.

À **Nadia et François**, merci pour votre accueil, pour votre chaleur et votre soutien. Merci pour votre confiance et pour la force de votre esprit de famille.

À **Sulakshana**, merci pour l'amitié et la fraternité. Merci pour le partage et l'inspiration. Merci pour la complicité de nos valeurs d'orient, pour la hauteur d'esprit et la sérénité.

REMERCIEMENTS

À **la famille Rigouin, Nicole, Michel, Alexandra, Jannick et Redouane, Romuald, Stéphanie, Lilly, Eva et Charlie**, merci pour les souvenirs, pour l'esprit de fête et de partage. Merci pour la place à vos côtés et votre affection renouvelée.

À **Morgane et Thomas**, merci pour l'esprit de famille et la cohésion. Merci d'avoir apporté **Mia** et de nous partager votre joie. Merci à elle de décupler mon énergie à lutter pour un monde viable et désirable dans les années qui viennent.

À **Jim**, merci pour le bol d'air. Merci pour la complicité et l'amitié, merci à ta famille pour la chaleur et l'accueil. Merci pour le terreau de rêves et pour la liberté de bâtir.

À **mes camarades de Bordeaux**, internes, techniciens et biologistes, merci pour mes deux premières années d'internat, si denses et riches en évolutions. Merci pour l'esprit de cohésion, l'amitié, la pluralité des points de vue et les expériences de vie partagées.

À **mes camarades d'Angers**, merci pour ce semestre express et l'accueil instantané. Merci pour le rire et l'accompagnement, pour le partage et l'amitié.

À **Nathalie Hourmant**, merci de m'avoir pris à vos côtés pendant ces quatre années, merci pour l'émancipation et pour l'indépendance. Merci de m'avoir offert cette chance et d'avoir cru en moi. Merci d'avoir rendu ma vie actuelle possible, sans vous les chemins devant moi auraient été moins nombreux. Merci de m'avoir fait rencontrer et adopter Nabu, mon précieux compagnon.

À **Emmanuel Jan**, merci d'avoir été présent et de m'avoir regardé. Merci d'avoir cru en moi et de m'avoir tenu la main. Merci d'avoir été un exemple à suivre. Merci d'avoir été le professeur dont tant d'élèves ont besoin.

À toutes les personnes qui m'ont fait être celui que je suis, merci pour les rencontres, pour les enseignements et pour les chemins ouverts.

Liste des abréviations et sociétés savantes

| | |
|---------------------|---|
| ADN | Acide Désoxyribonucléique |
| API | Aspergillose Pulmonaire Invasive |
| CSH | Cellules Souches Hématopoïétiques |
| CO ₂ | Dioxyde de carbone / gaz carbonique / anhydride carbonique |
| CotH | Coat Protein Homologs |
| COVID-19 | Coronavirus Disease 2019 (= maladie à coronavirus 2019) |
| Ct | Cycle threshold (= cycle seuil) |
| ECMM | European Confederation of Medical Mycology |
| EORTC/MSG | 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 |
| ESCMID | European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases |
| ETP | Equivalent Temps Plein |
| FPCRI | Fungal PCR Initiative |
| GES | Gaz à Effet de Serre |
| Gt | Gigatonne |
| GvHD | Graft versus Host Disease (= maladie du greffon contre l'hôte) |
| GRP78 | Glucose-Regulated Protein 78 |
| IFI | Infection Fongique Invasive |
| IRM | Imagerie par Résonance Magnétique |
| ISHAM | International Society Human and Animal Mycology |
| LBA | Liquide Broncho-Alvéolaire |
| LCR | Liquide Céphalo-Rachidien |
| MALDI-TOF | Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization Time Of Flight |
| MtCO ₂ e | Mégatonne équivalent CO ₂ |
| ORL | Oto-Rhino-Laryngologie |
| PCR | Polymerase Chain Reaction (= réaction de polymérisation en chaîne) |
| RESSIF | Réseau de Surveillance des Infections Fongiques |
| SARS-CoV2 | Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 (= Syndrome respiratoire aigu sévère lié au coronavirus 2) |
| TEP | Tonne Equivalent Pétrole |
| VPN | Valeur Prédictive Négative |
| VPP | Valeur Prédictive Positive |

Plan

INTRODUCTION

1. GENERALITES

1.1. Taxonomie et écologie des Mucorales

1.2. Physiologie des espèces infectantes : interaction hôte-pathogène

1.3. Epidémiologie

1.4. Aspects cliniques

1.4.1. Formes cliniques

1.4.1.1. Forme rhino-orbitale primitive

1.4.1.2. Forme pulmonaire primitive

1.4.1.3. Forme cutanée primitive

1.4.1.4. Forme gastro-intestinale primitive

1.4.1.5. Forme disséminée

1.5. Cas particuliers

1.5.1. Pays en développement

1.5.2. COVID-19

1.6. Pronostic et mortalité

1.7. Comparaison avec l'aspergillose pulmonaire invasive

1.8. Coût économique

1.9. Modalités du diagnostic

1.9.1. Diagnostic conventionnel

1.9.2. Place de la biologie moléculaire

1.10. Traitement

2. MISE EN PLACE DU KIT MUCORGENIUS®

2.1. Etapes préliminaires

2.2. Sélection des sérums

2.3. Analyses et résultats

2.4. Conclusions et perspectives

3. DISCUSSION

3.1. Apport à la prise en charge du patient et au laboratoire

3.2. Apport pour l'hôpital : analyse médico-économique

3.2.1. Coûts de l'analyse externalisée

3.2.2. Coûts de l'analyse internalisée

3.2.3. Perspectives sur 5 ans

3.2.4. Conclusions de l'analyse médico-économique

3.3. Perspectives

3.3.1. Validation de la PCR sur le LBA

3.3.2. Association avec la PCR aspergillose

3.3.3. Extension future des moyens diagnostiques

3.4. Contextualisation de l'apport de cette technique face aux enjeux bioclimatiques et énergétiques du XXI^{ème} siècle

4. CONCLUSION
BIBLIOGRAPHIE
LISTE DES FIGURES
LISTE DES TABLEAUX
TABLE DES MATIERES
ANNEXES

INTRODUCTION

Les Mucorales constituent un ordre de champignons cosmopolites responsables d'infections à très fort potentiel de létalité. Présents de manière ubiquitaire dans l'environnement, ces saprophytes du sol et de nombreux substrats végétaux peuvent être à l'origine d'infections communautaires ou liées aux soins, et touchent essentiellement des individus immunodéprimés (1-3). Les mucormycoses se situent ainsi au troisième rang des infections fongiques invasives (IFI) après les candidémies et les aspergilloses. Elles peuvent être localisées aux poumons, à la peau, à la sphère ORL, au système digestif,... voire être disséminées (3). Les différentes présentations cliniques de ces infections sont influencées par de multiples facteurs, notamment les comorbidités du patient (3-5). Au cours des dernières décennies, l'augmentation importante des situations d'immunodépression a contribué à une augmentation notable du nombre d'IFI et à l'émergence des mucormycoses, notamment dans les services d'onco-hématologie et de réanimation (6,7). L'immunodépression acquise à la suite d'un traitement par corticothérapie à forte dose dans le traitement de la COVID a ainsi récemment mis en exergue ces champignons (8).

Le pronostic des IFI dépend étroitement de la précocité d'instauration du traitement antifongique, qui diffère par ailleurs entre les mucormycoses et les aspergilloses (9,10). Cependant, leur diagnostic demeure difficile et repose actuellement sur un faisceau d'arguments cliniques, biologiques et radiologiques (10-12). Les performances de l'examen mycologique conventionnel restent limitées, notamment en l'absence de prélèvement de site profond. Aussi, un certain nombre de tests diagnostiques alternatifs à la culture ont été développés. La plupart des tests antigéniques commercialisés (recherche de galactomannane ou de bêta-glucanes circulants) ne sont contributifs qu'au diagnostic des aspergilloses. Pour

les mucormycoses, seules des techniques permettant la détection d'ADN sont aujourd'hui disponibles.

Parmi les techniques de biologie moléculaire développées, des PCR spécifiques d'espèces ou pan-Mucorales ont été proposées (11). L'évaluation et la standardisation de ces techniques reste toutefois incomplète et n'a pas encore abouti à des recommandations des sociétés savantes. À ce jour, la plupart des laboratoires hospitaliers de mycologie ont adopté une PCR multiplexe « maison », ciblant les genres les plus fréquemment incriminés en situation pathogène, à savoir *Rhizopus*, *Rhizomucor*, *Lichtheimia* et *Mucor*, et qui a fait l'objet d'une évaluation au niveau national (13,14). Plus récemment, quelques kits commerciaux ont été introduits, facilitant ainsi la mise en place et l'accréditation de la technique au sein des laboratoires. Au CHU d'Angers, le choix s'est porté sur le kit de PCR pan-Mucorales MucorGenius® distribué par la société PathoNostics. Une série *a minima* hebdomadaire, en parallèle d'une PCR *Aspergillus* (qui sera prochainement réalisée au sein du laboratoire) est ainsi envisagée. Ceci devrait permettre d'améliorer la prise en charge des patients à risque élevé d'IFI, en réduisant le délai de rendu de résultat pour cette analyse, qui est à l'heure actuelle externalisée.

Ce travail porte sur la contextualisation de cette avancée, sa mise en place, la validation de méthode ainsi que sur la présentation des apports de cette technique au laboratoire de Parasitologie-Mycologie du CHU d'Angers et des limites énergétiques et climatiques potentielles à venir.

1. GENERALITES

1.1. Taxonomie et écologie des Mucorales

Les Mucorales étaient anciennement intégrées à la division des *Zygomycota*, groupe comprenant également l'ordre des Entomophthorales et des Endogonales. Cette division ayant été abandonnée, elles font maintenant partie de la division des *Mucoromycota*, au sein de la sous-division des *Mucoromycotina* (1). Cet ordre de champignons supérieurs regroupe des moisissures saprophytes à croissance rapide et ayant la particularité de produire un mycélium aérien, qui se caractérise microscopiquement par des filaments larges, peu ou pas septés et présentant des ramifications habituellement à angle droit. En raison de la dispersion des spores par voie aérienne et de la capacité importante de ces champignons à dégrader les hydrates de carbone (notamment l'amidon), ils sont parmi les premiers colonisateurs de la matière organique en décomposition. Dans certains cas, ils peuvent également présenter un caractère phytopathogène. Supportant des températures élevées et une humidité relative importante, on les retrouve presque partout dans l'environnement et sur la majorité des denrées alimentaires si les conditions leurs sont favorables (2) :

- sur les fruits et légumes (cucurbitacées ou solanacées en première ligne – **figure 1**) ;
- sur les céréales stockées insuffisamment sèches (maïs notamment) ;
- sur le pain (ils sont connus au Canada sous le nom de « moisissure noire du pain » ou « moisissure chevelue ») ;
- sur les produits laitiers (accident illustré par le fameux « poil de chat » des fromages).



Figure 1. Mucorale sur une tomate

(source : <https://www.flickr.com/photos/bjacques/2229870014/in/photostream/>)

Le caractère aérien de leur sporulation pose problème autant en phytopathologie qu'en pathologie humaine, puisque ces spores peuvent coloniser les environnements médicaux, depuis les surfaces de laboratoires jusqu'aux matériels de soin ou aux dispositifs médicaux. On peut aussi simplement les retrouver en suspension dans l'air et quelques centaines de spores suffisent à coloniser un milieu. Ceci en fait autant des contaminants fréquents des laboratoires de biologie médicale que des agents d'infections nosocomiales (2).

Leur capacité à disséminer dans l'environnement s'illustre par leur morphologie particulière, schématisée sur la **figure 2**. Au cours de la reproduction asexuée, une ou plusieurs sporocystospores sont produites dans des sporocystes, structures fermées en forme de poche éclatant pour libérer leur contenu. Ne restent ensuite des sporocystes qu'un reliquat basal nommé columelle, accroché à un hyphes spécialisé, le sporocystophore, par son renflement terminal, l'apophyse. Une autre particularité anatomique permet à certains genres de Mucorales d'être particulièrement invasifs en spécialisant une partie de leur mycélium en rhizoïdes. Cette structure ancre le champignon à son substrat, tout en assurant la communication par l'intermédiaire de stolons.

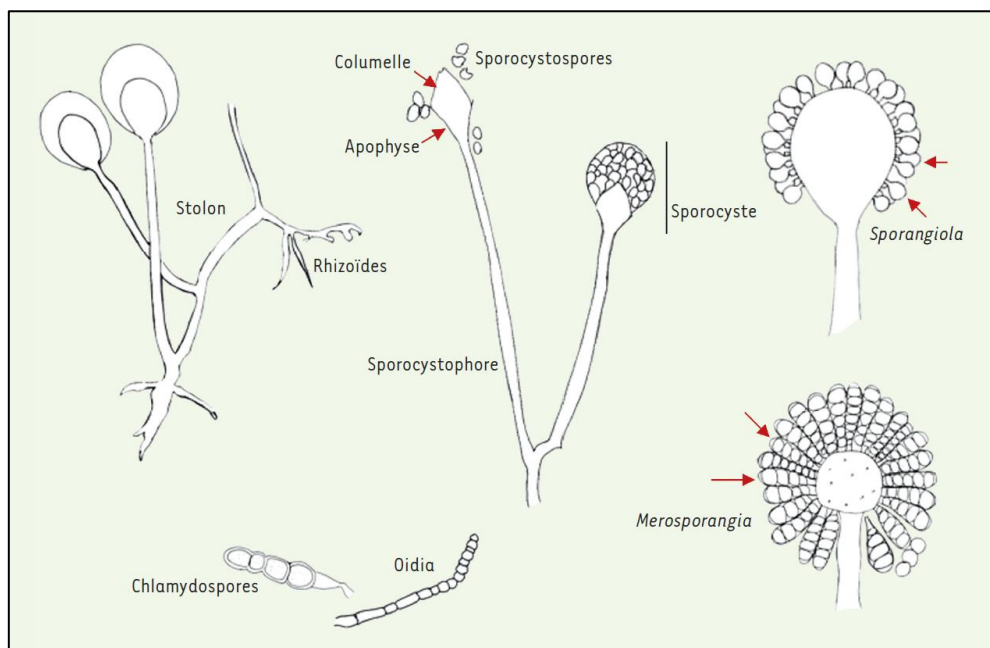


Figure 2. Structures morphologiques des Mucorales, d'après Garcia-Hermoso (1)

Ainsi, nous retrouvons dans cet ordre de nombreux genres dont certains peuvent être pathogènes pour l'homme, à l'image de *Rhizopus*, *Lichtheimia*, *Rhizomucor*, *Cunninghamella*, *Mucor*, *Saksenaea*, *Cokeromyces*, *Apophysomyces* et *Syncephalastrum*. 92% des infections humaines sont causées par les 4 premiers genres (49%, 29%, 7% et 7%, respectivement) (3).

1.2. Physiologie des espèces infectantes : interaction hôte-pathogène

En pathologie humaine, ces champignons sont connus pour leur caractère angio-invasif pouvant entraîner des atteintes extrêmement graves et délabrantes. Chez *Rhizopus oryzae*, l'hyperglycémie ainsi que les concentrations élevées en fer sérique sont des facteurs identifiés comme favorisant l'invasion des tissus épithéliaux (15). Ils induisent en effet l'expression d'une protéine chaperonne, la glucose-regulated protein (GRP78), un récepteur endothélial particulièrement présent au niveau cérébral, pulmonaire et sinusal, qui permet l'adhérence de *R. oryzae* via la protéine de surface Coth. L'augmentation de la synthèse de GRP78 est associée à une augmentation de la virulence du champignon sur les cellules endothéliales de l'hôte (12).

Ces conditions, qui sont réunies lors des acidocétoses diabétiques, peuvent aussi se rencontrer individuellement et favoriser les mucormycoses. La surcharge glycémique du diabète entraîne de nombreux dysfonctionnements du système immunitaire. Entre glycation des protéines, diminution du chimiotactisme, stress du réticulum endoplasmique, stress oxydatif, production de cytokines pro-inflammatoires et polarisation immunitaire vers un profil Th1 qui auto-entretient ces altérations, de nombreux facteurs entravent le fonctionnement de la lutte contre les agents infectieux, notamment de la phagocytose. L'importance de ces altérations serait corrélée à l'intensité de l'hyperglycémie, expliquant pourquoi les hyperglycémies aiguës ou les déséquilibres chroniques sont associés à un risque plus élevé. La microangiopathie provoquée par le diabète pourrait également jouer un rôle dans la diffusion des Mucorales et le développement de lésions nécrotiques (16–18).

Quant à elle, la surcharge en fer relative lors d'une chélation par déféroxamine (notamment chez les patients dialysés) crée des complexes ferrioxamines normalement éliminés par les fèces et les urines, mais mobilisables par les Mucorales. Ces complexes induisent l'expression de récepteurs à la surface de ces champignons, Fob1 et Fob2, permettant leur fixation aux cellules fongiques. Par la suite, le fer complexé est absorbé via la perméase FTR1 (transporteur de haute affinité du fer ferrique), augmentant ainsi la virulence du champignon (19,20). L'hypersidérémie peut également être consécutive à une rhabdomyolyse importante, notamment dans le cas des traumatismes relatifs à des catastrophes naturelles (21).

Différentes voies d'infections ont été décrites, telles que l'inhalation de spores, l'inoculation cutanée à la suite d'une brûlure ou d'un traumatisme, le contact entre un dispositif non stérile (abaisse-langue en bois) et les muqueuses, l'ingestion d'aliments ou de médicaments contaminés, ainsi que l'inoculation intraveineuse via un dispositif médical ou chez des patients toxicomanes (22). Si la germination des spores n'est pas suffisamment contenue par le

système immunitaire, le caractère angio-invasif de ces champignons pourra alors s'exprimer. On observe ainsi une dissémination vasculaire, la formation de thromboses et de nécroses tissulaires de mauvais pronostic. Ces infarctissements peuvent diminuer la diffusion tissulaire des molécules antifongiques au niveau du site d'infection (23).

Le développement de l'infection, conséquence d'une rupture d'équilibre entre l'hôte et l'agent pathogène, est influencé par certains facteurs de virulence du champignon, mais aussi et surtout par différents facteurs d'hôte (déficit immunitaire et/ou d'organe) qui seront détaillés ci-dessous.

1.3. Epidémiologie

Les mucormycoses sont des infections fongiques opportunistes touchant préférentiellement les hommes, avec une médiane de 59 ans (24). Les terrains sur lesquels surviennent habituellement ces infections sont les suivants :

- hémopathies malignes ;
 - o hémopathies avec greffe de cellules souches hématopoïétiques (CSH),
 - o hémopathies avec neutropénie sans greffe de CSH,
 - o hémopathies sans aucune des précédentes conditions ;
- transplantations d'organes solides ;
- infection à VIH ;
- tumeurs solides ;
- maladies inflammatoires (maladie de Crohn, sarcoïdose, polyarthrite rhumatoïde, lupus érythémateux disséminé,...) ;
- diabète (type 1 ou 2) ;
- affections respiratoires chroniques (bronchopneumopathie chronique obstructive, asthme sévère, mucoviscidose,...) ;

- insuffisance rénale chronique et aiguë, obésité morbide, cirrhose et pancréatite ;
- brûlures sévères.

Ces données ont été collectées et analysées par le RESeau de Surveillance des Infections Fongiques (RESSIF). Ainsi, parmi les 348 cas de mucormycoses recensés en France entre 2012 et 2019, 71,5% survenaient chez des patients présentant une immunodépression (63,2% pour les hémopathies malignes et 8,3% pour les transplantés d'organes solides). Les autres populations à risque, les grands traumatisés et grands brûlés ainsi que les diabétiques, représentaient 19,3% des mucormycoses signalées (respectivement 11,8% et 7,5%) (24).

Bien que rares, puisqu'elles ne touchent que 79 patients par an en France contre 1185 pour les aspergilloses pulmonaires invasives (API) (25), les mucormycoses représentent la deuxième cause d'IFI à champignon filamenteux dans la population de patients ayant une hémopathie maligne ou recevant une transplantation d'organe solide. L'augmentation de la population à risque de développer une IFI au cours des dernières décennies, liée essentiellement à l'intensification des thérapeutiques, est responsable d'un accroissement de l'incidence des mucormycoses. Ces infections sont devenues une préoccupation importante dans les services de soins, plus particulièrement en onco-hématologie (26). On retrouve ainsi une incidence de 0,12/100.000 habitants en 2010, contre 0,07/100.000 en 2001 en France. Ceci représente une augmentation de 7,3% par an entre 2001 et 2010 dans la population générale. Il s'agit de la deuxième plus grosse augmentation d'incidence parmi les IFI, derrière les candidémies (6). L'augmentation est encore plus marquée pour les patients atteints d'hémopathie maligne, puisque l'incidence a augmenté de +24% par an entre 1997 et 2006 (27). Ces données épidémiologiques sont restées stables jusqu'en 2014 (25) et sont comparables avec celles d'autres études européennes ou nord-américaines (28). Cette

augmentation d'incidence doit toutefois être nuancée par l'amélioration des outils diagnostiques, avec notamment l'introduction de la PCR au cours de la dernière décennie.

1.4. Aspects cliniques

Ces IFI présentent des similitudes avec les API dans leur expression clinique et radiologique. On reconnaît en effet un socle physiopathologique commun caractérisé par une rapidité d'installation de l'infection, un tropisme pulmonaire et vasculaire marqué, une diffusion fréquente des lésions et une gravité clinique. Ces atteintes sont traditionnellement distinguées en cinq formes cliniques en fonction de leur localisation : rhino-orbito-cérébrale, pulmonaire, cutanée, gastro-intestinale et disséminée.

1.4.1. Formes cliniques

1.4.1.1. Forme rhino-orbitale primitive

C'est la forme la plus courante chez les patients présentant comme facteur de risque principal un diabète non contrôlé. Elle représente en moyenne 65% des cas de mucormycoses chez les patients diabétiques (3,4) et près de 27% des cas totaux de mucormycoses déclarés en Europe (29). Dans ce tableau clinique est surreprésenté le genre *Rhizopus*, dont nous avons déjà évoqué l'appétence vis-à-vis des hyperglycémies (15).

Cette atteinte survient habituellement sur une porte d'entrée oto-rhino-laryngologique (ORL), notamment nasale. Le champignon se développe tant dans les cavités naso-sinusiennes que dans les tissus, en raison de son caractère nécrosant. Outre des signes d'infection générale comme de la fièvre ou de l'asthénie, les symptômes suivants sont fréquemment associés :

- douleurs du massif rhino-facial ;
- sensation d'obstruction nasale ;
- sécrétions nasales purulentes, voire hémorragiques ;

- exophtalmie ;
- atteintes des nerfs crâniens (nerf facial, oculomoteur ou trijumeau) ;
- troubles de la vision (thrombose rétinienne).

Ces infections peuvent donner lieu à des complications sévères à la morbi-mortalité importante comme une cellulite gangréneuse de la face ou des nécroses du palais, de la cloison nasale, des os périorbitaires ou des sinus (**figure 3**).

La dangerosité de cette forme réside dans la proximité du site d'infection avec le système nerveux central et la multiplication rapide du champignon, associée au caractère angio-invasif responsable de nécroses. Les Mucorales sont ainsi capables de s'étendre le long des trajets nerveux pour atteindre de nouveaux territoires (30). Une fois ce compartiment infecté, des signes neurologiques focaux, des convulsions, des troubles de la conscience ainsi que des thromboses viennent renforcer la morbidité et augmenter la mortalité. C'est pour cette raison que la dénomination de forme rhino-cérébrale ou rhino-orbito-cérébrale est souvent employée.



Figure 3. Atteinte orbitaire avec extension faciale de la nécrose, observée au sixième jour d'hospitalisation (1) et IRM en T₂ montrant une exophtalmie avec infiltrat des muscles orbitaires et comblement partiel des cellules ethmoïdales sans extension cérébrale (2), d'après Chaari *et al.* (31)

1.4.1.2. Forme pulmonaire primitive

Il s'agit de la forme la plus fréquente de mucormycose en France et en Europe, avec 30% des cas recensés (29). On la retrouve majoritairement chez les patients hospitalisés en hématologie. Entre 60 et 79% de ces patients présentent ainsi cette atteinte lorsqu'ils sont infectés. Cela peut être expliqué par le déficit immunitaire important de ces patients, souvent neutropéniques, voire en aplasie au cours des conditionnements pour les greffes de CSH. Comme dans la prévention de l'API (mesures de contrôle de l'air et des surfaces), une attention toute particulière doit être portée chez ces patients pour limiter au maximum l'inhalation de spores fongiques.

L'infection débute classiquement par une fièvre ne répondant pas à un traitement antibiotique probabiliste à large spectre. Viennent ensuite, de manière aiguë voire fulminante, les symptômes pulmonaires et/ou pleuraux suivants :

- toux plus ou moins sèche ;
- dyspnée ;
- expectorations ;
- hémoptysie ;
- douleur pleurale.

En l'absence de traitement spécifique, l'évolution se fait inexorablement vers l'aggravation avec hypertension artérielle pulmonaire et thromboses pulmonaires, ou vers la dissémination (32). Comme dans la forme rhino-faciale, des atteintes cérébrales peuvent être observées.

1.4.1.3. Forme cutanée primitive

Cette atteinte est habituellement secondaire à une dissémination hématogène, mais des formes cutanées primitives chez des patients immunocompétents sont décrites, survenant dans certaines circonstances propices à l'installation du champignon telles qu'une effraction

cutanée importante avec souillure tellurique, à la suite de traumatismes pénétrants ou multiples, de brûlures profondes ou de morsures. Quelques cas groupés ont ainsi été rapportés, en lien avec des catastrophes naturelles : 8 cas après l'éruption du volcan Nevado del Ruiz de 1985 en Colombie, deux lors du tsunami de 2004 dans l'océan Indien et 13 cas suite à la tornade de 2011 à Joplin, dans le Missouri (21). On retrouve également cette atteinte lors de l'administration de drogue par voie intra-veineuse. Un certain nombre de ces formes primitives sont par ailleurs rattachées à des infections nosocomiales, par exemple lors de l'apposition d'un pansement occlusif sur une plaie opératoire, de la pose d'une stomie ou d'un cathéter contaminé (2). Au total, ces atteintes cutanées représentent entre 20 et 26% des mucormycoses (29).

Dans tous les cas, l'infection est associée à une inflammation importante, puis à une nécrose extensive des tissus autour de la plaie (**figure 4**). La gravité de ces formes dépend de la localisation, déterminant l'importance des séquelles après traitement. La face et le tronc sont donc des sites particulièrement sensibles. La morbi-mortalité augmente nettement si le patient est immunodéprimé, en raison du risque de diffusion sous-cutanée et d'extension en profondeur du champignon.



Figure 4. Mucormycose cutanée avec nécrose du membre supérieur gauche, d'après Carton *et al.* (33)

1.4.1.4. Forme gastro-intestinale primitive

C'est l'atteinte la moins documentée, ne représentant pas plus de 10% des mucormycoses référencées dans la littérature, dont plus de 50% sont décrites en Asie, le plus souvent lors d'un diagnostic post-mortem. La forme gastro-intestinale peut toucher tout le tube digestif, de l'œsophage jusqu'au colon, ce dernier étant la localisation la plus fréquente. L'alimentation représente la source de contamination principale, mais un terrain favorisant (fragilité de la muqueuse intestinale) est constamment associé :

- ulcère ;
- cancer ;
- malnutrition ;
- maladies inflammatoires ;
- maladie du greffon contre l'hôte (GvHD) post-transplantation ;
- prématurité ;
- déficit immunitaire ;
- antécédent d'antibiothérapie à large spectre ou de nutrition parentérale.

Les symptômes rencontrés sont dominés par la fièvre, les douleurs et dilatations abdominales, les troubles du transit ainsi que les saignements digestifs (hématémèse ou méléna). La nécrose étant aussi très extensive, le risque de perforation digestive conditionne le pronostic de cette atteinte (34).

1.4.1.5. Forme disséminée

Majoritairement secondaire à une forme pulmonaire, la dissémination peut faire suite à chacune des précédentes atteintes, voire survenir d'emblée. Représentant entre 15 et 18% des mucormycoses observées en France (3,4,29), cette forme se développe près de quatre fois plus souvent dans le cadre d'une immunodépression, que celle-ci soit secondaire à une

hémopathie ou à une transplantation d'organe (5). C'est la forme de mucormycose associée à la mortalité la plus élevée et son diagnostic clinique est particulièrement difficile du fait du polymorphisme des symptômes. En dehors d'une fièvre persistante sous traitement anti-infectieux non adapté, aucun signe n'est constant, puisque tous les organes peuvent être touchés (**figure 5**). Le cerveau, la rate, les reins, le cœur, le foie, la peau et le tube digestif sont les sites les plus souvent atteints secondairement.

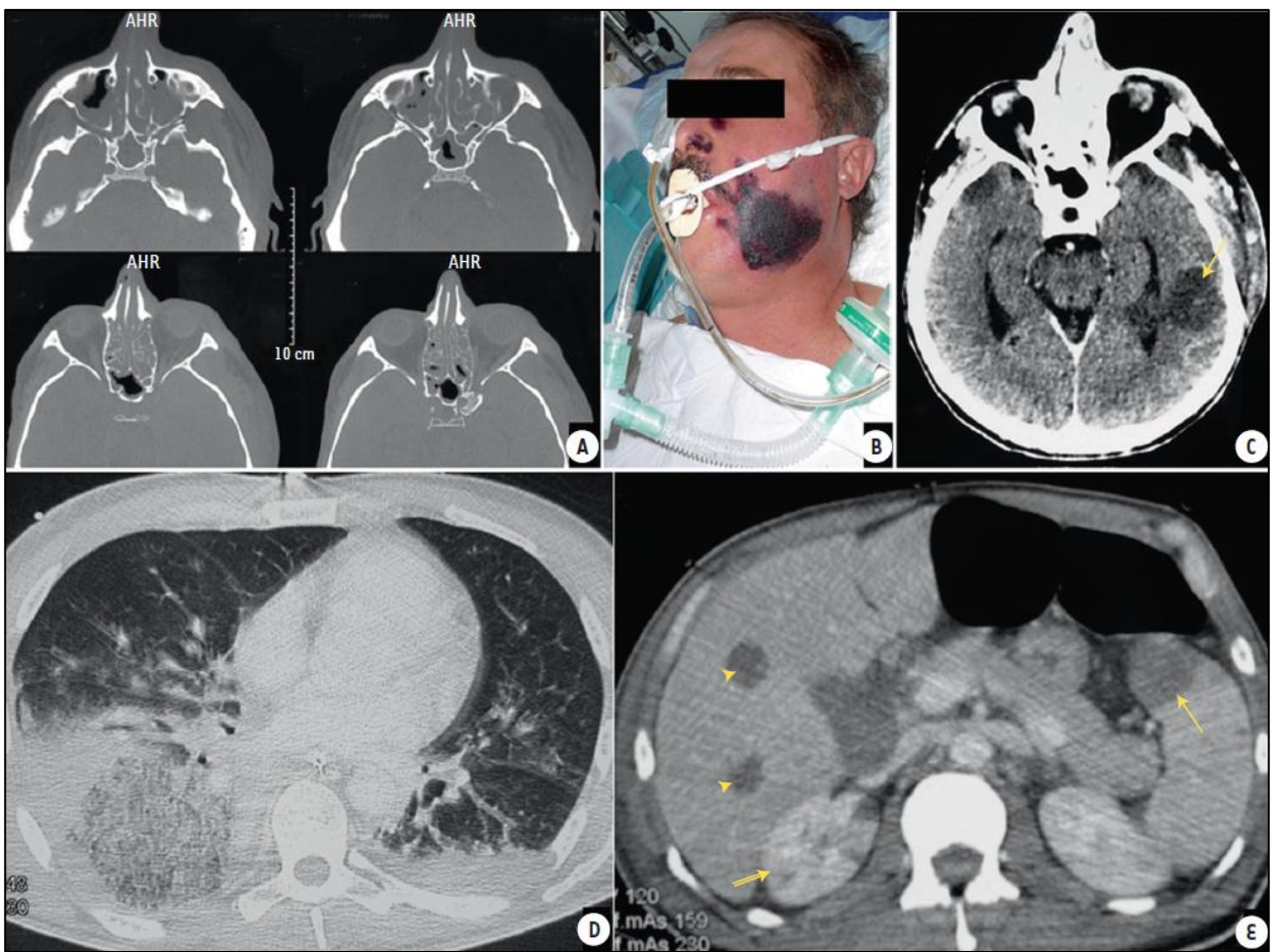


Figure 5. Mucormycose disséminée. Lésions présentes chez un même patient : atteinte primitive au niveau des sinus maxillaires, sphénoïdaux et ethmoïdaux (A) s'étendant par contiguïté vers la face et la région sous-palpébrale gauche (B) et disséminant par voie hématogène au cerveau (hypodensité temporale gauche, cf. flèche) (C), au poumon (D) ainsi qu'au foie (têtes de flèche), à la rate (flèche) et au rein droit (double flèche) (E), d'après Herbrecht *et al.* (35)

1.5. Cas particuliers

1.5.1. Pays en développement

On observe dans les pays en développement comme l'Inde ou le Mexique une prévalence accrue des formes rhino-orbitales avec extension cérébrale, en majorité dues au genre *Rhizopus*. Ceci est à opposer à l'équilibre de prévalence entre les différentes atteintes dans les pays dits développés, avec notamment l'importance des formes pulmonaires et disséminées (7,36,37).

Cette différence de prévalence peut s'expliquer d'abord par la part importante de la population touchée par le diabète et un contrôle de la maladie moins optimal. Ensuite, les situations d'immunodépression profonde, telles qu'on les rencontre en Europe ou sur le continent nord-américain, favorisant plutôt les atteintes pulmonaires et disséminées, sont beaucoup moins fréquentes dans les pays à faibles ressources (dans lesquels seule une minorité de patients peut avoir accès aux transplantations d'organes ou aux greffes de CSH). C'est un point important, appuyant la nécessité d'une adaptation de la stratégie à adopter face aux mucormycoses en fonction de l'origine géographique du patient.

1.5.2. COVID-19

L'infection par le 2019-nCoV, virus responsable de la pandémie de COVID-19, a été responsable d'une augmentation importante de l'incidence des mucormycoses dans certains pays comme l'Inde. Pour les patients hospitalisés et oxygéo-requérants, un des premiers traitements symptomatiques pour les formes graves de cette nouvelle maladie consiste en l'utilisation de posologies élevées de dexaméthasone intra-veineuse. L'utilisation prolongée des corticoïdes à forte dose est associée à une immunomodulation, un effet recherché dans le cadre particulier de cette indication. Cependant, cette immunodépression relative crée des

conditions favorables à l'émergence de pathogènes opportunistes, y compris les Mucorales. Une autre particularité notable de cette thérapeutique réside en un effet secondaire également connu dans l'utilisation des corticoïdes, à savoir leur action sur le métabolisme du glucose et le déséquilibre ou le déclenchement du diabète (8). Ceci est d'autant plus important que les patients des pays en développement présentent rarement un bon équilibre de leur diabète. Un nombre très important de mucormycoses a donc été observé dans ces pays fortement touchés par l'épidémie de SARS-CoV2. Ainsi, en Inde, des centres spécialisés pour traiter la « maladie à champignon noir » ont été mis en place, afin de prendre en charge des dizaines de milliers de patients atteints lors de la seconde vague de COVID-19 (38,39).

1.6. Pronostic et mortalité

Comme celui des autres IFI, le pronostic associé aux mucormycoses est souvent réservé et dépend de nombreux facteurs. La mortalité dépend essentiellement du terrain sur lequel se développe la maladie, les patients d'onco-hématologie ou transplantés d'organes étant les plus fragiles. Les mucormycoses disséminées, particulièrement présentes dans cette population, sont associées à une mortalité pouvant dépasser les 90% dans certaines séries européennes (29). Ces patients reçoivent parfois du voriconazole en traitement curatif ou probabiliste d'une API. Or, les Mucorales présentant une sensibilité variable à cet antifongique, le risque de développer une mucormycose est augmenté en conséquence. Le pronostic varie évidemment en fonction des organes atteints. Ainsi, le taux de survie des formes rhino-orbitales chez les patients diabétiques peut atteindre 95% lorsque celles-ci sont prises en charge de manière précoce et adaptée (37).

La précocité de mise en route du traitement adapté représente, comme pour les API, le facteur pronostic majeur. Une mucormycose prise en charge tardivement et non traitée correctement présente un taux de survie inférieur à 5%, alors que sous traitement antifongique adapté, ce

taux passe à 61% et sous chirurgie seule, à 57%. Avec un traitement associant, lorsque c'est possible, antifongiques et chirurgie précoce, la survie monte alors à 70% (4). Une étude de Chamilos *et al.* suggère même qu'un retard de 6 jours ou plus dans l'instauration du traitement double presque la mortalité à 12 semaines par rapport à un traitement précoce (82,9% vs. 48,6%) (40). Il est également important de noter la recommandation d'instaurer un traitement spécifique, plutôt qu'un traitement probabiliste à large spectre.

Enfin, certaines Mucorales sont, de par leur caractère angio-invasif et nécrosant important, associées à certaines formes cliniques et à un moins bon pronostic. C'est notamment le cas des *Cunninghamella* spp., bien plus rarement isolés que les *Rhizopus* spp. et les *Lichtheimia* spp., mais souvent responsables de mucormycoses pulmonaires ou disséminées et dont le pronostic est plus sombre (4,5).

1.7. Comparaison avec l'aspergillose pulmonaire invasive

Comme nous l'avons déjà évoqué, les mucormycoses partagent un continuum clinico-radiologique avec les API. Un des points communs des plus importants et impactant significativement la prise en charge des patients est celui des facteurs de risque. On retrouve les deux entités essentiellement chez les patients immunodéprimés, hospitalisés en onco-hématologie ou transplantés d'organes. Il apparaît donc difficile de distinguer les deux infections selon des critères purement épidémiologiques.

Certaines différences peuvent toutefois être notifiées, davantage statistiques que réellement discriminantes. Ainsi, les mucormycoses se retrouvent plus souvent chez les enfants ou les adolescents, chez les patients après une GvHD ou chez ceux présentant des neutropénies ou des lymphopénies plus profondes et plus longues que pour l'API. On reconnaît d'ailleurs moins de formes pulmonaires dans les mucormycoses par rapport aux aspergilloses et les atteintes

d'organes sont parfois plus caractéristiques (formes rhino-orbito-cérébrale et cutanée notamment). Les infections à Mucorales sont souvent disséminées chez les patients les plus à risque, avec une clinique souvent plus bruyante (douleurs et hémoptysies), ainsi que des lésions scanographiques plus importantes et un signe du halo (inversé ou non) plus fréquent que dans l'API (41).

Les pronostics et les taux de mortalité de ces deux entités pathologiques semblent comparables, du fait de l'importante variabilité des séries et de l'importance des atteintes d'organes dans chacune de ces IFI. Dans les mucormycoses comme dans les API, nous retrouvons des taux de létalité allant de 5% à 100% en fonction de l'atteinte, du terrain, de la rapidité de diagnostic et de la rapidité de mise en route du traitement.

1.8. Coût économique

Les mucormycoses, en plus de leur morbi-mortalité importante, sont associées à un coût économique non négligeable pour l'équilibre du système de soins. Il existe actuellement peu de données, mais certaines équipes nord-américaines ou allemandes se sont penchées sur la question. Ainsi, on observe que le premier poste de dépenses concernant les mucormycoses invasives est la durée d'hospitalisation, très longue par rapport à d'autres pathologies contrôles (entre +10,6 à +26,5 jours en fonction des séries). S'ajoute à cela le prix des traitements directs, dont les posologies médicamenteuses peuvent varier en fonction du terrain, mais qui sont évalués à 22 816 € par patient en Allemagne. Le coût des soins totaux est ainsi évalué à environ 53 261 € par patient, soit un surcoût d'environ 32 991 € par séjour et par patient, par rapport à d'autres patients présentant les mêmes terrains (42). Aux Etats-Unis, le coût total moyen par séjour par patient est évalué à 112 419 \$ et le coût moyen par jour à 4 096 \$. Sachant que le taux de réadmission est évalué à 30 et 37% après 1 et 3 mois respectivement (28), le coût total de la prise en charge d'une mucormycose peut donc être très élevé.

Ces données ne prennent cependant pas en compte les coûts indirects des mucormycoses comme l'impact des séquelles psychologiques, esthétiques ou sociales. Ne sont également pas intégrés dans ces données le coût des décès pour la société et la perte de matériel biologique précieux, comme les greffes de moelle osseuse ou les organes transplantés chez ces patients décédés. On imagine alors que le coût global des mucormycoses soit extrêmement important et justifie un certain nombre d'investissements. Des études médico-économiques sont en tout cas tout à fait justifiées pour évaluer le gain économique apporté par de nouvelles stratégies de prise en charge diagnostique et/ou thérapeutique.

1.9. Modalités du diagnostic

1.9.1. Diagnostic conventionnel

Les critères cliniques, déjà évoqués précédemment, sont relativement pauvres et peu spécifiques. Même si leur association ou leur spécificité d'organe peut orienter, ils ne permettent pas à eux seuls d'établir un diagnostic de certitude.

Parmi les examens complémentaires, les techniques d'imagerie peuvent orienter vers une IFI. La tomodensitométrie (scanner) haute-résolution représente ainsi un pilier du diagnostic, comme dans l'API, sans toutefois pouvoir formellement trancher entre les deux. On retrouve ainsi des signes d'orientation en fonction de l'organe atteint.

- **Forme pulmonaire** : des condensations ou plages d'atélectasies peuvent s'observer, comme des nodules présentant ou non le signe du halo (atténuation croissante de la densité du centre vers la périphérie). Le signe du halo inversé (atténuation décroissante de la densité du centre vers la périphérie) serait plus spécifique des mucormycoses, mais inconstant. On peut retrouver, plus tard dans l'infection, un signe du croissant gazeux accompagnant une excavation (**figure 6**), un épanchement pleural et une extension rachidienne ou thoracique.

- **Forme rhino-orbitale** : la radiographie est parfois utilisée pour mettre en évidence le comblement des sinus de la face. Au scanner, on peut observer avec plus de précision l'extension osseuse et tissulaire de la mucormycose vers la bouche, les yeux ou le cerveau. On peut également visualiser une thrombose du sinus caverneux ou un abcès. Les atteintes vasculaire et cérébrale peuvent être précisées par l'utilisation de l'IRM, parfois plus précoce et permettant d'identifier une trajectoire d'extension (30).
- **Forme gastro-intestinale** : le scanner ou l'IRM peuvent mettre en évidence des plages de condensation de la muqueuse, des dilations intestinales ou encore des saignements digestifs. La meilleure modalité reste toutefois l'endoscopie digestive, permettant par ailleurs de réaliser des prélèvements.

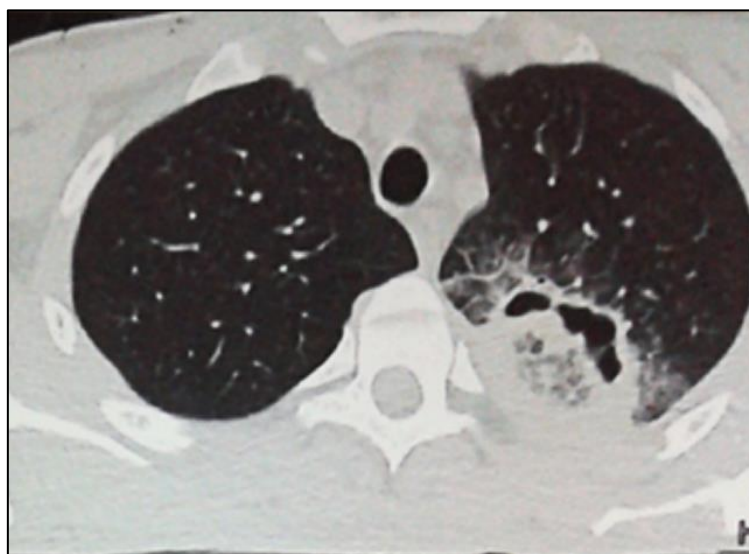


Figure 6. Signe du croissant gazeux et du halo inversé dans une mucormycose pulmonaire, d'après Klimko *et al.*(41)

Les techniques de mycologie médicale ou d'anatomopathologie viendront confirmer le diagnostic après l'orientation clinico-radiologique, en mettant en évidence le champignon au sein des tissus. L'étape de recueil est assez délicate et difficile, puisque les Mucorales sont présentes de manière ubiquitaire dans notre environnement et que leur présence n'est pas toujours synonyme d'infection. Il est donc préférable de réaliser des prélèvements profonds,

bien que l'état des patients ne le permette pas toujours. Les modalités de recueil du matériel biologique varient en fonction du site concerné :

- **forme pulmonaire** : LBA d'intérêt et de rentabilité supérieurs à l'expectoration. La biopsie transpariétale représente la modalité la plus intéressante ;
- **forme ORL** : biopsie de lésion (nez ou sinus) ou reliquat du débridement chirurgical ;
- **forme neurologique** : biopsie de lésion ou matériel de débridement chirurgical ;
- **forme cutanée** : biopsie en périphérie de lésion ;
- **forme digestive** : culture des selles de faible rentabilité. La biopsie sous endoscopie présente un meilleur intérêt.

Une fois le matériel recueilli, il peut être pris en charge par les laboratoires d'anatomopathologie et de mycologie médicale. Dans les deux cas, il s'agit de mettre en évidence, à l'examen histologique ou direct, les filaments mycéliens caractéristiques de ces champignons :

- hyalins ;
- larges (5 à 20 μm) ;
- à contours irréguliers ;
- à paroi fine
- rubanés ;
- peu ou pas septés ;
- à ramifications majoritairement à angle droit.

La sensibilité de ce premier examen peut être améliorée, au laboratoire de mycologie médicale, par l'utilisation de fluorochromes comme le calcofluor white, ou par l'imprégnation argentique d'après Gomori-Grocott, utilisée au CHU d'Angers. Ceci permet de mettre en évidence les structures mycéliennes, même en cas de faible charge fongique, tout en différenciant habituellement le type de champignon incriminé (**figure 7**).

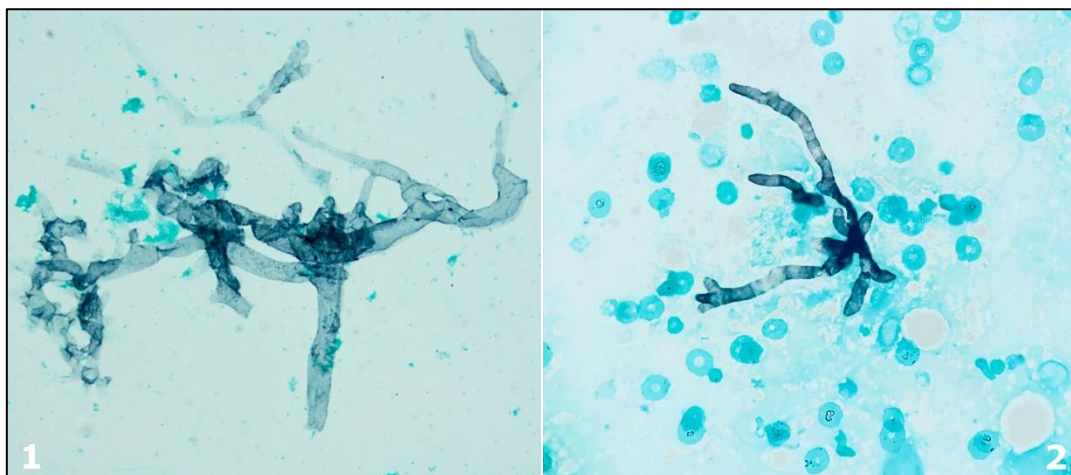


Figure 7. Examen direct (imprégnation argentique de Gomori-Grocott) mettant en évidence des filaments mycéliens de type Mucorale (1) ou de type aspergillaire (2)

Au laboratoire d'anatomopathologie, l'examen est réalisé grâce à des colorations spécifiques ou non : Gomori-Grocott, PAS (periodic acid Schiff) ou HES (hématoxyline-éosine), illustrées dans la **figure 8**.

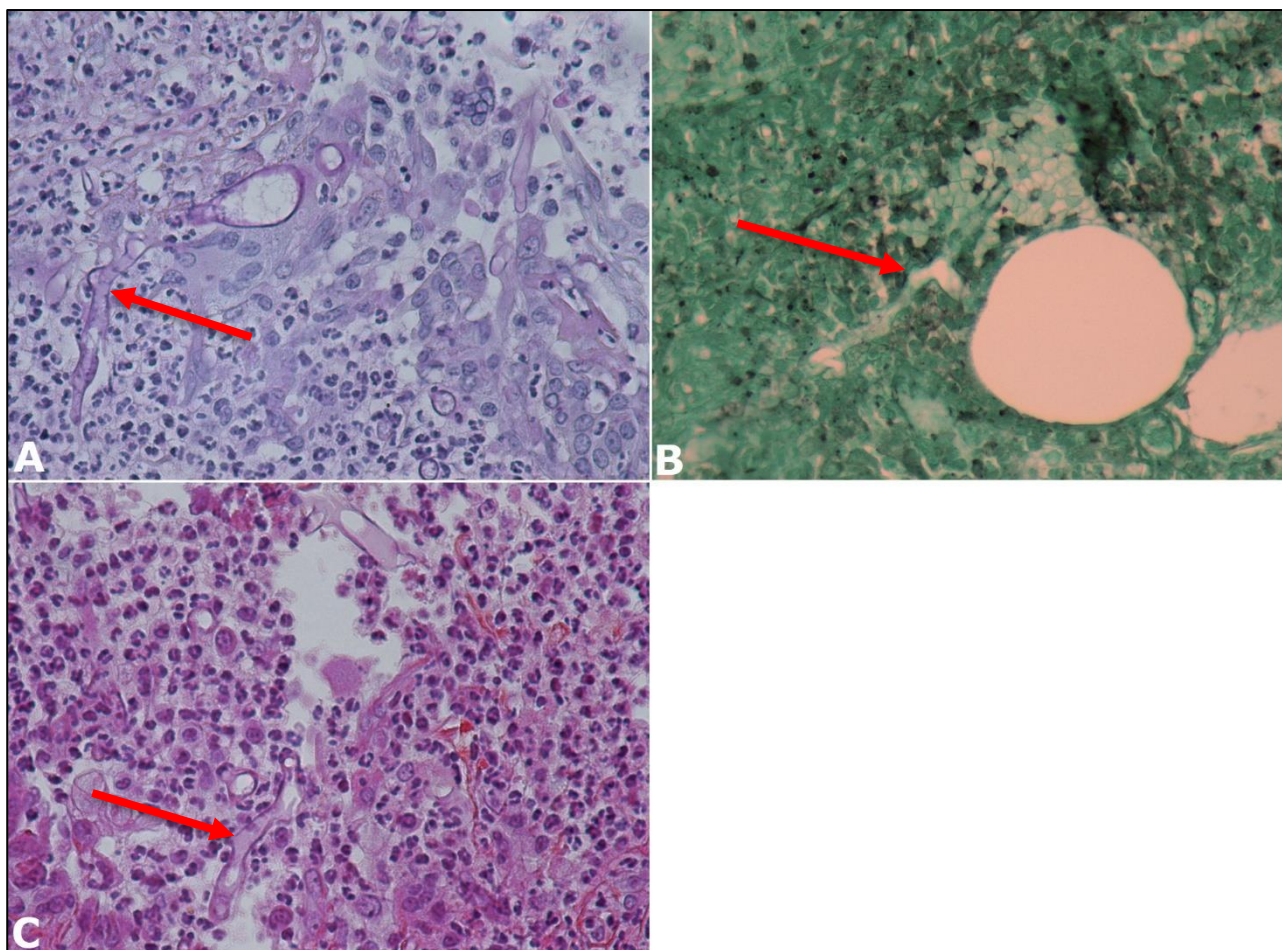


Figure 8. Préparations histopathologiques montrant des filaments mycéliens de type Mucorale. A : HES, x100 ; B : Gomori-Grocott, x100 ; C : PAS, x100, d'après Carton *et al.* (33)

L'examen direct constitue la première partie du diagnostic mycologique ; la seconde étape, plus longue, consiste en la réalisation de cultures afin d'isoler le champignon puis de l'identifier. Celles-ci sont réalisées sur milieu de Sabouraud, incubé à 37°C pendant une durée minimale de deux semaines. Il n'est pas recommandé d'utiliser des milieux additionnés de cycloheximide (Actidione®), car les Mucorales sont habituellement inhibées au contact de cet antifongique, même à faible concentration. Par ailleurs, dans le cas d'un échantillon solide (biopsie), celui-ci sera plus volontiers déposé ou émincé, mais ne devrait pas faire l'objet d'un broyage, trop violent pour les cellules de Mucorales. La croissance de ces champignons étant souvent importante et aérienne (**figure 9**), l'utilisation de boîtes de Petri peut être préférée aux tubes gélosés.



Figure 9. Culture de Mucorale sur gélose de Sabouraud (CHU d'Angers)

Ces cultures permettront d'obtenir du matériel nécessaire à l'identification, qui est habituellement réalisée à partir de critères morphologiques (aspects macro- et microscopiques, voir **Annexe 1**) ou, dans certains laboratoires, par spectrométrie de masse de type MALDI-TOF. Un séquençage de l'ADN du champignon isolé peut parfois venir compléter ces analyses, afin d'identifier précisément l'espèce en cause.

Il n'existe malheureusement pas encore de biomarqueurs biologiques (spécifiques ou non) disponibles permettant d'aider au diagnostic des infections à Mucorales, comme cela peut être le cas dans l'API ou la pneumocystose. En l'absence de synthèse significative de β -glucanes par les Mucorales, la détection de l'antigène β -D-glucane dans le sérum ne peut être contributive au diagnostic de mucormycose.

Ainsi, toutes ces modalités se retrouvent dans les critères diagnostiques proposés par l'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), initialement à visée épidémiologique, permettant de classer la probabilité d'IFI en prouvée (**figure 10**), probable (**figure 11**) ou possible à partir de critères cliniques, radiologiques, biologiques et histologiques.

| Fungus | Microscopic Analysis: Sterile Material | Culture: Sterile Material | Blood | Serology | Tissue Nucleic Acid Diagnosis |
|---|--|---|---|----------------|--|
| Molds ^a | Histopathologic, cytopathologic, or direct microscopic examination ^b of a specimen obtained by needle aspiration or biopsy in which hyphae or melanized yeast-like forms are seen accompanied by evidence of associated tissue damage | Recovery of a hyaline or pigmented mold by culture of a specimen obtained by a sterile procedure from a normally sterile and clinically or radiologically abnormal site consistent with an infectious disease process, excluding BAL fluid, a paranasal or mastoid sinus cavity specimen, and urine | Blood culture that yields a mold ^c (eg, <i>Fusarium</i> species) in the context of a compatible infectious disease process | Not applicable | Amplification of fungal DNA by PCR combined with DNA sequencing when molds are seen in formalin-fixed paraffin-embedded tissue |
| Abbreviations: BAL, bronchoalveolar lavage; PCR, polymerase chain reaction. ^a If culture is available, append the identification at the genus or species level from the culture results. ^b Tissue and cells submitted for histopathologic or cytopathologic studies should be stained using Grocott-Gomori methenamine silver stain or periodic acid Schiff stain to facilitate inspection of fungal structures. Whenever possible, wet mounts of specimens from foci related to invasive fungal disease should be stained with a fluorescent dye (eg, calcofluor or blankophor). ^c Recovery of <i>Aspergillus</i> species from blood cultures rarely indicates endovascular disease and almost always represents contamination. ^d <i>Trichosporon</i> and yeast-like <i>Geotrichum</i> species and <i>Blastoschizomyces capitatus</i> may also form pseudohyphae or true hyphae. | | | | | |

Figure 10. Critères diagnostiques définis pour une IFI prouvée

| Host factors | Clinical features |
|--|---|
| Recent history of neutropenia ($<0.5 \times 10^9$ neutrophils/L [<500 neutrophils/ mm^3] for >10 days) temporally related to the onset of invasive fungal disease | <i>Pulmonary aspergillosis</i> |
| Hematologic malignancy ^a | The presence of 1 of the following 4 patterns on CT: |
| Receipt of an allogeneic stem cell transplant | Dense, well-circumscribed lesions(s) with or without a halo sign |
| Receipt of a solid organ transplant | Air crescent sign |
| Prolonged use of corticosteroids (excluding among patients with allergic bronchopulmonary aspergillosis) at a therapeutic dose of ≥ 0.3 mg/kg corticosteroids for ≥ 3 weeks in the past 60 days | Cavity |
| Treatment with other recognized T-cell immunosuppressants, such as calcineurin inhibitors, tumor necrosis factor- α blockers, lymphocyte-specific monoclonal antibodies, immunosuppressive nucleoside analogues during the past 90 days | Wedge-shaped and segmental or lobar consolidation |
| Treatment with recognized B-cell immunosuppressants, such as Bruton's tyrosine kinase inhibitors, eg, ibrutinib | <i>Other pulmonary mold diseases</i> |
| Inherited severe immunodeficiency (such as chronic granulomatous disease, STAT 3 deficiency, or severe combined immunodeficiency) | As for pulmonary aspergillosis but also including a reverse halo sign |
| Acute graft-versus-host disease grade III or IV involving the gut, lungs, or liver that is refractory to first-line treatment with steroids | <i>Tracheobronchitis</i> |
| | Tracheobronchial ulceration, nodule, pseudomembrane, plaque, or eschar seen on bronchoscopic analysis |
| | <i>Sino-nasal diseases</i> |
| | Acute localized pain (including pain radiating to the eye) |
| | Nasal ulcer with black eschar |
| | Extension from the paranasal sinus across bony barriers, including into the orbit |
| | <i>Central nervous system infection</i> |
| | 1 of the following 2 signs: |
| | Focal lesions on imaging |
| | Meningeal enhancement on magnetic resonance imaging or CT |
| Mycological evidence | |
| Any mold, for example, <i>Aspergillus</i> , <i>Fusarium</i> , <i>Scedosporium</i> species or Mucorales recovered by culture from sputum, BAL, bronchial brush, or aspirate | Probable invasive fungal diseases (IFD) requires the presence of at least 1 host factor, a clinical feature and mycologic evidence and is proposed for immunocompromised patients only, whereas proven IFD can apply to any patient, regardless of whether the patient is immunocompromised. Probable IFD requires the presence of a host factor, a clinical feature, and mycologic evidence. Cases that meet the criteria for a host factor and a clinical feature but for which mycological evidence has not been found are considered possible IFD. (1,3)-beta-D glucan was not considered to provide mycological evidence of any invasive mold disease. |
| Microscopical detection of fungal elements in sputum, BAL, bronchial brush, or aspirate indicating a mold | Abbreviations: BAL, bronchoalveolar lavage; CSF, cerebrospinal fluid; CT, computed tomography; PCR, polymerase chain reaction. |
| <i>Tracheobronchitis</i> | ^a Hematologic malignancy refers to active malignancy, in receipt of treatment for this malignancy, and those in remission in the recent past. These patients would comprise largely acute leukemias and lymphomas, as well as multiple myeloma, whereas patients with aplastic anemia represent a more heterogeneous group of individuals and are not included. |
| <i>Aspergillus</i> recovered by culture of BAL or bronchial brush | |
| Microscopic detection of fungal elements in BAL or bronchial brush indicating a mold | |
| <i>Sino-nasal diseases</i> | |
| Mold recovered by culture of sinus aspirate samples | |
| Microscopic detection of fungal elements in sinus aspirate samples indicating a mold | |

Figure 11. Critères diagnostiques définis pour une IFI pulmonaire probable

1.9.2. Place de la biologie moléculaire

La contribution de la biologie moléculaire au diagnostic des IFI commence au début des années 2000 et, pour les mucormycoses, aux années 2010. L'objectif premier du développement de ces méthodes était de venir compléter des modalités diagnostiques relativement peu performantes, lacunaires et souvent tardives.

Des premiers travaux pré-cliniques, menés entre 2006 et 2010, ont permis d'identifier des séquences-cibles et de mettre au point la détection d'ADN de Mucorales à partir du sérum, du LBA ou de tissus paraffinés dans différents modèles animaux (43–45). Ces travaux ont notamment mis en évidence une positivité possible de la PCR Mucorales dès le premier jour suivant l'infection.

Ces résultats préliminaires ont ensuite été confirmés en 2012 dans l'étude clinique rétrospective de Millon *et al.* (14). Des sérums de patients, pour lesquels un diagnostic de mucormycose prouvée avait été posé, ont été analysés par une PCR multiplexe comprenant trois couples d'amorces ciblant l'ADNr 18S des genres les plus fréquemment isolés de mucormycoses (*Mucor/Rhizopus*, *Lichtheimia* et *Rhizomucor*). Ces travaux ont ainsi mis en évidence les résultats suivants :

- **Précocité diagnostique** : positivité de la PCR en moyenne 10 jours [3-68] avant le diagnostic histopathologique ou mycologique par culture, et positivité dans 7 cas sur 12 au moment des premiers symptômes (fièvre principalement).
- **Sensibilité et spécificité** : absence de réaction croisée avec d'autres genres fongiques, excellente cohérence avec les identifications antérieures et seulement un patient reconnu positif pour lequel la PCR était négative.
- Possibilité de préciser le diagnostic de mucormycose avec une **simple ponction veineuse**, ce qui est particulièrement intéressant chez des patients pour lesquels un prélèvement profond n'est pas envisageable, en raison d'une hémodynamique instable, d'une cytopénie ou de troubles de la coagulation.

Une seconde étude rétrospective, multicentrique cette fois-ci et à laquelle ont participé différents correspondants du réseau RESSIF, a permis d'évaluer plus précisément les performances diagnostiques de cette PCR et d'évaluer la corrélation entre la charge fongique, le pronostic et l'efficacité thérapeutique (13). Ce travail a révélé les résultats suivants :

- **Sensibilité de 81-92%** en fonction du volume de sérum ;
 - un volume minimal de 1mL est associé à une meilleure sensibilité,
 - à noter que la sensibilité apparaît plus importante que pour la PCR *Aspergillus*.
- Ceci peut être corrélé avec un potentiel angio-invasif plus important des

Mucorales, qui se traduirait par une circulation plus élevée de l'ADN fongique chez les patients neutropéniques (46).

- **Survie à 84 jours** significativement plus élevée chez les patients négativant leur PCR après l'initiation du traitement, par rapport à ceux où elle reste positive (48% vs 4%).
- **Les coûts et la difficulté de mise en place** de cette technique sont complètement acceptables pour les laboratoires des CHU.

Ces données ont ensuite été vérifiées en conditions réelles, avec une méthodologie prospective multicentrique, dans un programme hospitalier de recherche clinique (PHRC) national qui incluait 10 CHU de 2015 à 2017. L'intégration dans un projet d'ampleur européenne du groupe de travail Fungal PCR Initiative (FPCRI) de l'International Society for Human and Animal Mycology (ISHAM) a permis de renforcer les conclusions apportées, afin de participer à l'effort de standardisation.

- **Les performances des tests de biologie moléculaire** pour le diagnostic des mucormycoses sont très satisfaisantes et reproductibles à l'échelle européenne.
- **Certaines étapes clés nécessitent un renforcement de la standardisation** : volume de prélèvement, volume d'élution, volume de mix et plateforme utilisée.
- **Ces conclusions devraient participer à l'intégration de la PCR dans les critères diagnostiques** des mucormycoses reconnus par l'EORTC/MSG, comme cela a été le cas en 2019 à la suite des résultats du groupe de travail European Aspergillus PCR Initiative (EARPCI) de l'ISHAM pour les API (11,47).

Parallèlement à l'évaluation de la PCR sérique, l'intérêt diagnostique de la PCR dans le LBA pour le diagnostic précoce des mucormycoses pulmonaires a été évalué (48), révélant :

- **Une sensibilité de 100% et une spécificité de 97%** (infections pulmonaires prouvées ou probables).

- **Des résultats positifs précoces**, précédant les signes clinico-radiologiques et les résultats biologiques ou histologiques.
- **Une cohérence avec la PCR sérique**, régulièrement positive en même temps que la PCR sur le LBA (17/24). La PCR sérique était cependant fréquemment plus précoce (15/17).

La PCR Mucorales représente donc actuellement une avancée significative pour le diagnostic des mucormycoses. Ses performances très intéressantes et le caractère peu invasif des prélèvements en font un outil de choix. Outre le gain de précocité dans le diagnostic, l'identification du champignon responsable de l'IFI permet également une meilleure compréhension de l'écologie locale et d'adapter éventuellement la prise en charge thérapeutique. Cependant, la PCR ne permet pas à l'heure actuelle de s'affranchir des techniques mycologiques conventionnelles. En effet, en l'absence de dissémination sanguine, comme cela est fréquemment observé au cours des atteintes cutanées primitives, la PCR sérique présente peu d'intérêt. Par ailleurs, les échantillons pulmonaires peuvent être contaminés par des spores de Mucorales présentes dans l'environnement. Ainsi, à l'image de la PCR aspergillose, la place de ces techniques dans l'arsenal diagnostique actuel sera probablement précisée dans les recommandations des sociétés savantes, notamment de l'EORTC/MSG. Il restera alors aux laboratoires de biologie médicale à faire leur choix entre les différents kits commerciaux proposés (Ademtech, PathoNostics, ...) qui, dans le cadre de l'accréditation, seront très probablement préférés aux kits « maison ».

1.10. Traitement

Parmi les recommandations thérapeutiques des sociétés savantes, celles formulées par l'ECIL (actuellement le 6^e rapport) sont largement suivies par les cliniciens (9). Le traitement des mucormycoses est multiple et pluridisciplinaire. Tout d'abord, un traitement médicamenteux

curatif est nécessaire pour freiner l'évolution du champignon. La molécule recommandée en première intention dans cette indication est l'amphotéricine B (polyène macrocyclique) sous forme liposomale (AMBISOME®) à forte dose, soit ≥ 5 mg/kg/jour en cas d'infection épargnant le système nerveux central et 10 mg/kg/jour si celui-ci est atteint. Le posaconazole (NOXAFIL®) peut être proposé en deuxième intention, notamment en cas d'intolérance, ou en relais *per os* (9). Parmi les autres dérivés azolés, le voriconazole (VFEND®) n'est pas recommandé en raison d'une efficacité insuffisante sur les Mucorales. L'isavuconazole (CRESEMBA®), qui possède une AMM dans le traitement probabiliste des IFI, présenterait quant à lui une certaine efficacité dans le traitement des mucormycoses. Ces résultats nécessitent cependant d'être confirmés dans de plus larges études (10,49). Il n'existe actuellement aucune recommandation d'association d'antifongiques.

La chirurgie, lorsqu'elle est possible (essentiellement dans les formes localisées), représente la deuxième composante du traitement et améliore significativement le pronostic. Dans les atteintes rhino-faciales, le rapport bénéfice/risque de la chirurgie est souvent en faveur de cette dernière, mais au prix parfois de séquelles fonctionnelles et esthétiques importantes. Le recours à la chirurgie permet de diminuer considérablement la charge fongique tissulaire et facilite ainsi l'action des antifongiques, permettant d'atteindre un taux de survie global de l'ordre de 70% (4,34).

Enfin, la prise en charge de la pathologie et/ou des facteurs de risque sous-jacents représente un facteur déterminant, qui conditionne souvent l'issue de l'infection à long terme. Il s'agit notamment de contrôler le diabète ou de diminuer les thérapeutiques immunosuppressives.

2. MISE EN PLACE DU KIT MUCORGENIUS®

Actuellement, les demandes de PCR Mucorales sont externalisées auprès du laboratoire de parasitologie-mycologie du CHU Henri Mondor de Créteil (Val-de-Marne) qui utilise une PCR « maison ». Aussi, l'internalisation de la technique au sein du CHU d'Angers devrait permettre d'améliorer la précocité de prise en charge des patients présentant une suspicion de mucormycose, mais apporter également des avantages pour l'hôpital. Cette décision fait par ailleurs écho à l'appel de la FPCRI, en participant à la diffusion et à l'intégration des techniques de biologie moléculaire pour la détection des Mucorales.

2.1. Etapes préliminaires

Un kit commercial a été préféré à une méthode « maison », essentiellement pour une plus grande souplesse vis-à-vis de la démarche d'accréditation. Le choix s'est porté sur le kit MucorGenius® proposé par la société PathoNostics, qui a déjà fait l'objet d'évaluations par les confrères des CHU de Rennes et de Bordeaux (50). Ainsi, il a été possible de comparer les protocoles utilisés dans ces centres avec les recommandations du fabricant stipulées dans la notice. Il est à noter que ce kit détecte l'ADN de *Rhizopus*, *Rhizomucor*, *Lichtheimia*, *Mucor* et *Cunninghamella*, mais ne précise pas le genre incriminé, contrairement à la PCR mise en place à Créteil. En revanche, cette dernière ne permet pas la détection de l'ADN de *Cunninghamella*.

Après réception des kits, la première étape a consisté à réaliser une gamme d'étalonnage afin d'estimer la concentration minimale d'ADN détectable grâce à cette technique. À cet effet, différentes concentrations d'ADN extrait à partir d'une culture pure d'un isolat de *Rhizopus* sp. ont été amplifiées (**tableau 1**).

Tableau 1. Résultats de l'amplification de concentrations décroissantes d'ADN de *Rhizopus* sp.

| 1^{ère} série | | 2^{ème} série | |
|------------------------------|-----------|------------------------------|-----------|
| Quantité ADN | Ct | Quantité ADN | Ct |
| NTC MUCOR | No Ct | NTC MUCOR | No Ct |
| T+ MUCOR | 25,4 | T+ MUCOR | 25,54 |
| 660 ng/μL | No Ct | 66 pg/μL | 24,83 |
| 66 ng/μL | 13,36 | 6,6 pg/μL | 28,74 |
| 6,6 ng/μL | 17,13 | 0,66 pg/μL | 32,80 |
| 660 pg/μL | 20,61 | 0,066 pg/μL | 35,15 |
| 66 pg/μL | 25,21 | 6,6 10 ⁻³ pg/μL | No Ct |
| 6,6 pg/μL | 28,55 | 6,6 10 ⁻⁴ pg/μL | No Ct |
| 0,66 pg/μL | 32,58 | 6,6 10 ⁻⁵ pg/μL | No Ct |
| 0,066 pg/μL | 36,01 | 6,6 10 ⁻⁶ pg/μL | No Ct |

Il a pu être établi que ce kit permettait de détecter des concentrations en ADN supérieures à 6,6 fg/μL (soit 6,6 10⁻¹⁵ g/μL). Ce résultat est cohérent avec les données de la littérature et celles d'autres kits pour d'autres pathogènes. Il a également été mis en évidence qu'une concentration d'ADN très élevée (> 66 pg/μL) pouvait inhiber la réaction d'amplification.

2.2. Sélection des sérums

Nous avons ensuite sélectionné dans la sérothèque du laboratoire des sérums de patients pour lesquels un résultat de PCR Mucorales avait déjà été obtenu auprès du CHU de Créteil, et qui présentaient un volume suffisant (1 mL) pour permettre l'extraction de l'ADN. Treize sérums de 7 patients, qui présentaient une mucormycose probable ou possible, ont ainsi pu être analysés. En l'absence de disponibilité d'un sérum datant du jour du diagnostic, les échantillons prélevés aux dates les plus proches ont été retenus. Deux sérums de patients positifs en PCR Mucorales ont par ailleurs été fournis par nos confrères du CHU de Nantes. La synthèse des résultats biologiques concernant les sérums testés est présentée dans le **tableau 2**. Pour

d'avantage d'informations concernant les contextes cliniques et radiologiques des patients, se référer à l'**Annexe 2**.

Tableau 2. Résultats biologiques antérieurs des échantillons testés

| Patient | DDN | Date | Résultat PCR (Créteil) | BDG | GM | Culture | Diagnostic |
|---------|------------|------------|--|----------|---------|-----------------|--------------------------------------|
| | | entrée | | | | (Angers) | retenu |
| 1 | 16/08/1971 | 22/02/2021 | <i>Rhizomucor</i> 34 Ct | Négatif | Positif | Pas de Mucorale | Mucormycose possible |
| 2 | 19/07/1986 | 27/02/2021 | <i>Mucor</i> + <i>Rhizopus</i> 25 Ct | NR | Négatif | NR | Mucormycose possible |
| 3 | 02/06/1981 | 17/01/2019 | <i>Rhizomucor</i> + <i>Lichtheimia</i> 37 Ct | Négatif | Négatif | NR | Aspergillose probable |
| 4 | 12/03/1950 | 27/04/2019 | <i>Mucor</i> + <i>Rhizopus</i> 43 Ct | NR | Négatif | Pas de Mucorale | Aucune documentation microbiologique |
| 5 | 08/10/1953 | 15/09/2018 | <i>Mucor</i> + <i>Rhizopus</i> 35 CT <i>Rhizomucor</i> + <i>Lichtheimia</i> 37 Ct | Négatifs | Négatif | Pas de Mucorale | Mucormycose possible |
| 6 | 13/01/2003 | 11/08/2018 | <i>Mucor</i> + <i>Rhizopus</i> 42 Ct | Positif | Positif | Pas de Mucorale | Aspergillose probable |
| 7 | 26/11/1955 | 18/08/2018 | <i>Lichtheimia</i> 39 Ct | Positif | Négatif | Pas de Mucorale | Pneumocystose probable |

DDN = date de naissance ; BDG = β -D-Glucane ; GM = galactomannane ; NR = non réalisé

Si tous les patients testés présentaient un contexte hématologique, en revanche les preuves d'infection par une Mucorale étaient assez pauvres. Il est à noter que les PCR rendues positives par Créteil présentaient globalement un Ct assez élevé.

2.3. Analyses et résultats

L'ADN contenu dans ces échantillons a ensuite été extrait via le système automatisé eMAG®. Conformément à la notice d'utilisation, nous avons établi un volume de sérum minimal à 1 mL pour 50 μ L d'éluat final. En effet, la sensibilité de la PCR avec cette quantité atteint 92% alors qu'elle ne dépasse pas 81% lorsque le volume est inférieur à 500 μ L (13). Les 5 μ L de contrôle interne sont ainsi intégrés lors de cette extraction d'environ 10 minutes, qui se fait en présence

de tampon de lyse et de silice magnétique. 50 µL d'éluat sont recueillis, dont 5 µL seront utilisés pour amplification après mélange avec 10 µL de mix PCR Mucorgenius®, 1 µL de Taq polymérase et 9 µL de tampon de dilution. Tous les échantillons ont été passés en duplicate. Le programme d'amplification utilisé sur le thermocycleur Applied Biosystems est présenté en **annexe 3**. Les valeurs obtenues ont été validées en se référant aux recommandations de la notice (voir **tableau 3**).

Tableau 3. Indications d'interprétation du kit MucorGenius®

| Signaux d'amplification du MucorGenius® | | | |
|---|-----|-----|---|
| CFX | HEX | Cy5 | |
| | + | + | Présence d'ADN de Mucorales |
| | - | + | Absence d'ADN de Mucorales |
| | + | - | IC supplanté par une forte charge de Mucorales ; mais le résultat est valable |
| | - | - | Résultat non valable |

Afin d'interpréter les résultats obtenus, en l'absence de valeur fixe de cut-off fourni par le fabricant, les valeurs suivantes de seuils de Ct ont été adoptées :

- > 38 : résultat négatif ;
- ≤ 38 : résultat positif :
- positif faible à reconstrôler : seuil à déterminer (au CHU de Bordeaux, un seuil à 35 a été choisi, avec un résultat souvent négatif lors de la vérification).

Les résultats finaux sont présentés dans le **tableau 4** :

Tableau 4. Résultats de l'amplification avec le kit MucorGenius®

| <i>Patients</i> | Résultat d'amplification |
|-------------------------|---------------------------------|
| <i>Patient n° 1</i> | Négatif |
| <i>Patient n° 2</i> | Positif : 25,6 et 25,7 Ct |
| <i>Patient n° 3</i> | Négatif |
| <i>Patient n° 4</i> | Négatif |
| <i>Patient n° 5</i> | Positif : 41,5 et 35,9 Ct |
| <i>Patient n° 6</i> | Négatif |
| <i>Patient n° 7</i> | Négatif |
| <i>Patient Nantes 1</i> | Positif : 31,5 et 31,9 Ct |
| <i>Patient Nantes 2</i> | Positif : 29,8 et 30 Ct |

2.4. Conclusions et perspectives

Malgré les réserves liées au faible nombre d'échantillons analysés, ces premiers résultats sont plutôt encourageants et consolident la dynamique de mise en place du kit. Nous pouvons d'ores et déjà constater les éléments suivants :

- **On observe une bonne répétabilité de la technique** ; aucune discordance n'est observée entre deux amplifications d'un même échantillon.
- **La sensibilité de ce kit semble plus faible que celle de la PCR « maison » de Créteil**, puisque nous retrouvons globalement moins de sérums positifs. Néanmoins, comme déjà évoqué, en l'absence de sérum à J0, un échantillon à J-1 ou J+1 a pu être testé. De plus, certains sérums étaient conservés à -20°C depuis plusieurs années et on ne peut éliminer une dégradation de l'ADN fongique, avec notamment des cycles de congélation-décongélation successifs.
- Il est intéressant de constater que **les Ct obtenus avec ce kit ne sont pas très éloignés de ceux fournis par Créteil.**

Afin de démontrer davantage les performances du kit MucorGenius® au sein du laboratoire, il reste un certain nombre d'étapes à valider. La stratégie d'accréditation pourra suivre le planning suivant :

- **jour 1** : répétabilité, variabilité inter-opérateur, contamination et 1^{er} cycle de stabilité ;
- **jour 2** : fidélité intermédiaire (reproductibilité) et 2^{ème} cycle de stabilité ;
- **jour 3** : fidélité intermédiaire (reproductibilité) et 3^{ème} cycle de stabilité.

Ces tests, qui nécessitent une disponibilité importante du personnel technique, devraient être réalisés d'ici la fin de l'année 2021, afin de pouvoir introduire officiellement la technique dans le laboratoire au premier semestre 2022.

Parallèlement, le paramétrage de cette analyse dans le système de gestion de l'information du laboratoire (SIL) a pu être réalisé. Différentes conclusions possibles sont présentées dans la **figure 12** ; des exemples de comptes-rendus figurent en **annexe 4**.

| PARASITOLOGIE - MYCOLOGIE | |
|--|-----------------------------|
| Sérum | |
| RECHERCHE DE MUCORALES PAR PCR | |
| - PCR Mucorales : <i>PCR en Temps Réel, cible 28S rRNA, kit MucorGenius - PathoNostics.</i> | Présence d'ADN de Mucorales |
| - CT : | 32 |
| Présence d'ADN de Mucorales, dont le diagnostic de genre ne peut être précisé en l'absence de culture positive. PCR ciblant les genres les plus fréquemment incriminés en situation pathogène, à savoir Rhizopus, Rhizomucor, Lichtheimia, Mucor et Cunninghamella. | |
| - PCR Mucorales : <i>PCR en Temps Réel, cible 28S rRNA, kit MucorGenius - PathoNostics.</i> | IndéTECTABLE |
| Absence d'ADN de Mucorales dans l'échantillon analysé. PCR ciblant les genres les plus fréquemment incriminés en situation pathogène, à savoir Rhizopus, Rhizomucor, Lichtheimia, Mucor et Cunninghamella. | |

Figure 12. Exemples d'interprétation des résultats de PCR Mucorales

3. DISCUSSION

Le dynamisme de la biologie médicale française, ainsi que la littérature abondante sur les techniques de biologie moléculaire, ont conduit le laboratoire de parasitologie-mycologie du CHU d'Angers à intégrer la PCR Mucorales dans son catalogue d'analyses. Le choix de la technique s'est porté sur un kit commercial (MucorGenius®, PathoNostics) plutôt que sur une technique « maison », du fait des bonnes performances de ce dernier et de la possibilité d'une mise en place rapide dans le cadre de la démarche d'accréditation. Les premiers tests de la validation de méthode ont pu être réalisés au cours de l'été 2021, mais la disponibilité insuffisante du personnel technique en raison d'un sous-effectif chronique (particulièrement prégnant en période de congés), a fortement pénalisé l'avancée de ce travail et retardé la mise en place de la technique.

Par ailleurs, en raison du faible échantillonnage de patients positifs en PCR, il a fallu collecter de nouveaux prélèvements au mois de mai, ce qui a également retardé la mise en route. Nous aurions éventuellement pu élargir notre pool d'échantillons en testant des sérums de patients sans argument en faveur d'une mucormycose, mais qui présentaient des facteurs de risque de développer une IFI.

3.1. Apport à la prise en charge du patient et au laboratoire

Cette nouvelle technique vient compléter le panel d'analyses de biologie moléculaire du laboratoire, en sus des PCR toxoplasmose et pneumocystose. La mise en place de la PCR Mucorales s'inscrit dans un contexte de modernisation de l'unité, notamment pour le diagnostic des IFI. Elle devrait être suivie par l'introduction de la PCR aspergillose, ce qui permettrait au laboratoire d'assurer une série *a minima* hebdomadaire des deux PCR, afin de répondre à la demande croissante des cliniciens. Ceci devrait permettre d'améliorer le diagnostic et le suivi des patients à risque, donc leur prise en charge et leur pronostic.

L'intérêt de la PCR dans le diagnostic des IFI (mucormycoses ou aspergilloses) réside dans la précocité de sa positivité par rapport aux autres modalités diagnostiques (51). En raison de l'externalisation actuelle de la PCR Mucorales, le délai moyen de rendu de résultats est de l'ordre d'une semaine. Grâce à l'internalisation, il serait inférieur à ce délai, probablement autour de 3 ou 4 jours en moyenne avec, peut-être, la possibilité de réaliser des analyses en urgence au besoin.

Cependant, la stratégie d'utilisation de la PCR Mucorales reste encore à définir localement avec les services cliniques (notamment d'oncohématologie, de transplantation et de réanimation). Il convient en effet de préciser les conditions de réalisation du test, ainsi que ses limites. Cette PCR doit être réservée aux mucormycoses systémiques ou pulmonaires, ces dernières formes étant les plus compliquées à suivre en raison des signes scanographiques qui ne permettent pas de les différencier avec certitude des API et de suivre l'évolution de l'infection sous traitement. Une information sur les performances du test doit être délivrée auprès des prescripteurs, afin de ne pas s'écarter des recommandations et des bonnes pratiques. Ceci concerne notamment la place de la PCR en cas de prophylaxie antifongique, qui entraîne une diminution de la spécificité mais pas de la sensibilité (à l'inverse de la détection du galactomannane dans le diagnostic de l'API). Par ailleurs, cette technique présentant une VPN plus importante que sa VPP, doit-on proposer de manière systématique une confirmation sur un deuxième prélèvement en cas de résultat positif ? Cette interrogation rejoint celle sur les seuils de Ct pour une zone d'incertitude (ou de faible positivité), qui reste encore à définir.

Enfin, il est nécessaire de rappeler que la PCR ne se substitue pas aux modalités diagnostiques actuelles (notamment aux examens mycologique et histologique), mais se positionne en complément.

3.2. Apport pour l'hôpital : analyse médico-économique

Les performances et l'intérêt pour ce kit étant confirmés au laboratoire, il reste à déterminer les charges induites par l'introduction de la technique au CHU d'Angers, tant d'un point de vue économique que du côté des ressources humaines.

3.2.1. Coûts de l'analyse externalisée

Au cours des trois dernières années, le laboratoire de parasitologie-mycologie du CHU d'Angers a envoyé **en moyenne 100,6 sérums par an** au laboratoire du CHU Henri Mondor pour la réalisation des PCR Mucorales. On observe une augmentation de 8 à 15% par an du nombre de demandes :

- 2018 : 87 sérums
- 2019 : 103 sérums
- 2020 : 112 sérums

En 2021, 73 sérums ont été externalisés au début du mois de septembre (70 l'étaient l'année précédente au même moment). La demande annuelle de 2021 peut alors être extrapolée à 123 en moyenne [117-129].

Chaque analyse externalisée étant facturée 388,80 €, les dépenses relatives à cette PCR sur les trois dernières années sont donc les suivantes :

- 2018 : 33 825,60 €
- 2019 : 40 046,40 €
- 2020 : 43 545,60 €

On retrouve une **dépense moyenne annuelle d'environ 39 139,20 €** (41 310 € en prenant les 47 822,40 € de l'année 2021 extrapolée en compte).

3.2.2. Coûts de l'analyse internalisée

Cinq postes de dépense sont à prévoir à la suite de l'internalisation de la technique de PCR Mucorales au laboratoire :

- 1- Le **matériel** (automates d'extraction et d'amplification, centrifugeuses, réfrigérateurs, congélateurs, ...) est déjà présent et utilisé conjointement avec d'autres secteurs. Son coût est donc considéré comme négligeable dans cette étude.
- 2- Les **consommables** (pipettes et pointes, barrettes pour l'extraction et l'amplification, tubes pour l'aliquotage, etc...) sont commandés par le Pôle de Biologie, notamment pour les techniques utilisant déjà l'eMAG® et le thermocycleur d'Applied Biosystems. Leur coût n'a pas encore été évalué à l'échelle d'une série de PCR Mucorales avec le kit MucorGenius® et sera considéré comme négligeable dans cette étude.
- 3- Le seul nouveau poste de dépense en **réactifs** lors de la mise en place de cette technique sera l'achat des kits de PCR MucorGenius®. Un kit permet de réaliser 25 analyses pour un coût de 329,65 € ; l'analyse unitaire coutant 13,19 €, le coût annuel moyen pour la réalisation de 100 analyses en moyenne serait donc de 1318,60 €, ce qui correspond à l'achat de quatre kits.
- 4- Le coût des **contrôles** n'est cependant être intégré. En effet, trois contrôles internes (contrôle d'extraction, contrôles positif et négatif), sont réalisés dans chaque série de PCR. A la différence du contrôle négatif qui ne nécessite que du tampon de dilution et dont le coût est considéré comme négligeable, les deux autres contrôles utilisent des réactifs au même titre qu'une analyse patient. À raison d'une série par semaine, ce coût peut donc être estimé à celui de 104 analyses supplémentaires par an, soit 1 371,34 €.

5- Les **ressources humaines** :

- a. Aucune charge de travail supplémentaire significative ne semble envisagée pour les biologistes à court terme. Selon les moyennes observées, 2 analyses patients et 2 contrôles sont à prévoir chaque semaine.
- b. Le laboratoire de parasitologie-mycologie compte actuellement cinq techniciens, correspondant à 4,6 équivalents temps-plein (ETP). L'analyse de leur salaire moyen a été réalisé à partir des grilles indiciaires « techniciens de laboratoire d'analyse médicale ». Les résultats pour un ETP sont présentés dans le **tableau 5**.

Tableau 5. Données économiques du personnel technique du laboratoire de parasitologie-mycologie du CHU d'Angers

| | Salaire brut (€) | Salaire net (€) | Coût employeur (€) |
|--------------------------|-------------------------|------------------------|---------------------------|
| <i>Moyenne mensuelle</i> | 2 281,16 | 1 784 | 2 965,8 |
| <i>Moyenne annuelle</i> | 27 373,87 | 21 408 | 35 589,6 |
| <i>Moyenne sur 5 ans</i> | 136 869,36 | 107 040 | 177 948 |

La réalisation de la PCR Mucorales ne nécessitant qu'une seule journée par semaine, le besoin réel est de 0,2 ETP (7 heures par semaine, soit 30,31 heures par mois). Afin d'assurer la continuité des soins lors des absences, la ressource humaine nécessaire apparaît être de 0,24 ETP (120%). En se basant sur la moyenne actuelle au sein du laboratoire, le coût d'un tel poste serait de 8 541,50 € pour l'employeur.

Il sera nécessaire de commander 8,16 kits par an afin de réaliser les 204 analyses annuelles moyennes. Ceci équivaut à un nouveau kit toutes les six semaines, ne posant ainsi aucun souci de stabilité puisque le délai de conservation au congélateur est d'un an. Afin de se prémunir de l'effet délétère de trop nombreux cycles de congélation-décongélation, les réactifs seront aliquotés à l'ouverture du kit.

En résumé, les coûts prévisibles en réactifs, contrôles et ressources humaines pour l'internalisation de la PCR Mucorales, sont de **11 231,44 € par an**.

3.2.3. Perspectives sur 5 ans

Le nombre de prescriptions de PCR Mucorales devrait augmenter lorsque la technique sera introduite au CHU d'Angers. On peut en effet imaginer qu'une partie des cliniciens ne prescrit actuellement pas cette analyse, soit par souci de rapidité d'obtention des résultats, soit par méconnaissance. Par ailleurs, les centres hospitaliers périphériques du groupement hospitalier de territoire (GHT) adresseront probablement un certain nombre d'échantillons. Cette augmentation du nombre de demandes majorera alors le nombre d'analyses, mais pas la quantité de réactifs nécessaires annuellement pour les contrôles positifs, soit 104 si la technique est hebdomadaire ou 208 si elle est bihebdomadaire. Dans le cadre de cette analyse, l'augmentation du nombre de prescriptions peut être évaluée, selon le rythme des années précédentes, à :

- 123 sérums en 2021
- 136 sérums en 2022
- 149 sérums en 2023
- 164 sérums en 2024
- 180 sérums en 2025

Les coûts de l'intégration de la technique au CHU sur les prochaines années, hors ressources humaines, peuvent alors être évalués comme suit dans le **tableau 6**.

Tableau 6. Comparaison des coûts liés à la PCR Mucorales

| Année | Coût si analyse externalisée (€) | Coût si analyse interne, sans contrôle (€) | Coût si analyse interne, contrôles inclus (€) |
|--------------|---|---|--|
| 2021 | 47 822,4 | 1 621,88 | 2 993,22 |
| 2022 | 52 876,8 | 1 793,30 | 3 164,64 |
| 2023 | 57 931,2 | 1 964,71 | 3 336,06 |
| 2024 | 63 763,2 | 2 162,50 | 3 533,85 |
| 2025 | 69 984 | 2 373,48 | 3 744,82 |

Prenant en compte les analyses nécessaires aux contrôles, les différences de coûts absolues annuelles et mensuelles seraient donc de :

Tableau 7. Gains estimés après intégration de la PCR Mucorales au CHU d'Angers

| Année | Economie annuelle (€) | Economie mensuelle (€) |
|--------------|------------------------------|-------------------------------|
| 2021 | 44 829,18 | 3 735,76 |
| 2022 | 49 712,16 | 4 142,68 |
| 2023 | 54 595,14 | 4 549,60 |
| 2024 | 60 229,35 | 5 019,11 |
| 2025 | 66 239,18 | 5 519,93 |

3.2.4. Conclusions de l'analyse médico-économique

Avec un coût annuel moyen actuel de 39 139,20 € et un coût annuel moyen après internalisation de 11 231,44 €, **le gain pour l'hôpital serait de 27 907,76 €**. Ce résultat vient confirmer l'intérêt et la pertinence économique de cette démarche, d'autant que les données sur cinq ans sont aussi encourageantes.

Reste une difficulté consécutive à cette analyse, à savoir comment y octroyer 0,24 ETP ? Deux solutions peuvent être envisagées :

- Libérer du temps du personnel technique déjà en place dans le laboratoire. Ceci semble difficilement réalisable, en raison de conditions de travail déjà très tendues dues au manque actuel en ressources humaines, évalué à 1,2 ETP.
- Recruter du personnel. Il peut être difficile de recruter une personne pour seulement 0,24 ETP. Il convient donc d'explorer l'intérêt de la mise en œuvre de cette technique avec l'embauche d'un ETP technicien. La rémunération de ce dernier reviendrait en moyenne à 35 589,60 € par an au service. En additionnant les coûts des réactifs et des contrôles, on obtient un **coût total annuel de 38 279,54 €**, légèrement inférieur aux 39 139,20 € de coût annuel moyen actuel, mais très inférieur aux 47 822,40 € de projection pour 2021 ou aux 52 876,80 € de projection pour 2022 (année prévue de mise en place de la technique). Des perspectives intéressantes s'ouvriraient ainsi pour le laboratoire grâce au 0,76 ETP technicien en plus. Cette ressource humaine pourrait être mise à contribution pour participer aux activités actuelles du laboratoire, mais aussi et surtout pour internaliser d'autres techniques. Ainsi, la validation du kit MucorGenius® sur les prélèvements respiratoires et la validation de méthode pour la PCR aspergillose pourraient être rapidement envisagées.

3.3. Perspectives

3.3.1. Validation de la PCR sur le LBA

Il est prévu, à court terme, de réaliser la validation de méthode du kit MucorGenius® sur les prélèvements respiratoires afin d'élargir le panel des modalités diagnostiques. La PCR Mucorales sur LBA apparaît en effet beaucoup plus sensible que les techniques mycologiques conventionnelles et parfois davantage que la PCR sérique, au cours des formes non

disséminées. La réalisation de la technique sur les deux matrices permettra d'accroître les performances diagnostiques et donc d'accélérer la mise en route d'un traitement adapté, premier facteur pronostique dans la prise en charge des mucormycoses (48). Il convient cependant de garder à l'esprit qu'en raison de la présence de spores de Mucorales dans l'air et donc d'un risque de contamination ou de colonisation transitoire des voies respiratoires, la VPP de la PCR sur le LBA est moins élevée que sur le sérum. Une réflexion sur les valeurs seuils de Ct sera donc à mener, afin d'interpréter les résultats.

Quelques ajustements techniques devront par ailleurs être réalisés, comme l'adaptation du volume d'échantillon minimal qui sera de 1,5 mL de LBA contre 1 mL de sérum. En dehors de ces adaptations simples (à partir des données du fournisseur ou de la littérature), les automates d'extraction et d'amplification restent les mêmes.

3.3.2. Association avec la PCR aspergillose

En parallèle de la mise en place de la PCR Mucorales, le laboratoire a l'intention d'internaliser également la PCR aspergillose. Cette dernière est maintenant intégrée dans les recommandations des sociétés savantes, après de nombreuses années de débats d'experts (11). Le kit AsperGenius®, également distribué par la société Pathonostics, a ainsi été testé en parallèle de ce travail. Cette technique viendra compléter le panel d'outils diagnostiques du laboratoire (analyse mycologique et dosage de l'antigène galactomannane dans le sérum, le LBA ou le LCR). Le dosage des β -D-glucanes sériques devrait, quant à lui, rester encore externalisé.

Les avantages de cette PCR sont pour la plupart les mêmes que ceux attendus pour la PCR Mucorales. Nous pouvons ainsi citer :

- **Précocité de positivité**, pouvant aller jusqu'à deux semaines avant les biomarqueurs et les techniques de mycologie standard (52).
- **Conservation de la sensibilité malgré la mise en place d'une prophylaxie antifongique** ou d'une thérapeutique adaptée. Seule la spécificité et la VPP sont diminuées (51).
- **Amélioration du suivi thérapeutique et de l'appréciation pronostique** par son rôle de marqueur d'efficacité thérapeutique. Les patients pour lesquels la PCR ne se négative pas après la mise en route d'un traitement adapté présentent en effet un taux de survie inférieur à ceux pour qui elle se négative (46).
- Permet de poser un **diagnostic d'API probable** même si les cultures, l'examen direct, l'histologie et les marqueurs sérologiques ne sont pas disponibles ou négatifs (11) (à noter que la PCR Mucorales, en revanche, n'est pas encore intégrée dans les recommandations de l'EORTC/MSG).

Les automates d'extraction et d'amplification seront également communs aux deux techniques, n'engendrant pas de coût supplémentaire en dehors de l'achat des kits et des ressources humaines. En principe, le laboratoire pourrait réaliser une série hebdomadaire concomitante à la série de PCR Mucorales, réalisant donc un panel de biologie moléculaire pour la détection des IFI chaque semaine. On peut imaginer, si les ressources humaines techniques augmentaient et si les besoins des services cliniques le justifiaient, réaliser deux séries hebdomadaires pour ce panel. Ceci viendrait optimiser le diagnostic, la prise en charge et le suivi thérapeutique des patients les plus à risque et permettrait d'établir des protocoles de soins optimaux en renforçant le dialogue clinico-biologique.

La mise en place d'un panel « *Aspergillus*-Mucorales » devrait permettre d'adapter rapidement la prise en charge thérapeutique devant une suspicion clinique d'IFI, d'évaluer et de rediscuter les mesures de prophylaxie pour les patients à risque (53).

3.3.3. Extension future des moyens diagnostiques

L'amélioration du pronostic des mucormycoses nécessite encore des efforts conséquents. En premier lieu, on note l'extension des modalités diagnostiques en biologie moléculaire à toutes les matrices d'intérêt. En nous inspirant de l'intérêt de la PCR aspergillaire dans le LCR (ou sur biopsie cérébrale – mais ce geste est rarement réalisable chez des patients polymorbides ou extrêmement fragilisés), cette extension de la PCR Mucorales pourrait présenter, comme sur d'autres matrices, des performances intéressantes sans toutefois se substituer à l'analyse mycologique et histologique. La grande sensibilité de la PCR, ainsi que son indépendance de performances vis-à-vis de la prophylaxie antifongique, représentent des avantages majeurs (54). Il conviendra toutefois de préciser la stratégie d'utilisation et la valeur des résultats, en fonction du type d'atteinte suspectée. En effet, dans l'API, la VPN de la PCR dans le LCR est moins bonne en cas d'abcès cérébral que lors d'une atteinte parenchymateuse (55).

Comme cela a été mis en évidence avec d'autres agents infectieux, notamment bactériens, il n'est pas toujours nécessaire d'explorer le site d'infection primaire pour mettre en évidence une infection. En effet, certains produits métaboliques peuvent être mis en évidence dans les excréta, urines ou selles. Ainsi, une équipe de Californie a travaillé sur la détection dans les urines du gène de la protéine CotH, impliquée dans l'adhérence endothéliale des Mucorales. Dans un modèle murin, les auteurs ont obtenu des performances très intéressantes, avec une sensibilité et une spécificité supérieures à celles des PCR dans le sérum ou le LBA (56).

D'autres équipes travaillent par ailleurs à la mise au point d'une PCR multiplexe « panfongique » permettant la détection des *Aspergillus*, Mucorales, *Fusarium* et *Scedosporium* dans des échantillons de tissus préalablement formolés. Cette technique, pour l'instant réservée aux échantillons présentant des filaments mycéliens à l'examen direct, pourrait venir renforcer la sensibilité du diagnostic des IFI (57). D'autres PCR multiplexes

sériques sont également en développement, mais leur sensibilité diagnostique est encore insuffisante.

Enfin, on peut aussi espérer la détection de nouveaux biomarqueurs afin d'améliorer significativement le panel diagnostique pour les mucormycoses. Ceci permettrait de disposer du même arsenal que pour les autres IFI et donc d'augmenter substantiellement la précocité de prise en charge et le pronostic des patients.

3.4. Contextualisation de l'apport de cette technique face aux enjeux bioclimatiques et énergétiques du XXI^{ème} siècle

La mise en place de la PCR Mucorales au CHU d'Angers, signe de modernisation du laboratoire, devrait contribuer à améliorer la prise en charge des patients. Cet apport est, comme toujours en médecine, à intégrer dans une balance bénéfices-risques. Les risques peuvent sembler insignifiants si l'on se cantonne au seul champ médico-technique, mais deux principaux écueils peuvent nous intéresser d'un point de vue plus global : l'impact de l'augmentation de la dépense énergétique du laboratoire et la pérennité de cette technique dans un monde soumis à un changement climatique inédit et à des accords de diminution d'utilisation des ressources fossiles.

En effet, cette technique de biologie moléculaire s'intègre dans le champ global des healthtechs, regroupant les biotechs et les medtechs. Leur développement est extrêmement soutenu ces dernières années, car elles répondent à des besoins de santé cruciaux et à une demande d'amélioration des prestations de santé (rapidité, fiabilité et standardisation) (58).

Les industries chimiques et pharmaceutiques produisant les réactifs des kits que nous utilisons dans les laboratoires de biologie médicale utilisent des procédés de fabrication assez simples, centrés autour de bioréacteurs alimentés en gaz et en nutriments et dont les paramètres

(poids, pH, concentrations d'oxygène ou de dioxyde de carbone et taux de glucose, de lactates ou d'azote) sont constamment mesurés. À des échelles industrielles, ceci nécessite d'importants moyens et surtout une importante consommation d'énergie. L'achat de matières premières et les chaînes logistiques représentent ainsi de grands postes de dépense de ces industries, souvent ultra-centralisées (hubs logistiques internationaux automatisés et climatisés, transports routier, maritime et aérien, consommables de transports). Cette consommation est amplifiée par l'utilisation des ressources gazières ou pétrolières, que ce soit comme source d'énergie ou comme matières premières, à l'image de l'industrie du plastique fournissant les consommables nécessaires aux automates de laboratoire. Ces mêmes automates, toujours plus nombreux puisque nécessaires à l'utilisation de ces nouvelles technologies, nécessitent également un apport d'énergie fiable et bon marché. On observe que le coût de l'énergie représente entre 15 et 30% du prix de revient de ces biotechs (59). Plus globalement, l'industrie chimique et pharmaceutique totalise 32 % de la consommation brute totale d'énergie du secteur industriel en France, soit 11,8 millions de tonnes équivalent pétrole (TEP) (60). On comprend la nécessité d'une énergie disponible et compétitive pour le développement de ces solutions de santé. Ces dernières sont nécessaires au maintien d'une croissance des moyens dans un modèle de compétitivité des centres de soins, tributaires financièrement de cette course en avant vers le progrès technologique. Ainsi, l'augmentation des coûts et la nécessité d'optimiser l'industrie pousse nombre d'acteurs des healthtechs à se tourner vers l'Asie du Sud-Est ou le continent américain, soit pour exporter leurs productions de biotechnologies, soit pour solliciter des sous-traitants. Les coûts directs sont alors réduits, mais les chaînes logistiques s'alourdissent et les transports augmentent, ainsi que la consommation de ressources pétrolières.

Nous pouvons prévoir un potentiel effet rebond après la communication de l'ajout de cette nouvelle technique dans le catalogue du laboratoire. En effet, de nouveaux protocoles diagnostiques seront probablement mis en place avec les services cliniques du CHU, voire avec les services d'autres centres hospitaliers qui ne prescrivaient pas cette analyse jusqu'à présent. Ainsi, comme dans la plupart des améliorations technologiques, le bénéfice ne s'évaluera pas par le « mieux » mais par le « plus », entraînant dans le même temps une augmentation de la consommation d'énergie totale (61). On peut, à juste titre, penser que l'ajout de cette seule technique ne représente qu'une goutte d'eau dans la quantité d'énergie consommée chaque année. Certes, mais ceci participe à une dynamique globale d'augmentation de la consommation d'énergie des systèmes de soins et de leurs émissions de gaz à effet de serre (GES) alors que ces derniers sont déjà responsables de 4,4% des émissions de GES mondiales annuelles (2 gigatonnes (Gt) de dioxyde de carbone (CO₂)). S'ils devaient être un pays, les systèmes de santé mondiaux seraient le 5^{ème} plus gros émetteur de la planète, entre la Russie et le Japon (62). À titre de comparaison, cela représente à peu près autant d'émissions que les secteurs des transports aériens et maritimes réunis. La France est en retard dans la comptabilité carbone et plus particulièrement dans celle de son système de soins, mais les anglo-saxons nous proposent de précieuses données. On remarque ainsi que les systèmes de soins représentent une partie non négligeable des émissions nationales dans ces différents pays :

- Angleterre : 6,3%
- Etats-Unis : 8%
- Canada : 5%
- Australie : 7%

En France, parmi les grands centres hospitaliers, seul le CHU de Grenoble a réalisé un bilan carbone complet, dont les résultats sont les suivants :

- **92 % des GES sont liés aux émissions du scope 3** (émissions indirectes non associées à la production d'électricité, de chaleur ou de vapeur), dont :
 - o 44% pour l'achat de produits ou services (les kits et réactifs de biologie moléculaire sont dans cette catégorie) ;
 - o 27% pour les déplacements domicile-travail ;
 - o 11% pour les transports de visiteurs et de patients (63).

Une estimation de The Shift Project, un think tank spécialisé dans la décarbonation de l'économie, propose des émissions de GES annuelles pour le système de soins en France d'un minimum de 33,6 mégatonnes équivalent CO₂ (MtCO_{2e}), soit plus de 5,1% du total national (64).

L'augmentation des moyens diagnostiques issus des biotechnologies et la course au progrès technique dans le domaine sanitaire nécessitent donc une augmentation globale de la consommation électrique, déjà premier secteur émetteur de CO₂ dans le monde avec 39 % du total des émissions (65), de celle de gaz, principale ressource de l'industrie chimique, ainsi que de celle de pétrole, fluide vital des chaînes de production et de logistique.

L'augmentation de la consommation d'énergie relative à l'intégration de ces biotechs dans l'offre de soins participe donc directement à l'augmentation des émissions de GES dans le monde. La quantité de CO₂ dans l'atmosphère atteignait près de 2090 Gt en 2016. Pour contenir l'augmentation des températures par rapport à la période préindustrielle à moins de 2°C, comme convenu dans l'accord de Paris de la COP21 (66), il nous est permis d'émettre seulement 2900 Gt. Ainsi, selon un rythme constant d'émissions de GES (ce qui n'a jamais été le cas, puisqu'elles sont en augmentation continue depuis le début de l'ère industrielle), nous

arriverions à ce seuil dans une vingtaine d'années, soit avant 2050 (65). Pour endiguer cette hausse et respecter l'accord de Paris de 2015, il faudrait diminuer chaque année les émissions de GES de 4 à 5%. À titre de comparaison, les seules années depuis le début du 20^{ème} siècle où les émissions annuelles ont baissé de 4% ou plus sont :

- 1932 : paroxysme de la crise de 1929 ;
- 1945 : anéantissement des capacités industrielles du Japon et de l'Allemagne ;
- 2020 : crise du coronavirus entraînant une diminution de l'ordre de 7% des émissions de GES (67).

On mesure la difficulté de la tâche qui nous incombe et il est nécessaire de rappeler les conséquences d'une inaction pour évaluer l'impact de toute augmentation de la consommation d'énergie. La traduction physique de l'inaction (politique, sociale, économique), ou d'actions insuffisantes, est une augmentation continue des émissions de GES, donc une amplification du phénomène de changement climatique et de ses conséquences. Les événements suivants sont ainsi attendus, dès maintenant et durant les décennies à venir, du fait de la très grande inertie de ces gaz :

- a. **Augmentation des températures :** Un rapport de l'ONU prenant en compte les mesures actuelles et à venir fait état d'une trajectoire orientant la planète vers une augmentation globale des températures de +2,7 °C (2,1-3,5) d'ici la fin du siècle, du fait des émissions de GES d'origine anthropique (68).
- b. **Augmentation des vagues de chaleurs et des canicules** (3 jours ou plus de températures anormalement élevées, de jour comme de nuit) : à l'image de la canicule de 2003 et de ses 19 490 morts français et 70 000 morts européens lors de l'été (69), leur fréquence pourrait doubler voire décupler d'ici la fin du siècle (70). L'été 2003 pourrait ainsi être représentatif des étés typiques dès 2050 (71).

- c. **Augmentation des sécheresses et des méga-feux**, à l'image de ceux de l'été 2021, dont la survenue, l'intensité et la durée sont maintenant scientifiquement associées aux émissions de GES d'origine anthropique (72,73). Ceux-ci amplifient les phénomènes de sécheresse et de pollution aérienne, tout en diminuant les capacités de captation du CO₂ de la biosphère.
- d. **Perturbation du cycle de l'eau** participant à l'intensification des sécheresses, à la concentration des pluies annuelles sur les basses saisons et à la survenue de pluies torrentielles (70). L'augmentation du niveau des mers et des océans entraîne, en plus de la destruction des espaces urbains côtiers, la salinisation des terres et des réserves d'eau douce, impactant l'agriculture et la sécurité alimentaire des populations.
- e. L'augmentation de la concentration en vapeur d'eau dans l'atmosphère couplée à l'augmentation des températures globales amplifie les **risques de canicules humides**, cocktails effrayants de conditions inhibant les capacités de thermorégulation humaines et pouvant entraîner des défaillances d'organes après 12 heures en l'absence de rafraîchissement artificiel. Ce couple de conditions a été précisé par une équipe de l'université d'Hawaï, dont voici la représentation graphique :

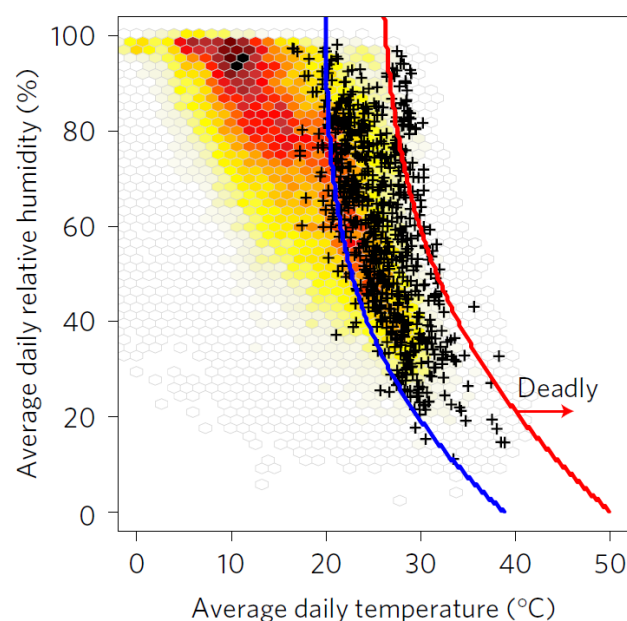


Figure 13. Climatic conditions of recent lethal heat events, d'après Mora et al. (74)

Actuellement, près de 30,6% de la population mondiale est exposée à ces conditions plus de 20 jours par an, ceci sur environ 13,2% de la surface terrestre. En fonction du scénario retenu, en 2100, de 47,6% à 73,9% de la population mondiale (environ 7,9 milliards actuellement) subirait ces conditions au minimum 20 jours par an, soit près de 5,5 milliards d'individus. L'augmentation se fera évidemment avant 2100, comme nous avons pu le constater cet été 2021 à Jacobabad (Pakistan) et Ras el Khaïmah (Ras Al Khaimah). D'autres régions de la planète, notamment en zones intertropicales ou côtières comme l'Asie du Sud et du Sud-est, le golfe du Mexique, le reste du golfe persique, certaines parties du continent africain et le Sud de l'Europe (dont la frontière pyrénéenne française), suivent le même chemin (74).

- f. **Augmentation de la pollution de l'air**, maintenant correctement corrélée à l'augmentation des allergies respiratoires, aux exacerbations d'asthme ou de pathologies respiratoires et à l'apparition ou aggravation de maladies cardiovasculaires (75). En France, en fonction des sources, c'est entre 48 000 et 97 242 décès prématurés chaque année qui sont imputables à la pollution de l'air d'origine anthropique. Ceci représente de 9% à 17,3% des décès annuels (76). À l'échelle mondiale, ce sont entre 4,2 et 8,7 millions de morts prématurés (77), ce qui représente près d'un décès sur cinq.

Ces effets physiques, géo-hydrologiques, résultant de l'aggravation continue du phénomène de réchauffement climatique, entraînent très concrètement dans nos sociétés humaines les conséquences suivantes :

- a. **Majoration des décès, blessures, défaillances d'organes, impacts psychologiques et pertes d'autonomie** liés aux événements météorologiques extrêmes, aux températures anormalement élevées et à la pollution aérienne.

- b. **Diffusion de pathologies infectieuses** liées à la qualité ou à la rareté de l'eau, aux difficultés d'approvisionnement ou de conservation des denrées alimentaires et aux vecteurs hématophages : choléra, infection à *Campylobacter*, cryptosporidiose, leptospirose, salmonelloses, mycotoxines, paludisme, chikungunya, dengue, infection par le virus Zika, infection à virus West Nile, fièvre de la vallée du Rift, infections à hantavirus, leishmaniose, encéphalite à tique ou encore maladie de Lyme. Selon l'OMS, rien que l'augmentation des diarrhées et du paludisme à cause du changement climatique pourrait provoquer entre 48 000 et 60 000 décès supplémentaires entre 2030 et 2050 (75,78).
- c. **Emergence de nouveaux agents infectieux** à potentiel épidémique ou pandémique. Du fait de l'augmentation des températures, de la montée des eaux et des migrations de populations, les sociétés humaines risquent de continuer d'exploiter et de détruire les écosystèmes tels que les forêts primaires. Ceci entraîne le contact avec des animaux sauvages porteurs d'agents infectieux inconnus du système immunitaire des humains ou de leurs animaux domestiques, terreau idéal à l'émergence de nouvelles épidémies ou pandémies, à l'image de celle de SARS-CoV2 apparue fin 2019 (79,80). La barrière entre ces agents infectieux et nos sociétés, service écosystémique inestimable à la vue des 424 milliards d'euros que la crise COVID va coûter à la France d'ici à 2022 (et de la perte des 22 000 milliards de dollars de produit intérieur brut mondial entre 2020 et 2025), s'amenuise à mesure que nous détruisons la biodiversité.
- d. **Augmentation substantielle du nombre de migrants climatiques**. La banque mondiale estime actuellement que les effets directs du changement climatique pourraient entraîner la migration d'environ 216 millions de personnes en interne d'ici 2050 (81), quand l'ONU évalue le chiffre global à 250 millions. Les conséquences indirectes pourraient, elles, déplacer jusqu'à 1,2 milliards d'individus d'ici 2050 (82).

Les demandes d'asiles dans l'Union Européenne pourraient ainsi augmenter de plus de 188% d'ici la fin du siècle (83). Ces migrations seront évidemment à l'origine de troubles sanitaires conséquents, d'abord psychologiques mais également infectieux et traumatiques.

La demande de soins risque donc de connaître une forte croissance dans les années à venir, qui sera d'autant plus importante dans les pays comme la France où le système de santé est accessible à tous, sans conditions de ressources. La demande d'actes de biologie médicale sera elle aussi certainement en augmentation, puisque cette spécialité contribue à elle seule à poser entre 60 et 70% des diagnostics médicaux. Ceci pourrait nécessiter une augmentation d'échelle et de productivité propices à la valorisation de l'automatisation et des panels syndromiques de biologie moléculaire, déjà fortement demandés.

Mais dans les mêmes temps et à des horizons de temps plus proches de nous, la communauté internationale appelle à combattre le réchauffement climatique pour se préserver des effets vus précédemment ainsi que d'autres non évoqués, ceci en diminuant les émissions de GES et donc la consommation d'énergie fossile. C'est notamment le cas de l'accord de la COP21 signé en 2015 à Paris (66), ambitieux mais peu contraignant donc ne permettant pas à l'heure actuelle la diminution des émissions de GES (84,85). Ces ambitions seront certainement renforcées lors de la COP26 de novembre 2021 en réaction à la publication du premier chapitre du 6^{ème} rapport du Groupe d'experts Intergouvernemental sur l'Evolution du Climat. En effet, ce dernier acte formellement la responsabilité des sociétés humaines et de leurs émissions de GES dans le phénomène de changement climatique, en plus d'en préciser les effets actuels et à venir (86). Ceci peut poser un problème dans notre secteur puisque la demande d'énergie augmente, que l'électrification n'est pas encore déployée à toutes les échelles et que les énergies renouvelables, seules restantes dans un monde neutre en carbone (objectif 2050),

ne permettent même pas, à l'heure actuelle, de produire suffisamment pour compenser la hausse annuelle de consommation globale d'énergie, et donc de réduire les émissions (85). À titre de comparaison, les 11,8 millions TEP consommées chaque année par l'industrie chimique et pharmaceutique équivalent à une consommation de 137 234 GWh sur un an, soit 15,666 GW d'installation électrique. Le parc éolien français complet disposait en 2019 de 16,5 GW, alors que la programmation pluriannuelle de l'énergie (PPE) fixe un objectif de 34 GW en 2028. Cet exercice nécessite donc une sérieuse réflexion et un pilotage précis pour orienter la transition énergétique.

Ce pilotage est d'autant plus nécessaire dans un contexte où la contraction de l'approvisionnement en pétrole a déjà commencé depuis le pic de pétrole conventionnel en 2008 et l'arrivée prochaine du pic global, du fait de l'épuisement des gisements actifs et de la baisse du rendement des nouveaux forages, conventionnels ou non (87). Le risque sur les approvisionnements futurs de l'Union Européenne est d'ailleurs apprécié avec un déclin probable de l'approvisionnement entre 2019 et 2030 autour de -8%, toutes solutions confondues (88). Ce que nous nommons la transition énergétique, soit la sortie des énergies fossiles, se fera donc obligatoirement, buttant sur des limites physiques. Reste à savoir si elle se fera de gré, pilotée et maîtrisée, ou si elle se fera de force, dans un système en décroissance énergétique pour lequel aucun exemple passé ne nous permet d'évaluer la stabilité. Ce qui est certain, en l'état des connaissances, c'est que plus le temps passe et plus la rupture sera inconfortable, inégalitaire et dangereuse.

Les risques pour notre secteur sont ainsi multiples. D'abord la contraction de l'approvisionnement en pétrole menace concrètement le fonctionnement de nos laboratoires. La raréfaction des matières premières et la diminution de la capacité de production impacteront directement les industries du plastique et de la chimie, toutes deux à même de nous fournir

en consommables et en réactifs. Le secteur des transports est également gravement menacé. Premier consommateur de pétrole dans notre pays, comment s'organisera-t-il pour importer les produits asiatiques et américains en attendant une hypothétique indépendance industrielle européenne alors que les réserves de carburant s'essoufflent ? Nous voyons bien avec les exemples de l'Ever-Given fin mars 2021 ou du Royaume-Uni fin septembre 2021 les conséquences d'un ralentissement de l'approvisionnement maritime et d'un blocage de quelques jours de la chaîne de transport.

Cette raréfaction de l'énergie et des matières premières, illustrée par la survenue chaque année plus précoce du « jour du dépassement » (29 juillet en 2021) est anticipée depuis plusieurs décennies par des scientifiques, des intellectuels et des hauts responsables industriels, à l'image du Club de Rome, commanditaire du célèbre « rapport Meadows » intitulé *The Limits to Growth* (Les limites à la croissance) au MIT. Il fut publié en 1972 pour explorer les possibles organisations de notre société mondialisée permettant d'assurer une vie juste, pacifique, équitable et décente à toute personne. Ses conclusions étaient claires : tous les scénarios recherchant une croissance continue et ne limitant pas l'industrie aboutissaient à un effondrement au milieu du XXI^{ème} siècle, ceci soit via une raréfaction des ressources, soit par une pollution insupportable (89). Comme disait Denis Meadows dans sa conférence du 1^{er} mars 2012 intitulée « *It is too late for sustainable development* » (Il est trop tard pour le développement durable), il était possible, 40 ans auparavant, de ralentir le rythme et d'éviter un scénario de déclin incontrôlé, soit le passage d'un système à l'équilibre dont les variations sont comprises dans des bornes maîtrisables, à une situation de rupture d'équilibre, ceci jusqu'à en trouver un nouveau. C'est ce qui est nommé, dans la littérature anglo-saxonne, un effondrement. Aujourd'hui, cela ne semble plus envisageable (90).

Le risque concernant le système sanitaire est donc bien celui d'une rupture d'approvisionnement, en énergie mais surtout en médicaments, en réactifs ou en consommables, ceci de manière bien plus importante qu'actuellement. Concernant la biologie moléculaire et la mise en place de notre technique, la question se pose donc de son impact et de sa pérennité dans un contexte délétère dont les biotechnologies sont à la fois responsables et victimes. Des études supplémentaires sont évidemment nécessaires pour estimer au mieux la balance entre les apports positifs et négatifs.

À la vue des connaissances évoquées précédemment, il paraît intéressant de se demander quelle est l'horizon de cette PCR, probablement mise en place courant 2022 : 2025 ? 2030 ? Cette technique, la biologie moléculaire, la biologie médicale et, plus globalement, le système de soins, seront-ils préservés et priorités lorsque l'énergie viendra à manquer et lorsque les décideurs devront effectuer des arbitrages avec l'économie, l'industrie, les transports, l'agriculture, la sécurité intérieure et extérieure ? Il s'agit ainsi de renforcer la résilience de notre modèle de soins, l'un des plus solidaires, équitables et performants du monde, face aux facteurs d'instabilité à venir. En effet, les conditions climatiques pour 2050 sont maintenant figées du fait de l'inertie du CO₂, mais la deuxième moitié du XXI^{ème} siècle, l'état de la biodiversité et l'organisation de nos sociétés restent encore à définir. Il est maintenant temps d'écouter la science et les scientifiques qui, malgré l'ignorance généralisée des dernières décennies, continuent de lutter pour nous alerter. Rejoignons la centaine de journaux scientifiques appelant à l'action pour limiter la hausse des températures, restaurer la biodiversité et protéger la santé globale, ceci sans attendre la fin de la pandémie actuelle. Tous reconnaissent la nécessité de changer de modèle, notamment de mode de consommation (91). J'aimerais ainsi que le serment porté à la suite de ce travail fasse écho à ces enjeux, participe à l'intégration de ces revendications dans la sphère médicale et rappelle à tous notre responsabilité : agissons-nous en faveur de l'intérêt général ou contre ?

4. CONCLUSION

Ce travail a permis de confirmer en situation réelle, au sein du laboratoire de parasitologie-mycologie du CHU d'Angers, les performances du kit de PCR Mucorales MucorGenius®. Les étapes préliminaires, le paramétrage informatique et les premiers tests étant finalisés, il reste encore à effectuer les trois étapes de validation de méthode avant d'envisager la mise en route hebdomadaire de la technique. Ces tests seront mis en œuvre dès que la tension en ressources humaines se sera apaisée, probablement durant l'hiver 2021-2022. L'évaluation médico-économique de l'internalisation de la PCR Mucorales a été effectuée en ce sens et a démontré la pertinence du projet. Le recrutement de personnel technique grâce aux économies générées apparaît bénéfique pour l'hôpital, que le budget alloué soit minimal avec 0,24 ETP pour ne subvenir qu'aux besoins de cette méthode, ou maximal avec 1 ETP, permettant de soutenir l'évolution du laboratoire.

Cette modernisation technique a par ailleurs été contextualisée et intégrée dans la dynamique de modernisation technologique des systèmes de soins au moment où la crise écologique touche l'ensemble des secteurs de nos économies et où les ressources fossiles ne sont plus désirables et profuses. L'intégration de ces problématiques dans l'évaluation médicale et la sortie d'une réflexion en vase clos permet d'observer les conséquences de l'augmentation des émissions de gaz à effet de serre, secondaire à l'amélioration technologique et à l'augmentation des moyens diagnostiques. Ainsi, deux préoccupations apparaissent : ces modalités *a priori* bénéfiques entraînent des effets indirects sur la santé humaine antinomiques à l'objectif premier du corps soignant (ne pas nuire) et leurs effets sur l'environnement mettent en péril les chaînes de production et logistiques nécessaires à leur fourniture. Des tensions sont donc éventuellement à prévoir dans les années à venir, sans pouvoir en préciser la temporalité dans ce court travail qui n'a comme seules prétentions que de prévenir et de motiver à l'engagement contre le dérèglement climatique.

BIBLIOGRAPHIE

1. Garcia-Hermoso D. Diagnostic microbiologique des mucormycoses. *médecine/sciences*. 2013;29:13-8.
2. Walther G, Wagner L, Kurzai O. Outbreaks of Mucorales and the species involved. *Mycopathologia*. 2020;185:765-81.
3. Lanternier F, Dannaoui E, Morizot G, Elie C, Garcia-Hermoso D, Huerre M, et al. A global analysis of mucormycosis in France: the RetroZygo Study (2005-2007). *Clin Infect Dis*. 2012;54(Suppl 1):S35-43.
4. Roden MM, Zaoutis TE, Buchanan WL, Knudsen TA, Sarkisova TA, Schaufele RL, et al. Epidemiology and outcome of zygomycosis: a review of 929 reported cases. *Clin Infect Dis*. 2005;41(5):634-53.
5. Jeong W, Keighley C, Wolfe R, Lee WL, Slavin MA, Kong DCM, et al. The epidemiology and clinical manifestations of mucormycosis: a systematic review and meta-analysis of case reports. *Clin Microbiol Infect*. 2019;25(1):26-34.
6. Bitar D, Lortholary O, Le Strat Y, Nicolau J, Coignard B, Tattévin P, et al. Population-based analysis of invasive fungal infections, France, 2001-2010. *Emerg Infect Dis*. 2014;20(7):1163-9.
7. Martínez-Herrera E, Julián-Castrejón A, Frías-De-León MG, Moreno-Coutiño G. Rhinocerebral mucormycosis to the rise? The impact of the worldwide diabetes epidemic. *An Bras Dermatol*. 2021;96(2):196-9.
8. Moorthy A, Gaikwad R, Krishna S, Hegde R, Tripathi KK, Kale PG, et al. SARS-CoV-2, uncontrolled diabetes and corticosteroids-An unholy trinity in invasive fungal infections of the maxillofacial region? A retrospective, multi-centric analysis. *J Maxillofac Oral Surg*. 2021;20(3):418-25.
9. Tissot F, Agrawal S, Pagano L, Petrikos G, Groll AH, Skiada A, et al. ECIL-6 guidelines for the treatment of invasive candidiasis, aspergillosis and mucormycosis in leukemia and hematopoietic stem cell transplant patients. *Haematologica*. 2017;102(3):433-44.
10. Risum M, Helweg-Larsen J, Petersen SL, Kampmann P, Overgaard UM, El Fassi D, et al. Introduction of a comprehensive diagnostic and interdisciplinary management approach in haematological patients with mucormycosis: A pre and post-intervention analysis. *J Fungi*. 2020;6(4):268.
11. Donnelly JP, Chen SC, Kauffman CA, Steinbach WJ, Baddley JW, Verweij PE, et al. Revision and update of the consensus definitions of Invasive Fungal Disease from the European Organization for Research and Treatment of Cancer and the Mycoses Study Group Education and Research Consortium. *Clin Infect Dis*. 2020;71(6):1367-76.
12. Hassan MIA, Voigt K. Pathogenicity patterns of mucormycosis: epidemiology, interaction with immune cells and virulence factors. *Med Mycol*. 2019;57(Suppl 2):S245-56.
13. Millon L, Herbrecht R, Grenouillet F, Morio F, Alanio A, Letscher-Bru V, et al. Early diagnosis and monitoring of mucormycosis by detection of circulating DNA in serum: retrospective analysis of 44 cases collected through the French Surveillance Network of Invasive Fungal Infections (RESSIF). *Clin Microbiol Infect*. 2016;22(9):810.e1-810.e8.
14. Millon L, Larosa F, Lepiller Q, Legrand F, Rocchi S, Daguindau E, et al. Quantitative polymerase chain reaction detection of circulating DNA in serum for early diagnosis of mucormycosis in immunocompromised patients. *Clin Infect Dis*. 2013;56(10):e95-101.

15. Liu M, Spellberg B, Phan QT, Fu Y, Fu Y, Lee AS, et al. The endothelial cell receptor GRP78 is required for mucormycosis pathogenesis in diabetic mice. *J Clin Invest*. 2010;120(6):1914-24.
16. Mohamedi N, Batteux F, Larger E. Le diabète altère-t-il vraiment les défenses immunitaires ? Polynucléaires neutrophiles et diabète. *Médecine Mal Métaboliques*. 2020;14(1):7-12.
17. Berrou J, Fougeray S, Venot M, Chardiny V, Gautier J-F, Dulphy N, et al. Natural killer cell function, an important target for infection and tumor protection, is impaired in type 2 diabetes. Ahlenstiel G, éditeur. *PLoS ONE*. 2013;8(4):e62418.
18. Knapp S. Diabetes and infection: Is there a link? - A mini-review. *Gerontology*. 2013;59(2):99-104.
19. Liu M, Lin L, Gebremariam T, Luo G, Skory CD, French SW, et al. Fob1 and Fob2 proteins are virulence determinants of *Rhizopus oryzae* via facilitating iron uptake from ferrioxamine. Cramer RA, éditeur. *PLoS Pathog*. 2015;11(5):e1004842.
20. Ibrahim AS, Spellberg B, Edwards J. Iron acquisition: a novel perspective on mucormycosis pathogenesis and treatment: *Curr Opin Infect Dis*. 2008;21(6):620-5.
21. Neblett Fanfair R, Benedict K, Bos J, Bennett SD, Lo Y-C, Adebajo T, et al. Necrotizing cutaneous mucormycosis after a tornado in Joplin, Missouri, in 2011. *N Engl J Med*. 2012;367(23):2214-25.
22. Rammaert B, Lanternier F, Zahar J-R, Dannaoui E, Bournoux M-E, Lecuit M, et al. Healthcare-associated mucormycosis. *Clin Infect Dis*. 2012;54(Suppl 1):S44-54.
23. Pilimis B, Alanio A, Lortholary O, Lanternier F. Recent advances in the understanding and management of mucormycosis. *F1000Research*. 2018;7:1429.
24. Dromer F. Rapport annuel d'activité 2020 - Centre national de référence Mycoses Invasives et Antifongiques.pdf [Internet]. Institut Pasteur; 2020 [cité 18 juin 2021]. Disponible sur: <https://www.pasteur.fr/fr/file/39845/download>
25. Gangneux J-P, Bournoux M-E, Hennequin C, Godet C, Chandenier J, Denning DW, et al. An estimation of burden of serious fungal infections in France. *J Mycol Médicale*. 2016;26(4):385-90.
26. Bitar D, Che D. Épidémiologie des mucormycoses en France métropolitaine, 1997-2010. *médecine/sciences*. 2013;29:7-12.
27. Bitar D, Cauteren DV, Lanternier F, Dannaoui E, Che D, Dromer F, et al. Increasing incidence of zygomycosis (mucormycosis), France, 1997-2006. *Emerg Infect Dis*. 2009;15(9):7.
28. Kontoyiannis DP, Yang H, Song J, Kelkar SS, Yang X, Azie N, et al. Prevalence, clinical and economic burden of mucormycosis-related hospitalizations in the United States: a retrospective study. *BMC Infect Dis*. 2016;16(1):730.
29. Skiada A, Pagano L, Groll A, Zimmerli S, Dupont B, Lagrou K, et al. Zygomycosis in Europe: analysis of 230 cases accrued by the registry of the European Confederation of Medical Mycology (ECMM) Working Group on Zygomycosis between 2005 and 2007. *Clin Microbiol Infect*. 2011;17(12):1859-67.
30. Hwang CJ, Katowitz WR, Volpe NJ. Orbital metallic mesh causing chronic intraocular foreign body and restrictive strabismus. *Ophthal Plast Reconstr Surg*. 2007;23(4):312-3.
31. Chaari A, Ghadoun H, Ben Algia N, Bahloul M, Bouaziz M. La mucormycose : une cause rare d'exophtalmie unilatérale. *J Mycol Médicale*. 2013;23(2):140-3.

32. Shao W, Zhang Z, Feng H, Liang C, Liu D. Pulmonary mucormycosis: a case of pulmonary arterial hypertension, Westermark sign, and bronchopleural fistula. *J Int Med Res.* 2020;48(11):1-6.
33. Carton L, Juste M, Desoubeaux G. Les mucormycoses. *Feuill Biol.* 2014;319:15-26.
34. Kaur H, Ghosh A, Rudramurthy SM, Chakrabarti A. Gastrointestinal mucormycosis in apparently immunocompetent hosts - A review. *Mycoses.* 2018;61(12):898-908.
35. Herbrecht R, Sabou M, Ledoux M-P. Aspects cliniques et radiologiques des mucormycoses. *médecine/sciences.* 2013;29:19-24.
36. Patel A, Kaur H, Xess I, Michael JS, Savio J, Rudramurthy S, et al. A multicentre observational study on the epidemiology, risk factors, management and outcomes of mucormycosis in India. *Clin Microbiol Infect.* 2020;26(7):944.e9-944.e15.
37. Corzo-León DE, Chora-Hernández LD, Rodríguez-Zulueta AP, Walsh TJ. Diabetes mellitus as the major risk factor for mucormycosis in Mexico: Epidemiology, diagnosis, and outcomes of reported cases. *Med Mycol.* 2018;56(1):29-43.
38. In the wake of India's Covid crisis, a 'black fungus' epidemic follows - The New York Times. [cité 25 sept 2021]; Disponible sur: <https://www.nytimes.com/2021/06/20/world/asia/india-covid-black-fungus.html>
39. Stone N, Gupta N, Schwartz I. Mucormycosis: time to address this deadly fungal infection. *Lancet Microbe.* 2021;2(8):e343-4.
40. Chamilos G, Lewis RE, Kontoyiannis DP. Delaying amphotericin B-based frontline therapy significantly increases mortality among patients with hematologic malignancy who have zygomycosis. *Clin Infect Dis.* 2008;47(4):503-9.
41. Klimko N, Khostelidi S, Shadrivova O, Volkova A, Popova M, Uspenskaya O, et al. Contrasts between mucormycosis and aspergillosis in oncohematological patients. *Med Mycol.* 2019;57(Suppl 2):S138-144.
42. Heimann SM, Vehreschild MJGT, Cornely OA, Heinz WJ, Grüner B, Silling G, et al. Healthcare burden of probable and proven invasive mucormycosis: a multi-centre cost-of-illness analysis of patients treated in tertiary care hospitals between 2003 and 2016. *J Hosp Infect.* 2019;101(3):339-46.
43. Schwarz P, Bretagne S, Gantier J-C, Garcia-Hermoso D, Lortholary O, Dromer F, et al. Molecular identification of zygomycetes from culture and experimentally infected tissues. *J Clin Microbiol.* 2006;44(2):340-9.
44. Dannaoui E, Schwarz P, Slany M, Loeffler J, Jorde AT, Cuenca-Estrella M, et al. Molecular detection and identification of zygomycetes species from paraffin-embedded tissues in a murine model of disseminated zygomycosis: A collaborative European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ESCMID) Fungal Infection Study Group (EFISG) evaluation. *J Clin Microbiol.* 2010;48(6):2043-6.
45. Kasai M, Harrington SM, Francesconi A, Petraitis V, Petraitiene R, Beveridge MG, et al. Detection of a molecular biomarker for zygomycetes by quantitative PCR assays of plasma, bronchoalveolar lavage, and lung tissue in a rabbit model of experimental pulmonary zygomycosis. *J Clin Microbiol.* 2008;46(11):3690-702.

46. Imbert S, Gauthier L, Joly I, Brossas J-Y, Uzunov M, Touafek F, et al. *Aspergillus* PCR in serum for the diagnosis, follow-up and prognosis of invasive aspergillosis in neutropenic and nonneutropenic patients. *Clin Microbiol Infect.* 2016;22(6):562.e1-562.e8.
47. Rocchi S, Scherer E, Mengoli C, Alanio A, Botterel F, Bougnoux ME, et al. Interlaboratory evaluation of *Mucorales* PCR assays for testing serum specimens: A study by the fungal PCR Initiative and the Modimucor study group. *Med Mycol.* 2021;59(2):126-38.
48. Scherer E, Iriart X, Bellanger AP, Dupont D, Guitard J, Gabriel F, et al. Quantitative PCR (qPCR) detection of *Mucorales* DNA in bronchoalveolar lavage fluid to diagnose pulmonary mucormycosis. Warnock DW, éditeur. *J Clin Microbiol.* 2018;56(8):e00289-18.
49. Salmanton-García J, Seidel D, Koehler P, Mellinghoff SC, Herbrecht R, Klimko N, et al. Matched-paired analysis of patients treated for invasive mucormycosis: standard treatment versus posaconazole new formulations (MoveOn). *J Antimicrob Chemother.* 2019;74(11):3315-27.
50. Guegan H, Iriart X, Bougnoux M-E, Berry A, Robert-Gangneux F, Gangneux J-P. Evaluation of MucorGenius® *mucorales* PCR assay for the diagnosis of pulmonary mucormycosis. *J Infect.* 2020;81(2):311-7.
51. Cruciani M, White PL, Mengoli C, Löffler J, Morton CO, Klingspor L, et al. The impact of anti-mould prophylaxis on *Aspergillus* PCR blood testing for the diagnosis of invasive aspergillosis. *J Antimicrob Chemother.* 2021;76(3):635-8.
52. Suarez F, Lortholary O, Buland S, Rubio MT, Ghez D, Mahe 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;46(11):3772-7.
53. Song G, Liang G, Liu W. Fungal co-infections associated with global COVID-19 pandemic: A clinical and diagnostic perspective from China. *Mycopathologia.* 2020;185(4):599-606.
54. Shigemura T, Nakazawa Y, Matsuda K, Motobayashi M, Saito S, Koike K. Evaluation of *Mucorales* DNA load in cerebrospinal fluid in a patient with possible cerebral mucormycosis treated with intravenous liposomal amphotericin B. *Int J Infect Dis.* 2014;29:200-2.
55. Imbert S, Brossas J-Y, Palous M, Joly I, Meyer I, Fekkar A. Performance of *Aspergillus* PCR in cerebrospinal fluid for the diagnosis of cerebral aspergillosis. *Clin Microbiol Infect.* 2017;23(11):889.e1-889.e4.
56. Baldin C, Soliman SSM, Jeon HH, Alkhazraji S, Gebremariam T, Gu Y, et al. PCR-based approach targeting *Mucorales*-specific gene family for diagnosis of mucormycosis. Warnock DW, éditeur. *J Clin Microbiol.* 2018;56(10):e00746-18.
57. Salehi E, Hedayati MT, Zoll J, Rafati H, Ghasemi M, Doroudinia A, et al. Discrimination of aspergillosis, mucormycosis, fusariosis, and scedosporiosis in formalin-fixed paraffin-embedded tissue specimens by use of multiple real-time quantitative PCR assays. Warnock DW, éditeur. *J Clin Microbiol.* 2016;54(11):2798-803.
58. Mouthon F, Chabanon O, Evans C, Servanton H, Maurisse R, Garcia C, et al. Panorama France Healthtech 2020 [Internet]. France biotech; 2020 [cité 25 sept 2021] p. 83. Disponible sur: <https://fr.calameo.com/read/006597052c88e9a1ca1ec>
59. Guide sectoriel pour la réalisation d'un bilan des émissions de gaz à effet de serre. Agence de l'Environnement et de la Maîtrise de l'Energie; 2015 mai p. 202. (Chimie).

60. Rousseau S. La consommation d'énergie dans l'industrie est stable en 2018, la facture s'accroît encore [Internet]. Insee; 2020 janv [cité 29 sept 2021] p. 7. (Insee Focus). Report No.: 179. Disponible sur: <https://www.insee.fr/fr/statistiques/4289935>
61. Bihouix P. Le bonheur était pour demain: les rêveries d'un ingénieur solitaire. Paris: Seuil; 2019.
62. Karliner J, Slotterback S, Boyd R, Ashby B, Steele K. L'EMPREINTE CLIMATIQUE DU SECTEUR DE LA SANTE.pdf [Internet]. Health Care Without Harm and Arup; 2019 sept [cité 21 sept 2021] p. 48. (Climate-Smart Healthcare). Report No.: Rapport vert n°1. Disponible sur: https://noharm-uscanada.org/sites/default/files/documents-files/6718/French_HealthCaresClimateFootprint_091619_web.pdf
63. Devroedt C. Bilan carbone CHU Grenoble Alpes [Internet]. Agence de l'Environnement et de la Maîtrise de l'Energie; 2018 [cité 3 mars 2020] p. 1. Disponible sur: <https://www.bilans-ges.ademe.fr/fr/bilandenligne/detail/index/idElement/4937/back/bilans>
64. Marraud L. Décarbonons la santé pour soigner durablement [Internet]. Paris: The Shift Project; 2021 p. 172. (Plan de transformation de l'économie française). Disponible sur: <https://theshiftproject.org/article/decarbonons-la-sante-rapport-intermediaire-shift/>
65. Vailles C. Datalab – Chiffres clés du climat – France et Monde [Internet]. Institut for climate economics; 2019 [cité 14 sept 2021] p. 80. Disponible sur: <https://www.i4ce.org/download/chiffres-cles-du-climat-2019-france-europe-et-monde/>
66. Accord de Paris [Internet]. United Nations Framework Convention on Climate Change; 2015 déc [cité 20 nov 2020] p. 28. Disponible sur: <https://unfccc.int/fr/processus-et-reunions/l-accord-de-paris/l-accord-de-paris>
67. Friedlingstein P, O'Sullivan M, Jones MW, Andrew RM, Hauck J, Olsen A, et al. Global Carbon Budget 2020. Earth Syst Sci Data. 11 déc 2020;12(4):3269-340.
68. Nationally determined contributions under the Paris Agreement [Internet]. United Nations Framework Convention on Climate Change; 2021 sept [cité 20 sept 2021] p. 42. Disponible sur: <https://unfccc.int/documents/268571>
69. Improving public health responses to extreme weather/heat-waves : EuroHEAT : technical summary. Copenhagen : WHO Regional Office for Europe: World Health Organization. Regional Office for Europe & European Commission.; 2009 p. 88.
70. Soubeyroux J-M, Bernus S, Corre L, Drouin A, Dubuisson B, Etchevers P, et al. Les nouvelles projections climatiques de référence pour la métropole - DRIAS 2020 [Internet]. Météo-France; 2019 sept [cité 13 mars 2021] p. 98. Disponible sur: <http://www.drias-climat.fr/accompagnement/sections/296>
71. Boucher O, Braconnot P, Masson-Delmotte V. Changement climatique : les résultats des nouvelles simulations françaises. CEA/CNRS/Météo France; 2019.
72. Philip SY, Kew SF, van Oldenborgh GJ, Yang W, Vecchi GA, Anslow FS, et al. Rapid attribution analysis of the extraordinary heatwave on the Pacific Coast of the US and Canada June 2021. :37.
73. World Weather Attribution. Western North American extreme heat virtually impossible without human-caused climate change. [Internet]. <https://www.worldweatherattribution.org>. 2021 [cité 10 sept 2021]. Disponible sur: <https://www.worldweatherattribution.org>
74. Mora C, Dousset B, Caldwell IR, Powell FE, Geronimo RC, Bielecki CR, et al. Global risk of deadly heat. Nat Clim Change. juill 2017;7(7):501-6.

75. Haines A, Ebi K. The Imperative for Climate Action to Protect Health. Solomon CG, éditeur. N Engl J Med. 17 janv 2019;380(3):263-73.
76. Pascal M, Chanel P de C, Corso M, Medina S, Wagner V, Gorla S, et al. Impacts de l'exposition chronique aux particules fines sur la mortalité en France continentale et analyse des gains en santé de plusieurs scénarios de réduction de la pollution atmosphérique [Internet]. Santé publique France; 2016 janv [cité 20 sept 2021] p. 162. Disponible sur: <https://www.santepubliquefrance.fr/determinants-de-sante/pollution-et-sante/air/documents/rapport-synthese/impacts-de-l-exposition-chronique-aux-particules-fines-sur-la-mortalite-en-france-continentale-et-analyse-des-gains-en-sante-de-plusieurs-scenarios>
77. Vohra K, Vodonos A, Schwartz J, Marais EA, Sulprizio MP, Mickley LJ. Global mortality from outdoor fine particle pollution generated by fossil fuel combustion: Results from GEOS-Chem. Environ Res. avr 2021;195:110754.
78. Organisation mondiale de la santé. Principaux repères sur le changement climatique et la santé [Internet]. <https://www.who.int/fr/news-room/fact-sheets/detail/climate-change-and-health>. 2021 [cité 19 sept 2021]. Disponible sur: <https://www.who.int/fr/news-room/fact-sheets/detail/climate-change-and-health>
79. Robin M-M. La fabrique des pandémies: Préserver la biodiversité, un impératif pour la santé planétaire. Paris: La Découverte; 2021.
80. Morand S. La prochaine peste: Une histoire globale des maladies infectieuses. Paris: Fayard; 2016.
81. Clement V, Rigaud KK, De Sherbinin A, Jones B, Adamo S, Schewe J, et al. Agir face aux migrations climatiques internes [Internet]. Banque internationale pour la reconstruction et le développement, Banque mondiale; 2021 [cité 27 sept 2021] p. 20. (Groundswell). Disponible sur: <https://www.banquemondiale.org/fr/news/press-release/2021/09/13/climate-change-could-force-216-million-people-to-migrate-within-their-own-countries-by-2050>
82. Institute for Economics & Peace. Ecological threat register 2020 [Internet]. Institute for Economics & Peace; 2020 sept [cité 27 sept 2021] p. 95. Disponible sur: https://www.visionofhumanity.org/wp-content/uploads/2020/10/ETR_2020_web-1.pdf
83. Missirian A, Schlenker W. Asylum applications respond to temperature fluctuations. Science. 22 déc 2017;358(6370):1610-4.
84. Joly A, Dugast C. L'État français se donne-t-il les moyens de son ambition climat ? [Internet]. Carbone 4; 2021 févr p. 246. Disponible sur: <https://www.carbone4.com/publication-letat-francais-se-donne-t-moyens-de-ambition-climat>
85. International energy agency. Global Energy Review 2021 [Internet]. International energy agency; 2021 [cité 20 sept 2021] p. 36. Disponible sur: <https://www.iea.org/reports/global-energy-review-2021>
86. IPCC, 2021: Summary for Policymakers. In: Climate Change 2021: The Physical Science Basis. Contribution of Working Group I to the Sixth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change [V., P. Zhai, A. Pirani, S. L. Connors, C. Péan, S. Berger, N. Caud, Y. Chen, L. Goldfarb, M. I. Gomis, M. Huang, K. Leitzell, E. Lonnoy, J.B.R. Matthews, T. K. Maycock, T. Waterfield, O. Yelekçi, R. Yu and B. Zhou (eds.)]. Cambridge University Press. In Press.
87. Rystad Energy. Wildcat safari running dry: Onshore success rate dips to lowest on record, falls for fourth year in a row [Internet]. <https://www.rystadenergy.com>. 2021 [cité 20 mars 2021]. Disponible sur: <https://www.rystadenergy.com/newsevents/news/press-releases/wildcat-safari-running-dry->

onshore-success-rate-dips-to-lowest-on-record-falls-for-fourth-year-in-a-row/?utm_campaign=&utm_content=&utm_medium=&utm_source=twitter

88. Auzanneau M. L'union européenne risque de subir des contraintes fortes sur les approvisionnements pétroliers d'ici à 2030 [Internet]. The Shift Project; 2020 juin [cité 14 mars 2021] p. 66. Disponible sur: <https://theshiftproject.org/article/ue-declin-approvisionnements-petrole-2030-etude/>
89. Meadows D, Meadows D, Randers J, Behrens W. The limits to growth [Internet]. Falls Church: Potomac Associates – Universe Books; 1972 [cité 2 juin 2021]. 205 p. Disponible sur: <http://www.donellameadows.org/wp-content/userfiles/Limits-to-Growth-digital-scan-version.pdf>
90. Meadows D. Perspectives on the Limits of Growth: It is too late for sustainable development [Internet]. Washington, DC 20024, USA; 2012 [cité 27 sept 2021]. Disponible sur: <https://www.youtube.com/watch?v=f2oyU0RusiA>
91. Atwoli L, Baqui AH, Benfield T, Bosurgi R, Godlee F, Hancocks S, et al. Call for emergency action to limit global temperature increases, restore biodiversity, and protect health. The Lancet. sept 2021;398(10304):939-41.

LISTE DES FIGURES

| | |
|--|----|
| Figure 1. Mucorale sur une tomate | 4 |
| Figure 2. Structures morphologiques des Mucorales | 5 |
| Figure 3. Mucormycose rhino-faciale | 10 |
| Figure 4. Mucormycose cutanée | 12 |
| Figure 5. Mucormycose disséminée | 14 |
| Figure 6. Signe du croissant gazeux et du halo inversé dans une mucormycose pulmonaire | 20 |
| Figure 7. Examen direct (imprégnation argentique de Gomori-Grocott) | 22 |
| Figure 8. Préparations histopathologiques montrant des filaments mycéliens de type Mucorale | 22 |
| Figure 9. Culture de Mucorale sur gélose de Sabouraud | 23 |
| Figure 10. Critères diagnostiques définis pour une IFI prouvée | 24 |
| Figure 11. Critères diagnostiques définis pour une IFI pulmonaire probable | 25 |
| Figure 12. Exemples d'interprétation des résultats de PCR Mucorales | 35 |
| Figure 13. Climatic conditions of recent lethal heat events | 52 |

LISTE DES TABLEAUX

| | |
|--|----|
| Tableau 1. Résultats de l'amplification de concentrations décroissantes d'ADN de <i>Rhizopus</i> sp. | 31 |
| Tableau 2. Résultats biologiques antérieurs des échantillons testés | 32 |
| Tableau 3. Indications d'interprétation du kit MucorGenius® | 33 |
| Tableau 4. Résultats de l'amplification avec le kit MucorGenius® | 34 |
| Tableau 5. Données économiques du personnel technique au laboratoire de mycologie d'Angers | 40 |
| Tableau 6. Comparaison des coûts liés à la PCR Mucorales | 42 |
| Tableau 7. Gains estimés après intégration de la PCR Mucorales au CHU d'Angers | 42 |

TABLE DES MATIERES

| | |
|---|-----------|
| INTRODUCTION | 1 |
| 1. GENERALITES..... | 3 |
| 1.1. Taxonomie et écologie des Mucorales..... | 3 |
| 1.2. Physiologie des espèces infectantes : interaction hôte-pathogène | 5 |
| 1.3. Epidémiologie..... | 7 |
| 1.4. Aspects cliniques | 9 |
| 1.4.1. Formes cliniques | 9 |
| 1.4.1.1. Forme rhino-orbitale primitive | 9 |
| 1.4.1.2. Forme pulmonaire primitive | 11 |
| 1.4.1.3. Forme cutanée primitive | 11 |
| 1.4.1.4. Forme gastro-intestinale primitive | 13 |
| 1.4.1.5. Forme disséminée | 13 |
| 1.5. Cas particuliers | 15 |
| 1.5.1. Pays en développement | 15 |
| 1.5.2. COVID-19..... | 15 |
| 1.6. Pronostic et mortalité | 16 |
| 1.7. Comparaison avec l'aspergillose pulmonaire invasive..... | 17 |
| 1.8. Coût économique | 18 |
| 1.9. Modalités du diagnostic | 19 |
| 1.9.1. Diagnostic conventionnel | 19 |
| 1.9.2. Place de la biologie moléculaire | 25 |
| 1.10. Traitement | 28 |
| 2. MISE EN PLACE DU KIT MUCORGENIUS® | 30 |
| 2.1. Etapes préliminaires | 30 |
| 2.2. Sélection des sérums | 31 |
| 2.3. Analyses et résultats..... | 32 |
| 2.4. Conclusions et perspectives..... | 34 |
| 3. DISCUSSION | 36 |
| 3.1. Apport à la prise en charge du patient et au laboratoire | 36 |
| 3.2. Apport pour l'hôpital : analyse médico-économique..... | 38 |
| 3.2.1. Coûts de l'analyse externalisée..... | 38 |
| 3.2.2. Coûts de l'analyse internalisée..... | 39 |
| 3.2.3. Perspectives sur 5 ans | 41 |
| 3.2.4. Conclusions de l'analyse médico-économique..... | 42 |
| 3.3. Perspectives..... | 43 |
| 3.3.1. Validation de la PCR sur le LBA | 43 |
| 3.3.2. Association avec la PCR aspergillose..... | 44 |
| 3.3.3. Extension future des moyens diagnostiques | 46 |
| 3.4. Contextualisation de l'apport de cette technique face aux enjeux bioclimatiques et énergétiques du XXI ^{ème} siècle | 47 |

| | |
|---------------------------------|-----------|
| 4. CONCLUSION..... | 59 |
| BIBLIOGRAPHIE..... | 60 |
| LISTE DES FIGURES | 67 |
| LISTE DES TABLEAUX..... | 67 |
| TABLE DES MATIERES | 68 |
| ANNEXES..... | |

ANNEXES

Annexe 1 : Critères d'identification des principaux genres pathogènes de Mucorales

| Genre | Aspect macroscopique | Aspect microscopique |
|---|--------------------------------------|--|
| <i>Rhizopus</i> | Texture floconneuse Blanc ou gris | Sporocyste sphérique multispore Columelle sans apophyse visible Rhizoïdes développés Sporocystophore en groupe non branché |
| <i>Lichtheimia</i> (ex. <i>Absidia</i>) | Texture floconneuse Gris | Sporocyste piriforme multispore Columelle avec apophyse conique Apophyse conique, parfois mélanisé Stolon et rhizoïdes en faible quantité |
| <i>Rhizomucor</i> | Texture floconneuse Gris | Sporocyste sphérique multispore Columelle sans apophyse visible Rhizoïdes simples Sporocystophore en groupe branché |
| <i>Cunninghamella</i> | Texture floconneuse Blanc | Sporangioles externes disposés sur une vésicule et libérant des sporangiospores Sporocystophore souvent ramifié |
| <i>Mucor</i> | Texture floconneuse Jaune | Sporocyste sphérique multispore Columelle sans apophyse visible Absence de rhizoïdes |

Annexe 2 : Contexte clinique des patients sélectionnés

| <u>Nom</u> | <u>Service</u> | <u>Terrain</u> | <u>Clinique et radiologie</u> | <u>Diagnostic retenu</u> | <u>Décès</u> |
|-------------------|---------------------------------------|---|--|--------------------------------------|---------------------|
| Patient 1 | Hématologie | Allogreffe de CSH sur LLC | Apyrétique, toux sèche et plaques de verre dépoli péri-hilaires bilatérales | Mucormycose possible | Non |
| Patient 2 | Hématologie puis Réanimation médicale | Aplasie secondaire à une chimiothérapie sur LAM | Choc septique sans documentation bactériologique | Mucormycose possible | 28/02/2021 |
| Patient 3 | Hématologie | LAM | Pneumopathie d'allure infectieuse au TDM | Aspergillose probable | 23/04/2021 |
| Patient 4 | Hématologie | LAM | Neutropénie fébrile et aspect TDM évoquant une IFI | Aucune documentation microbiologique | Non |
| Patient 5 | Réanimation médicale | LMMC allogreffée en échappement | Pancytopenie fébrile, détresse respiratoire aiguë et défaillance hémodynamique | Mucormycose possible | 14/11/2018 |
| Patient 6 | Oncologie | LAM | Fièvre, toux et collection sous cutanée fronto-nasale avec extension orbite et sinus | Aspergillose probable | 03/06/2019 |
| Patient 7 | Infectiologie | LMMC allogreffée en rémission + diabète | Fièvre isolée | Pneumocystose probable | Non |

Annexe 3 : Programme d'amplification et réglages du thermocycleur pour la PCR Mucorales

| Durée | Température | Fonction |
|--------------|--------------------|--------------------------------------|
| 2min | 95°C | Taq activation/dénaturation initiale |
| 15 sec | 94°C | Dénaturation |
| 60 sec | 58°C | Hybridation et extension |
| | | } PCR 45 cycles |

| MucorGenius® | Rotor-Gene (nm) | | LC480 II (nm) | | CFX96 | QS5 | Mic qPCR |
|---------------------|------------------------|------------------|----------------------|------------------|--------------|--------------------|-----------------|
| | Source | Détecteur | Source | Détecteur | | | |
| Mucorales spp. | 530 | 555 | 533 | 580 | HEX | 520-558 520-586 | Jaune |
| IC | 625 | 660 | 618 | 660 | CY5 | 640-682 | Rouge |

Annexe 4 : Exemples de comptes-rendus de PCR Mucorales au CHU d'Angers



Prescripteur : LABO PARASITO-MYCOLO

Nom : TEST

Prénom : PARASITOLOGIE

Né le : 25/04/2007 Sexe : M

Nom de naissance :

N° de dossier : 210031712 IEP :

Date et heure de prélèvement non renseignées,

Enregistrement du 16/02/2021 14:05

Pôle de Biologie - Pathologie

Département des Agents infectieux

UF de Parasitologie - Mycologie

Pr Jean-Philippe BOUCHARA

Dr Ludovic de GENTILE

Dr Bernard CIMON

Dr Marc PIHET

Dr Jean-Philippe LEMOINE

LABO PARASITO-MYCOLO (UF : 7018)

Antériorités

PARASITOLOGIE - MYCOLOGIE

Sérum

RECHERCHE DE MUCORALES PAR PCR

- PCR Mucorales :

PCR en Temps Réel, cible 28S rRNA, kit MucorGenius - PathoNostics.

- CT :

Présence d'ADN de Mucorales

32

Présence d'ADN de Mucorales, dont le diagnostic de genre ne peut être précisé en l'absence de culture positive.

PCR ciblant les genres les plus fréquemment incriminés en situation pathogène, à savoir Rhizopus, Rhizomucor, Lichtheimia, Mucor et Cunninghamella.

Vous avez bénéficié d'un examen biologique au laboratoire de Parasitologie-Mycologie du CHU d'Angers. L'établissement a également pour vocation de faire progresser les connaissances et de former les futurs professionnels de santé. Les informations contenues dans votre dossier médical peuvent être utilisées au sein de l'établissement à des fins statistiques ou de recherche en santé dans le respect de la confidentialité. Vous pouvez vous opposer à cette utilisation en le signalant au médecin ou au secrétariat du service. Vous pourrez à tout moment revenir sur cette décision. Ce refus sera enregistré dans votre dossier et n'aura pas d'impact sur votre prise en charge.

Dossier complet édité le 16 février 2021 à 14:34.

Accueil Pôle de Biologie CHU Angers

Téléphone : 02.41.35.53.61

Télécopie : 02.41.35.59.07

Page 1 / 1

Prescripteur : LABO PARASITO-MYCOLO

Nom : TEST

Prénom : PARASITOLOGIE

Né le : 25/04/2007 Sexe : M

Nom de naissance :

N° de dossier : 210031712 IEP :

Date et heure de prélèvement non renseignées,

Enregistrement du 16/02/2021 14:05

LABO PARASITO-MYCOLO (UF : 7018)

Antécédents

EXAMEN MYCOLOGIQUE ET PARASITOLOGIQUE

RECHERCHE DE MUCORALES PAR PCR

Prélèvement n° 21003171201 - Lavage broncho-alvéolaire

- PCR Mucorales :

IndéTECTABLE

PCR en Temps Réel, cible 28S rRNA, kit MucorGenius - PathoNestics.

Absence d'ADN de Mucorales dans l'échantillon analysé.

PCR ciblant les genres les plus fréquemment incriminés en situation pathogène, à savoir Rhizopus, Rhizomucor, Lichtheimia, Mucor et Cunninghamella.

Vous avez bénéficié d'un examen biologique au laboratoire de Parasitologie-Mycologie du CHU d'Angers. L'établissement a également pour vocation de faire progresser les connaissances et de former les futurs professionnels de santé. Les informations contenues dans votre dossier médical peuvent être utilisées au sein de l'établissement à des fins statistiques ou de recherche en santé dans le respect de la confidentialité. Vous pouvez vous opposer à cette utilisation en le signalant au médecin ou au secrétariat du service. Vous pourrez à tout moment revenir sur cette décision. Ce refus sera enregistré dans votre dossier et n'aura pas d'impact sur votre prise en charge.

Dossier complet édité le 16 février 2021 à 14:34.

Accueil Pôle de Biologie CHU Angers

Téléphone : 02.41.35.53.61

Télécopie : 02.41.35.59.07

Page 1 / 1

BRUNIER Julien

Diagnostic des mucormycoses par PCR au CHU d'Angers : mise en place du kit MucorGenius®, contextualisation économique et intégration des enjeux bioclimatiques et énergétiques du XXI^{ème} siècle.

RÉSUMÉ

Les mucormycoses, infections fongiques opportunistes émergentes, s'intègrent dans le spectre des infections fongiques invasives dont elles partagent la sévérité du pronostic et les difficultés diagnostiques. Leur expression clinique et radiologique peu spécifique permet rarement de les différencier formellement des aspergilloses invasives, tandis que les modalités diagnostiques actuelles présentent des performances limitées ou manquent de rapidité face à ces pathologies préoccupantes, dont le pronostic dépend essentiellement de la vitesse d'instauration du traitement antifongique.

La biologie moléculaire vient apporter, depuis une dizaine d'années, des perspectives nouvelles dans ce domaine. La PCR Mucorales sérique, qui ne nécessite pas de procédure invasive pour le patient, apporte en effet un gain de précocité dans le diagnostic. Cette technique est cependant actuellement externalisée, générant des délais de rendu de résultat non optimaux. Les performances du kit MucorGenius® ont ainsi été évaluées au sein du laboratoire de parasitologie-mycologie du CHU d'Angers, permettant d'envisager sa mise en place officielle début 2022, dès que les ressources humaines du service le permettront. L'amélioration de ces ressources peut être justifiée grâce à l'étude médico-économique de ce projet d'internalisation de la PCR, démontrant sa viabilité budgétaire jusqu'à l'embauche d'un technicien en équivalent temps plein. Cette ressource supplémentaire viendrait ainsi soutenir l'effort de modernisation du laboratoire et contribuer à l'élargissement du panel d'analyses proposé dans le cadre du diagnostic des infections fongiques invasives.

L'apport de cette technique nouvelle a été intégré aux problématiques écologiques bioclimatiques et aux enjeux énergétiques de ce début de XXI^{ème} siècle, permettant de rappeler le lien inéluctable entre l'industrie de nos produits de santé, notre consommation d'énergie et nos émissions de gaz à effet de serre. Ces dernières impactent la santé des populations et participent à la dégradation de notre environnement, jusqu'à mettre en danger la pérennité des systèmes de production et logistiques. Il apparaît donc nécessaire d'adopter une vision globale et d'intégrer ces enjeux dans notre considération du progrès sanitaire, au risque d'être surpris par des ruptures prévisibles dont les premières victimes seront les patients.

Mots-clés : Mucormycoses, Mucorales, PCR, évaluation médico-économique, climat, énergie, croissance.

Diagnosis of mucormycosis by PCR at Angers University Hospital: implementation of the MucorGenius® kit, economic contextualization and integration of the bioclimatic and energy challenges of the 21st century.

ABSTRACT

Mucormycosis are emerging opportunistic fungal infections that are part of invasive fungal infections ; they share with them the severity of the prognosis and the diagnostic difficulties. Their clinical and radiological expression are rarely specific and do not allow formally the differentiation with invasive aspergillosis. Moreover, the current diagnostic methods for these extremely serious diseases present limited performances or are not fast enough. However, their prognosis mainly depends on the rapidity of initiation of an antifungal treatment.

Molecular biology has brought new perspectives in this field for the past ten years. The Mucorales PCR on serum, which does not require any invasive procedure for the patient, really enables an earlier diagnosis. This technique is currently outsourced, generating delays in rendering results. The performances of the MucorGenius® kit were thus evaluated in the parasitology-mycology laboratory of the Angers University Hospital, allowing its official implementation to be considered in early 2022, as soon as the human resources of the department will allow it. The improvement of these resources may be justified due to the medico-economic study of the project of internalization of the PCR, which demonstrates its budgetary viability until the hiring of a full-time technician. This additional resource would thus support the effort to modernize the laboratory and contribute to the expansion of the range of analyzes that are proposed for diagnosis of invasive fungal infections.

The contribution of this new technique has been integrated into the bioclimatic ecological issues and energy issues of the beginning of the 21st century. So, the ineluctable link between the industry of our health products, our energy consumption and our emissions of greenhouse gas, has been reminded. The latter have an impact on the health of populations and contribute to the degradation of our environment, until endangering the sustainability of production and logistics systems. Therefore, it appears necessary to adopt a global vision and to integrate these issues into our consideration of health progress, at the risk of being surprised by foreseeable ruptures, the first victims of which will be the patients.

Keywords : Mucormycosis, Mucorales, PCR, medico-economic evaluation, climate, energy, growth