



**HAL**  
open science

**Infections fongiques compliquant les hémopathies et les greffes de cellules souches : incidence, facteurs de risque, mortalité, et développement de scores prédictifs décisionnels pour améliorer la pertinence des prophylaxies**

Christine Robin

► **To cite this version:**

Christine Robin. Infections fongiques compliquant les hémopathies et les greffes de cellules souches : incidence, facteurs de risque, mortalité, et développement de scores prédictifs décisionnels pour améliorer la pertinence des prophylaxies. Médecine humaine et pathologie. Université Paris-Est, 2018. Français. NNT : 2018PESC0056 . tel-01952983

**HAL Id: tel-01952983**

**<https://theses.hal.science/tel-01952983>**

Submitted on 12 Dec 2018

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

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

Université Paris-Est

Ecole Doctorale Science de la Vie et de la Santé

Thèse de doctorat

Pathologie et Recherche Clinique

**Infections fongiques compliquant les hémopathies et les greffes de cellules souches :  
incidence et facteurs de risque**

**Christine ROBIN**

Soutenue le 12/06/2018

**Jury**

Pr Raoul HERBRECHT	Rapporteur
Dr Fanny LANTERNIER	Rapporteur
Pr Florence CANOUI-POITRINE	Examineur
Dr Jean-Henri BOURHIS	Examineur
Pr Anne TOTET	Examineur
Pr Catherine CORDONNIER	Examineur
Pr Sébastien MAURY	Directeur de thèse
Pr Sylvie BASTUJI-GARIN	Co-directeur de thèse

## Remerciements

Au Pr Catherine Cordonnier, qui m'a accueillie dans son service et m'a guidée depuis 5 ans. Pour le savoir et la rigueur qu'elle m'a transmis. Pour tout le temps qu'elle m'a consacré avec bienveillance. Pour son exemplarité à bien des égards.

Au Pr Sébastien Maury, qui m'a co-encadrée pour ce travail. Pour la confiance qu'il me donne. Pour m'avoir donné les moyens et le temps de réaliser cette thèse.

Au Pr Sylvie Bastuji-Garin, qui m'a co-encadrée pour ce travail. Pour m'avoir formée à la méthodologie et aux statistiques. Pour m'avoir accueillie dans son service pendant un an afin de m'immerger dans les statistiques.

Au Dr Fanny Lanternier, pour avoir accepté de juger ce travail. J'espère que cette thèse sera suivie de collaborations autour du champignon.

Au Pr Raoul Herbrecht, pour avoir accepté de juger ce travail malgré la distance et les grèves de transport. C'est un honneur pour moi de la part du maître français de l'aspergillose.

Au Dr Jean-Henri Bourhis, pour avoir accepté de juger ce travail. Pour ses conseils judicieux au cours du comité de suivi de thèse.

Au Pr Florence Canoui-Poitrine, pour avoir accepté de juger ce travail. Pour ses conseils judicieux au cours du comité de suivi de thèse. Pour son enthousiasme.

Au Pr Anne Totet, pour avoir accepté de juger ce travail. C'est dans votre laboratoire que j'ai découvert que la mycologie était un art.

Au Pr Stéphane Bretagne, pour m'avoir permis de travailler à partir du registre SAIF et pour avoir accepté immédiatement de participer à l'étude sur les pneumocystoses. Pour ses conseils avisés.

Au Dr Alexandre Alanio, pour ses conseils précieux et pour avoir génotypé tous les pneumocystis.

Au Pr Olivier Lortholary, qui m'a fait découvrir l'infectiologie et m'a permis de travailler à partir du registre SAIF.

Au Pr Françoise Dromer, pour m'avoir permis de travailler à partir du registre SAIF.

A tous les cliniciens et biologistes ayant participé au programme SAIF : Daniel Ajzenberg, Marie-Thérèse Baixench, Marc Bernard, Anne-Lise Bienvenu, Karine Bilger, Marie-Elisabeth Bougnoux, Patrice Ceballos, Jacques Chandenier, Patrice Chevallier, Etienne Daguindau, Gandhi Damaj, Eric Dannaoui, Marguerite Fines, Jean-Pierre Gangneux, Martine Gari-Toussaint, Françoise Gay Andrieu, Gaelle Guillerm, Catherine Kauffman, Claire Lacroix, Bernadette Lebeau, Valerie Letscher, Marie Machouart, Natacha Maillard, Mauricette Michallet, Laurence Million, Frédérique de Monbrison, Jean-Louis Poirot, Dorothée Quinio, Stéphane Ranque, Pierre-Simon Rohrlisch, Marie-Thérèse Rubio, Gérard Socié, Yvon Sterkers, Felipe Suarez, Anne Thiebaud-Bertrand, et Pascal Turlure .

A Nicole Raus, qui m'a donné accès à ProMise et pour le temps consacré.

Au Pr Régis Peffaut de Latour qui a validé le projet au sein de la SFGM-TC.

Au Dr Anne Hulin, pour les collaborations passées et futures, toujours enrichissantes et très agréables.

A mes collègues d'hématologie clinique Florence Beckerich, Mathieu Leclerc, Lydia Roy, Cécile Pautas, Andréa Toma, Rabah Redjoul et Selwa Bouledroua avec lesquels je partage les moments heureux aussi bien que les moments parfois durs de la clinique.

Au Dr Nadia Oubaya, à Lauriane Segaux, Emmanuelle Boutin et Richard Layese pour leurs nombreux conseils, toujours précieux et judicieux. Merci d'avoir toujours été présents et de m'avoir aussi bien accueillie.

A mes parents pour leur soutien et leur relecture.

A Ivan, pour son indéfectible soutien. A mon fidèle coach, toujours présent et toujours pertinent. Pour tes encouragements et ta présence dans les bons et les mauvais moments.

A Gabriel pour ta joie de vivre qui est le meilleur des remontants. C'est toi ma plus belle réussite, j'ai juste mis un peu trop de mitochondries.

## Résumé en français

Les infections fongiques sont une complication fréquente des patients d'hématologie et en particulier des patients ayant reçu une greffe de cellules souches hématopoïétiques (CSH). L'objectif de ce travail était d'identifier les facteurs de risque intrinsèques d'infections fongiques et les modalités de leur transmission.

Nous avons d'abord étudié l'aspergillose invasive (AI) qui est l'infection fongique la plus fréquente chez les greffés de CSH en croisant les données du registre européen des greffés ProMise et la base de données de l'étude prospective SAIF. Nous avons mené une étude cas-témoins nichée dans une cohorte de 185 cas et 651 témoins appariés. Les facteurs associés à la survenue d'une aspergillose étaient l'irradiation corporelle totale, une GvH aiguë de grade  $\geq 2$  et la rechute de l'hémopathie. Trente-cinq cas étaient précoces ( $< J40$ ), 33 tardifs (entre  $J40$  et  $J100$ ) et 117 très tardifs ( $> J100$ ). Le facteur associé à la survenue d'une AI précoce était l'absence de prise de greffe. Le facteur associé à la survenue d'une AI tardive était la GvH aiguë de grade 3-4. Les facteurs associés à la survenue d'une AI très tardive étaient la GvH aiguë de grade  $\geq 2$ , la rechute et la neutropénie secondaire. Tous les facteurs pré-greffe étaient effacés par les facteurs post-greffe.

Puis nous avons étudié la transmission d'infection fongique par l'étude d'une épidémie de pneumocystose survenue dans le service. Douze cas de pneumocystose sont survenus en 7 mois dans le service soit beaucoup plus qu'au cours des années précédentes. L'analyse moléculaire a permis de montrer que 4 cas appartenaient au même génotype, qui est un génotype rare jamais décrit dans une série de plus de 300 génotypes en Europe. La carte de transmission a permis de constater que ces 4 patients se sont rencontrés uniquement en hôpital de jour. Cette étude est la première démonstration moléculaire d'une épidémie de pneumocystose dans un service d'hématologie.

## Résumé en anglais

Fungal infections are a common complication of hematology patients and especially in hematopoietic stem cell transplantation (HSCT) recipients. The objective of this work was to identify intrinsic risk factors for fungal infections and transmission.

We first studied invasive aspergillosis (IA), which is the most common fungal infection after HSCT by crossing data from the European HSCT registry ProMise and the prospective study database SAIF. We conducted a nested case-control study in a cohort of 185 cases and 651 matched controls. Factors associated with onset of aspergillosis were total body irradiation, acute GVHD grade  $\geq 2$ , and relapse of the underlying disease. Thirty-five IA were early ( $< D40$ ), 33 late (between  $D40$  and  $D100$ ) and 117 very late ( $> D100$ ). The factor associated with the occurrence of an early IA was the absence of engraftment. The factor associated with the occurrence of late IA was acute grade 3-4 GvH. Factors associated with the occurrence of very late IA were acute GVHD grade  $\geq 2$ , relapse, and secondary neutropenia. All pre-transplant factors were supplanted by post-transplant factors.

Then we studied the transmission of fungal infection by studying a pneumocystosis outbreak occurring in the hematology department. Twelve cases occurred within 7 months. Molecular analysis showed that 4 of them belonged to the same genotype, which is a rare genotype never described in a series of more than 300 genotypes in Europe. The transmission map permitted to identify that these 4 patients met only in the daycare center. This study is the first molecular demonstration of a pneumocystis outbreak in a hematology ward.

## Mots-clé français

Infection fongique invasive

Aspergillose invasive

Facteurs de risque

Greffe de cellules souches hématopoïétiques

*Pneumocystis jirovecii*

Epidémie

Hématologie

## Mots-clé anglais

Invasive fungal infection

Invasive aspergillosis

Risk factor

Hematopoietic stem cell transplantation

*Pneumocystis jirovecii*

Outbreak

Hematology

## **Laboratoire d'accueil**

Institut Mondor de Recherche Biomédicale (IMRB)

INSERM U955 – Equipe 21

Hôpital Henri Mondor

51 ave du Maréchal de Lattre de Tassigny

94000 CRETEIL

## Table des matières

I.	Introduction .....	19
A.	Infections fongiques invasives et aspergilloses.....	19
1.	Définition des infections fongiques invasives .....	19
2.	Incidence des infections fongiques invasives .....	22
3.	L'aspergillose invasive, la plus fréquente des infections fongiques invasives après greffe de cellules souches hématopoïétiques .....	23
4.	Les aspergilloses surviennent de plus en plus tardivement après allogreffe .....	25
5.	Physiopathologie .....	26
6.	Clinique .....	29
7.	Outils diagnostiques .....	30
8.	Traitement .....	32
9.	Mortalité .....	33
10.	Facteurs de risque .....	36
11.	Prophylaxies .....	43
12.	Pourquoi les infections fongiques invasives augmentent-elles ?.....	46
13.	Objectifs de l'étude des facteurs de risque d'aspergillose chez les patients allogreffés .....	47
B.	Pneumopathies à pneumocystis (PcP) .....	49
1.	Définition et clinique .....	49
2.	Diagnostic .....	52
3.	Physiopathologie .....	60
4.	Traitement .....	60
5.	Mortalité .....	63
6.	Facteurs de mauvais pronostic .....	64

7.	Facteurs de risque .....	64
8.	Prophylaxie .....	65
9.	Incidence des PcP en augmentation.....	67
10.	Objectifs de l'étude pneumocystose .....	68
C.	Objectifs de la thèse .....	69
II.	Facteurs de risque d'AI chez les patients allogreffés.....	70
A.	Méthodes .....	70
1.	Schéma de l'étude .....	70
2.	Cas.....	70
3.	Témoins .....	72
4.	Collection des données.....	73
5.	Analyse statistique.....	73
B.	Résultats.....	79
1.	Caractéristiques des patients .....	79
2.	Facteurs pré- et post- greffe associés au risque d'AI .....	82
3.	Facteurs pré- et post-greffe associés à la survenue d'une AI précoce, tardive et très tardive .....	84
4.	Survie .....	93
C.	Discussion.....	96
1.	Discussion des résultats.....	96
2.	Différences entre nos observations et les données de la littérature.....	99
3.	Forces et limites.....	100
D.	Conclusion .....	104
III.	Etude d'une épidémie de <i>Pneumocystis jirovecii</i> dans un service d'hématologie .....	105
A.	Introduction.....	105
B.	Méthodes .....	106

C.	Résultats .....	108
1.	Caractéristiques des patients .....	108
2.	Génotypages de <i>Pneumocystis jirovecii</i> .....	112
3.	Carte de transmission .....	112
D.	Discussion .....	124
1.	Définition d'une épidémie .....	124
2.	Investigation d'une épidémie .....	124
3.	Source de l'épidémie .....	127
4.	Mode de transmission .....	128
5.	Réservoir .....	130
6.	Variation saisonnière .....	130
7.	Identification de la population à risque .....	131
8.	Les mesures prises .....	131
E.	Conclusion .....	135
IV.	Conclusion .....	141
V.	Bibliographie .....	142

## Figures

Figure 1 Critères d'hôte, critères cliniques et critères mycologiques de la définition des infections fongiques de l'EORTC-MSG 2008. (De Pauw, Walsh et al. 2008).....	21
Figure 2 Classification des infections fongiques invasives selon les critères EORTC-MSG 2008 (d'après (De Pauw, Walsh et al. 2008)).....	22
Figure 3 Réponse immunitaire contre <i>Aspergillus fumigatus</i> (Al-Bader and Sheppard 2016)	27
Figure 4 Réponse immunitaire après inhalation de spores d'aspergillus, (Segal 2009) .....	28
Figure 5 Aspect tomodensitométrique d'une aspergillose invasive, (Segal 2009). A : signe du halo, B : signe du croissant gazeux.....	29
Figure 6 : Examen direct d'un lavage broncho-alvéolaire montrant des filaments de type aspergillaire. La culture permettra l'identification d'un <i>Aspergillus fumigatus</i> .....	30
Figure 7 Courbe de survie de l'essai Voriconazole versus Amphotéricine B deoxycholate. (Herbrecht, Denning et al. 2002) .....	34
Figure 8 Les deux périodes à risque d'infection fongique au décours d'une allogreffe de CSH d'après Kontoyiannis CID 2010 (Kontoyiannis, Marr et al. 2010) .....	37
Figure 9 Facteurs de risque d'aspergillose (Herbrecht, Bories et al. 2012) .....	38
Figure 10 Scanner d'une pneumocystose (Vogel, Vatlach et al. 2012).....	50
Figure 11 Scanner d'une pneumocystose (Vogel, Vatlach et al. 2012).....	50
Figure 12 Scanner d'une pneumocystose (Vogel, Vatlach et al. 2012).....	51
Figure 13 Scanner d'une pneumocystose (Vogel, Vatlach et al. 2012).....	51
Figure 14 Examen direct de lavage broncho-alvéolaire montrant des kystes de <i>Pneumocystis jirovecii</i> (coloration Gomori-Grocott).....	53

Figure 15 Algorithme diagnostique des pneumocystoses chez les patients non VIH, recommandations européennes de l'ECIL. (Alanio, Hauser et al. 2016) .....	59
Figure 16 : Date de survenue des aspergilloses invasives .....	79
Figure 17 Diagramme de flux .....	80
Figure 18 Courbe de survie de Kaplan-Meier des cas et des témoins .....	93
Figure 19 Courbe de survie de Kaplan-Meier des cas et des témoins avec stratification sur la date d'apparition de l'aspergillose (2005-2007 versus 2008-2010) .....	94
Figure 20 Survie globale en fonction du délai de survenue de l'aspergillose invasive .....	95
Figure 21 Analyse des microsatellites de 6 marqueurs nucléaires. La taille des produits de PCR obtenus par dépend du nombre de répétitions en tandem au niveau de chaque marqueur et définit un allèle. D'après (Gits-Muselli, Peraldi et al. 2015) .....	107
Figure 22 Génotypage de <i>Pneumocystis jirovecii</i> . Une combinaison d'un allèle spécifique par marqueur définit un génotype. Un génotype peut être identifié si tous les allèles sont uniques pour un marqueur (génotype pur) ou si plusieurs allèles sont retrouvés pour un seul marqueur (génotype multiple). Si plusieurs allèles sont observés pour plus d'un marqueur, le génotype est impossible à déterminer. ....	107
Figure 23 Nombre de cas de pneumocystose observés dans le service d'hématologie de 2013 à 2016.....	109
Figure 24 Carte de transmission des quatre patients infectés par le génotype 2 .....	115
Figure 25 Salle de soins commune de l'hôpital de jour .....	126
Figure 26 Salle d'attente de l'hôpital de jour.....	126
Figure 27 Salle de repas de l'hôpital de jour attenante à la salle d'attente .....	127

## Tableaux

Tableau 1 Différences entre les pneumocystoses des patients VIH+ et VIH-. (Cordonnier, Cesaro et al. 2016).....	49
Tableau 2 Traitement de 1 <sup>ère</sup> ligne des pneumocystoses pour les patients non VIH selon les recommandations de l'ECIL. (Maschmeyer, Helweg-Larsen et al. 2016) .....	61
Tableau 3 Traitement de 2 <sup>e</sup> ligne des pneumocystoses pour les patients non VIH selon les recommandations de l'ECIL. (Maschmeyer, Helweg-Larsen et al. 2016) .....	62
Tableau 4 Choix des molécules pour la prophylaxie des patients d'hématologie, recommandations de l'ECIL. (Maertens, Cesaro et al. 2016).....	67
Tableau 5 Liste des centres et nombre de cas par centre .....	72
Tableau 6 Facteurs pré- et post-greffe associés à la survenue d'une aspergillose invasive (analyse univariée) .....	76
Tableau 7 Analyse descriptive des facteurs pré-greffe complémentaires.....	81
Tableau 8 Analyse multivariée des facteurs pré- et post-greffe associés à la survenue d'une aspergillose.....	83
Tableau 9 Analyse univariée des facteurs pré- et post-greffe en fonction du délai de survenue de l'aspergillose invasive.....	85
Tableau 10 Analyse multivariée des facteurs pré- et post-greffe associés à la survenue d'une AI précoce.....	88
Tableau 11 Analyse multivariée des facteurs pré- et post-greffe associés à la survenue d'une AI tardive .....	89
Tableau 12 Analyse multivariée des facteurs pré- et post-greffe associés à la survenue d'une AI très tardive .....	90
Tableau 13 Analyse multivariée des facteurs pré- et post-greffe associés à la survenue d'une AI selon la date .....	92

Tableau 14 Caractéristiques des patients .....	110
Tableau 15 Résultats biologiques des 12 patients .....	113

## Annexes

Annexe 1 Molecular Demonstration of a Pneumocystis Outbreak in stem cell transplant patients : evidence for transmission in the daycare center (Robin, Alanio et al. 2017). .....	116
Annexe 2 Plasma concentrations of atovaquone given to immunocompromised patient to prevent <i>Pneumocystis jirovecii</i> . (Robin, Le et al. 2017).....	136

## Abréviations

AI	Aspergillose invasive
CMV	Cytomégalovirus
CNIL	Commission nationale de l'informatique et des libertés
CSH	Cellules souches hématopoïétiques
EBMT	European Society for Blood and Marrow Transplantation
ECIL	European Conference on Infections in Leukaemia
ECOG-PS	Eastern Cooperative Oncology Groupe Performans status
GvH	Réaction du Greffon contre l'Hôte (Graft-versus-Host disease)
IC <sub>95%</sub>	Intervalle de confiance à 95%
ICT	Irradiation corporelle totale
IFI	Infection fongique invasive
IV	Intraveineux
LA	Leucémie aiguë
LAM	Leucémie aiguë myéloïde
LAL	Leucémie aiguë lymphoblastique
LBA	Lavage broncho-alvéolaire
NFS	Numération formule sanguine
OR	Odd ratio
ORa	Odd ratio ajusté
PcP	Pneumocystose
PO	Per os

SAIF	Surveillance des aspergilloses invasives en France
SMD	Syndrome myélodysplasique
TMP/SMX	Triméthoprime/Sulfaméthoxazole
VPN	Valeur prédictive négative
VPP	Valeur prédictive positive

## I. Introduction

### A. Infections fongiques invasives et aspergilloses

Les infections fongiques invasives (IFI) représentent une complication grave de l'allogreffe de cellules souches hématopoïétiques (CSH). La plus fréquente d'entre elles en France est l'aspergillose invasive (AI). Les moyens diagnostiques et thérapeutiques ont évolué sur les 25 dernières années : apparition de nouveaux outils diagnostiques et de nouvelles molécules antifongiques. Ceci change les perspectives et incite à réfléchir sur les stratégies de prise en charge des IFI au cours de l'allogreffe. Tous les allogreffés partent-ils à J0 de la greffe avec le même risque ? Doit-on appliquer la même stratégie à tous ? Les stratégies élaborées dans les années 2000 sont-elles toujours d'actualité ? Pour tenter de répondre à ces questions il est important d'étudier précisément les facteurs de risque d'AI au décours de l'allogreffe : à partir des données disponibles à J0 de la greffe (facteurs pré-greffe) puis avec les données de l'évolution (facteurs post-greffe).

#### 1. Définition des infections fongiques invasives

Les infections fongiques invasives sont des infections touchant principalement l'immunodéprimé. Leur diagnostic est difficile malgré l'apparition de nouveaux outils. Chez les patients d'hématologie, les IFI (hors *Pneumocystis jirovecii*) sont classées selon les critères EORTC-MSG 2008 (De Pauw, Walsh et al. 2008) en IFI prouvées, probables et possibles. Les critères d'hôte (Figure 1) correspondent au terrain connu comme étant un facteur de risque. Les critères cliniques correspondent aux signes cliniques ou radiologiques d'IFI. Les critères mycologiques correspondent à des marqueurs directs (examen direct, culture) ou indirects (galactomannane,  $\beta$ -D-glucane). Une infection prouvée (Figure 2) est définie par un examen histologique positif ou la culture positive d'un site normalement stérile. Une infection probable est définie par la présence d'un critère d'hôte, un critère clinique et un critère mycologique. Une infection possible est définie par la présence d'un critère d'hôte et d'un critère clinique. Ces critères ont été élaborés pour les études, en particulier pour homogénéiser les définitions dans les essais thérapeutiques. La PCR aspergillus qui n'était

pas standardisée en 2008 ne faisait pas partie des critères mycologiques. Cette classification est actuellement en cours de révision mais les nouveaux critères ne sont pas encore publiés.

Ces définitions ne prennent pas en compte les infections à *Pneumocystis jirovecii*, autre champignon responsable de pneumopathies sévères chez les patients d'hématologie.

## Criteria for probable invasive fungal disease except for endemic mycoses

---

### Host factors<sup>a</sup>

Recent history of neutropenia ( $<0.5 \times 10^9$  neutrophils/L [ $<500$  neutrophils/mm<sup>3</sup>] for  $>10$  days) temporally related to the onset of fungal disease

Receipt of an allogeneic stem cell transplant

Prolonged use of corticosteroids (excluding among patients with allergic bronchopulmonary aspergillosis) at a mean minimum dose of 0.3 mg/kg/day of prednisone equivalent for  $>3$  weeks

Treatment with other recognized T cell immunosuppressants, such as cyclosporine, TNF- $\alpha$  blockers, specific monoclonal antibodies (such as alemtuzumab), or nucleoside analogues during the past 90 days

Inherited severe immunodeficiency (such as chronic granulomatous disease or severe combined immunodeficiency)

### Clinical criteria<sup>b</sup>

#### Lower respiratory tract fungal disease<sup>c</sup>

The presence of 1 of the following 3 signs on CT:

Dense, well-circumscribed lesions(s) with or without a halo sign

Air-crescent sign

Cavity

#### Tracheobronchitis

Tracheobronchial ulceration, nodule, pseudomembrane, plaque, or eschar seen on bronchoscopic analysis

#### Sinonasal infection

Imaging showing sinusitis plus at least 1 of the following 3 signs:

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

#### CNS infection

1 of the following 2 signs:

Focal lesions on imaging

Meningeal enhancement on MRI or CT

#### Disseminated candidiasis<sup>d</sup>

At least 1 of the following 2 entities after an episode of candidemia within the previous 2 weeks:

Small, target-like abscesses (bull's-eye lesions) in liver or spleen

Progressive retinal exudates on ophthalmologic examination

### Mycological criteria

#### Direct test (cytology, direct microscopy, or culture)

Mold in sputum, bronchoalveolar lavage fluid, bronchial brush, or sinus aspirate samples, indicated by 1 of the following:

Presence of fungal elements indicating a mold

Recovery by culture of a mold (e.g., *Aspergillus*, *Fusarium*, *Zygomycetes*, or *Scedosporium* species)

#### Indirect tests (detection of antigen or cell-wall constituents)<sup>e</sup>

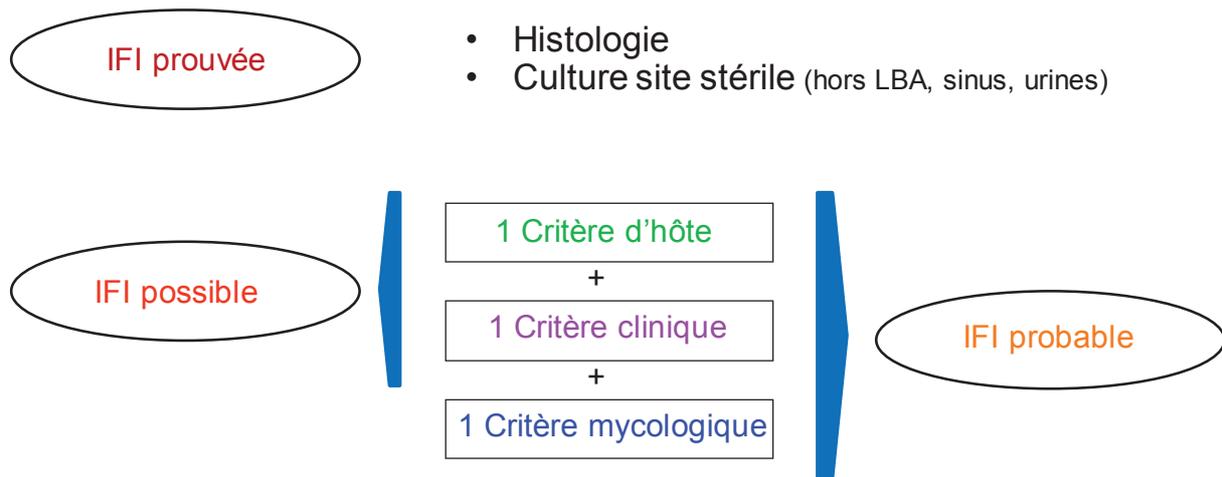
##### Aspergillosis

Galactomannan antigen detected in plasma, serum, bronchoalveolar lavage fluid, or CSF

Invasive fungal disease other than cryptococcosis and zygomycoses

$\beta$ -D-glucan detected in serum

**Figure 1** Critères d'hôte, critères cliniques et critères mycologiques de la définition des infections fongiques de l'EORTC-MSG 2008. (De Pauw, Walsh et al. 2008)



**Figure 2** Classification des infections fongiques invasives selon les critères EORTC-MSG 2008 (d'après (De Pauw, Walsh et al. 2008))

## 2. Incidence des infections fongiques invasives

Les infections fongiques invasives sont une complication fréquente chez les patients d'hématologie et en particulier au décours de l'allogreffe de cellules souches hématopoïétiques, avec une incidence allant de 5 à 20% en fonction du centre et du type de greffe.

Une étude rétrospective réalisée en Espagne de 1996 à 1999 rapportait 12% d'IFI après allogreffe génoidentique ayant pour source cellulaire des cellules souches périphériques (50 épisodes d'IFI chez 46 patients pour 395 allogreffes) (Martino, Subira et al. 2002). Aux Etats-Unis, une étude rétrospective de 1997 à 2001 (Fukuda, Boeckh et al. 2003) concernant des allogreffes non myéloablatives rapportait 19% d'IFI à 1 an (31/163), 15% d'infections fongiques invasives à filamenteux (25/163), dont 14% d'aspergillose invasive (23/163). La médiane de survenue des infections invasives à filamenteux était de 107 jours. Dans leur étude de cohorte rétrospective de 1999 à 2003 dans 11 centres italiens évaluant 3228 greffes de CSH dont 1249 allogreffes et 1979 autogreffes, Pagano et al rapportaient 121 IFI (soit 3.7% (7.8% post allogreffe) dont 91 épisodes à filamenteux (Pagano, Caira et al. 2007). Plus récemment, dans une étude prospective sur 1858 allogreffes consécutives, Girmenia et al rapportaient une incidence cumulée d'IFI de 5.1% à J40, 6.7% à J100 et 8.8% à 12 mois (Girmenia, Raiola et al. 2014). Dans une cohorte brésilienne, l'incidence cumulée d'IFI à 1 an

était de 11.3% dans les leucémies aiguës myéloïdes (LAM) et myélodysplasies (Nucci, Garnica et al. 2013) et de 8% après allogreffe (Atalla, Garnica et al. 2015). En Chine, l'équipe de Shanghai a analysé rétrospectivement 190 allogreffes de 2000 à 2007 et observé 12.5% d'infections invasives à filamenteux (Li, Wang et al. 2012). L'équipe de Pékin, dans une étude rétrospective de 2000 à 2007 sur 286 patients allogreffés sans antécédent d'IFI avant greffe rapportait 20% d'IFI après greffe (Zhang, Jiang et al. 2010).

### **3. L'aspergillose invasive, la plus fréquente des infections fongiques invasives après greffe de cellules souches hématopoïétiques**

Le risque d'infection fongique est supérieur après allogreffe de CSH par rapport aux autogreffes de CSH. Dans le registre nord-américain Transnet (Kontoyiannis, Marr et al. 2010) de 15820 greffes de CSH, l'incidence cumulée à 12 mois d'IFI était globalement de 3.4% après greffe de CSH, 1.2% après autogreffe de CSH, 5.8% après allogreffe génomique, 7.7% après allogreffe avec un donneur non apparenté et 8.1% après allogreffe apparentée avec mismatch.

La grande majorité des IFI observées chez les patients d'hématologie sont des infections à filamenteux. Celles-ci représentent trois quarts des IFI observées après greffe de CSH (Neofytos, Horn et al. 2009; Kontoyiannis, Marr et al. 2010). La plus fréquente des infections à filamenteux chez les patients d'hématologie et chez les patients allogreffés en Europe est l'aspergillose invasive (AI) avec une incidence allant de 2.7 à 23% après allogreffe (Herbrecht, Bories et al. 2012).

En Espagne, Martino et al. observaient une proportion d'aspergillose après allogreffe de 64% des IFI et de 86% des infections fongiques invasives à filamenteux : pour 50 IFI, 37 étaient des infections fongiques invasives à filamenteux dont 32 AI (Martino, Subira et al. 2002). En Italie, l'aspergillose représentait 71% des IFI après greffe de CSH (86/121) (Pagano, Caira et al. 2007). En Autriche, dans une étude rétrospective de 2000 à 2003, Post et al. observaient 23% d'aspergilloses après allogreffe de CSH (23/104) (Post, Lass-Floerl et al. 2007).

Dans le programme Transnet, programme prospectif de surveillance des infections chez les greffés de CSH (dont 78% d'allogreffes) de 2001 à 2005 dans 23 centres américains, 983 IFI

avaient été diagnostiquées chez 875 greffés dont 43% d'AI (425/983) (Kontoyiannis, Marr et al. 2010). Soixante-dix pour cent des conditionnements étaient myéloablatifs. La date médiane de survenue de l'AI était de 99 jours après greffe. Dans le registre nord-américain PATH (Neofytos, Horn et al. 2009) qui a collecté prospectivement les IFI chez les greffés de CSH (dont 68.8% d'allogreffes) dans 16 centres aux Etats-Unis et au Canada entre 2004 et 2007, 250 IFI ont été diagnostiquées chez 234 patients. L'AI était la plus fréquente des IFI : 59.2% (148/250). La survenue médiane des AI était de 82 jours après la greffe. Plus récemment à Baltimore, Neofytos et al. (Neofytos, Treadway et al. 2013) rapportaient rétrospectivement 106 IFI à filamenteux chez des patients greffés de CSH et d'organes solides de 2000 à 2009. L'AI était, là encore, la plus fréquente des infections à filamenteux (69/106 soit 65%). Les incidences des infections à filamenteux et des AI chez les greffés de CSH étaient respectivement de 3.5% et 2.5%. Le délai moyen du diagnostic était d'environ 200 jours après la greffe pour les infections à filamenteux (215 jours) et pour les AI (219 jours).

En Chine l'aspergillose est aussi l'infection fongique la plus fréquente parmi les infections fongiques invasives à filamenteux : l'équipe de Shanghai rapportait que les AI représentaient 85% des infections fongiques invasives à filamenteux dans leur centre (Li, Wang et al. 2012).

Au Brésil en revanche l'épidémiologie n'est pas la même et les fusarioses représentaient plus de 50% des infections à filamenteux (Nucci, Garnica et al. 2013; Atalla, Garnica et al. 2015).

Les patients d'hématologie représentent la population la plus à risque d'IFI et en particulier d'AI. Dans le programme SAIF (Surveillance des Aspergilloses Invasives en France) (Lortholary, Gangneux et al. 2011) ayant collecté prospectivement 393 AI prouvées et probables, 77% des AI survenaient chez des patients d'hématologie : 35% chez des patients porteurs d'une leucémie aiguë (LA) : 23% au cours du traitement d'une leucémie aiguë myéloïde et 21% après allogreffe de CSH. Reprenant les données de l'essai voriconazole (Herbrecht, Denning et al. 2002) et de l'étude Ambiload (Cornely, Maertens et al. 2007), Herbrecht et al estimaient que 63% des AI survenaient chez des patients ayant une hémopathie et 21.3% chez les allogreffés (Herbrecht, Bories et al. 2012).

#### **4. Les aspergilloses surviennent de plus en plus tardivement après allogreffe**

Après allogreffe, il existe deux périodes particulièrement à risque d'IFI : la période d'aplasie et la période de la GvH. Les IFI à filamenteux post-allogreffe semblent de plus en plus tardives. En effet, Marr et al (Marr, Carter et al. 2002) ont recueilli prospectivement toutes les AI (187) chez 1682 patients allogreffés : 57 (30%) survenaient avant J40, 99 (53%) entre J40 et J180 et 31 (17%) après J180. Au cours de la période d'étude, les AI survenaient de plus en plus tardivement. La même équipe a étudié les IFI à filamenteux rétrospectivement de 1998 à 2002 (Garcia-Vidal, Upton et al. 2008) et retrouvé 163 IFI à filamenteux sur 1248 greffes dont 36 (22%) avant J40, 65 (40%) entre J40 et J100, et 62 (38%) après J100. Avec le développement des conditionnements d'intensité réduite (Passweg, Baldomero et al. 2013; Baron, Ruggeri et al. 2016; Savani, Labopin et al. 2016), les AI surviennent plus tardivement qu'après allogreffe avec conditionnement myéloablatif, sans toutefois que l'incidence à un an de la greffe soit différente. Kojima et al. retrouvaient un délai médian de survenue d'AI de 127 jours après un conditionnement d'intensité réduite versus 97 jours après un conditionnement myéloablatif (Kojima, Kami et al. 2004). Dans une cohorte canadienne de 125 allogreffes non myéloablatives, 13 patients ont développé une AI, en médiane 229 jours après la greffe (Labbe, Su et al. 2007), soit un risque d'AI de 7% à 1 an, 11% à 2 ans et 15% à 3 ans. Grow et al. rapportaient 15% d'AI après allogreffe avec une médiane de survenue de 92 jours (Grow, Moreb et al. 2002). Ce phénomène est sans doute lié avant tout au développement des greffes avec conditionnement d'intensité réduite et non-myéloablatif suivi de la réinjection de CSP, au décours desquelles la durée et la profondeur de la neutropénie initiale sont réduites par rapport aux greffes myéloablatives suivies de réinjection de moelle, diminuant ainsi le risque d'AI précoce. Parallèlement la survenue de la GvH est retardée, sans toutefois en diminuer la fréquence ni la sévérité (Passweg, Baldomero et al. 2013).

## 5. Physiopathologie

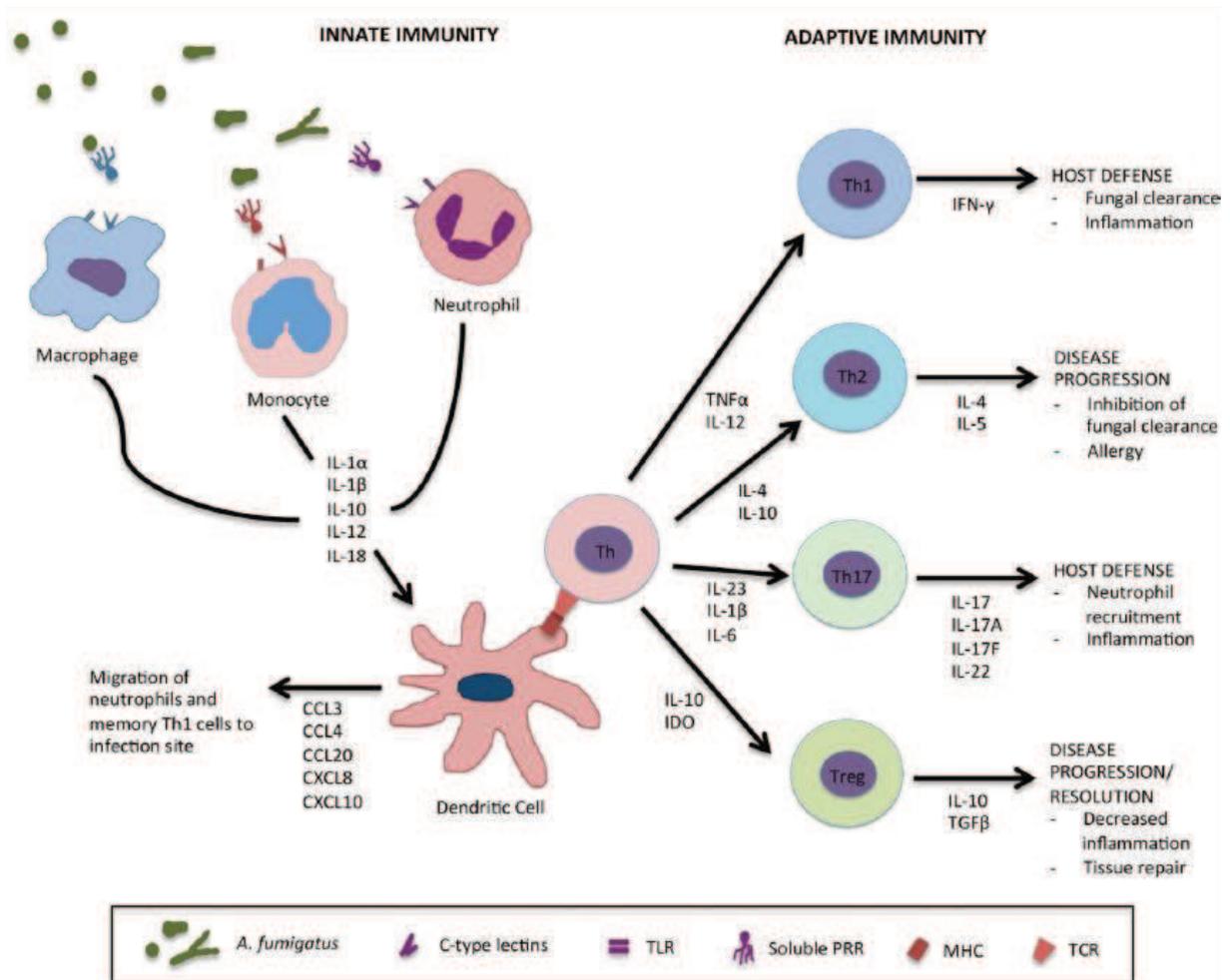
Les spores d'*Aspergillus* contenues dans l'air sont inhalées par tout individu à raison en moyenne d'une centaine de spores par jour (Al-Bader and Sheppard 2016). Elles subissent une épuration muco-ciliaire au niveau des bronches. Si elles parviennent jusqu'aux alvéoles, elles sont éliminées par les macrophages alvéolaires. Chez les individus immunocompétents, les macrophages et les cellules présentatrices d'antigène reconnaissent les spores et participent à leur élimination de façon directe (fongicidie) et en activant la réponse immunitaire (Figure 3). La reconnaissance de l'antigène est sous la dépendance de certains facteurs du complément et de récepteurs lectiniques pour le mannose et le fucose. L'activation des TLR 2 et 4 à la surface des macrophages et des cellules dendritiques (Figure 4) entraîne la production de cytokines telles que le TNF  $\alpha$  et l'IL-1  $\beta$ , ce qui amplifie la réponse inflammatoire. Les spores non éliminées peuvent se transformer en filaments mycéliens qui ont un tropisme vasculaire. La fongicidie des formes filamenteuses est normalement assurée par les polynucléaires neutrophiles et l'immunité adaptative via les effecteurs lymphocytaires cellulaires et humoraux.

Chez les patients d'hématologie, la colonisation à *aspergillus* peut évoluer vers l'infection.

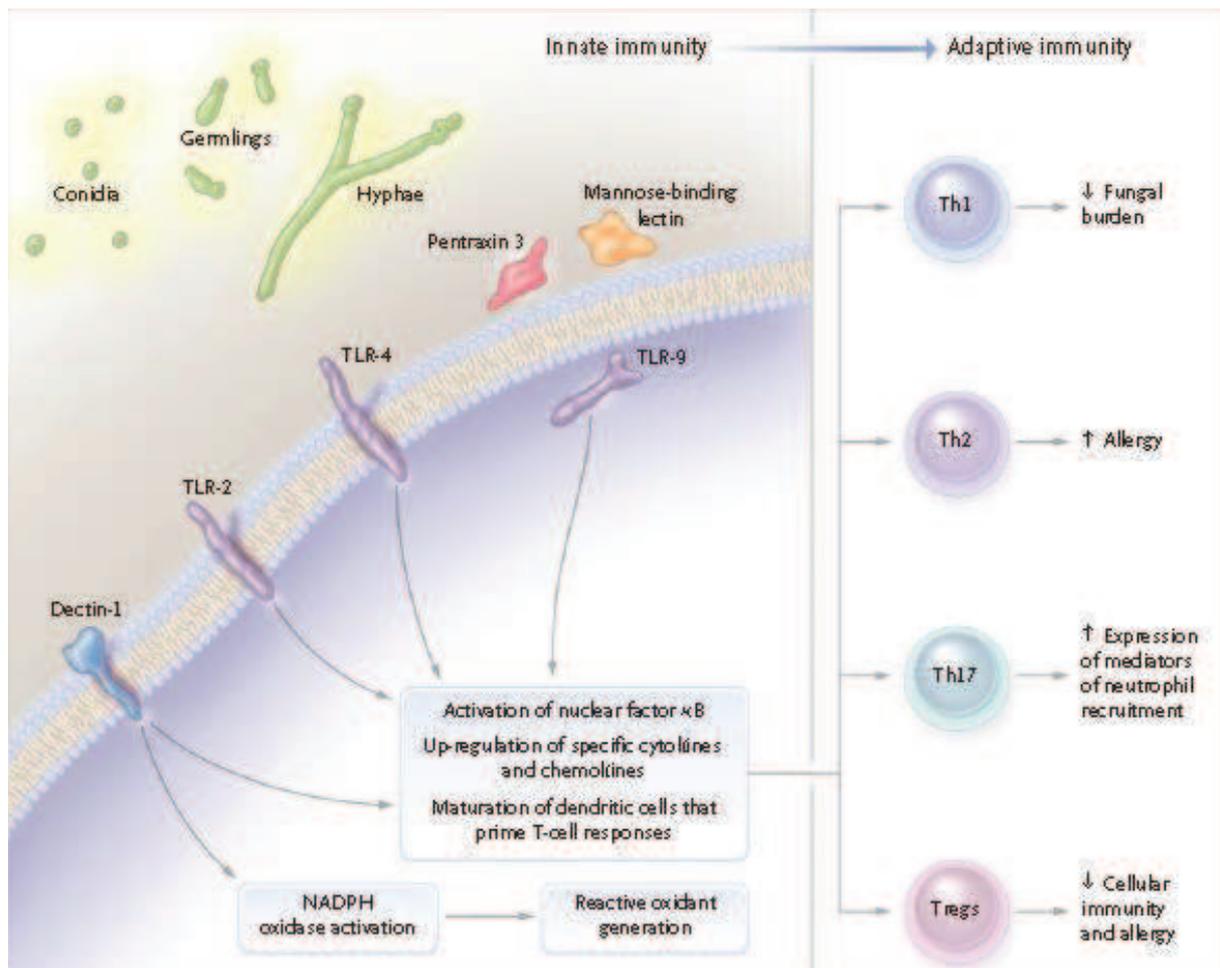
Le tapis mucociliaire est altéré après allogreffe (Cordonnier, Gilain et al. 1996), sans doute par plusieurs facteurs concomitants : l'atteinte des muqueuses par la GvH mais aussi la radiothérapie et la chimiothérapie, voire les infections liées aux virus respiratoires, ce qui favorise la pénétration et le pouvoir d'adhérence des spores.

En cas de déficit macrophagique, les spores ne sont pas éliminées et se transforment en filaments mycéliens qui ont un tropisme vasculaire (Winston, Territo et al. 1982).

En cas de neutropénie, il y a prolifération des formes filamenteuses. L'angioinvasion des filaments d'*Aspergillus* aboutit à la dissémination et l'infection.



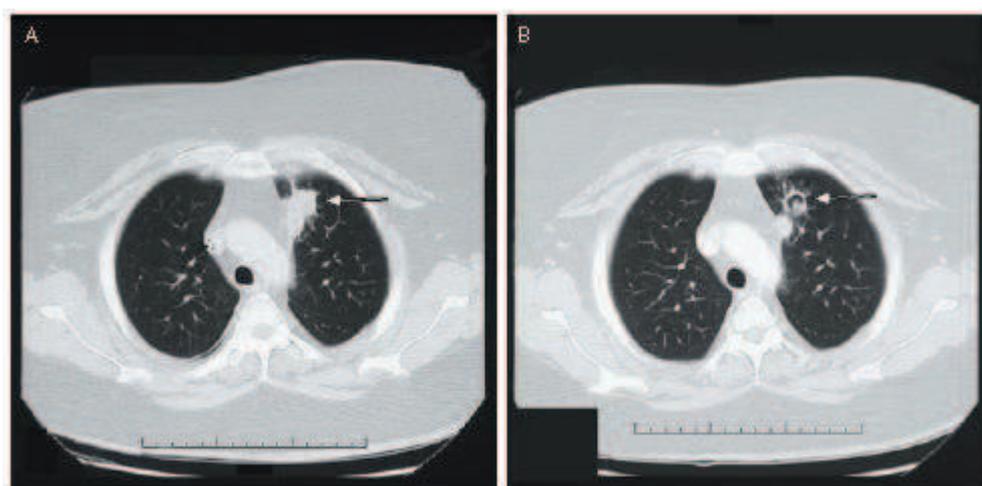
**Figure 3** Réponse immunitaire contre *Aspergillus fumigatus* (Al-Bader and Sheppard 2016)



**Figure 4** Réponse immunitaire après inhalation de spores d'*aspergillus*, (Segal 2009)

## 6. Clinique

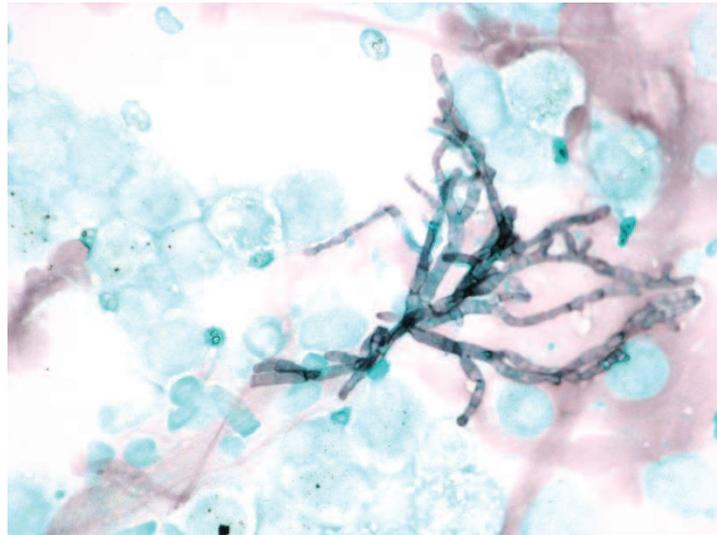
Les localisations principales de l'aspergillose invasive sont avant tout pulmonaires, puis sinusiennes, et cérébrales. Les autres localisations (cutanées, digestives, disséminées...) sont plus rares. L'imagerie des aspergilloses pulmonaires en particulier scannographique a été étudiée par Caillot et al (Caillot, Couaillier et al. 2001) chez les patients neutropéniques. Elle est caractérisée par le signe du halo (figure 5) qui apparaît vers J4 et est fugace. C'est un nodule aspergillaire entouré d'une zone de verre dépoli, correspondant à une extravasation d'exsudat hémorragique périlésionnel. Ce signe du halo évolue vers le signe du croissant gazeux, plus tardif vers J10-J20, habituellement après la sortie d'aplasie et correspond à la détertion du foyer par les polynucléaires neutrophiles.



**Figure 5** Aspect tomodensitométrique d'une aspergillose invasive, (Segal 2009). A : signe du halo, B : signe du croissant gazeux.

## 7. Outils diagnostiques

Le diagnostic d'aspergillose selon les critères EORTC-MSG 2008 (De Pauw, Walsh et al. 2008) peut reposer sur des critères mycologiques directs, l'histologie, l'examen direct (Figure 6) et la culture, ou sur des critères indirects avec des biomarqueurs.



**Figure 6 :** Examen direct d'un lavage broncho-alvéolaire montrant des filaments de type aspergillaire. La culture permettra l'identification d'un *Aspergillus fumigatus*

Parmi eux, le galactomannane est un sucre de la paroi d'aspergillus. Il peut être dosé dans le sérum, le plasma ou le lavage broncho-alvéolaire. Dans sa revue de la littérature, White et al. concluaient à une sensibilité de 81.6%, une spécificité de 91.6%, une valeur prédictive positive de 63.3% et une valeur prédictive négative de 96.6% (White, Wingard et al. 2015). Le test galactomanne n'est cependant pas spécifique d'aspergillus car d'autres champignons, comme les *Fusarium* spp. peuvent en produire également (Dalle, Charles et al. 2005; Cummings, Jamison et al. 2007; Huang, Hung et al. 2007; Wheat, Hackett et al. 2007; Tortorano, Esposto et al. 2012; Kebabci, van Diepeningen et al. 2014; Nucci, Carlesse et al. 2014). Certains traitements peuvent entraîner des faux positifs du test. Parmi eux, on trouve certaines bêta-lactamines (Bart-Delabesse, Basile et al. 2005; Aubry, Porcher et al. 2006) comme l'amoxicilline-acide clavulanique, et la pipéracilline-tazobactam (Sulahian, Touratier et al. 2003), les immunoglobulines polyvalentes (Ramsay, Gorton et al. 2016), certaines

nutritions entérales et parentérales (Petraitiene, Petraitis et al. 2011). Certains laits peuvent également positiver le galactomannane (Gangneux, Lavarde et al. 2002). Les performances du test sont meilleures chez le patient d'hématologie par rapport aux sujets immunocompétents ou aux transplantés d'organes, et en particulier chez le patient profondément neutropénique (Cordonnier, Botterel et al. 2009; Marchetti, Lamoth et al. 2012). Ainsi chez les patients d'hématologie, la sensibilité était de 58%, la spécificité de 95% ; chez les patients greffés la sensibilité était de 65% et la spécificité de 65%. En revanche la valeur prédictive positive du test pour l'aspergillose est mauvaise sous prophylaxie antifilamenteuse lorsque la probabilité d'AI est très faible (Marr, Laverdiere et al. 2005).

Le  $\beta$ -D-Glucane est un sucre présent dans la paroi de tous les champignons sauf les mucorales et le cryptocoque. Il fait également partie des critères mycologiques EORTC-MSG (De Pauw, Walsh et al. 2008). Deux tests consécutifs positifs avaient une spécificité excellente de 98.9% mais une sensibilité médiocre de 49.6% pour le diagnostic d'IFI (Lamoth, Cruciani et al. 2011). Dans sa revue White et al. trouvaient une sensibilité de 76.9%, une spécificité de 89.4%, une valeur prédictive positive de 44.7% et une excellente valeur prédictive positive de 97.2% (White, Wingard et al. 2015). Certains facteurs peuvent également positiver le bêta-D-glucane en l'absence d'IFI : les bactériémies (Mennink-Kersten, Ruegebrink et al. 2008; Racil, Kocmanova et al. 2013; Desjardins, Parize et al. 2015), certains traitements comme l'albumine, les immunoglobulines polyvalentes, l'amoxicilline-acide clavulanique (Mennink-Kersten, Warris et al. 2006), ou certains matériaux comme les compresses ou les membranes d'hémodialyse (Miyazaki, Kohno et al. 1995).

La PCR *Aspergillus* a été développée depuis les années 1990 (Alanio and Bretagne 2017). Elle n'a pas été intégrée dans les critères EORTC-MSG 2008 (De Pauw, Walsh et al. 2008) par manque de standardisation. C'est le développement des PCR quantitatives en temps réel qui a permis de juguler ces écueils. La métaanalyse de Mengoli et al. (Mengoli, Cruciani et al. 2009) trouvait pour un test positif une sensibilité de 88% et une spécificité de 75%, et pour 2 tests positifs une sensibilité de 75% et une spécificité de 87%. Les auteurs concluaient qu'il fallait un test pour exclure le diagnostic et 2 tests pour l'affirmer. Plus récemment, la qPCR avait une meilleure sensibilité et spécificité dans le plasma (respectivement 94.7% et 83.3%) que dans le sérum (respectivement 68.4% et 76.2%) (White, Barnes et al. 2015). La même année, Lewis et al. publiaient une revue (Lewis, Giannella et al. 2015) dans laquelle ils

rapportaient une sensibilité des qPCR autour de 85% et une spécificité autour de 75%, concluant que la qPCR était « prête » à être intégrée aux futurs critères EORTC. Parallèlement Cruciani et al. publiaient une autre métaanalyse (Cruciani, Mengoli et al. 2015) et trouvaient pour un test positif une sensibilité de 80.5% et une spécificité de 78.5% et pour 2 tests positifs une sensibilité de 58% et une spécificité de 96.2%. La qPCR apparaissait donc comme un outil intéressant pour le diagnostic des AI en complément des techniques existantes.

## **8. Traitement**

Dans les années 1990, les deux seules molécules actives contre aspergillus étaient l'amphotéricine B déoxycholate et l'itraconazole, l'amphotéricine B deoxycholate étant le traitement de référence avec une efficacité médiocre (<40%) et une toxicité importante. Depuis 2002, le traitement de première ligne de l'aspergillose invasive repose sur le voriconazole (Herbrecht, Denning et al. 2002). La supériorité du voriconazole par rapport à l'amphotéricine B deoxycholate a été établie dans un essai randomisé avec un taux de réponse complète ou partielle de 52.8% à 12 semaines dans le bras voriconazole versus 31.6% dans le bras amphotéricine B et une survie à 12 semaines de 70.8% dans le bras voriconazole versus 57.9% dans le bras amphotéricine B. L'analyse de ces données en reclassant les patients selon la seconde version des critères EORTC-MSG 2008 a confirmé cette supériorité du voriconazole (Herbrecht, Patterson et al. 2015). L'amphotéricine B liposomale est mieux tolérée que l'amphotéricine B deoxycholate, et peut être administrée beaucoup plus longtemps (Leenders, Daenen et al. 1998). L'Amphotéricine B liposomale est actuellement recommandée en alternative au voriconazole pour le traitement de l'aspergillose, ou pour le traitement des aspergilloses résistantes aux azolés. L'isavuconazole a depuis démontré sa non-infériorité en terme d'efficacité par rapport au voriconazole et sa moindre toxicité (Maertens, Raad et al. 2016). Les dernières recommandations de l'European Conference of Infections in Leukemia (ECIL) (Tissot, Agrawal et al. 2017) conseillent ces deux molécules en première intention mais considèrent qu'il n'y a pas de place pour une bithérapie en première intention. En effet l'étude comparant le voriconazole en monothérapie versus le voriconazole associé à l'anidulafongine n'a pas montré la supériorité de l'association sur la mortalité à 6 semaines qui était le critère de jugement

principal : 27.8% dans le bras monothérapie versus 19.5% dans le bras bithérapie,  $p=0.087$  (Marr, Schlamm et al. 2015).

## **9. Mortalité**

### ***a) Mortalité des IFI***

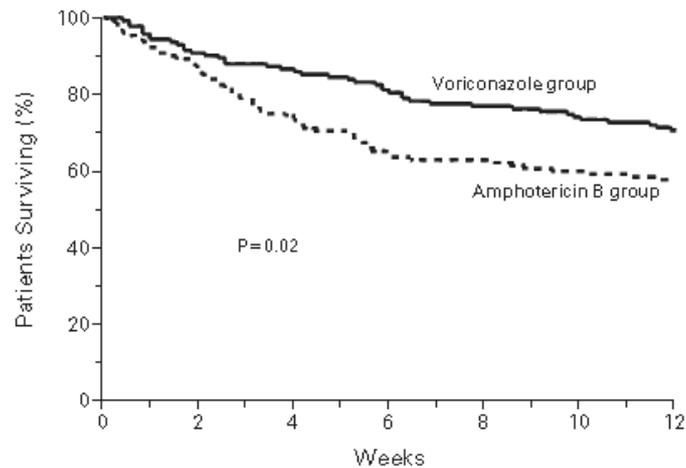
Les IFI sont une complication grave des patients d'hématologie et en particulier des patients greffés, elles engagent toujours le pronostic vital malgré le développement des antifongiques avec une mortalité allant de 20 à 80% (Marr, Carter et al. 2002; Fukuda, Boeckh et al. 2003; Cordonnier, Ribaud et al. 2006; Mihu, King et al. 2008; Neofytos, Horn et al. 2009; Baddley, Andes et al. 2010; Kontoyiannis, Marr et al. 2010; Herbrecht, Caillot et al. 2012; Li, Wang et al. 2012; Neofytos, Treadway et al. 2013; Girmenia, Raiola et al. 2014; Harrison, Mitterbauer et al. 2015; Marr, Schlamm et al. 2015) et une surmortalité importante par rapport aux patients ne développant pas d'IFI. Dans une cohorte rétrospective autrichienne de 242 patients allogreffés, la mortalité à un an des 25 patients ayant développé une IFI était de 48% versus 25% pour ceux n'en ayant pas développé (Harrison, Mitterbauer et al. 2015).

### ***b) Mortalité des AI***

Même si le pronostic des AI s'est amélioré au cours des deux dernières décennies, et notamment depuis l'avènement du voriconazole, les AI engagent toujours le pronostic vital avec persistance d'une surmortalité chez les patients ayant développé une AI par rapport à ceux qui n'en avait pas. Dans une étude rétrospective autrichienne de 166 allogreffes, la mortalité était de 56% pour les patients ayant développé une AI versus 8% pour les patients n'ayant pas développé d'AI (Post, Lass-Floerl et al. 2007).

Dans l'étude comparant le voriconazole à l'amphotéricine B deoxycholate (Herbrecht, Denning et al. 2002), la mortalité à la semaine 12 (S12) était de 70.8% dans le bras voriconazole versus 57.9% dans le bras amphotéricine B. La différence entre les 2 bras de

traitement était déjà significative à 6 semaines (Figure 7), raison pour laquelle l'évaluation de la survie dans les essais ultérieurs était réalisée à 6 semaines.



**Figure 7** Courbe de survie de l'essai Voriconazole versus Amphotéricine B deoxycholate. (Herbrecht, Denning et al. 2002)

Dans le registre du Fred Hutchinson Cancer Research Center de 1990 à 2004 (Upton, Kirby et al. 2007), le pronostic des AI s'est amélioré au cours de cette période. La survie à J90 était de 22% pour la période 1990 à 2001 versus 45% pour la période 2002 à 2004 et le voriconazole était indépendamment associé à une diminution de la mortalité attribuable. La survie à J30 était de 69% avec voriconazole versus 33% sans voriconazole. la survie à J90 était de 44% avec voriconazole versus 22% sans voriconazole. La survie à 1 an était de 28% avec voriconazole versus 13% sans voriconazole. La mortalité attribuable à J30 et J90 était respectivement de 29% et 32% sans voriconazole, versus 17% et 23% avec voriconazole.

### **c) Mortalité attribuable**

Au décours de l'allogreffe, et en l'absence d'autopsie, les causes de décès ne sont pas toujours facilement identifiables car souvent intriquées. Pour l'aspergillose qui survient souvent dans un contexte de GvH non contrôlée et de co-infections, la cause du décès est souvent mixte et enregistrée dans les bases de données parmi l'ensemble des causes de

décès non liés à la rechute. La mortalité attribuable de l'aspergillose reste néanmoins probablement très élevée autour de 70% post-allogreffe (Pagano, Caira et al. 2007; Mikulska, Raiola et al. 2009). Pagano et al retrouvaient une mortalité attribuable post-AI de 72.1% après greffe de CSH : 77.2% post-allogreffe et 14.3% post-autogreffe (Pagano, Caira et al. 2007). Dans l'étude de Ramos et al. chez 449 patients d'hématologie avec AI, la mortalité globale à 12 semaines était de 60% et la mortalité attribuable de 55% (Ramos, Jiang et al. 2011).

#### **d) Facteurs pronostiques**

Les facteurs de mauvais pronostic sont :

- Caractéristiques de l'AI :
  - Une AI disséminée (Cordonnier, Ribaud et al. 2006; Upton, Kirby et al. 2007)
  - Un épanchement pleural (Cordonnier, Ribaud et al. 2006; Lortholary, Gangneux et al. 2011)
  - Une atteinte du système nerveux central (Lortholary, Gangneux et al. 2011)
  - Une AI survenant plus de 40 jours après allogreffe (Upton, Kirby et al. 2007)
  - Nécessité de recours à la ventilation mécanique et/ou à l'hémodialyse (Neofytos, Horn et al. 2009; Herbrecht, Caillot et al. 2012)
  
- Facteurs au moment du diagnostic d'AI
  - Un taux de monocytes  $< 120/\text{mm}^3$  au diagnostic d'AI (Cordonnier, Ribaud et al. 2006)
  - Une hyperbilirubinémie (Upton, Kirby et al. 2007; Neofytos, Treadway et al. 2013)
  - Une insuffisance rénale (Upton, Kirby et al. 2007; Mikulska, Raiola et al. 2009)
  - Une corticothérapie  $\geq 2 \text{ mg/kg}$  d'équivalent prednisone (Fukuda, Boeckh et al. 2003; Cordonnier, Ribaud et al. 2006; Upton, Kirby et al. 2007; Mikulska, Raiola et al. 2009; Baddley, Andes et al. 2010; Zhang, Jiang et al. 2010; Ramos, Jiang et al. 2011; Li, Wang et al. 2012)

- Une GvH non contrôlée (Cordonnier, Ribaud et al. 2006)
- Une maladie à CMV (Martino, Parody et al. 2006)
- Facteurs pré-greffe antérieurs à la survenue de l'AI
  - Le statut de l'hémopathie : absence de rémission complète (Martino, Parody et al. 2006; Herbrecht, Caillot et al. 2012)
  - Un donneur non apparenté (Pagano, Caira et al. 2007) et le mismatch HLA (Upton, Kirby et al. 2007)
- Facteurs post-greffe antérieurs à la survenue de l'AI
  - Une durée prolongée de neutropénie après greffe (Martino, Caballero et al. 2001)
  - Une GvH de grade  $\geq 2$  (Martino, Caballero et al. 2001; Ramos, Jiang et al. 2011)

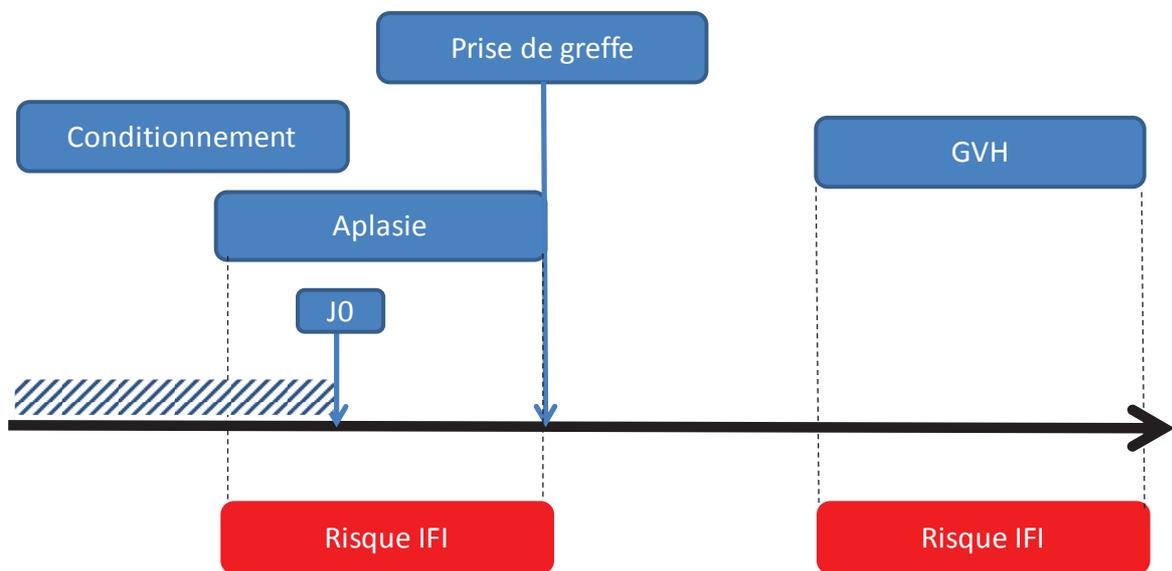
Un traitement par voriconazole est associé à un meilleur pronostic (Upton, Kirby et al. 2007; Lortholary, Gangneux et al. 2011; Ramos, Jiang et al. 2011)

## 10. Facteurs de risque

Devant la sévérité des infections fongiques, les facteurs de risque potentiels ont été étudiés afin d'identifier les patients les plus à risque. Ces facteurs comprennent donc :

- les facteurs intrinsèques au patient : identification des patients les plus immunodéprimés et donc les plus à risque de développer une infection fongique,
- et les facteurs extrinsèques au patient : risque d'acquisition de l'agent pathogène.

Les deux populations d'hématologie les plus à risque d'aspergillose sont les patients atteints de LAM en particulier pendant la période d'aplasie post-induction et les patients allogreffés, principalement pendant l'aplasie et au moment de la GvH (Figure 8). Les facteurs de risque d'aspergillose après allogreffe comprennent des facteurs liés à l'allogreffe, qu'ils soient pré-greffe ou post-greffe, d'autres facteurs liés à l'hôte, des facteurs environnementaux et des facteurs génétiques (Figure 9).



**Figure 8** Les deux périodes à risque d'infection fongique au décours d'une allogreffe de CSH d'après Kontoyiannis CID 2010 (Kontoyiannis, Marr et al. 2010)

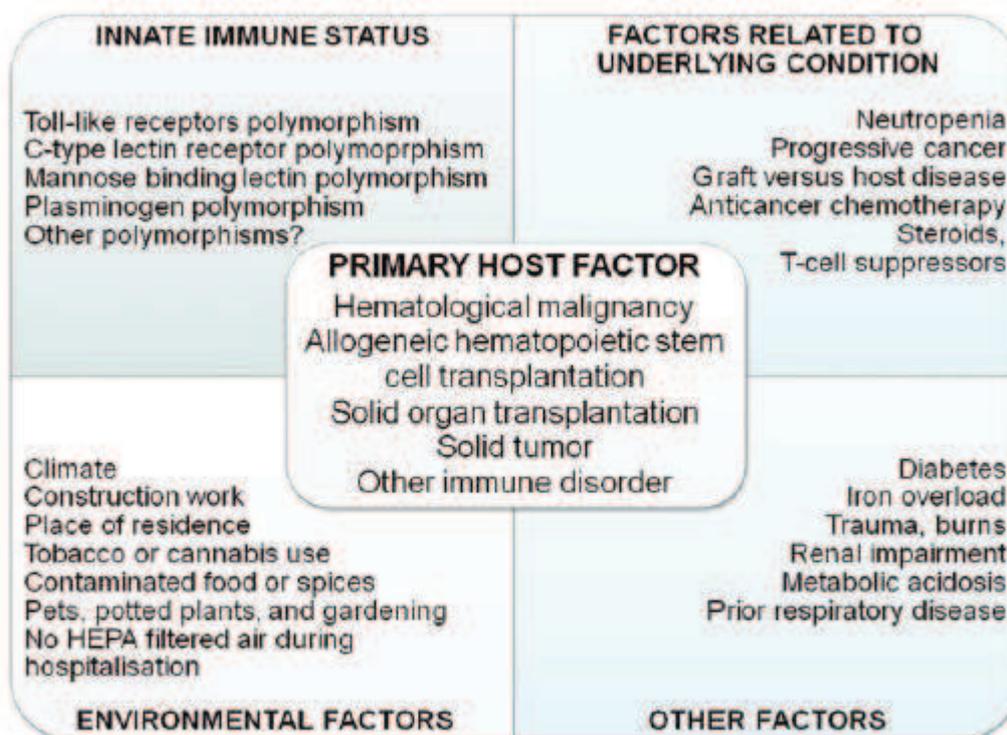


Figure 2. Diagram of the various risk factors affecting the primary host condition.

**Figure 9** Facteurs de risque d'aspergillose (Herbrecht, Bories et al. 2012)

Les principaux facteurs pré-greffe associés à la survenue d'une AI sont (Marr, Carter et al. 2002; Kojima, Kami et al. 2004; Kontoyiannis, Chamilos et al. 2007; Garcia-Vidal, Upton et al. 2008; Mihu, King et al. 2008; Blennow, Remberger et al. 2010; Kontoyiannis, Marr et al. 2010; Panackal, Li et al. 2010; Zhang, Jiang et al. 2010; Baddley 2011; Girmenia, Ferretti et al. 2014) :

- L'âge : un âge avancé augmente le risque d'AI. Dans l'étude de Marr et al. (Marr, Carter et al. 2002), un âge > 40 ans augmentait le risque d'AI (HR 2.4). Dans l'étude de Kojima et al. (Kojima, Kami et al. 2004), un âge > 50 ans augmentait le risque d'AI (RR 2.12). Dans l'étude de Garcia-Vidal et al. (Garcia-Vidal, Upton et al. 2008), chaque tranche d'âge de 10 ans augmentait le risque d'AI (HR ajusté 1.2)
- Le type de donneur : les greffes phéno-identiques avec mismatch sont plus à risque d'AI que les greffes phéno-identiques sans mismatch, elles-mêmes plus à risque que les greffes géno-identiques (Marr, Carter et al. 2002; Kontoyiannis, Marr et al. 2010; Zhang, Jiang et al. 2010; Atalla, Garnica et al. 2015)

- La source du greffon : les greffes de cordons sont les plus à risque d'AI (Marr, Carter et al. 2002) suivies par les greffes de moelle puis de cellules souches périphériques (Kojima, Kami et al. 2004)
- La T-déplétion du greffon (Marr, Carter et al. 2002),
- La saison de la greffe : une greffe en été dans un lieu où la température est plus élevée et les précipitations plus basses qu'en hiver, corrélé à un taux de spores d'*Aspergillus* plus élevé dans l'air, est plus à risque d'AI qu'au cours d'une autre saison (Panackal, Li et al. 2010)
- Le statut de la maladie à la greffe : si l'hémopathie n'est pas en rémission complète au moment de la greffe, le risque d'AI est plus élevé, en particulier s'il s'agit d'une leucémie aiguë (Marr, Carter et al. 2002; Barnes and Marr 2007)
- Certaines drogues du conditionnement comme la fludarabine, l'alemtuzumab, (Mihu, King et al. 2008; Blennow, Remberger et al. 2010; Herbrecht, Bories et al. 2012)
- La surcharge en fer : le risque d'AI augmente avec le nombre de culots globulaires transfusés (Garcia-Vidal, Upton et al. 2008). Une ferritine > 2000 ng/mL augmente le risque d'AI précoce (Garcia-Vidal, Upton et al. 2008). Kontoyiannis et al. ont développé un score d'infiltration médullaire en fer (Kontoyiannis, Chamilos et al. 2007) : un score  $\geq 3$  était associé à un risque accru. Une série autopsique a également montré qu'une surcharge hépatique en fer était associée à un surrisque d'AI après greffe de CSH (Barnes and Marr 2007).
- Un antécédent d'AI avant greffe (Fukuda, Boeckh et al. 2004; Baddley 2011; Herbrecht, Bories et al. 2012)
- Un donneur séronégatif pour le CMV et un receveur séropositif (D+/R-) (Blennow, Remberger et al. 2010)

Les principaux facteurs post-greffe associés à la survenue d'une AI sont (Junghanss, Marr et al. 2002; Marr, Carter et al. 2002; Martino, Subira et al. 2002; Fukuda, Boeckh et al. 2003; Kojima, Kami et al. 2004; Post, Lass-Floerl et al. 2007; Garcia-Vidal, Upton et al. 2008; Mihu, King et al. 2008; Mikulska, Raiola et al. 2009; Zhang, Jiang et al. 2010; Baddley 2011; Herbrecht, Bories et al. 2012; Li, Wang et al. 2012; Girmenia, Ferretti et al. 2014):

- La GvH aiguë et chronique (Martino, Subira et al. 2002; Kojima, Kami et al. 2004; Thursky, Byrnes et al. 2004; Labbe, Su et al. 2007; Garcia-Vidal, Upton et al. 2008;

Mihu, King et al. 2008; Blennow, Remberger et al. 2010; Baddley 2011; Herbrecht, Bories et al. 2012)

- L'infection et la maladie à CMV (Junghanss, Marr et al. 2002; Marr, Carter et al. 2002; Fukuda, Boeckh et al. 2003; Thursky, Byrnes et al. 2004; Garcia-Vidal, Upton et al. 2008; Mikulska, Raiola et al. 2009; Blennow, Remberger et al. 2010; Zhang, Jiang et al. 2010; Baddley 2011; Herbrecht, Bories et al. 2012; Li, Wang et al. 2012)
- La durée de la neutropénie (Post, Lass-Floerl et al. 2007) et le retard à la prise de greffe, (Mikulska, Raiola et al. 2009; Baddley 2011; Herbrecht, Bories et al. 2012)
- Les cytopénies, neutropénie secondaire, lymphopénie, monocytopenie (Marr, Carter et al. 2002; Thursky, Byrnes et al. 2004; Mihu, King et al. 2008; Mikulska, Raiola et al. 2009; Baddley 2011; Herbrecht, Bories et al. 2012; Li, Wang et al. 2012)
- Le ganciclovir (Thursky, Byrnes et al. 2004)
- Les corticoïdes (Martino, Subira et al. 2002; Thursky, Byrnes et al. 2004; Garcia-Vidal, Upton et al. 2008; Mikulska, Raiola et al. 2009; Zhang, Jiang et al. 2010; Baddley 2011; Herbrecht, Bories et al. 2012; Li, Wang et al. 2012; Hol, Wolfs et al. 2014)
- Les infections à virus respiratoires, notamment le VRS, les virus influenza et parainfluenza (Marr, Carter et al. 2002; Garcia-Vidal, Upton et al. 2008)
- La rechute (Mikulska, Raiola et al. 2009)

Les facteurs de risque sont différents en fonction du délai de survenue de l'AI après la greffe. Ainsi les différentes hémopathies sous-jacentes peuvent être associées à un risque d'AI différent en fonction de la date de survenue de l'AI. Dans l'étude de Marr et al., l'hémopathie pouvait avoir une influence différente en fonction du délai de survenue. Ainsi, les patients allogreffés pour leucémie myéloïde chronique en phase chronique développaient moins d'AI précoce (<40 jours) que les patients allogreffés pour une autre hémopathie, tandis que les patients allogreffés pour un myélome multiple ou un lymphome développaient plus d'AI tardive (>40 jours) que les patients allogreffés pour une autre hémopathie (Marr, Carter et al. 2002). Dans l'étude d'Atalla et al., la LAM était associée aux AI précoces et les lymphomes aux AI tardives (Atalla, Garnica et al. 2015).

Les AI précoces sont associées plutôt aux facteurs pré-greffe tels que l'absence de rémission complète de l'hémopathie à la greffe, le type d'hémopathie (LAM), le match HLA donneur/receveur, et à des facteurs post-greffe tels que le retard à la prise de greffe, la

lymphopénie post-greffe, et l'infection à CMV (Garcia-Vidal, Upton et al. 2008; Mikulska, Raiola et al. 2009; Atalla, Garnica et al. 2015). Les AI tardives sont associées à des facteurs post-greffe : GVH, cytopénies secondaires, ganciclovir, corticothérapie, et rechute de l'hémopathie après la greffe (Thursky, Byrnes et al. 2004; Garcia-Vidal, Upton et al. 2008; Mikulska, Raiola et al. 2009; Atalla, Garnica et al. 2015).

Les greffes à conditionnement atténué sont à risque d'AI comparable aux greffes myéloablatives, mais le risque est retardé parallèlement à la date de survenue de la GvH (Kojima, Kami et al. 2004; Thursky, Byrnes et al. 2004).

Des facteurs de risque d'acquisition d'*Aspergillus* ont également été décrits. Ainsi la présence de travaux augmente de risque d'AI (Vonberg and Gastmeier 2006; Baddley 2011; Combariza, Toro et al. 2017). Les facteurs géoclimatiques ont une influence également : Panackal et al. ont décrit une augmentation du risque d'AI si la greffe était effectuée en été à Seattle où le niveau de spores dans l'air était élevé, la température élevée, et les précipitations faibles, alors qu'il n'y avait pas de variations saisonnières à Houston où le niveau de spores était stable toute l'année et les différences de température entre saisons étaient limitées (Panackal, Li et al. 2010).

Plus récemment, des prédispositions génétiques à développer une AI ont été mises en évidence (Maskarinec, Johnson et al. 2016).

Des polymorphismes au niveau de différents TLR (Toll like receptor) ont été décrits comme associés à la survenue d'une AI chez les patients immunodéprimés et en particulier chez les patients d'hématologie et chez les allogreffés de CSH. Trois équipes ont observé une association entre le polymorphisme de TLR4 chez le donneur et la survenue d'une AI (Bochud, Chien et al. 2008; de Boer, Jolink et al. 2011; Koldehoff, Beelen et al. 2013). Koldehoff et al. (Koldehoff, Beelen et al. 2013) ont également montré que le polymorphisme de TLR4 chez le donneur ou le receveur était associé à la survenue d'une AI. La présence d'un codon STOP sur le gène de TLR5 chez le receveur d'allogreffe de CSH était également associée à un risque augmenté d'AI (Grube, Loeffler et al. 2013). La présence d'un polymorphisme isolé au niveau du TLR1 ou la présence d'un polymorphisme simultanément au niveau des TLR 1 et 6 chez le receveur étaient associées à la survenue d'une AI (Kesh,

Mensah et al. 2005). Un polymorphisme de TLR3 qui permet l'activation des LT CD8 a été décrit chez la souris et les allogreffés (Carvalho, De Luca et al. 2012).

Des polymorphismes au niveau de récepteurs de type lectine C (Dectin1 et DC SIGN) ont également été décrits comme associés à la survenue d'une AI. La Dectin 1 est le principal récepteur aux  $\beta$ -glucanes fongiques présent sur les cellules myéloïdes (Chai, de Boer et al. 2011). Son rôle est indispensable pour la génération d'une réponse inflammatoire des macrophages alvéolaires et pour le recrutement des polynucléaires neutrophiles (Steele, Rapaka et al. 2005; Werner, Metz et al. 2009). Le polymorphisme Y238X sur le gène de la Dectin-1 entraîne un codon STOP prématuré, modifiant la production des cytokines IFN $\gamma$ , IL10, IL1 $\beta$ , IL6 et IL17A. Ce polymorphisme présent chez le donneur ou le receveur d'une allogreffe de CSH était associé à la survenue d'une AI après greffe (Cunha, Di Ianni et al. 2010). L'association était encore plus forte si le donneur et le receveur présentaient tous deux ce polymorphisme. Ces résultats ont été confirmés par Sainz et al. (Sainz, Lupianez et al. 2012) qui ont retrouvé une association entre polymorphisme de Dectin-1 et DC SIGN et survenue d'une AI.

Le polymorphisme sur les gènes de certaines cytokines était également associé à la survenue d'une AI. Certains haplotypes du gène de l'IL1 étaient associés à un risque augmenté et d'autres à un risque moindre (Sainz, Perez et al. 2008). Deux équipes ont décrit des polymorphismes génétiques au niveau du promoteur du gène codant pour l'IL10 chez des patients d'hématologie ou allogreffés avec des polymorphismes associés à un risque augmenté et des polymorphismes associés à un risque diminué d'AI (Seo, Kim et al. 2005; Sainz, Hassan et al. 2007). Des polymorphismes de l'IL4R et de l'IL8 ont également été décrits comme étant associés à un risque augmenté d'AI tandis que ceux de l'IL12B et de l'IFN $\gamma$  étaient associés à un risque moindre (Lupianez, Canet et al. 2015). Trois polymorphismes de CXCL10 étaient également associés à une augmentation du risque d'AI (Mezger, Steffens et al. 2008) avec un taux de CXCL10 dans le sérum des patients ayant une AI était supérieur au taux des patients sans AI.

D'autres polymorphismes génétiques ont été décrits comme associés à un risque d'AI. Cunha et al. (Cunha, Aversa et al. 2014) ont décrit un surrisque d'AI chez les patients allogreffés si le donneur était homozygote h2/h2 pour le gène PTX3. Celui-ci code pour un Prp (patter

recognition receptor) soluble sécrété par les cellules phagocytaires au site de l'inflammation, qui module l'activité innée et active l'immunité adaptative. Il agit également directement sur *Aspergillus fumigatus* comme une opsonine, favorisant sa phagocytose. Les polymorphismes de PTX3 ont également été décrits chez les transplantés d'organes solides (Wojtowicz, Lecompte et al. 2015). Des polymorphismes de RAGE (receptor for advanced glycation end products), ont été décrits comme associés à la survenue d'une AI dans le cadre de l'allogreffe de CSH, s'ils étaient présents chez le donneur uniquement, ou simultanément chez le donneur et le receveur (Cunha, Giovannini et al. 2011). RAGE est un récepteur à des protéines de l'inflammation amplifiant la réponse inflammatoire. Des polymorphismes au niveau du plasminogène ont également été décrits sur un modèle murin puis validé sur une cohorte de patients allogreffés (Zaas, Liao et al. 2008). Enfin la voie NF- $\kappa$ B a également été étudiée : le polymorphisme d'IRF4 multipliait par 6 le risque d'AI dans la sous-population des allogreffés (Lupianez, Villaescusa et al. 2016).

Récemment Fisher et al. ont analysé 20 polymorphismes sur 14 gènes dans une cohorte de 2609 patients allogreffés dont 483 avec une AI et 2126 sans AI et confirmé l'association des polymorphismes de PTX3, CLEC7a, CD209, CXCL10, TLR6, S100B, IFN $\gamma$ , PLG et TNFR1 (Fisher, Hohl et al. 2017).

En résumé, des polymorphismes génétiques chez le donneur ou le receveur ont été décrits comme associés au risque aspergillaire chez les patients allogreffés. Ces facteurs ne sont actuellement pas pris en compte dans la prise en charge des patients en routine. Néanmoins des études vont débuter afin de les incorporer dans les stratégies de prophylaxie anti-filamenteux.

## **11. Prophylaxies**

Devant la sévérité de ces infections, des stratégies de traitement précoce et de prophylaxie ont été développées.

Tout d'abord la prophylaxie environnementale (chambres avec filtration de l'air et pression positive, de type flux laminaire) vise à éviter la colonisation : le patient est placé dans un environnement dépourvu de spores. La majorité des patients allogreffés en Europe

bénéficient de ce type de protection, soit en chambre individuelle de type chambre à flux laminaire, soit dans des unités fermées sans flux laminaire individuel. L'équipe de Genève a observé dans une étude cas-témoins de 29 cas d'IFI et 102 témoins appariés dans deux services d'hématologie, dans un contexte d'épidémie d'IFI et de travaux, que le fait de sortir plus de 5 fois d'une chambre à flux multiplie par 6 le risque d'IFI, et par 7 si ces sorties avaient lieu pendant la période de neutropénie (Gayet-Ageron, Iten et al. 2015).

D'autre part, différentes approches médicamenteuses ont été développées.

Dans les années 1980, devant le constat d'une forte mortalité par infections fongiques chez les patients en aplasie, et la pauvreté des moyens diagnostiques de l'époque, des stratégies de traitement empirique pour les fièvres persistantes sous antibactériens à large spectre ou pour les fièvres récurrentes, ont été historiquement mises en place pour diminuer l'incidence des infections fongiques (Pizzo, Robichaud et al. 1982; EORTC 1989). L'une des deux études princeps comportait moins de 50 patients, la seconde étude était randomisée mais ouverte. L'impact de la stratégie sur la mortalité n'était significatif que dans la deuxième étude. Néanmoins, en l'absence à l'époque de toute possibilité de prophylaxie médicamenteuse prolongée couvrant la majorité des IFI, à levures ou à filamenteux, cette stratégie a été rapidement adoptée dans les services d'hématologie pour les patients ayant des neutropénies prolongées, d'au moins 10 jours. Sous certains aspects, la stratégie empirique peut être considérée comme une stratégie « prophylactique tardive ». Elle a néanmoins l'inconvénient de traiter un grand nombre de patients (50 à 70%) pour un taux moyen de 10% d'IFI. Des stratégies dites « pré-emptives » ont donc été évaluées afin de diminuer la consommation d'antifongiques et de mieux cibler les patients auxquels on administre un antifongique avant le diagnostic d'une IFI prouvée ou probable. Une première étude (Maertens, Theunissen et al. 2005) a montré que la stratégie préemptive combinant galactomannane et scanner thoracique permettait de traiter 9/88 patients au lieu de 44/88 si ces patients avaient été traités par une stratégie empirique, soit une réduction de 78% des indications d'antifongiques. Dans l'étude Prévert (Cordonnier, Pautas et al. 2009), les stratégies empiriques et préemptives étaient comparées par randomisation chez des patients ayant une neutropénie de haut risque à l'exclusion des allogreffés. Cette étude de non-infériorité n'a pas montré de différence entre les deux stratégies sur le critère de jugement principal qui était la survie 14 jours après la sortie d'aplasie. Il y avait en revanche

plus d'IFI prouvées et probables dans le bras pré-emptif (13/143) que dans le bras empirique (4/150) ( $p < 0.02$ ). La grande majorité des 17 IFI de cette étude étaient en fait survenues au cours des inductions de LA dont la durée médiane était de 26 jours versus 12 jours pour les autres patients. L'analyse du sous-groupe des inductions de LA montrait une différence plus significative sur l'incidence des IFI entre le bras pré-emptif (12/73, 16.4%) et le bras empirique (3/78, 3.8%) ( $p < 0.01$ ). Compte-tenu du nombre de patients, cette étude n'a pas pu affirmer la non-infériorité du bras pré-emptif sur la survie à J42 dans ce sous-groupe le plus à risque. Cette incertitude est la raison pour laquelle une autre étude, incluant uniquement des patients à haut risque avec une neutropénie prolongée, a été menée par l'EORTC. Les résultats de cette seconde étude sont en cours d'analyse.

Avec le développement des antifongiques et notamment d'antifongiques moins toxiques, des stratégies de prophylaxie primaire ont été étudiées dans les populations les plus à risque d'IFI.

Au cours des inductions de leucémies aiguës myéloïdes, le posaconazole diminue significativement les IFI de 8% à 2% et les AI de 7% à 1% (Cornely, Maertens et al. 2007). Après allogreffe, le posaconazole diminue les IFI de 9% à 5% et les AI de 7% à 2% au cours des réactions du greffon contre l'hôte (Ullmann, Lipton et al. 2007).

Le risque de rechute d'une AI après allogreffe chez les patients ayant un antécédent d'AI avant la greffe est important, aux alentours de 30 à 60% en l'absence de prophylaxie secondaire (Offner, Cordonnier et al. 1998; Sipsas and Kontoyiannis 2006). Une série rétrospective de 45 patients ayant un antécédent d'AI avant allogreffe au sein d'une cohorte de 2319 patients allogreffés retrouvait 29% de rechute d'AI après allogreffe (13/45) avec une survie de 56% pour les patients ayant un antécédent d'AI versus 77% pour les patients sans AI (Fukuda, Boeckh et al. 2004). Le risque de rechute d'AI après allogreffe était plus important si le patient avait bénéficié de moins d'un mois d'antifongique avant l'allogreffe. En revanche, si le patient avait bénéficié de plus d'un mois d'antifongique et qu'il y avait résolution des anomalies radiologiques avant allogreffe, la probabilité d'AI après allogreffe ainsi que la survie étaient identiques à celles des patients sans antécédent d'AI avant greffe. Des stratégies de prophylaxies secondaires ont alors été développées permettant de réduire le taux de rechute de 64% (25/39) à 16% (31/190) (Sipsas and Kontoyiannis 2006). Aucune

étude randomisée n'a été réalisée pour évaluer le bénéfice de la prophylaxie secondaire car la comparaison à des cohortes historiques montrait un bénéfice important de celle-ci. Dans une série rétrospective de 48 patients ayant une AI avant allogreffe, 33% rechutaient après greffe (16/48) avec une mortalité de 88% (Offner, Cordonnier et al. 1998). Le taux de rechute était plus important en l'absence de prophylaxie secondaire (4/7 soit 57%) qu'avec une prophylaxie secondaire (12/41 soit 29%). Une série de 11 patients (10 AI et 1 candidose) ayant bénéficié d'une prophylaxie secondaire par voriconazole, 9 dans le cadre d'une allogreffe et 2 pour des consolidations de LA, a montré que cette prophylaxie secondaire était bien tolérée et efficace puisqu'il n'y a pas eu de rechute de l'infection fongique (Cordonnier, Maury et al. 2004). Une étude prospective contrôlée a évalué le bénéfice du voriconazole en prophylaxie secondaire chez 45 patients ayant un antécédent d'IFI (dont 25 AI) (Cordonnier, Rovira et al. 2010). Le taux d'IFI après greffe était de 6.7% (2 rechutes et 1 nouvelle IFI de type mucormycose), ce qui est bien inférieur aux taux historiques d'au moins 30%. Plus récemment une étude prospective rapportait 136 patients ayant un antécédent d'AI (Liu, Lin et al. 2014) et qui ont bénéficié d'une prophylaxie secondaire post-allogreffe avec le même antifongique que pour le traitement curatif : 24 par itraconazole, 74 par voriconazole, 32 par caspofongine et 6 par amphotéricine B liposomale. Douze patients ont rechuté de leur AI après la greffe soit un taux de succès de 91.2% (124/136). A un an, 27.3% des patients avaient développé une IFI, 24.7% une AI ; les deux tiers d'entre eux ont développé l'IFI après l'arrêt de la prophylaxie.

Un antécédent d'IFI avant allogreffe justifie des précautions particulières (éviter l'irradiation corporelle totale, privilégier un conditionnement à intensité réduite, donner une prophylaxie secondaire), mais sous réserve de ces précautions, ne représente plus une contre-indication à la greffe.

## **12. Pourquoi les infections fongiques invasives augmentent-elles ?**

L'incidence des infections fongiques invasives à filamenteux est en augmentation, que ce soit les aspergilloses invasives ou les autres infections à filamenteux (Marr, Carter et al. 2002; Pagano, Caira et al. 2007; Chamilos, Lewis et al. 2008; Park, Pappas et al. 2011; Bitar, Lortholary et al. 2014).

En premier lieu, l'amélioration des soins de support, et en particulier la meilleure gestion des infections bactériennes, a permis d'améliorer la survie des patients immunodéprimés qui restent ainsi à risque de faire d'autres complications.

De plus, l'avènement de la prophylaxie antifongique a modifié l'épidémiologie des infections fongiques. Ainsi la généralisation de la prophylaxie par fluconazole lors de la période d'aplasie post-allogreffe (Slavin, Osborne et al. 1995; Marr, Seidel et al. 2000) a changé l'épidémiologie des IFI après allogreffe, avec une diminution des candidoses et une augmentation des infections à filamenteux (Marr, Carter et al. 2002; Kontoyiannis, Marr et al. 2010).

D'autre part, l'augmentation du panel des drogues immunosuppressives et des lignes de chimiothérapie a augmenté la taille de la population immunodéprimée susceptible de développer des IFI. Ainsi les IFI touchent de nouvelles populations comme les patients atteints de syndromes lymphoprolifératifs ayant reçu de nombreuses lignes de traitement (Lortholary, Gangneux et al. 2011).

Enfin, l'amélioration des outils diagnostiques permet le diagnostic d'un plus grand nombre d'IFI qui étaient auparavant souvent diagnostiquées à l'autopsie. Une grande proportion des AI est diagnostiquée sur le galactomannane seul, sans documentation microbiologique par examen direct ou culture, et ces cas peuvent représenter jusqu'à 80% dans certaines séries (Marr, Schlamm et al. 2015).

### **13. Objectifs de l'étude des facteurs de risque d'aspergillose chez les patients allogreffés**

Malgré les progrès diagnostiques et thérapeutiques, l'AI est toujours une complication fréquente et grave après allogreffe de CSH. La stratégie de prise en charge comprend la stratégie diagnostique et thérapeutique. Les stratégies thérapeutiques sont multiples, curative, empirique, préemptive, prophylactique primaire et secondaire. La prophylaxie donnée à tous les allogreffés pose le problème du coût, de la sélection de résistance et d'éventuelles interférences médicamenteuses. De plus, un patient allogreffé n'a pas le même risque d'AI à tout moment de son parcours de soin. Pour exemple, la survenue d'une

GvH ou d'une infection à CMV augmente considérablement ce risque (Junghanss, Marr et al. 2002; Marr, Carter et al. 2002; Martino, Subira et al. 2002; Fukuda, Boeckh et al. 2003; Kojima, Kami et al. 2004; Thursky, Byrnes et al. 2004; Labbe, Su et al. 2007; Garcia-Vidal, Upton et al. 2008; Mihi, King et al. 2008; Mikulska, Raiola et al. 2009; Blennow, Remberger et al. 2010; Zhang, Jiang et al. 2010; Baddley 2011; Herbrecht, Bories et al. 2012; Li, Wang et al. 2012). Le risque étant évolutif, les stratégies de prise en charge doivent probablement l'être aussi. Il est donc primordial de déterminer les facteurs de risque potentiels d'AI à J0 de la greffe (facteurs pré-greffe) et au cours du suivi du patient (facteurs post-greffe). L'objectif de notre étude des facteurs de risque d'aspergillose chez les patients allogreffés est de déterminer les facteurs de risque potentiels d'AI après allogreffe, à J0 de la greffe, puis au cours du suivi.

## B. Pneumopathies à pneumocystis (PcP)

### 1. Définition et clinique

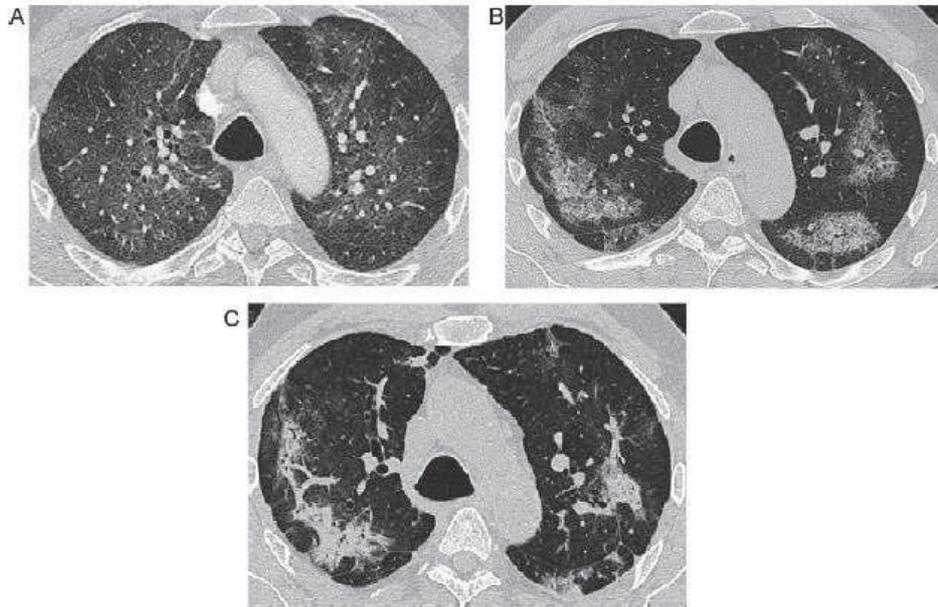
La pneumopathie à *Pneumocystis jirovecii* ou pneumocystose (PcP) est une complication classique du patient immunodéprimé. Elle a été initialement décrite chez les enfants prématurés et dénutris (Cordonnier, Cesaro et al. 2016). Elle a ensuite été beaucoup étudiée à l'occasion de la pandémie VIH. La pneumocystose du patient non VIH est cependant différente de la pneumocystose du patient VIH, que ce soit sur le plan clinique, biologique ou pronostique (Tableau 1).

**Tableau 1** Différences entre les pneumocystoses des patients VIH+ et VIH-. (Cordonnier, Cesaro et al. 2016)

	VIH+	VIH-
PcP révélant la maladie sous-jacente	Oui	Exceptionnel
Corticoïdes avant diagnostic PcP	Non	Oui (90%) (surtout décroissance ou après arrêt)
Début des symptômes avant le diagnostic	Progressif (3-5 semaines)	Aigu (4-8 jours)
Hypoxémie	Modérée	Souvent sévère
Augmentation des LDH :		
- Spécificité et sensibilité	-Bonnes	-Faibles
- Niveau	-Elevé	-Modéré
LBA	Nombreux kystes Peu de PNN	Faible nombre de kystes Nombreux PNN
Mortalité	17-30%	28-53% (surtout après allogreffe)

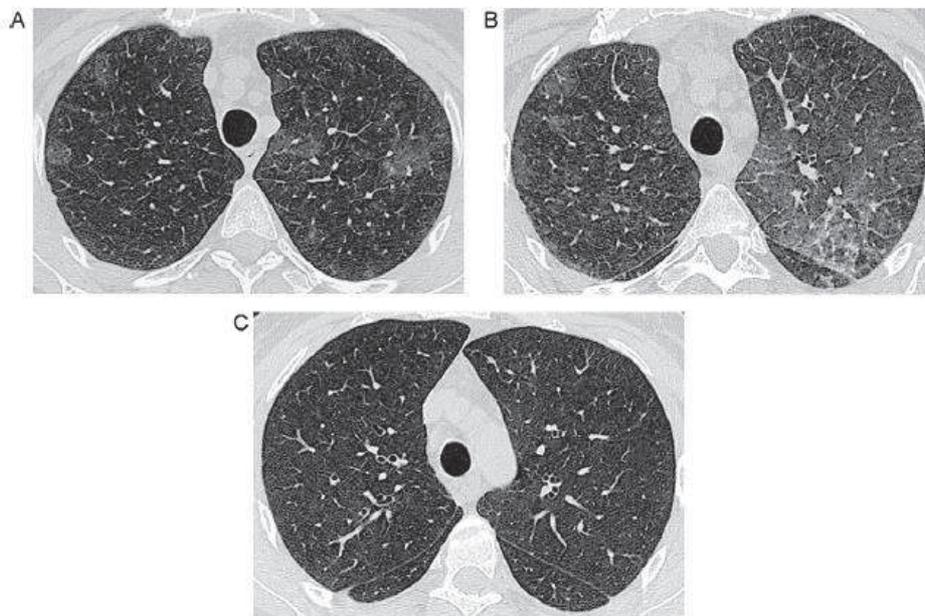
LBA : lavage broncho-alvéolaire ; PNN : polynucléaires neutrophiles

Le tableau clinique classique est une pneumopathie interstitielle fébrile (Figures 10 à 13).



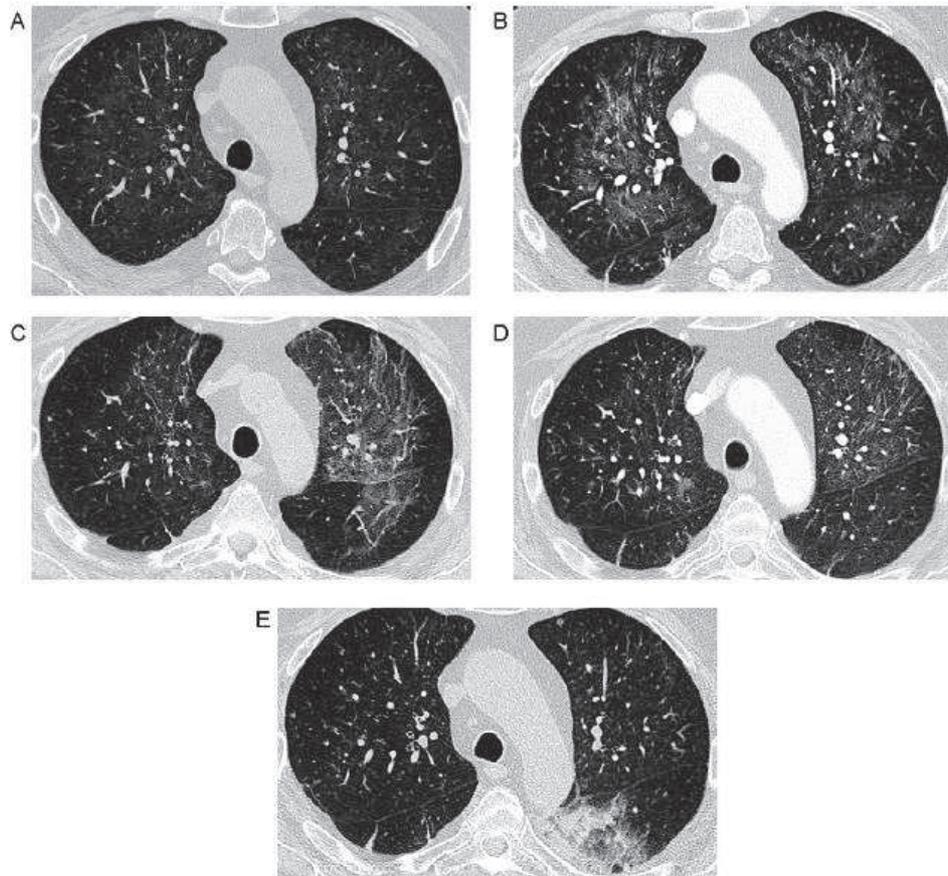
**Fig. 2.** Sixty-five-year-old patient with Wegener's granulomatosis and fever for 5 days. (a) CT1 shows PJP in the typical apical distribution with peripheral sparing. (b) Ten days after the application of intravenous therapy with sulphonamides but no corticosteroids. CT-attenuation of pulmonary infiltrates has increased and beginning architectural distortions can be observed. GGO is still present. (c) Another 10 days later. Parenchymal consolidations and architectural distortions are progressive.

**Figure 10** Scanner d'une pneumocystose (Vogel, Vatlach et al. 2012)



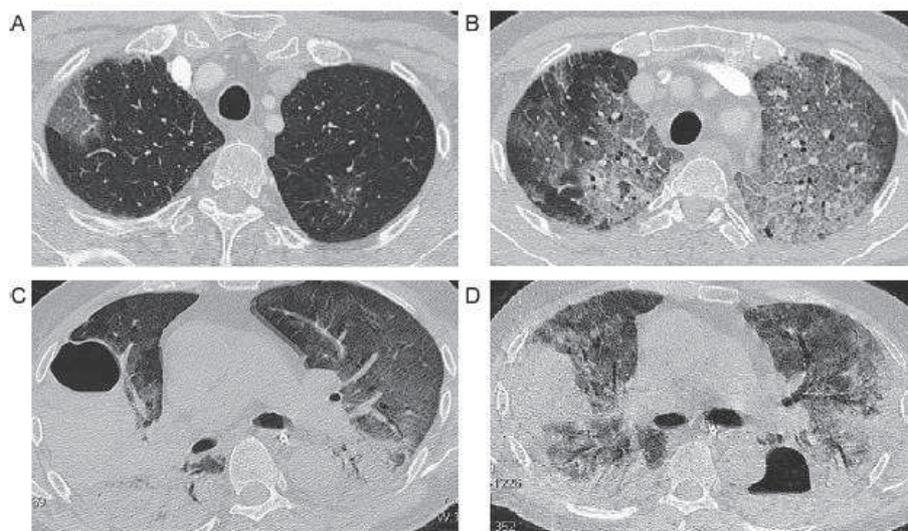
**Fig. 1.** Forty-six-year-old woman with chemotherapy for acute lymphoblastic leukemia (ALL). (a) Two days after onset of symptoms, patchy GGO is seen bilaterally in a non-anatomical distribution involving the upper lobes including subpleural areas. Viral pneumonia was suspected and antiviral treatment was applied. (b) Four days later. No specific PJP treatment had been applied until then. GGO are denser and diffused. (c) Another 5 days later after 5 days of sulphonamide-therapy with adjunctive corticosteroids. The image shows almost complete resolution of PJP.

**Figure 11** Scanner d'une pneumocystose (Vogel, Vatlach et al. 2012)



**Fig. 3.** Sixty-two-year-old man under corticosteroid-therapy due to cerebral metastases of malignant melanoma. (a) Acute PJP the day of the onset of symptoms. Discrete GGO is seen bilaterally in the upper lobes with peripheral sparing. (b) Eight days later in the course of the disease, still without any specific treatment, GGO has become denser. (c) Another 5 days later, after 4 days of sulphonamide-therapy, GGO partially resolved. Architectural distortions are seen especially in the left upper lobe. Sulphonamide-therapy was continued and doses of corticosteroids increased. (d) Another 22 days later, GGO is still declining; architectural distortions also regressed, but were still present. (e) Two months later irregular linear opacities disappeared (atelectasis due to a new pulmonary metastasis is seen apically in the left lower lobe).

**Figure 12** Scanner d'une pneumocystose (Vogel, Vatlach et al. 2012)



**Fig. 4.** Sixty-five-year-old patient under chemotherapy of non-Hodgkin lymphoma (NHL). (a) Acute PJP 3 days after onset of symptoms. GGO without peripheral sparing are seen in the apex of the right lung. (b) No specific therapy was applied. Five days later GGO shows progression. Some irregular linear opacities can be seen. (c) Another 6 days later (still no specific therapy) there are dense parenchymal consolidations. A pulmonary cyst occurred in the right upper lobe. (d) Another 9 days later (9 days after intravenous therapy with sulfonamides plus corticosteroids) a 2nd pulmonary cyst is seen in the left lower lobe.

**Figure 13** Scanner d'une pneumocystose (Vogel, Vatlach et al. 2012)

Dans une étude rétrospective de 55 patients ayant une hémopathie maligne et une PcP entre 1990 et 1999 en Italie, les symptômes étaient une fièvre dans 86% des cas, une dyspnée dans 78% des cas, une toux sèche dans 71% des cas, une hypoxie sévère dans 71% des cas, une douleur thoracique dans 14% des cas et des frissons dans 5% des cas (Pagano, Fianchi et al. 2002). Dans une autre étude rétrospective de 56 patients dont 44 avaient une hémopathie maligne, la fièvre était présente dans 85.7% des cas, la dyspnée 78.6% des cas, la toux dans 57.1% des cas (Bollée, Sarfati et al. 2007). Un infiltrat interstitiel bilatéral était présent dans 80 % des cas et des opacités en verre dépoli dans 89% des cas sur le scanner thoracique. La présentation était aiguë avec une médiane de 7 jours entre le début des symptômes et le diagnostic, et l'hypoxie profonde avec une PaO<sub>2</sub> médiane de 58 mmHg. Les co-infections pulmonaires sont très fréquentes dans les PcP, et ont été décrites dans 28% à 71% des cas, qu'il s'agisse d'infections bactériennes (*Staphylococcus aureus*, BGN), fongiques (*Aspergillus sp*) ou virales (CMV). Chez l'allogreffé, la PcP est associée à une pneumonie à CMV dans 50% des cas (Ewig, Bauer et al. 1995; Yale and Limper 1996; Torres, Chemaly et al. 2006; Maschmeyer, Helweg-Larsen et al. 2016).

La pneumocystose étant une maladie grave et à évolution rapide, on ne peut pas attendre une confirmation diagnostique pour débiter un traitement. En effet tout retard thérapeutique a un impact sur la mortalité (Asai, Motojima et al. 2012; Li, Lee et al. 2014) et les examens mycologiques ne sont pas négativés par quelques jours de traitement.

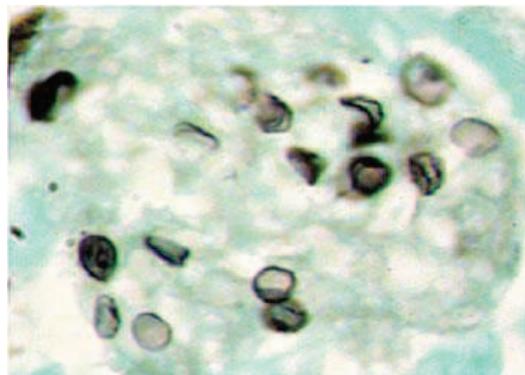
Le traitement doit être débuté en urgence chez un patient à risque, avec des symptômes (dyspnée, toux, fièvre, hypoxie, douleur thoracique) et une imagerie compatibles (radiographie de thorax ou de préférence scanner thoracique), avec ou sans élévation des LDH (Maschmeyer, Helweg-Larsen et al. 2016).

## **2. Diagnostic**

Le diagnostic mycologique de pneumocystose repose sur la détection de *Pneumocystis jirovecii* dans un prélèvement respiratoire. *Pneumocystis jirovecii* est un champignon qui se multiplie à la surface des pneumocytes de type I, raison pour laquelle sa densité est plus importante au niveau de l'alvéole.

### ✓ Comment détecter *Pneumocystis jirovecii* ?

Le *Pneumocystis jirovecii* n'est pas cultivable *in vitro* (Alanio, Hauser et al. 2016), et donc sa détection directe (microscopie, acides nucléiques) dans les prélèvements est primordiale. L'examen direct (Figure 14) de prélèvements respiratoires, en particulier du LBA, permet de détecter les kystes (asci) et les formes trophiques (ascospores) avec les colorations de Giemsa, bleu de toluidine, calcofluor et Gomori-Grocott. Dans les années 1970, est apparue l'immunofluorescence (IF) qui a une meilleure sensibilité que l'examen direct. La plupart des kits utilise des anticorps monoclonaux anti-kystes, mais certains utilisent des anticorps anti-kystes et anti-trophozoïtes.



**Figure 14** Examen direct de lavage broncho-alvéolaire montrant des kystes de *Pneumocystis jirovecii* (coloration Gomori-Grocott)

Les premières PCR ont été développées dans les années 1990. La PCR a été comparée à l'examen direct sur 47 LBA (Wakefield, Pixley et al. 1990). Elle était fortement positive dans le LBA de 16 patients qui avaient une pneumocystose confirmée par un examen direct positif et dans le LBA de 4 patients qui avaient des symptômes cliniques évocateurs mais un examen direct négatif. Elle était faiblement positive dans les LBA de 3 patients immunodéprimés « sans pneumocystose ». Elle était négative dans le LBA de 10 patients immunocompétents. Comme attendu, la PCR apparaissait déjà comme plus sensible que l'examen direct. Dans les années 2000, la PCR quantitative en temps réel (qPCR) a été développée. La comparaison sur 173 LBA chez 150 patients a montré que la qPCR était plus

rapide que la PCR standard ; les deux avaient une sensibilité de 100%, la spécificité de la PCR standard était de 87% et la spécificité de la PCR en temps réel de 85% (Flori, Bellete et al. 2004). Deux métaanalyses sur la qPCR dans le LBA retrouvaient une sensibilité de l'ordre de 99% et une spécificité de l'ordre de 91% (Lu, Ling et al. 2011; Fan, Lu et al. 2013). Il est apparu que la PCR était plus sensible que l'examen direct et que l'immuno-fluorescence pour établir un diagnostic de pneumocystose. L'équipe de mycologie du CHU Henri Mondor a développé une qPCR et l'a validée sur 353 LBA chez 287 patients (Botterel, Cabaret et al. 2012). Dix-sept LBA (5%) étaient positifs en immunofluorescence et en qPCR, 63 (18%) étaient négatifs en immunofluorescence et positifs en qPCR, et 273 (77%) étaient négatifs en immunofluorescence et en qPCR. La charge fongique des prélèvements positifs en immunofluorescence et en qPCR ( $4.2 \log_{10}$  copies/ $\mu\text{L}$ ) était supérieure à la charge fongique des prélèvements négatifs en immunofluorescence et positifs en qPCR ( $1.1 \log_{10}$  copies/ $\mu\text{L}$ ) ( $p < 10^{-4}$ ). En prenant l'immunofluorescence comme examen de référence, la sensibilité de la qPCR était de 100 % pour une charge fongique  $\geq 2.6 \log_{10}$  copies/ $\mu\text{L}$  et la spécificité de 100% pour une charge fongique  $\geq 4 \log_{10}$  copies/ $\mu\text{L}$ . Dans une étude prospective multicentrique sur 110 patients la sensibilité était de 93%, la spécificité de 91%, la valeur prédictive positive (VPP) de 59% et la valeur prédictive négative (VPN) de 99% (Hauser, Bille et al. 2011). Mais cette grande sensibilité pose le problème de la pertinence clinique d'un résultat positif : certains patients avaient une PCR positive avec un examen direct négatif et aucun signe clinique. La question de différencier infection et colonisation ou portage s'est posée et plusieurs équipes ont essayé d'identifier un seuil permettant de distinguer colonisation et infection. Dans une étude prospective sur 238 patients immunodéprimés ayant une pneumopathie, une PCR en temps réel a été réalisée sur 163 LBA et 115 expectorations induites (Alanio, Desoubieux et al. 2011). L'objectif était de différencier infection et colonisation. Sur 21 échantillons provenant de 16 patients avec une haute probabilité de pneumocystose, les 21 échantillons étaient positifs en qPCR alors que seuls 16 d'entre eux avaient un examen microscopique positif (examen direct avec la coloration Giemsa et/ou immunofluorescence). La charge fongique allait de 134 à  $1.73 \cdot 10^6$  TFEq/mL (trophic form equivalent). Sur 257 échantillons de 222 patients avec une faible probabilité de pneumocystose, 222 échantillons étaient négatifs pour toutes les techniques mais 35 étaient positifs uniquement en qPCR avec une charge fongique allant de 0.1 à 1840 TFEq/mL. Ces patients pourraient être uniquement colonisés. Les auteurs ont alors proposé 2 seuils, 120 et

1900 TFEq/mL, pour différencier colonisation et infection avec une zone grise entre les deux bornes. L'équipe de Grenoble suggère aussi d'utiliser 2 seuils de 3160 copies/mL et 31600 copies/mL avec une zone grise entre les deux (Maillet, Maubon et al. 2014). Dans cette étude, sur 35 patients, le seuil de 3160 copies/mL permettait d'avoir une sensibilité de 100% et une VPN de 100% mais une spécificité de 70% tandis qu'un seuil de 31600 copies/mL avait une spécificité de 100% et une VPP de 100% mais une sensibilité de 80%. Le problème majeur posé par les résultats de ces études est que la signification de la PCR pour le diagnostic de PcP a été évaluée en regard d'un diagnostic de PcP sur des paramètres purement cliniques (existence d'une pneumopathie, caractères de celle-ci, sévérité, existence d'autres pathogènes susceptibles d'expliquer la pneumopathie) dont certains étaient arbitraires et/ou clinicien-dépendants.

Néanmoins plusieurs études plus récentes ne parviennent pas à établir un seuil. Une étude de 71 cas de pneumocystose diagnostiqués par IF et 171 témoins (pneumopathie non pneumocystose) chez des patients non VIH (Muhlethaler, Bogli-Stuber et al. 2012) rapportait une VPP de 98% si la charge fongique était supérieure à 1450 pathogènes/mL. Pour les 153 patients avec PCR négative la VPN était de 99.3% mais entre 1 et 1450 pathogènes/mL, on ne pouvait pas trancher entre colonisation et infection. L'interprétation dépendait du degré de suspicion clinique. Dans une étude française prospective sur 4 ans (Robert-Gangneux, Belaz et al. 2014), 814 LBA chez 659 patients ont été analysés. Cent-dix-neuf patients avaient une qPCR positive avec un examen direct au May-Grünwald-Giemsa et une IF négative. Ces patients ont été classés en 35 PcP, 41 PcP possibles et 43 colonisations suivant des critères cliniques, et l'évolution avec ou sans traitement. Les auteurs n'ont pas réussi à établir un seuil permettant de distinguer avec pertinence une infection d'une colonisation. Enfin une étude rétrospective s'était intéressée à chercher un seuil chez les patients VIH et non VIH (Louis, Guitard et al. 2015). Les auteurs ont étudié rétrospectivement 1212 épisodes de pneumonies survenus chez 1003 patients investigués par LBA. Les PcP prouvées étaient définies par une IF positive. Les PcP probables étaient définies par une IF négative une PCR positive et une clinique, une imagerie et une évolution compatibles avec une PcP. Une colonisation était définie par une IF négative, une PCR positive et l'absence de signes radiologiques compatibles avec une PcP. L'absence de PcP était définie par une PCR et une IF négative et l'absence de signes cliniques de PcP. Chez les patients VIH, ils ont identifié 52 PcP

prouvées, 4 probables, 8 colonisations et 152 absences de PcP. Chez les non VIH, les auteurs ont identifié 27 PcP prouvées, 22 probables, 117 colonisations et 829 absences de PcP. Les charges fongiques étaient supérieures dans les PcP prouvées par rapport aux probables et supérieures chez les patients VIH par rapport aux non VIH. Avec un seuil à  $1.5 \cdot 10^4$  copies/mL, la sensibilité et la spécificité était de 100% pour les VIH. Chez les non VIH, le seuil proposé était de  $2.87 \cdot 10^4$  copies/mL pour avoir une spécificité de 100% et de  $3.39 \cdot 10^3$  copies/mL pour avoir une sensibilité de 100%. La recherche d'un seuil unique et universel est donc probablement illusoire. Il est probablement différent dans des populations certes toutes immunodéprimées mais avec des mécanismes et des niveaux d'immunodépression très différents. De plus, les méthodes utilisées sont variables en fonction des études, rajoutant un facteur de variabilité important.

#### ✓ **Quel prélèvement respiratoire ?**

Le prélèvement de référence est le lavage broncho-alvéolaire (Alanio, Hauser et al. 2016) avec réalisation d'un examen direct, d'une IF et d'une PCR quantitative en temps réel. Chez les patients d'hématologie, le LBA est d'autant plus important que les co-infections sont très fréquentes. Néanmoins le LBA est un prélèvement invasif, c'est pourquoi la recherche d'une stratégie diagnostique non invasive a été évaluée. Plusieurs études ont montré que les prélèvements des voies aériennes supérieures pouvaient être utiles bien que moins sensibles puisqu'il existe un gradient de charge fongique décroissant des alvéoles aux voies respiratoires supérieures (Guigue, Alanio et al. 2015). Helweg-Larsen et al (Helweg-Larsen, Jensen et al. 1998) ont également comparé le lavage pharyngé et le LBA chez 76 patients VIH et ont trouvé que la qPCR avait une sensibilité de 89%, une spécificité de 94%, une VPP de 93% et une VPN de 91% pour le diagnostic de PcP. Une étude prospective sur 202 enfants en Afrique du Sud (dont 65% étaient porteurs du VIH et 63% étaient sous prophylaxie par Cotrimoxazole) (Samuel, Whitelaw et al. 2011) qui consultaient pour pneumopathie, a comparé les résultats de 147 prélèvements respiratoires hauts et bas. Quatre-vingt-onze pour cent des couples de prélèvements respiratoires hauts et bas chez le même patient étaient concordants (70 positifs dans les deux types de prélèvements, 63 double négatifs). Chez 3 patients (2%), les auteurs retrouvaient des prélèvements respiratoires hauts positifs

et bas négatifs, et chez 11 (7%) patients des prélèvements respiratoires hauts négatifs et bas positifs. La sensibilité des prélèvements respiratoires hauts était de 86%, la spécificité de 95%, la VPP de 96% et la VPN 85%. Une autre équipe (To, Wong et al. 2013) a comparé 117 couples d'aspiration naso-pharyngée et de LBA. Quinze couples étaient concordants positifs, 98 concordants négatifs et quatre étaient positifs sur l'aspiration naso-pharyngée et négatifs dans le LBA. Aucun des patients ayant une pneumocystose n'avait d'hémopathie dans cette série. Les prélèvements respiratoires des voies aériennes supérieures sont donc une alternative au LBA quand celui-ci ne peut pas être réalisé. Néanmoins il est moins sensible du fait du gradient fongique et probablement encore plus chez les patients d'hématologie qui ont une charge fongique inférieure aux patients VIH. Un prélèvement négatif en qPCR dans les voies aériennes supérieures ne permet pas d'éliminer une pneumocystose (Alanio, Hauser et al. 2016). De plus le prélèvement respiratoire des voies supérieures ne permet pas de diagnostiquer les co-infections.

#### ✓ Marqueurs indirects

Le  $\beta$ -D-Glucane est un marqueur panfongique présent dans la paroi de *Pneumocystis jirovecii*. Deux métaanalyses ont retrouvé une sensibilité de 94.8% et 96% et une spécificité de 86.3% et 84% pour le  $\beta$ -D-Glucane dans le diagnostic de PcP (Onishi, Sugiyama et al. 2011; Karageorgopoulos, Qu et al. 2013). Damiani et al (Damiani, Le Gal et al. 2013) ont également étudié l'intérêt du  $\beta$ -D-Glucane pour différencier infection et colonisation sur 46 patients (dont 5 d'hématologie) ayant une PCR positive dans le LBA. Dix-sept patients ont été classés « pneumocystose » et 29 « colonisation ». Le diagnostic de pneumocystose était retenu si le patient avait des signes cliniques (dyspnée, toux), radiologiques (syndrome interstitiel), biologiques ( $\text{PaO}_2 < 70$  mmHg), et l'absence de pneumopathie bactérienne. Pour la PCR un seuil à  $1.6 \cdot 10^3$  copies/ $\mu\text{L}$  avait une sensibilité de 100% et un seuil à  $2 \cdot 10^4$  copies/ $\mu\text{L}$  avait une spécificité de 100%. Trente-deux patients se trouvaient de part et d'autre de ces deux seuils et étaient bien classés. Quatorze patients se situaient dans la zone grise entre ces seuils. Parmi eux, 4 patients avaient un  $\beta$ -D-Glucane positif et avaient initialement été assignés dans le groupe PcP. Les 10 autres, initialement assignés dans le groupe colonisation, avaient un  $\beta$ -D-Glucane négatif. Le  $\beta$ -D-Glucane reflète la charge fongique pulmonaire et pourrait

peut-être aider à distinguer colonisation et infection. Dans une étude rétrospective sur 63 patients immunodéprimés ayant eu un LBA pour une pneumopathie (Costa, Botterel et al. 2012), la qPCR était positive dans le sérum uniquement quand le LBA était positif en microscopie et en qPCR. Le  $\beta$ -D-Glucane était supérieur à 500 pg/mL pour les 10 patients dont le LBA était positif en microscopie et en qPCR. Dans le groupe des 26 patients dont le LBA était positif en qPCR mais négatif en microscopie, le  $\beta$ -D-Glucane était supérieur à 500 pg/mL pour 6 patients, compris entre 80 pg/mL et 500 pg/mL pour 19 patients et négatif pour 1 patient, qui avait une charge fongique la plus faible à 40 copies/ $\mu$ L. Dans le groupe des 34 patients dont le LBA était négatif en microscopie et en qPCR, le  $\beta$ -D-Glucane était supérieur à 500 pg/mL pour 2 patients, compris entre 80 pg/mL et 500 pg/mL pour 8 patients et négatif pour 24 patients. Il faut rappeler que le  $\beta$ -D-Glucane est un marqueur panfongique et que les co-infections sont fréquentes chez les patients d'hématologie.

Le  $\beta$ -D-Glucane est donc une aide pour le diagnostic de pneumocystose. Un algorithme diagnostique a été proposé par l'ECIL dans ses recommandations européennes de 2016 (Figure 15). Il est proposé qu'un  $\beta$ -D-Glucane négatif permette d'éliminer le diagnostic de PcP quand le LBA n'a pas pu être réalisé. A contrario, en l'absence de LBA, la positivité du  $\beta$ -D-Glucane n'est pas suffisamment spécifique dans cette population pour porter seul le diagnostic de pneumocystose, mais est un argument supplémentaire pour aider au diagnostic de pneumocystose en plus de la positivité de la qPCR dans un prélèvement respiratoire non invasif avec examen microscopique négatif.



### 3. Physiopathologie

Le mécanisme de la pneumocystose est débattu. Il a longtemps été admis que l'infection plus ou moins symptomatique était acquise durant la petite enfance et qu'il en résultait une colonisation asymptomatique. Ceci reposait sur la forte proportion de sujets séropositifs dès l'enfance : 2/3 de la population des enfants de 4 ans (Cordonnier, Cesaro et al. 2016). L'infection durant une phase d'immunodépression correspondait à la réactivation d'une colonisation. Néanmoins des cas de transmission interhumaine ont été décrits. Ainsi plusieurs épidémies ont été rapportées, principalement dans des services de transplantation rénale, en l'absence de prophylaxie ou en cas de prophylaxie sous-optimale (de Boer, de Fijter et al. 2011; Yiannakis and Boswell 2016). Une épidémie de pneumocystose avec analyse moléculaire dans un service de greffe hépatique a également été rapportée (Desoubeaux, Dominique et al. 2016) : 28 souches de *Pneumocystis jirovecii* ont été génotypées, 4 chez des patients transplantés hépatiques et 24 chez des patients non épidémiologiquement liés. Les 4 patients greffés hépatiques partageaient la même souche qui était différente de celles des 24 autres patients. La carte de transmission montrait que ces patients s'étaient rencontrés notamment en consultation. En hématologie, 3 épidémies ont été rapportées, la première sans analyse moléculaire (Ong and Jones 1998) et pour les 2 autres, l'analyse moléculaire n'avait pas permis de conclure à une source commune (Helweg-Larsen, Tsolaki et al. 1998; Depypere, Saegeman et al. 2016). Une transmission de pneumocystis au personnel de santé à partir d'un patient infecté a été décrite (Valade, Azoulay et al. 2015), et la diffusion dans l'air de la chambre des patients colonisés a été démontrée (Frealde, Valade et al. 2017). Les PcP peuvent donc aussi être des primo-infections, même si le patient a été antérieurement infecté par une autre souche. En faveur de cette hypothèse, il faut noter que 70 à 92% des patients porteurs d'une PcP sont infectés avec un mélange de plusieurs génotypes (Gits-Muselli, Peraldi et al. 2015; Alanio, Gits-Muselli et al. 2016).

### 4. Traitement

Il n'y a pas eu d'essai prospectif randomisé pour le traitement de la PcP, spécifiquement pour les patients d'hématologie et les recommandations (Maschmeyer, Helweg-Larsen et al.

2016) s'appuient sur les essais menés pour les patients VIH et les études observationnelles des patients d'hématologie. Le cotrimoxazole (Triméthoprime/Sulfaméthoxazole) est le traitement le plus efficace (Tableau 2). Toutes les autres molécules ne doivent être envisagées qu'en cas de contre-indication vraie et vérifiée.

**Tableau 2** Traitement de 1<sup>ère</sup> ligne des pneumocystoses pour les patients non VIH selon les recommandations de l'ECIL. (Maschmeyer, Helweg-Larsen et al. 2016)

Molécule	Grade
Triméthoprime/Sulfaméthoxazole 15-20 mg/kg (TMP) 75-100 mg/kg (SMX)	Allr
Pentamidine IV 4 mg/kg/j	CIIt
Primaquine + Clindamycine 30 mg/j PO + 600 mg x 3/j IV ou PO	CIIt
Atovaquone 750 mg x2 (ou 3)/j PO	CIIt

Le traitement est généralement débuté en intra-veineux (IV) mais peut être initié per os (PO) en l'absence de signes de gravité et en l'absence de troubles digestifs, et doit être poursuivi 2 à 3 semaines (Torres, Chemaly et al. 2006; McKinnell, Cannella et al. 2012; Maschmeyer, Helweg-Larsen et al. 2016). Le relais PO est à envisager dès qu'il y a une amélioration clinique. Il est classique de voir une détérioration pendant les 3 à 5 premiers jours et la réévaluation ne doit avoir lieu qu'à partir de J8. Il n'y a pas d'intérêt à suivre l'efficacité thérapeutique sur le  $\beta$ -D-Glucane car les co-infections et les surinfections sont fréquentes (Lemiale, Debrumetz et al. 2013). En cas de non-amélioration il faut chercher une complication (pneumothorax, épanchement pleural, infection acquise) (Torres, Chemaly et al. 2006) avant de changer de molécule. En effet toutes les autres molécules sont moins efficaces que le cotrimoxazole (Tableau 3)

**Tableau 3** Traitement de 2<sup>e</sup> ligne des pneumocystoses pour les patients non VIH selon les recommandations de l'ECIL. (Maschmeyer, Helweg-Larsen et al. 2016)

Molécule	Grade
Primaquine + Clindamycine 30 mg/j PO + 600 mg x 3/j IV ou PO	BIIt
Pentamidine IV 4 mg/kg/j	BIII
TMP/SMX (15-20 mg/kg/75-100 mg/kg) + Caspofongine (70-50 mg/j)	CIlu
Echinocandine seule	DIIlu

Chez les patients séropositifs pour le VIH, l'adjonction d'une corticothérapie en cas d'hypoxie importante ( $\text{PaO}_2 < 70$  mmHg) a fait l'objet d'une étude randomisée qui a montré son bénéfice avec une diminution du recours à la ventilation mécanique et un impact sur la survie dans le sous-groupe des patients ayant une hypoxie modérée à sévère (Bozzette, Sattler et al. 1990). Elle est donc recommandée (Limper, Knox et al. 2011) chez le patient VIH, en association avec le cotrimoxazole. Chez le patient d'hématologie, les seules données sont issues d'études rétrospectives dont les résultats sont contradictoires (Pareja, Garland et al. 1998; Delclaux, Zahar et al. 1999; Pagano, Fianchi et al. 2002; Roblot, Godet et al. 2002; Zahar, Robin et al. 2002; Bollée, Sarfati et al. 2007; Moon, Kim et al. 2011; Lemiale, Debrumetz et al. 2013; Kofteridis, Valachis et al. 2014). L'étude rétrospective de Lemiale et al. (Lemiale, Debrumetz et al. 2013) rapportait même un surrisque de mortalité avec adjonction de fortes doses de corticoïdes. La question des corticoïdes est beaucoup plus complexe chez les patients d'hématologie que chez les patients VIH. En effet, les patients d'hématologie reçoivent déjà, pour certains d'entre eux, des corticoïdes. La survenue de la pneumocystose survient d'ailleurs fréquemment lors de la décroissance ou de l'arrêt de la corticothérapie. Des études prospectives sont nécessaires afin d'évaluer l'intérêt d'une adjonction de corticoïdes chez les patients qui n'en ont pas au moment du diagnostic de PcP, et chez les patients qui en ont déjà.

## 5. Mortalité

La pneumocystose est une infection grave chez le patient d'hématologie. La mortalité est plus importante chez le patient d'hématologie, et en particulier chez les patients allogreffés, que chez le patient VIH, allant de 30 à 60% (Roux, Lemiale et al. 2010; Cordonnier, Cesaro et al. 2016). La gravité est liée au risque de détresse respiratoire qui survient dans 50% des cas de pneumocystose (Kojicic, Li et al. 2012).

Dans une cohorte prospective de 544 PcP VIH + et VIH- (26% de patients d'hématologie et une majorité de patients greffés d'organe solide), la mortalité était de 27% pour les patients VIH- (43% pour les allogreffés de CSH) versus 4% chez les patients VIH+ (Roux, Canet et al. 2014).

Dans une série de 79 PcP chez des patients non VIH ayant une hémopathie, une greffe de CSH ou une greffe d'organe solide, la mortalité était de 34% (26/ 76) (Torres, Chemaly et al. 2006). La mortalité attribuable à la PcP était supérieure chez les greffés de CSH (48%) comparativement aux autres patients (29%). Yale et al. (Yale and Limper 1996) ont étudié rétrospectivement 116 patients VIH négatifs ayant une PcP et ont retrouvé une mortalité hospitalière de 34%. Dans une étude rétrospective de 101 patients ayant une PcP (69 VIH et 32 non VIH), la mortalité hospitalière était de 19% pour les patients VIH versus 27% pour les non VIH. La mortalité à J90 était de 28% pour les VIH versus 41% pour les non VIH (McKinnell, Cannella et al. 2012). Dans une étude rétrospective de 60 patients non atteints par le VIH, et ayant une PcP, la mortalité était de 33% (Roblot 2003). Dans une autre étude rétrospective réalisée par la même équipe chez 103 patients non atteints par le VIH et ayant une PcP (Roblot, Godet et al. 2002), la mortalité était de 38%. Pagano et al ont mené une étude rétrospective sur 55 patients d'hématologie ayant une Pcp, la mortalité était de 29% à 30 jours (Pagano, Fianchi et al. 2002).

D'autres séries retrouvaient des taux de mortalité importants : 30% de mortalité dans une série de 30 PcP après Rituximab (Martin-Garrido, Carmona et al. 2013).

## **6. Facteurs de mauvais pronostic**

Chez les patients non VIH, les facteurs de mauvais pronostic au moment du diagnostic sont : une hémopathie non contrôlée, un mauvais état général avec un score de Eastern Cooperative Oncology Groupe Performans status (ECOG PS) > 2, une corticothérapie, un retard thérapeutique, une hypoalbuminémie, une co-infection à HSV ou CMV, un taux élevé de PNN dans le LBA, et un score APACHE-II ou SAPS-II élevé. Les paramètres évolutifs de mauvais pronostic sont : un état de choc, la nécessité d'utiliser des vasopresseurs, l'utilisation de fortes doses de corticoïdes, la détresse respiratoire, la nécessité d'utiliser de l'oxygène à haut débit, la nécessité d'avoir recours à la ventilation mécanique, un syndrome de détresse respiratoire aigu, ou une détérioration clinique à J8 (Yale and Limper 1996; Roblot, Godet et al. 2002; Roblot 2003; Torres, Chemaly et al. 2006; Boonsarngsuk, Sirilak et al. 2009; Lemiale, Debrumetz et al. 2013; Kim, Lee et al. 2014; Ko, Jeong et al. 2014; Kofteridis, Valachis et al. 2014; Roembke, Heinzow et al. 2014; Roux, Gonzalez et al. 2014; Maschmeyer, Helweg-Larsen et al. 2016).

## **7. Facteurs de risque**

Selon les recommandations de l'ECIL, les patients à risque élevé de PcP sont ceux atteints d'une LAL, d'un lymphome agressif en rechute, les patients allogreffés, les patients traités par de fortes doses de corticoïdes (>20 mg prednisone >1 mois) ou par des agents immunosuppresseurs T. Les patients ayant un antécédent de PcP sont également à haut risque de développer à nouveau une PcP. Les patients à risque modéré sont les patients autogreffés et ceux recevant une chimiothérapie intensive (R-CHOP 14, RFC, ABVD, gemcitabine, méthotrexate à forte dose). Cependant, la prophylaxie efface tous ces facteurs de risque (Maertens, Cesaro et al. 2016) et le principal facteur de risque est l'absence de prophylaxie ou la non-compliance chez les patients à haut risque. Les facteurs de risque d'acquisition ont été peu étudiés en dehors des cas de transmission interhumaine décrits plus haut.

## 8. Prophylaxie

Avant l'ère de la prophylaxie, l'incidence allait jusqu'à 40% chez les enfants atteints de LAL, et augmentait avec l'intensité de la chimiothérapie (Hughes, Feldman et al. 1975). Elle était de 16% après allogreffe (Meyers, Pifer et al. 1979).

L'incidence de PcP a diminué depuis la mise en place de la prophylaxie chez les patients à risque. Les PcP surviennent majoritairement en l'absence de prophylaxie. Pagano et al. dans leur étude rétrospective de 55 cas de PcP en hématologie n'a retrouvé que 2 cas qui avaient une prophylaxie par cotrimoxazole (Pagano, Fianchi et al. 2002). Tuan rapportait 19 PcP post greffe de CSH entre 1976 et 1991 sur 1454 greffes : un seul des 19 patients prenait une prophylaxie (Tuan, Dennison et al. 1992). Sur 1359 patients greffés à Seattle, les 15 PcP ne correspondaient qu'à des cas sans prophylaxie par cotrimoxazole (Chen, Boeckh et al. 2003). Dans une étude rétrospective monocentrique (Saint-Louis) sur 6 ans reprenant 519 allogreffes, 13 PcP (2.5%) ont été identifiées (De Castro, Neuville et al. 2005) : 3 précoces (avant 6 mois) dans les 5 premiers mois sous prophylaxie (mais on ne sait pas laquelle), et 10 tardives (après 6 mois) alors que la prophylaxie avait été arrêtée. La médiane de survenue de la PcP était de 14.5 mois.

Deux métaanalyses montraient que la prophylaxie diminue de 91% le risque de PcP (Green, Paul et al. 2007; Green, Paul et al. 2007).

Le type de prophylaxie a également une importance, la prophylaxie par cotrimoxazole étant la plus efficace. Ainsi, dans une étude rétrospective après allogreffe de CSH, l'incidence de PcP était de 0.37% (2/535) sous cotrimoxazole versus 7.2% (8/111) sous dapsonne  $p < 0.001$  (Souza, Boeckh et al. 1999). Vasconcelles et al ont analysé 327 patients et retrouvé 8 PcP. Aucun des 105 patients qui avaient une prophylaxie par cotrimoxazole n'a développé de PcP, 1 cas de PcP sur les 31 patients sous dapsonne, 4 sur les 44 sous aérosols de pentamidine, 2 sur les 147 qui ont eu plusieurs prophylaxies, et 1 PcP très tardive sans prophylaxie (Vasconcelles, Bernardo et al. 2000). En cas de prophylaxie bien conduite par cotrimoxazole chez l'enfant, l'incidence de PcP était de 0.09% (Caselli, Petris et al. 2014).

La généralisation de la prophylaxie chez les patients les plus à risque entraîne un déplacement des cas de survenue des PcP qui surviennent chez les patients qui n'ont pas ou

plus de prophylaxie : non compliance, non tolérance de la prophylaxie ou arrêt de celle-ci car la période la plus à risque est passée.

La prophylaxie est donc fortement recommandée selon l'ECIL (Maertens, Cesaro et al. 2016) :

- Chez les patients ayant une leucémie aiguë lymphoblastique (LAL) de l'induction à la fin de l'entretien de la chimiothérapie
- Chez les patients allogreffés de la prise de greffe jusqu'à au moins 6 mois et aussi longtemps que le patient reçoit des immunosuppresseurs
- Chez les patients recevant de l'alemtuzumab pendant au moins 6 mois après la fin du traitement
- Chez les patients recevant rituximab-fludarabine-cyclophosphamide ou l'alemtuzumab pendant au moins 6 mois après la fin du traitement
- Chez les patients recevant une corticothérapie de plus de 20 mg/j d'équivalent prednisone pendant 4 semaines consécutives.

Elle est optionnelle en cas de :

- Lymphome traité par R-CHOP14 ou BEACOPP escaladé
- Analogues nucléosidiques (fludarabine, cladribine, mycophenolate mofetil)
- Radiothérapie pour des tumeurs cérébrales ou des métastases lorsque la radiothérapie est associée à de fortes doses de corticoïdes

La molécule de choix est le cotrimoxazole, toute autre prophylaxie étant moins efficace (Tableau 4).

**Tableau 4** Choix des molécules pour la prophylaxie des patients d'hématologie, recommandations de l'ECIL. (Maertens, Cesaro et al. 2016)

<b>Molécule</b>	<b>dose</b>
<b>1<sup>er</sup> choix</b>	
TMP/SMX <b>AII</b>	Comprimés 80/400 mg 1/j ou cp 160/800 mg 1/j ou 3/sem <b>BII</b>
<b>2<sup>e</sup> choix</b>	
Dapsone <b>AII</b>	50 mg x2/j BII
Atovaquone <b>BII</b>	1500 mg/j BII
Pentamidine aérosols <b>AII</b>	300 mg 1/mois
Pentamidine IV <i>pas de data</i>	-

## 9. Incidence des PcP en augmentation

Malgré une meilleure définition des risques et des prophylaxies, l'incidence des PcP augmente : au Royaume-Uni elle est passée de 3.15 cas par million d'habitants par an entre 2000 et 2005, à 5.13 cas entre 2006 et 2010, soit plus du double en 10 ans, et un passage de 157 à 352 cas/an (Maini, Henderson et al. 2013). Cette augmentation concerne les patients VIH négatif et en particulier les patients atteints d'hémopathie maligne et les greffés d'organe solide.

L'augmentation du nombre de pneumocystoses est probablement liée à deux types de facteurs :

- l'augmentation de la population à risque. Il est vrai qu'avec les trithérapies, les patients séropositifs pour le VIH à risque de PcP sont moins nombreux. En revanche les traitements anticancéreux se multiplient, le nombre de greffes de CSH et de greffes d'organe solides augmente, ce qui augmente au total la population à risque.
- L'évolution des outils diagnostiques. La qPCR est plus sensible que l'examen microscopique. Le diagnostic est donc posé plus souvent.

## 10. Objectifs de l'étude pneumocystose

Les facteurs de risque de PcP intrinsèques au patient sont actuellement effacés par une prophylaxie efficace par cotrimoxazole. En revanche, il existe des situations où des facteurs exogènes vont constituer un risque pour le patient, voire conduire à une épidémie. L'étude de ces situations est primordiale afin d'identifier les facteurs favorisant une épidémie, de façon à pouvoir agir en amont. L'objectif de notre étude de l'épidémie de pneumocystose était donc d'affirmer la transmission interhumaine de *Pneumocystis jirovecii* et d'en identifier les potentiels facteurs favorisants.

### **C. Objectifs de la thèse**

L'objectif de cette thèse était de décrire les facteurs de risque des infections fongiques chez les patients d'hématologie, avec deux objectifs spécifiques.

Nous avons étudié les facteurs de risque d'AI intrinsèques chez les patients allogreffés, l'aspergillose étant l'infection à filamenteux la plus fréquente et les allogreffés la population la plus à risque. Pour cela, nous avons élaboré une étude cas-témoins nichée dans une cohorte en croisant deux bases de données issues d'un registre et d'une étude prospective.

Nous avons d'autre part étudié la transmission interhumaine de *Pneumocystis jirovecii*. Pour cela nous avons investigué une épidémie de pneumocystose survenue dans le service avec analyse moléculaire.

## **II. Facteurs de risque d'AI chez les patients allogreffés**

### **A. Méthodes**

#### **1. Schéma de l'étude**

Nous avons conduit une étude cas-témoins nichée dans une cohorte à partir de deux cohortes prospectives : le programme SAIF (Surveillance des Aspergilloses Invasives en France, Institut Pasteur Paris, SAIF) d'une part, qui a collecté anonymement les cas d'AI dans les hôpitaux universitaires de trois régions françaises (Ile-de-France, Grand Ouest et Rhône-Alpes) de 2005 à 2010 (Lortholary, Gangneux et al. 2011), et le registre européen ProMise de l'EBMT (European Group for Blood and Marrow Transplantation) d'autre part, qui collecte prospectivement toutes les greffes de CSH en Europe. Nous avons croisé ces deux bases de données complémentaires. SAIF contient les données cliniques, radiologiques et mycologiques des patients ayant une AI. Le registre ProMise contient toutes les données liées à la greffe de CSH de tous les patients greffés en Europe. Cette étude a été déclarée à la CNIL (Commission Nationale de l'Informatique et des Libertés) (number 1882064 v 0).

#### **2. Cas**

Les cas consécutifs d'AI ont été sélectionnés à partir de la base de données SAIF. Le programme SAIF collectait prospectivement tous les cas consécutifs d'AI des centres participants du 1<sup>er</sup> janvier 2005 au 31 décembre 2010. Les cas étaient déclarés par le mycologue de chaque centre qui remplissait le questionnaire. Les données collectées comprenaient les données démographiques, la pathologie sous-jacente, les données du diagnostic d'AI (imagerie, examen direct et culture mycologique, histologie, galactomananne), les dates d'hospitalisation, la première ligne d'antifongiques. Puis un comité local composé au moins du mycologue et de l'hématologue en charge du patient revoyait le dossier et classait chaque épisode d'AI en AI possible, prouvée et probable selon les critères EORTC-MSG 2002 (Ascioglu, Rex et al. 2002) pour les patients inclus avant 2008 et selon les critères EORTC-MSG 2008 (De Pauw, Walsh et al. 2008) pour les patients inclus de 2008 à 2010. La date de diagnostic d'AI retenue est la première date à laquelle les critères diagnostiques d'AI étaient présents. Les patients étaient pris en charge selon les procédures

locales tant pour le diagnostic que pour le traitement. Le programme SAIF ne comportait pas de directives sur la prise en charge des patients.

Les AI ont été classées en fonction de la date de survenue après allogreffe en précoces si elles survenaient avant J40, tardives si elles survenaient entre J40 et J100 et très tardives si elles survenaient après J100 (Garcia-Vidal, Upton et al. 2008).

A partir de la base de données de SAIF, nous avons sélectionné tous les cas d'AI prouvées et probables chez les patients de plus de 15 ans survenant après une allogreffe de CSH. Nous n'avons considéré que les premiers épisodes d'AI après allogreffe de CSH. En revanche un antécédent d'AI avant allogreffe n'était pas un critère d'exclusion.

Parmi les 20 centres français qui ont participé au programme SAIF et qui ont déclaré des cas survenant chez des patients allogreffés, 19 ont accepté de participer à cette étude (Tableau 5). Ces 19 centres ont effectué 3881 allogreffes de CSH sur cette période 2005-2010.

**Tableau 5** Liste des centres et nombre de cas par centre

Centre	Nombre de cas inclus
Paris Necker	14
Paris Saint-Louis	30
Besançon	10
Caen	3
Créteil	34
Nantes	14
Poitiers	4
Bordeaux	3
Grenoble	11
Nice	7
Angers	1
Brest	6
Rennes	10
IGR	1
Lyon-Sud	23
Strasbourg	3
Nancy	2
Montpellier	8
Limoges	1

### 3. Témoins

Notre objectif était d'apparier 4 témoins pour chaque cas sur le centre, l'âge ( $\pm 5$  ans) et l'année de greffe. Les témoins étaient sélectionnés à partir du registre ProMise parmi les patients qui n'avaient pas développé d'AI après allogreffe.

#### **4. Collection des données**

Les données cliniques et biologiques pré et post-transplantation des cas et des témoins ont été collectées à partir de la base de données du registre ProMise. Les définitions utilisées étaient celles de l'EBMT. La date de prise de greffe était définie par le premier de 3 jours consécutifs au cours desquels les polynucléaires neutrophiles atteignaient 0.5 G/L. La GvH aiguë était décrite selon les grades de Glucksberg (Glucksberg, Storb et al. 1974). Des données complémentaires ont été collectées rétrospectivement par un questionnaire envoyé à chaque centre.

Selon les recommandations de l'EBMT, tous les patients ont signé un consentement avant la greffe pour l'enregistrement des données dans le registre ProMise et leur utilisation pour des études rétrospectives.

#### **5. Analyse statistique**

Avec un risque alpha à 5%, 175 cas étaient nécessaires pour obtenir une puissance de 80% permettant de détecter des odds ratios (OR) > 1.65 pour des facteurs présents dans 35% de la population témoin et des OR > 5.21 pour des facteurs présents chez 1% de la population contrôle correspondant à la prévalence du facteur le moins fréquent (neutropénie secondaire).

Le tableau 6 montre la comparaison des variables pré- et post- transplantation des cas et des témoins. Les variables qualitatives étaient décrites par les effectifs (%) et comparées par le test du chi-2 ou le test exact de Fisher si les effectifs théoriques étaient inférieurs ou égaux à 5. Les variables quantitatives étaient décrites par la médiane (interquartiles 25%-75%) et comparées par le test non paramétrique de Kruskal-Wallis. Les OR et leur intervalle de confiance à 95% (IC<sub>95%</sub>) ont été estimés séparément pour les facteurs associés avec  $p < 0.20$  en analyse univariée en utilisant des modèles de régression logistique avec ajustement sur les variables d'appariement: le centre, l'âge et l'année de greffe. Les variables quantitatives ont été converties en variables catégorielles en utilisant un seuil présent dans la littérature s'il existait ou à défaut en utilisant la médiane. Les variables pré-greffe ont été étudiées sur la population entière. Pour les variables post-greffe, seuls les témoins ayant une durée de

suivi supérieure ou égale au délai de survenue de l'AI du cas correspondant ont été retenus (population « post-greffe»). D'autre part, seuls les événements survenus avant la date de diagnostic de l'AI ont été étudiés pour les variables post-greffe.

La prophylaxie par posaconazole a été introduite en France chez les patients allogreffés atteints de GvH au cours du deuxième trimestre 2007 à la suite de la publication d'Ullmann et al. (Ullmann, Lipton et al. 2007). La plupart des patients étaient hospitalisés dans un environnement protégé (chambre à flux laminaire) durant la phase initiale comprenant la période d'aplasie sauf ceux recevant une greffe non myéloablative (conditionnement par fludarabine et irradiation corporelle totale de 2 Gy) en raison de la courte durée d'aplasie attendue. Comme la prophylaxie de l'aspergillose par posaconazole au cours de la GvH est recommandée depuis 2008 (Ullmann, Lipton et al. 2007), des OR ajustés (ORa) sur la période (2005-2007 et 2008-2010) ont été calculés pour cette variable.

Pour l'analyse multivariée, nous avons considéré les variables pour lesquelles le degré de signification de p était inférieur à 0.10 en analyse univariée. Les interactions et les facteurs de confusion ont été recherchés par des analyses bivariées. Nous avons créé un premier modèle logistique multivarié en ne considérant que les variables pré-greffe (modèle 1). Puis dans un second modèle, nous avons ajouté les variables post-greffe sur la population « post-greffe » (modèle 2). La discrimination a été vérifiée par l'aire sous la courbe ROC (Zweig 1993) et l'adéquation par le test d' Hosmer-Lemeshow (Hosmer and Lemeshow 2000).

Les facteurs de risque d'AI selon le délai d'apparition (précoces, tardives et très tardives) ont été analysés selon la même stratégie. Des modèles de régression multinomiale en prenant les témoins comme classe de référence ont été utilisés. En raison du petit nombre de patients dans certains groupes, nous avons regroupé certaines classes pour les variables suivantes : statut de la maladie, source du greffon, sérologie CMV donneur (D)/receveur (R).

La survie a été analysée par construction de courbes de Kaplan-Meier, le critère d'évaluation étant le statut vital à la date des dernières nouvelles. Les courbes de survie ont été comparées avec le test du Logrank.

Tous les tests étaient bidirectionnels et les valeurs de  $p \leq 0.05$  étaient considérées comme significatives. Les analyses ont été effectuées avec le logiciel STATA V 12.0 (Stata

Corporation, College Station, TX, USA). Cette étude observationnelle a été rédigée selon les règles standard de rapport des études observationnelles en épidémiologie (von Elm, Altman et al. 2008).

**Tableau 6** Facteurs pré- et post-greffe associés à la survenue d'une aspergillose invasive (analyse univariée)

Facteurs pré-greffe	Cas (n=185)	Témoins (n=651)	P <sup>a</sup>	Analyses ajustées sur les variables d'appariement <sup>b</sup>	
				aOR [95% IC]	P
Age, médiane (Q1 – Q3), années	50.1 (36.7-57.6)	49.3 (38.0-57.6)	0.85		
Sexe féminin	71 (38.4)	257 (39.5)	0.79		
Indice de masse corporelle (152/542) <sup>c</sup>	24.2 (21.9-26.6)	23.6 (21.2-26.3)	0.11	0.7 [0.2-2.0]	0.47
Karnofsky = 100 (161/560)	68 (42.2)	248 (44.3)	0.64		
Pathologie sous-jacente			0.52		
Leucémie aiguë et syndrome myélodysplasique	122 (66.0)	453 (69.6)			
Syndromes lymphoprolifératifs	41 (22.2)	120 (18.4)			
Syndromes myéloprolifératifs	16 (8.7)	48 (7.4)			
Autres <sup>d</sup>	6 (3.2)	30 (4.6)			
Statut de la maladie (141/483)			0.20		
Rémission complète	92 (65.3)	333 (68.9)			
Rémission partielle	0	9 (1.9)			
Maladie stable	2 (1.4)	2 (0.4)			
Echec/rechute	46 (32.6)	134 (27.7)			
Autres	1 (0.7)	5 (1.0)			
Source du greffon (185/649)			0.91		
Moelle	51 (27.6)	169 (26.0)			
Cellules souches périphériques (CSP)	111 (60.0)	402 (61.9)			
Cordon	23 (12.4)	76 (11.7)			
Moelle + CSP	0	2 (0.3)			
Donneur non apparenté (185/649)	106 (57.3)	350 (53.9)	0.42		
Type de conditionnement			0.21		
Myéloablative	10 (5.4)	27 (4.2)			
Fludarabine + ICT 2 Gy	48 (26.0)	135 (20.7)			
Intensité réduite	127 (68.7)	489 (75.1)			

Sérologie CMV D/R (183/638)			0.11		
D-/R+	61 (33.3)	156 (24.5)		1.54 [1.1-2.2]	<b>0.02</b>
D-/R-	47 (25.7)	198 (31.0)			
D+/R-	23 (15.6)	89 (14.0)		1	
D+/R+	52 (28.4)	195 (30.6)			
Transplantation durant l'été <sup>e</sup>	44 (23.8)	124 (19.1)	0.16	1.3 [0.9-2.0]	0.16
SAL dans le conditionnement	64 (34.6)	277 (45.6)	<b>0.05</b>	0.7 [0.5-1.0]	<b>0.05</b>
Irradiation corporelle totale (184/646)	110 (94.4)	316 (48.9)	<b>0.01</b>	1.6 [1.1-2.2]	<b>0.01</b>
Clofarabine	6 (3.2)	8 (1.2)	0.10	2.8 [1.0-8.3]	0.06
Infection fongique invasive avant greffe (145/524)	12 (8.3)	52 (9.9)	0.55		
Donneur de sexe féminin (181/641)	75 (41.4)	272 (42.4)	0.81		
Age du donneur (149/547) médiane (Q1-Q3) <sup>f</sup>	41.7 (30.2-49.6)	43.6 (32.2-51.4)	0.18	1.3 [0.9-1.9]	0.21
<b>Facteurs post-greffe</b>	<b>Cas (185)</b>	<b>Témoins (526)</b>	<b>P</b>	<b>aOR [95% IC]</b>	<b>P</b>
GvH aiguë (149/516)			<b>&lt;0.001</b>		
Grade 0-1	349 (67.6)	104 (56.2)		1	
Grade 2	108 (20.9)	37 (20.0)		1.2 [0.7-1.8]	0.54
Grade 3-4	59 (11.4)	44 (23.8)		2.6 [1.7-4.1]	<b>&lt;0.001</b>
Infection à CMV (185/526)	36 (19.5)	113 (21.5)	0.56		
Délai median (Q1-Q3) de prise de greffe <sup>g</sup> (185/526)	19 (16-27)	19 (15-25)	0.76		
Absence de prise de greffe (182/515)	10 (5.5)	18 (3.5)	0.24		
Rechute après greffe (175/500)	40 (22.9)	7 (1.4)	<b>&lt;0.001</b>	20.7 [9.0-47.5]	<b>&lt;0.001</b>
Neutropénie secondaire (138/418)	55 (39.9)	94 (22.5)	<b>&lt;0.001</b>	2.3 [1.5-3.5]	<b>&lt;0.001</b>

Abréviations: aOR: odds ratio ajustés; IC: intervalle de confiance; CSP : cellules souches périphériques; SAL : sérum anti-lymphocytaire

<sup>a</sup> Valeur de P du test du chi2, du test exact de Fisher ou du test non paramétrique de Kruskal Wallis si approprié

<sup>b</sup> Analyse ajustée sur les variables d'appariement : le centre, l'âge ( $\pm 5$  ans) et l'année de greffe

<sup>c</sup> aOR calculé pour un indice de masse corporelle < 18

<sup>d</sup> Tumeur solide, aplasie médullaire, maladies génétiques, histiocytose et hémoglobinopathie

<sup>e</sup> Juillet, août, septembre

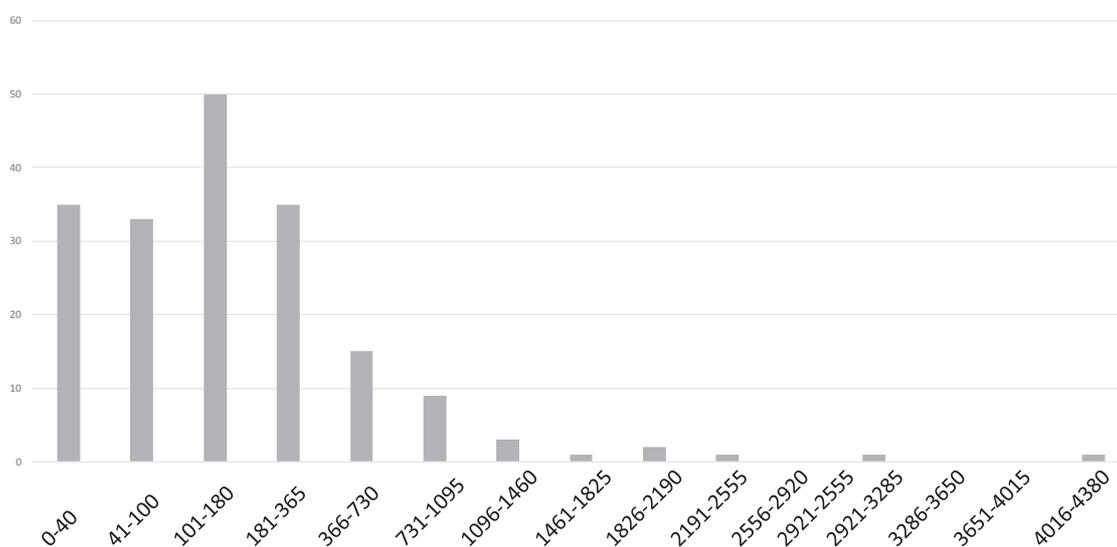
<sup>f</sup> aOR calculé pour un âge > 60 ans

<sup>g</sup> aOR calculé pour un délai de prise de greffe > 18 jours

## B. Résultats

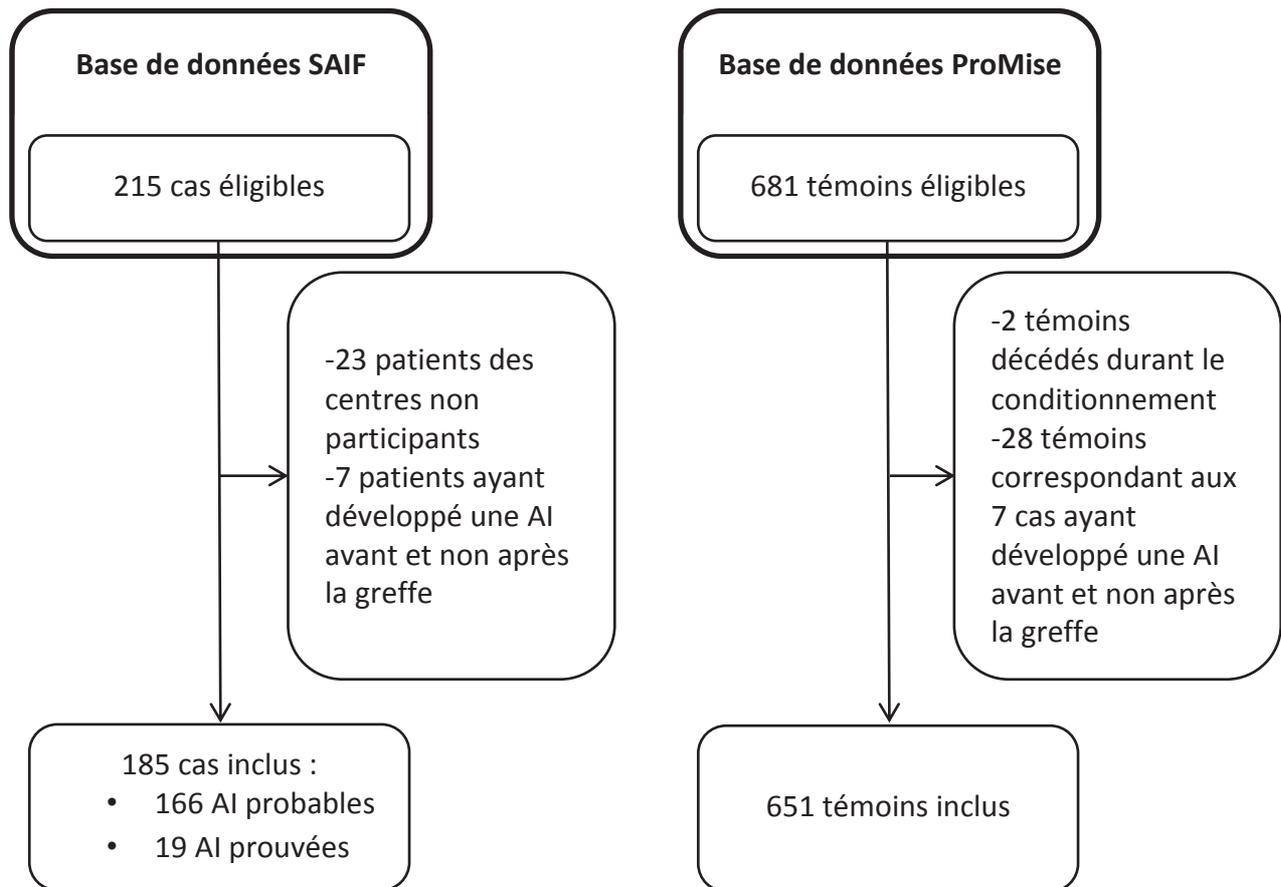
### 1. Caractéristiques des patients

Nous avons inclus 185 cas d'AI : 166 (90%) AI probables et 19 (10%) AI prouvées. Le délai médian de survenue des AI après la greffe était de 133 jours (64-233) avec des extrêmes de 3 à 4308 jours soit un peu plus de 11 ans. Trente-cinq (19%) des cas d'AI correspondaient à des AI précoces, 33 (18%) à des AI tardives, et 117 (63%) à des AI très tardives (Figure 16). Le nombre médian de cas par centre était de 7 (interquartiles 25% et 75% 3-14) allant de 1 à 34 (Tableau 6).



**Figure 16** : Date de survenue des aspergilloses invasives

Parmi 681 témoins éligibles, 651 témoins ont été inclus (Figure 17). Cent-trente-cinq cas avaient 4 témoins appariés, 24 avaient 3 témoins, 15 avaient 2 témoins, 9 avaient 1 témoin et 2 n'avaient pas de témoin. Pour l'analyse des variables post-greffe, 526 témoins avaient un suivi au moins aussi long que le délai de survenue de l'AI du cas correspondant.



**Figure 17** Diagramme de flux

Les témoins étaient bien appariés avec un bon équilibre dans les facteurs d'appariement entre les deux groupes (âge ( $p=0.85$ ) ; centre ( $p=1.0$ ) ; et année de greffe ( $p=1.0$ )).

La durée médiane de suivi était de 711 jours (209-1828).

Les caractéristiques des cas et des témoins sont résumées dans le tableau 6. Brièvement, l'âge médian à la greffe était de 49.6 ans (37.5-57.6). Plus des deux tiers des patients avaient une leucémie aiguë ou une myélodysplasie. Seuls 4.4% des patients avaient reçu une greffe avec conditionnement myélo-ablatif, les autres conditionnements étant d'intensité réduite ou non myélo-ablatif. La principale source du greffon était les cellules souches périphériques. Plus de la moitié des patients ont été greffés à partir d'un donneur non apparenté. La ferritine pré-greffe, les antécédents de bronchopneumopathie chronique obstructive, de diabète, de tabagisme, ainsi que toutes les drogues du conditionnement et les drogues de prévention de la GvH n'étaient pas associés à la survenue d'une AI (Tableau 7).

**Tableau 7** Analyse descriptive des facteurs pré-greffe complémentaires

<b>Facteurs pré-greffe</b>	<b>Cas (n=185)</b>	<b>Témoins (n=679)</b>	<b>P</b>
Ferritine à la greffe (41/217)	1353 (565-2610)	1390 (551-2380)	0.7589
Antécédents de BPCO (165/609)	2 (1.21)	10 (1.64)	1.0
Antécédents de diabète (161/609)	8 (4.97)	29 (4.77)	0.916
Tabac (149/553)	23 (15.44)	100 (18.08)	0.544
Drogues du conditionnement			
Amsacrine	10 (5.4)	60 (4.4)	0.571
Aracytine	14 (7.6)	34 (5.0)	0.178
Busulphan	60 (32.4)	259 (38.1)	0.154
Etoposide	2 (1.1)	7 (1.0)	1.000
Fludarabine	101 (54.6)	404 (59.5)	0.230
Melphalan	15 (8.1)	63 (9.3)	0.622
Thiohepa	2 (1.1)	6 (0.9)	0.682
Drogues pour la prévention de la GvH			0.322
Cyclophosphamide	21 (11.8)	114 (17.6)	
Inhibiteurs de calcineurine	81 (45.5)	277 (42.8)	
Methotrexate	69 (38.8)	234 (36.2)	
Autres	7 (3.9)	22 (3.4)	

Abréviations : BPCO : Bronchopathie chronique obstructive

## **2. Facteurs pré- et post- greffe associés au risque d'AI**

### **a) Analyse univariée**

En analyse univariée, les facteurs pré-greffe significativement associés au risque d'AI étaient (tableau 6) la sérologie CMV D/R (D-/R+ versus les autres combinaisons) et l'irradiation corporelle totale (ICT). Il n'y avait pas d'effet dose pour l'ICT : 35.3% des cas avaient bénéficié d'une ICT de 2 à 6 Gy versus 24.5% des témoins ; 24.5% des cas avaient bénéficié d'une ICT $\geq$ 8 Gy versus 23.7% des témoins. Le sérum anti-lymphocytaire (SAL) dans le conditionnement était significativement associé à un moindre risque d'AI, et une tendance à l'augmentation était observée pour l'utilisation de la clofarabine.

Parmi les facteurs post-greffe, une GvH aiguë de grade 3-4, une rechute après greffe et la survenue d'une neutropénie secondaire étaient significativement associées à la survenue d'une AI, quelle que soit sa date de survenue.

Etant donné que nous ne disposons pas de la donnée sur la prophylaxie par posaconazole durant la GvH, mais que l'usage de celle-ci s'est généralisé à partir de 2008 à la suite de la publication d'Ullmann et al. (Ullmann, Lipton et al. 2007), nous avons vérifié que cette prophylaxie n'affectait pas l'association entre GvH aiguë et AI. Après ajustement sur la période (2005 à 2007 versus 2008 à 2010), la GvH aiguë de grade 3-4 restait toujours associée à la survenue d'une AI : aOR 2.65 [1.68-4.17],  $p < 0.001$ .

### **b) Analyse multivariée**

Aucune interaction n'a été observée. En analyse multivariée (Tableau 8), la sérologie CMV D-/R+, l'usage de la clofarabine, et l'ICT étaient associés de façon indépendante à la survenue d'une AI. Le SAL n'était plus associé à la survenue d'AI après ajustement sur l'ICT.

L'analyse prenant en compte les facteurs pré- et post-greffe (table 2) montrait que l'ICT, une GVH aiguë de grade 3-4, et la rechute après greffe étaient indépendamment associées à la survenue d'une AI. Seule une tendance persistait pour la neutropénie. La sérologie CMV D/R ne persistait pas dans le modèle en raison de son association avec la survenue d'une GvH aiguë.

Le modèle final était bien calibré (adéquation  $p > 0.20$ ) mais la discrimination moyenne (aire sous la courbe ROC 0.77 [0.73-0.82]).

**Tableau 8** Analyse multivariée des facteurs pré- et post-greffe associés à la survenue d'une aspergillose

<b>Modèle 1 : Facteurs pré-greffe</b> (185 cas et 651 témoins)	<b>aOR</b>	<b>p</b>
Sérologie CMV D-R+	1.5 [1.0-2.2]	<b>0.03</b>
Clofarabine	4.1 [1.3-13.2]	<b>0.02</b>
Irradiation corporelle totale	1.6 [1.1-2.4]	<b>0.01</b>
<b>Modèle 2 : Facteurs pré- et post-greffe</b> (185 cas et 526 témoins)	<b>aOR</b>	<b>p</b>
Irradiation corporelle totale	1.9 [1.1-3.2]	<b>0.02</b>
GvH aiguë		
Grade 2	1.8 [1.0-3.2]	<b>0.05</b>
Grade 3-4	4.3 [2.4-7.7]	<b>&lt;0.001</b>
Rechute	31.0 [10.4-92.4]	<b>&lt;0.001</b>
Neutropénie secondaire	1.6 [1.0-2.8]	0.07

Abbréviations: aOR: odds ratio ajusté; GvH: maladie du greffon contre l'hôte

### **3. Facteurs pré- et post-greffe associés à la survenue d'une AI précoce, tardive et très tardive**

#### **a) Analyse univariée**

L'analyse univariée (Tableau 9) montrait que :

- La survenue d'une AI précoce était associée à l'absence de rémission complète au moment de la greffe, à une greffe de sang de cordon, à un donneur non apparenté, à la transplantation en été, et à l'usage de la clofarabine dans le conditionnement. Parmi les facteurs post-greffe, l'absence de prise de greffe et une rechute étaient associées au risque d'AI alors que l'absence de GvH et l'infection ou la maladie à CMV étaient associées à une diminution du risque d'AI précoce.
- La survenue d'une AI tardive était associée parmi les facteurs pré-greffe à l'absence de SAL dans le conditionnement et parmi les facteurs post-greffe à une GvH de grade 3-4 et une rechute après greffe. La GvH aiguë de grade 3-4 était toujours associée à la survenue d'une AI tardive après ajustement sur la période (avant 2008 versus à partir de 2008) : aOR 3.88 [1,58-9.57] p=0.003.
- La survenue d'une AI très tardive était associée parmi les facteurs pré-greffe à la sérologie CMV D-/R+, l'ICT, et à l'absence de SAL dans le conditionnement, et parmi les facteurs post-greffe à une GvH aiguë de grade  $\geq 2$ , à la rechute après greffe et à la neutropénie secondaire. La GvH aiguë de grade  $\geq 2$  était toujours associée à la survenue d'une AI très tardive après ajustement sur la période (avant 2008 versus à partir de 2008) : aOR 1.66 [0,98-2.79], p = 0.057 pour la GvH aiguë de grade 2 et aOR 4.12 [2.21-7.68], p<0.001 pour la GvH aiguë de grade 3-4. Il existait une tendance non significative à l'association entre hémopathie sous-jacente de type syndrome lymphoprolifératif, leucémie aiguë et syndrome myélodysplasique, et AI très tardive.

**Tableau 9** Analyse univariée des facteurs pré- et post-greffe en fonction du délai de survenue de l'aspergillose invasive

Facteurs pré-greffe	Témoins (n=651)	AI			P <sup>a</sup>	Analyses ajustées sur les variables d'appariement aOR [95% IC] <sup>b</sup>					
		AI précoces (n=35)	AI tardives (n=33)	AI très tardives (n=117)		AI précoces		AI tardives		AI très tardives	
					OR [95%IC]	P	OR [95%IC]	P	OR [95%IC]	P	
Age, médiane (Q1-Q3), années	49.3 (38.0-57.6)	47.5 (35.9-60.8)	54.8 (38.8-57.9)	50.1 (36.7-57.4)	0.87						
Sexe féminin	257 (39.5)	15 (42.9)	10 (30.3)	46 (39.3)	0.73						
IMC (542/30/30/92), médiane (Q1-Q3)	23.6 (21.2-26.3)	24.1 (22.5-29.8)	24.2 (19.6-27.4)	24.3 (21.8-26.5)	0.24						
Score de Karnofsky = 100 (560/30/33/98)	312 (55.7)	16 (53.3)	15 (45.5)	62 (63.3)	0.30						
Pathologie sous-jacente :					0.15						
Leucémie aiguë et syndrome myélodysplasique	453 (69.6)	22 (62.9)	18 (54.6)	82(70.1)		0.7 [0.2-3.1]	0.62	0.3 [0.9-1.0]	0.12	5.8 [0.8 -43.1] <b>0.09</b>	
Syndrome lymphoprolifératif	120 (18.4)	7 (20.0)	7 (21.2)	27 (23.1)		0.8 [0.2-4.2]	0.78	0.5 [0.1-2.1]	0.33	7.3 [0.9-56.7] 0.06	
Syndrome myéloprolifératif	48 (7.4)	4 (11.4)	5 (15.2)	7 (6.0)		1,2 [0.2-7.5]	0.81	1.0 [0.2-4.6]	0.96	4.2 [0.5-36.6] 0.19	
Autres <sup>c</sup>	30 (4.6)	2 (5.7)	3 (9.1)	1 (0.9)		1		1		1	
Absence de rémission complète (483/26/24/91)	150 (31.1)	14 (53.9)	6 (25.0)	29 (31.9)	0.09	2.4 [1.1-5.4]	<b>0.03</b>	0.7 [0.3-1.8]	0.43	1.1 [0.7-1.7] 0.82	
Cordon (649/35/33/117)	76 (11.7)	10 (28.6)	3 (9.1)	10 (8.6)	<b>0.03</b>	2.9 [1.3-6.4]	<b>0.01</b>	0.7 [0.2-2.3]	0.51	0.8 [0.4-1.6] 0.47	
Donneur non apparenté (649/35/33/117)	350 (53.9)	27 (77.1)	16 (48.5)	63 (53.9)	<b>0.05</b>	2.7 [1.2-6.1]	<b>0.02</b>	0.7 [0.4-1.5]	0.36	1.1 [0.7-1.6] 0.75	
Type de					0.27						

conditionnement												
Myeloablatif	27 (4.2)	4 (11.4)	1 (3.0)	5 (4.3)								
Fludarabine + ICT 2 Gy	135 (20.7)	9 (25.7)	10 (30.3)	29 (24.8)								
Intensité réduite	489 (75.1)	22 (62.9)	22 (66.7)	83 (70.9)								
Sérologie CMV D-/R +	156 (24.5)	11 (31.4)	8 (24.2)	42 (36.5)	<b>0.05</b>	1.5 [0.7-3.1]	0.31	1.0 [0.5-2.4]	0.94	1.7 [1.1-2.7]	<b>0.01</b>	
Greffe pendant l'été <sup>d</sup>	124 (19.1)	12 (34.3)	6 (18.2)	26 (22.2)	0.16	2.3 [1.1-4.7]	<b>0.03</b>	1.0 [0.4-2.4]	0.93	1.2 [0.8-2.0]	0.45	
SAL dans le conditionnement	277 (42.3)	20 (57.1)	10 (30.3)	34 (29.1)	<b>0.005</b>	1.5 [0.7-3.2]	0.25	0.4 [0.2-0.9]	<b>0.03</b>	0.6 [0.4-1.0]	<b>0.05</b>	
ICT (646/35/33/116)	316 (48.9)	21 (60.0)	18 (54.6)	71 (61.2)	0.07	1.7 [0.9-3.5]	0.13	1.4 [0.7-2.9]	0.33	1.6 [1.1-2.4]	<b>0.03</b>	
Clofarabine	8 (1.2)	3 (8.6)	2 (6.1)	1 (0.9)	<b>0.008</b>	6.3 [1.5-25.6]	<b>0.01</b>	3.9 [0.8-19.6]	0.10	0.9 [0.1-7.0]	0.88	
IFI avant greffe (524/30/31/84)	52 (9.9)	2 (6.7)	3 (9.7)	7 (8.3)	0.96							
Donneur de sexe féminin (641/34/33/114)	272 (42.4)	15 (44.1)	9 (27.3)	51 (44.7)	0.34							
Age du donneur (547/23/29/97) médiane (Q1-Q3)	41.7 (30.2-49.6)	40.5 (26.8-48.1)	45.4 (36.5-53.3)	43.6 (33.8-50.8)	0.26							
<b>Facteurs post-greffe</b>	<b>Témoins (n=526)</b>	<b>AI précoces (n=35)</b>	<b>AI tardives (n=33)</b>	<b>AI très tardives (n=117)</b>	<b>P</b>	<b>AI précoces (n=35)</b>	<b>P</b>	<b>AI tardives (n=33)</b>	<b>P</b>	<b>AI très tardives (n=117)</b>	<b>P</b>	
GvH aiguë (516/35/33/117)					<b>&lt;0.001</b>							
grade 0-1	349 (67.6)	33 (94.3)	14 (42.4)	57 (48.7)		1		1				
grade 2	108 (20.9)	1 (2.9)	4 (12.1)	32 (27.4)		0.1 [0.0-0.8]	<b>0.03</b>	1.0 [0.3-3.1]	1.00	1.7 [1.1-2.9]	<b>0.03</b>	
grade 3-4	59 (11.4)	1 (2.9)	15 (45.5)	28 (23.9)		0.2 [0.0-1.3]	0.09	6.2 [2.8-13.7]	<b>&lt;0.001</b>	3.2 [1.9-5.5]	<b>&lt;0.001</b>	
Infection à CMV	113 (21.5)	1 (2.9)	5 (15.2)	30 (25.6)	<b>0.03</b>	0.1 [0.0-0.8]	<b>0.03</b>	0.7 [0.3-1.8]	0.45	1.3 [0.8-2.1]	0.27	
Délai de prise de greffe <sup>e</sup> (117/35/33/117)	19 (15-25)	25 (17-40)	17 (15-34)	19 (15-23)	0.13	1.6 [0.8-3.3]	0.21	0.6 [0.3-1.2]	0.17	0.9 [0.6-1.4]	0.67	

médiane (Q1-Q3)												
Absence de prise de greffe (515/34/32/116)	18 (3.5)	8 (23.5)	2 (6.3)	0	<b>&lt;0.001</b>	8.7 [3.4-22.0]	<b>&lt;0.001</b>	1.8 [0.4-8.4]	0.43	2.6 10 <sup>-7</sup> [0-]	0.99	
Rechute après greffe (500/32/33/110)	7 (1.4)	3 (9.4)	2 (6.1)	35 (31.8)	<b>&lt;0.001</b>	8.0 [1.9-32.6]	<b>0.004</b>	5.0 [1.0-25.3]	<b>0.05</b>	31.1 [13.2-73.1]	<b>&lt;0.001</b>	
Neutropénie secondaire (418/23/25/90)	94 (22.5)	5 (21.7)	8 (32.0)	42 (46.7)	<b>&lt;0.001</b>	0.9 [0.3-2.6]	0.91	1.5 [0.6-3.6]	0.38	3.2 [2.0-5.2]	<b>&lt;0.001</b>	

Abréviations: IMC: indice de masse corporelle; ICT: irradiation corporelle totale; SAL : sérum anti-lymphocytaire; IFI : infection fongique invasive

<sup>a</sup> Valeur de *P* du test du chi<sup>2</sup>, du test exact de Fisher ou du test non paramétrique de Kruskal Wallis si approprié

<sup>b</sup> Analyse ajustée sur les variables d'appariement : le centre, l'âge (± 5 ans) et l'année de la greffe

<sup>c</sup> Tumeur solide, aplasie médullaire, maladies génétiques, histiocytose et hémoglobinopathie

<sup>d</sup> Juillet, août, septembre

<sup>e</sup> aOR calculé pour un délai de prise de greffe > 18 jours

## b) Analyse multivariée

### ✓ AI précoces

En analyse multivariée, le premier modèle ne prenant en compte que les facteurs pré-greffe montrait que la survenue d'une AI précoce tend à être associée à l'absence de rémission complète au moment de la greffe et à un donneur non apparenté (Tableaux 10 et 13). La saison n'était plus significative après ajustement sur la maladie active.

Le modèle prenant en compte les facteurs pré- et post-greffe montrait que l'absence de prise de greffe était le seul facteur à rester indépendamment associé à la survenue d'une AI précoce. Le donneur non apparenté et la rechute n'étaient plus significativement associés à la survenue d'une AI précoce après ajustement sur la rémission complète. Le modèle final avait une bonne calibration (adéquation  $p$  0.32) et une discrimination modérée (aire sous la courbe ROC 0.72 [0.60-0.84]).

**Tableau 10** Analyse multivariée des facteurs pré- et post-greffe associés à la survenue d'une AI précoce

AI précoce		aOR	p
<b><u>Facteurs pré-greffe</u></b>			
<b>(35 cas, 118 témoins)</b>			
Statut de la maladie	Absence de rémission complète	2.4 [0.9-6.3]	0.07
Donneur non apparenté		2.4 [0.9-6.4]	0.10
<b><u>Facteurs pré- et post-greffe</u></b>			
<b>(35 cas, 99 témoins)</b>			
Statut de la maladie	Absence de rémission complète	2.6 [0.9-7.2]	0.06
Absence de prise de greffe		16.4 [2.9-92.6]	<b>0.002</b>

### ✓ AI tardives

En analyse multivariée (Tableaux 11 et 13), le premier modèle ne prenant en compte que les facteurs pré-greffe montrait que seule l'absence d'utilisation de SAL dans le

conditionnement tendait à être associée à la survenue d'une AI tardive. La clofarabine n'était plus significativement associée à la survenue d'une AI tardive après ajustement sur le SAL.

Le modèle prenant en compte les facteurs pré- et post-greffe montrait que la GvH aiguë de grade 3-4 et la rechute après greffe étaient associées à la survenue d'une AI tardive. Le SAL n'était plus significativement associé à la survenue d'une AI tardive en raison de la GvH aiguë. Le modèle final a une bonne calibration (adéquation p 0.33) et une discrimination modérée (aire sous la courbe ROC 0.69 [0.58-0.80]).

**Tableau 11** Analyse multivariée des facteurs pré- et post-greffe associés à la survenue d'une AI tardive

<b>AI tardive</b>		aOR	p
<b><u>Facteurs pré-greffe</u></b>			
<b>(33 cas, 115 témoins)</b>			
SAL dans le conditionnement		0.4 [0.2-1.0]	0.06
<b><u>Facteurs pré- et post-greffe</u></b>			
<b>(33 cas, 101 témoins)</b>			
GvH aiguë	Grade 2	1.2 [0.3-4.4]	0.76
	Grade 3-4	4.7 [1.8-12.0]	<b>0.001</b>
Rechute après greffe		11.4 [0.9-142.5]	0.06

Abréviations : SAL : sérum anti-lymphocytaire ; GvH : réaction du greffon contre l'hôte

✓ **AI très tardives**

En analyse multivariée (Tableaux 12 et 13), le premier modèle ne prenant en compte que les facteurs pré-greffe montrait que seule la sérologie CMV D-/R+ était associée à la survenue d'une AI très tardive. L'hémopathie sous-jacente de type syndrome lymphoprolifératif, leucémie aiguë et syndrome myélodysplasique tendaient à être associée à la survenue d'une

AI très tardive. Le SAL et l'ICT n'étaient plus significativement associés à la survenue d'une AI très tardive après ajustement sur l'hémopathie sous-jacente et la sérologie CMV D/R.

Le modèle prenant en compte les facteurs pré- et post-greffe montrait que la survenue d'une AI très tardive était associée à la survenue d'une GvH aiguë de grade  $\geq 2$ , à la rechute après greffe et à la neutropénie secondaire. L'hémopathie sous-jacente n'était plus significativement associée à la survenue d'une AI très tardive après ajustement sur la rechute et la neutropénie secondaire. La sérologie CMV D/R n'était plus significativement associée à la survenue d'une AI très tardive après ajustement sur la GvH aiguë et la neutropénie secondaire. Le modèle final avait une bonne calibration (adéquation p 0.54) et une bonne discrimination (aire sous la courbe ROC 0.80 [0.74-0.85]).

**Tableau 12** Analyse multivariée des facteurs pré- et post-greffe associés à la survenue d'une AI très tardive

<b>AI très tardive</b>		<b>aOR</b>	<b>p</b>
<b><u>Facteurs pré-greffe</u></b>			
<b>(117 cas, 418 témoins)</b>			
Pathologie sous-jacente	LA et SMD	6.1 [0,8-46,5]	0.08
	Syndrome lymphoprolifératif	7.5 [0.9-59.9]	0.06
	Syndrome myéloprolifératif	4.7 [0.5-41.8]	0.17
	Autres	1	
Sérologie CMV D/R	D-R+	1.6 [1.0-2.2]	0.05
<b><u>Facteurs pré- et post-greffe</u></b>			
<b>(117 cas, 184 témoins)</b>			
GvH aiguë	Grade 2	2.6 [1.3-5.3]	<b>0.006</b>
	Grade 3-4	6.9 [3.1-15.3]	<b>&lt;0.001</b>
Rechute		24.1 [7.3-79.6]	<b>&lt;0.001</b>
Neutropénie secondaire		2.2 [1.1-4.1]	<b>0.02</b>

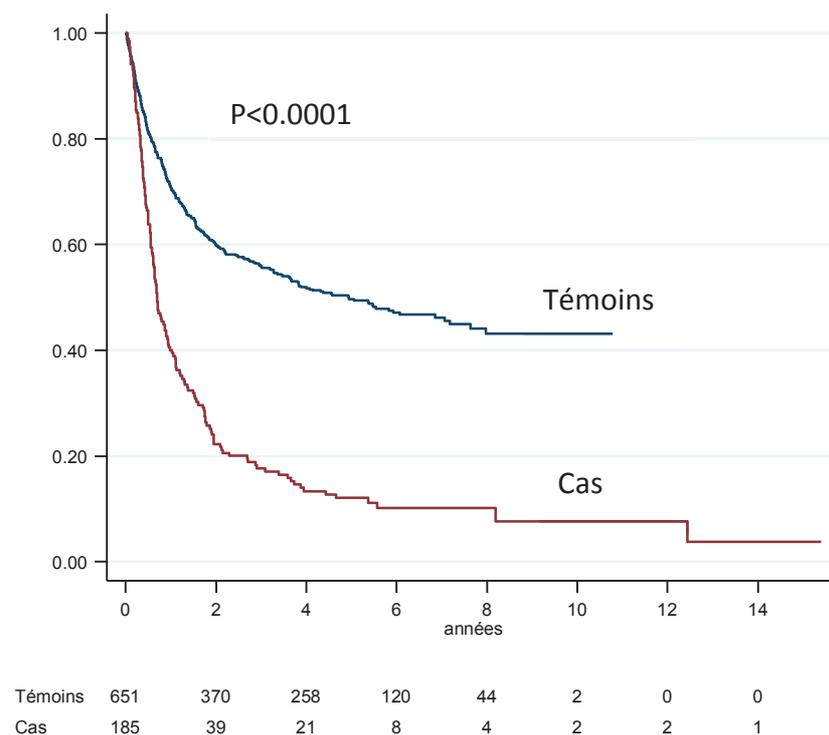
Abréviations : LA : leucémie aiguë ; SMD : syndrome myélodysplasique ; GvH : réaction du greffon contre l'hôte

**Tableau 13** Analyse multivariée des facteurs pré- et post-greffe associés à la survenue d'une AI selon la date

	AI précoces		AI tardives		AI très tardives	
	ORa [IC <sub>95%</sub> ]	p	ORa [IC <sub>95%</sub> ]	p	ORa [IC <sub>95%</sub> ]	p
<b>Facteurs pré-greffe</b>						
Pathologie sous-jacente						
LA et SMD					6.1 [0,8-46,5]	0.08
Syndrome lymphoprolifératif					7.5 [0.9-59.9]	0.06
Syndrome myéloprolifératif					4.7 [0.5-41.8]	0.17
Autres					1	
Absence de rémission complète	2.4 [0.9-6.3]	0.07				
Donneur non apparenté	2.4 [0.9-6.4]	0.10				
Sérologie CMV D-/R+					1.6 [1.0-2.2]	0.05
Sérum anti-lymphocytaire			0.4 [0.2-1.0]	0.06		
<b>Facteurs pré- et post-greffe</b>						
Absence de rémission complète	2.6 [0.9-7.2]	0.06				
GvH aiguë						
Grade 2			1.2 [0.3-4.4]	0.76	2.6 [1.3-5.3]	<b>0.006</b>
Grade 3-4			4.7 [1.8-12.0]	<b>0.001</b>	6.9 [3.1-15.3]	<b>&lt;0.001</b>
Absence de prise de greffe	16.4 [2.9-92.6]	<b>0.002</b>				
Rechute			11.4 [0.9-142.5]	0.06	24.1 [7.3-79.6]	<b>&lt;0.001</b>
Neutropénie secondaire					2.2 [1.1-4.1]	<b>0.02</b>

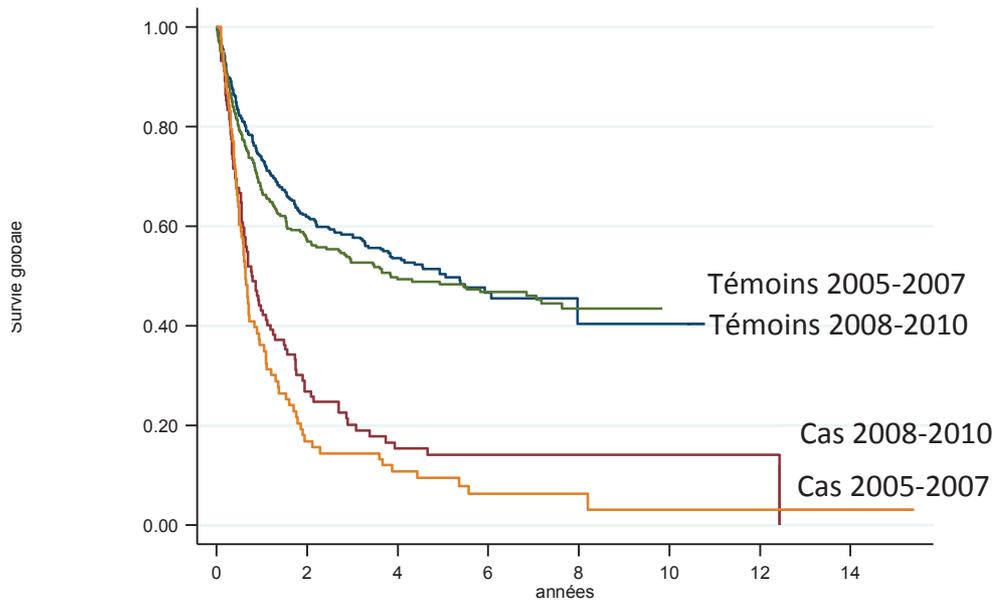
#### 4. Survie

La probabilité de survie globale était estimée à 11% pour les cas et de 49% pour les témoins ( $p < 0.001$ ) pour un suivi médian de 255 jours et 995 jours respectivement ( $p < 0.001$ ) (Figure 18).



**Figure 18** Courbe de survie de Kaplan-Meier des cas et des témoins

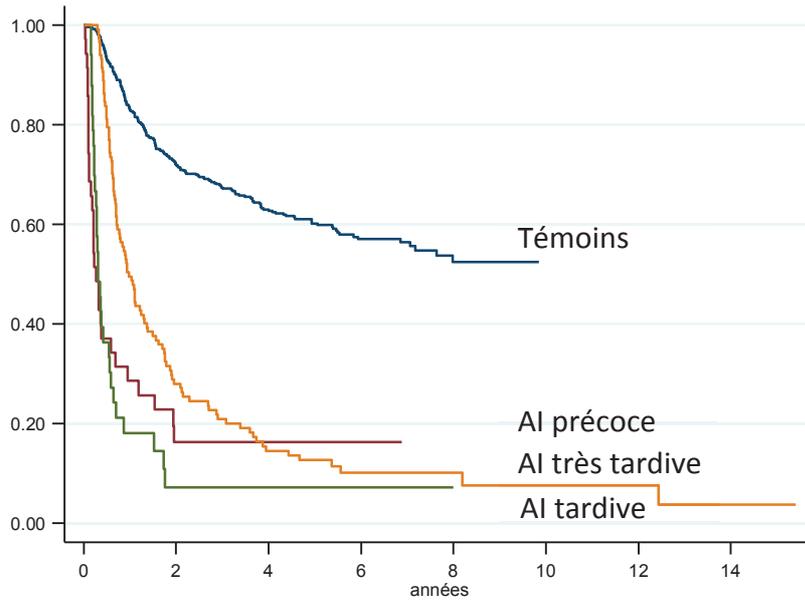
Il n'y avait pas de différence si on comparait les courbes de survie sur la période 2005-2007 (Figure 19) (ère pré-positaconazole) et 2008-2010 (période où la prophylaxie par positaconazole au cours de la GvH était généralisée).



Cas 2008-2010	365	217	142	42	8	2	0	0
Témoins 2005-2007	102	25	13	4	2	1	1	0
Cas 2005-2007	286	153	116	78	36	0	0	0

**Figure 19** Courbe de survie de Kaplan-Meier des cas et des témoins avec stratification sur la date d'apparition de l'aspergillose (2005-2007 versus 2008-2010)

La survie globale était de 49% pour les témoins, 17% pour les AI précoces, 9% pour les AI tardives et 9% pour les AI très tardives pour un suivi médian de respectivement de 995 (291-1967) jours, 99 (38-560) jours, 115 (80-236) jours et 357 (204-783) jours ( $p < 0.001$ ) (Figure 20).



AI précoces	526	359	255	117	42	0	0	0
AI tardives	35	5	3	1	0	0	0	0
AI très tardives	33	2	2	1	0	0	0	0

**Figure 20** Survie globale en fonction du délai de survenue de l'aspergillose invasive

## C. Discussion

### 1. Discussion des résultats

#### a) *Facteurs associés à la survenue d'une AI*

Notre étude montre que malgré l'évolution des procédures d'allogreffe depuis deux décennies, l'ICT, la GvH aiguë, et la rechute sont toujours les facteurs de risque de survenue d'une aspergillose invasive. L'avènement de la prophylaxie par posaconazole au décours d'une GvH n'a pas modifié l'association majeure entre celle-ci et la survenue d'une aspergillose.

Notre étude montre qu'outre la GVH, l'absence de prise de greffe, la rechute et la neutropénie secondaire sont des facteurs de risque d'AI, ce qui soulève la question de la prophylaxie dans ces autres situations qui ne sont pas nécessairement associées à la GvH. Des études prospectives pourraient être envisagées afin d'évaluer la prophylaxie dans ces indications. Parmi les facteurs significatifs en univarié mais non significatifs en multivarié, la sérologie CMV était associée à la GvH aiguë et à la neutropénie secondaire pour le modèle AI et pour le modèle AI très tardive. La sérologie CMV était en effet logiquement associée à la survenue d'une infection à CMV et l'infection à CMV est connue pour être associée à la GvH (Martino, Caballero et al. 2001). D'autre part, la neutropénie secondaire est connue pour être associée au ganciclovir donné en traitement de l'infection à CMV (Goodrich, Bowden et al. 1993; Winston, Ho et al. 1993). Dans le modèle AI versus témoins, la clofarabine était associée à la rechute. Elle était également associée à l'absence de rémission complète pour les AI précoces. La clofarabine est effectivement une drogue utilisée dans les conditionnements séquentiels pour des patients greffés avec une maladie active et qui donc rechutent plus après la greffe. Dans notre étude, un antécédent d'IFI n'est pas un facteur de risque d'AI, contrairement à ce que retrouvaient Fukuda et al. (Fukuda, Boeckh et al. 2004) dans leur étude rétrospective de 1992 à 2001. Cette observation est limitée par le fait que dans notre étude, la nature de l'IFI antérieure à la greffe (aspergillose, candidose, autre) n'est pas connue. Néanmoins, le développement des prophylaxies secondaires explique probablement que nous ne retrouvions plus ce paramètre comme facteur de risque.

***b) L'aspergillose, une complication de plus en plus tardive de la greffe***

Notre étude montre que la majorité des aspergilloses survient très tardivement, puisque 63% survient après J100, et ce, indépendamment du type de conditionnement. Ceci confirme les observations antérieures montrant la survenue de plus en plus tardive des aspergilloses après greffe (Grow, Moreb et al. 2002; Marr, Carter et al. 2002; Pagano, Caira et al. 2007; Garcia-Vidal, Upton et al. 2008; Mihu, King et al. 2008). La proportion d'AI très tardive est encore plus marquée dans notre étude peut-être du fait de la grande proportion de greffe à conditionnement réduit. Ceci suggère que les greffeurs ont appris à prévenir les aspergilloses précoces mais que le risque est toujours présent après 3 mois. En France, la majorité des patients sont hospitalisés en environnement protégé ou stérile (chambre à pression positive et chambre à flux laminaire) durant la phase d'aplasie mais nous ne disposons pas de cette donnée dans notre étude. En revanche, il est rare que les patients soient réhospitalisés en secteur stérile au décours d'une GvH aiguë. Notre étude suggère que cela serait potentiellement justifié. Enfin, le fait que la GvH aiguë soit un facteur de risque d'aspergillose très tardive pose la question de la durée de prophylaxie nécessaire chez ces patients avec les risques de toxicité, d'interactions médicamenteuses, de sélection de résistance et de coût engendrés par une prophylaxie prolongée.

***c) Association prédominante des facteurs post-greffe et de la survenue d'une AI quel que soit le délai***

Notre étude montre que seuls les facteurs post-greffe restent indépendamment associés à la survenue d'une AI, quel que soit le délai d'apparition de celle-ci. Pour chaque délai de survenue d'aspergillose, nous avons construit 2 modèles, le premier ne prenant en compte que les facteurs pré-greffe et le deuxième ajoutant les facteurs post-greffe, afin de rechercher si la survenue d'une aspergillose était prédictible à J0 de la greffe.

Dans le premier modèle, aucun facteur pré-greffe n'était indépendamment associé à la survenue d'une AI précoce ; il y avait une tendance pour le donneur non apparenté et l'absence de rémission complète qui sont des facteurs décrits dans la littérature. Même pour les aspergilloses précoces, les facteurs pré-greffe étaient finalement supplantés par

l'absence de prise de greffe, contrairement à ce que trouvaient Marr et al. (Marr, Carter et al. 2002), Garcia-Vidal et al. (Garcia-Vidal, Upton et al. 2008) et Mikulska et al. (Mikulska, Raiola et al. 2009). L'influence de l'âge n'a cependant pas pu être étudiée dans notre étude car il s'agissait d'une variable d'appariement.

Le premier modèle montrait une tendance à une association entre l'absence de SAL dans le conditionnement et la survenue d'une aspergillose tardive. Le SAL correspond à une prophylaxie de la GvH et cette association était effacée par la survenue d'une GvH aiguë de grade 3-4. Enfin le premier modèle montrait une tendance à l'association entre syndrome lymphoprolifératif, leucémie aiguë ou myélodysplasie, et survenue d'une aspergillose très tardive confirmant les résultats de Marr et al. (Marr, Carter et al. 2002) qui avaient observé moins d'AI précoces chez les patients allogreffés pour une leucémie myéloïde chronique et plus d'AI tardives (>J40) chez les patients greffés pour un myélome multiple. Le deuxième modèle montrait finalement que les aspergilloses précoces étaient associées à l'absence de prise de greffe, les aspergilloses tardives à la survenue d'une GvH aiguë de grade 3-4 et les aspergilloses très tardives à la survenue d'une GvH aiguë de grade  $\geq 2$ , d'une rechute post-greffe et d'une neutropénie secondaire. Tous les facteurs pré-greffe ont été gommés par les facteurs post-greffe y compris pour les AI précoces, démontrant que le risque d'AI n'est pas prédictible à J0 et que le risque est évolutif dans le temps.

#### ***d) Plusieurs types d'aspergilloses***

D'autre part, les aspergilloses survenant au cours d'une aplasie ont été largement étudiées, tant sur l'imagerie (Caillot, Couaillier et al. 2001), qu'en terme de biomarqueurs comme le galactomannane. Or les aspergilloses tardives sont différentes tant sur le plan clinique que physiopathologique. Les aspergilloses du patient neutropénique sont plus angio-invasives, le signe du halo puis celui du croissant gazeux sont fréquent, le galactomannane est souvent positif (Bergeron, Porcher et al. 2012). Pour les aspergilloses tardives, il s'agit d'une pathologie des voies aériennes, le scanner montre plutôt des images d'arbre en bourgeon et le galactomannane est moins souvent positif (Cordonnier, Botterel et al. 2009). Les définitions des aspergilloses de l'EORTC-MSG ne tiennent pas compte de ces disparités alors que l'interprétation de la positivité des prélèvements respiratoires, souvent positifs à

plusieurs champignons filamenteux chez les patients très immunodéprimés atteints d'une GvH, peut être délicate (Garcia-Hermoso, Alanio et al. 2015). Ceci pose la question de la pertinence des définitions de l'aspergillose invasive qui ont été établies surtout pour les patients neutropéniques et qui devraient probablement être affinées pour d'autres populations comme les patients ayant une GvH. Ces définitions sont d'ailleurs en cours de révision.

### ***e) Mortalité***

Enfin, malgré les progrès thérapeutiques, notre étude montre que la mortalité des patients ayant une aspergillose est toujours très importante par rapport aux témoins, quel que soit le délai d'apparition de celle-ci et cela n'a pas été modifié par l'introduction du posaconazole en 2008. Cette surmortalité peut être liée à l'infection elle-même mais peut aussi refléter une population plus immunodéprimée qui développe de nombreuses infections opportunistes associées.

## **2. Différences entre nos observations et les données de la littérature**

Contrairement à Panackal et al. (Panackal, Li et al. 2010), nous n'avons pas retrouvé dans notre étude, d'association entre la saison de la transplantation et la survenue d'une AI, même en séparant les régions du Nord et du Sud. Ceci est peut-être lié au fait qu'il y a moins de disparités de climat en France qu'aux Etats-Unis. Néanmoins dans notre étude, la greffe durant l'été était associée en analyse univariée à la survenue d'une AI précoce mais cette association disparaissait après ajustement sur le statut de la maladie à la greffe (maladie active).

Dans le programme SAIF (Lortholary, Gangneux et al. 2011), les hémopathies lymphoïdes représentaient un peu plus de 20% des patients ayant une AI. Il s'agissait là d'une nouvelle population à risque d'aspergillose du fait de l'augmentation du nombre de lignes thérapeutiques engendrant une immunodépression de plus en plus profonde. Dans notre

étude, les hémopathies lymphoïdes n'étaient pas un facteur de risque indépendant d'AI. Comme pour les autres facteurs pré-greffe, le rôle de la pathologie sous-jacente est effacé par les facteurs post-greffe.

### **3. Forces et limites**

#### ***a) Points forts de la méthodologie***

La méthodologie de cette étude est robuste, puisqu'il s'agit d'une étude cas-témoins nichée dans une cohorte reconstituée à partir de deux bases de données prospectives et consécutives : le registre européen des greffes de CSH ProMise et le programme prospectif français de surveillance des aspergilloses invasives SAIF. Les données de greffe ont été recueillies prospectivement de la même façon pour les cas et les témoins, limitant donc un potentiel biais d'information. C'est l'une des plus larges séries d'aspergillose après allogreffe de CSH de la littérature, avec 185 cas d'aspergillose invasive recueillis dans 19 centres français ayant réalisé 3881 allogreffes sur une période de 6 ans. Pour les facteurs post-greffe, nous n'avons considéré que les événements antérieurs à la survenue de l'AI, ce qui a permis de respecter la séquence temporelle exposition-maladie. De plus, pour les facteurs post-greffe, seuls les témoins ayant une période de suivi au moins égale au délai de survenue de l'AI ont été étudiés, ce qui permet aux témoins d'avoir eu le temps de développer les mêmes complications (biais du sujet immortel).

#### ***b) Choix des seuils pour les AI précoces, tardives et très tardives***

Dans notre étude, les facteurs de risque d'aspergillose sont différents en fonction du délai de survenue de celle-ci, comme précédemment rapporté au décours d'allogreffes myélo-ablatives (Marr, Carter et al. 2002; Garcia-Vidal, Upton et al. 2008). Nous avons choisi de classer les aspergilloses en précoces, tardives et très tardives selon les dates post-greffe proposées par Garcia-Vidal et al. (Garcia-Vidal, Upton et al. 2008). D'autres études ne différenciaient que les aspergilloses précoces (<40 jours) et tardives (> 40 jours) (Marr, Carter et al. 2002). Ce choix nous a semblé judicieux car dans notre population, une grande

proportion d'AI était très tardive, que la GvH aiguë par définition apparaît jusqu'à J100 et que les données de ProMise étaient probablement mieux remplies jusqu'à J100 qu'après.

### ***c) Discrimination modérée***

Tous nos modèles ont une bonne calibration (test d'Hosmer-Lemeshow  $> 0.20$ ) montrant que nos modèles sont en adéquation avec les données. En revanche les aires sous la courbe ROC sont comprises entre 0.69 et 0.80 (moyenne à 0.75 [0.70-0.79]), témoignant d'une discrimination modérée, ce qui suggère le rôle de facteurs additionnels non analysés ici car non disponibles : les facteurs classiques liés à la greffe et étudiés dans notre étude ne suffisent pas à prédire totalement qui fera une aspergillose invasive.

### ***d) Limites de notre étude***

Nous ne disposons pas de certaines données comme l'hospitalisation en environnement stérile, la prophylaxie antifongique, ou les doses de corticoïdes. En ce qui concerne la donnée sur l'environnement stérile, la majorité des centres français hospitalisent les patients durant la phase initiale en chambre à flux laminaire ou en chambre à pression positive. Ces mesures de prévention diminuent le risque fongique mais ne l'éliminent pas complètement (Hahn, Cummings et al. 2002). En ce qui concerne les données de prophylaxie anti-filamenteuse, la prophylaxie par posaconazole au décours d'une GvH a débuté en France au second semestre 2007 suite à la publication d'Ullmann et al en août 2007 (Ullmann, Lipton et al. 2007). L'analyse stratifiée sur la période 2005-2007 versus 2008-2010 montrait que la GvH aiguë reste un facteur de risque d'aspergillose malgré la prophylaxie par posaconazole. En ce qui concerne la prophylaxie secondaire, cela concernait les 64 patients ayant un antécédent d'IFI (12 cas et 52 témoins), ce qui représente un petit nombre de patients. La prophylaxie secondaire explique probablement, au moins partiellement, qu'un antécédent d'IFI n'était pas associé à un risque accru de développer une AI.

Nous avons cherché à collecter rétrospectivement certaines données comme la ferritine, la numération formule sanguine à J60 et J100, mais ces variables comportent beaucoup de

données manquantes. Le dosage pré-greffe de la ferritine n'était pas aussi systématique en 2005 qu'aujourd'hui.

Enfin les données collectées après J100 sont probablement moins bien remplies que les données pré-greffe et post-greffe jusqu'à J100. En revanche les données d'aspergillose ont été collectées prospectivement et les données liées à la greffe ont été enregistrées prospectivement dans ProMise assurant la consécuité et l'exhaustivité de ces données. Pour ces données, il n'y a donc pas de biais de mémoire.

La présence de données manquantes peut aboutir à une perte de puissance statistique et biaiser les calculs d'association (odd ratio) en univarié et surtout en multivarié puisque cette dernière ne tient compte que des individus complètement renseignés.

Nous n'avons pas utilisé de méthodes d'imputation des données manquantes. Les variables pré-greffe comportaient peu de données manquantes, les variables de suivi (variables post-greffe) en comportaient jusqu'à 22% pour les variables exploitées. Certaines variables collectées rétrospectivement comme la ferritine, les NFS de J60 et J100, ou d'autres recueillies prospectivement comme la GvH chronique, étaient trop mal renseignées pour être exploitées correctement. Ainsi la GvH chronique était renseignée pour 33% des témoins et 63% des cas. L'utilisation d'une méthode d'imputation multiple pour ces variables aurait nécessité que les populations avec des données complètes et incomplètes soient identiques et que le manque d'information ne soit pas lié à la variable elle-même.

La sélection des cas correspond aux AI diagnostiquées. Les AI non diagnostiquées échappent à notre sélection, ce qui entraîne un potentiel biais de sélection par non inclusion des cas non diagnostiqués. Néanmoins, l'aspergillose est une pathologie bien connue des greffeurs et recherchée systématiquement. En outre, nous avons sélectionné les témoins parmi les patients greffés n'ayant pas développé d'AI afin de limiter le biais de sélection. Nous avons 185 cas d'AI pour 3881 patients greffés sur cette période (5%), ce qui correspond à une fréquence classique dans la littérature.

D'autre part, le classement des aspergilloses en AI précoces, tardives et très tardives repose sur la date de diagnostic de l'AI. Ceci suppose que le diagnostic ait été fait rapidement après le début des symptômes, ce qui est généralement le cas, l'AI étant une complication

symptomatique et grave. Nous ne pouvons néanmoins pas exclure un biais de classement pour les cas ayant un diagnostic d'AI juste après J40 et juste après J100 soit 7 cas avec un diagnostic de J41 à J49 et 9 cas avec un diagnostic d'AI très tardive de J101 à J109, ce qui représente un petit nombre de cas. On ne peut pas non plus exclure que certaines AI précoces aient en fait débuté juste avant la greffe. Néanmoins les patients candidats à la greffe bénéficient d'un bilan pré-greffe qui recherche l'aspergillose au moindre doute.

De plus il faut rappeler qu'une étude cas-témoins permet de trouver des associations entre une maladie et des facteurs d'exposition mais ne peut pas affirmer un lien de causalité. Les critères de Bradford Hill (force de l'association, stabilité de l'association, cohérence, spécificité, temporalité, relation dose-effet, plausibilité, preuve expérimentale et analogie) permettent d'approcher un lien de causalité.

Le score de propension est une méthode statistique initialement développée pour les essais thérapeutiques non randomisés afin de rendre les groupes comparables. Il contient les informations des autres variables explicatives et permet de lever le biais d'indication. Nous avons tenté d'établir un score de propension pour chaque variable retrouvée en analyse multivariée. Ces scores auraient permis de vérifier si les patients qui ont eu une ICT, une non-prise de greffe, une GvH aiguë, une rechute ou une neutropénie secondaire et ceux qui n'en ont pas eu étaient similaires. Nous n'aurions pas pu appairer sur les scores de propension car cela aurait détruit l'appariement sur l'âge, le centre et l'année de la greffe, mais nous aurions pu ajuster dessus. Néanmoins, le score de propension est établi sur les patients pour lesquels il n'y a pas de données manquantes. La réalisation des scores de propension a donc abouti à la perte d'un grand nombre de cas dans l'analyse et à une perte de puissance majeure, raison pour laquelle ces analyses n'ont pas été présentées.

Enfin, nous n'avons pas exploré les prédispositions génétiques telles que le polymorphisme du TLR4 du donneur (Bochud, Chien et al. 2008), le polymorphisme de PTX3 du donneur (Cunha, Aversa et al. 2014), des mutations de la dectine-1 ou de DC-SIGN chez le receveur (Cunha, Di Ianni et al. 2010; Chai, de Boer et al. 2011; Sainz, Lupianez et al. 2012) qui sont également des facteurs de risque de développer une AI après allogreffe de CSH. Les facteurs génétiques sont encore du domaine de la recherche et leur détection n'est pas encore de pratique courante, d'autant plus que notre étude remonte à 2005-2010. Les facteurs

généétiques font probablement partie des variables manquant à notre étude expliquant la discrimination modérée de nos modèles. Dans l'avenir, la détection des polymorphismes de la Dectin-1, DC-SIGN, certaines interleukines, certains TLR, chez les donneurs et les receveurs aideront probablement à déterminer un risque individuel (White, Parr et al. 2017) voire à personnaliser la prise en charge du risque fongique. Néanmoins, les facteurs cliniques sont encore pertinents aujourd'hui pour identifier les patients à risque d'aspergillose.

#### **D. Conclusion**

Dans notre étude comprenant une large majorité de greffes à conditionnement atténué ou non myélo-ablatif, la GvH aiguë reste associée à la survenue d'une AI dès la prise de greffe. Les facteurs pré-greffe ne peuvent à eux seuls permettre de prédire la survenue d'AI y compris précoce. Les facteurs post-greffe ont un poids majeur en particulier l'absence de prise de greffe pour les AI précoces, la GvH aiguë sévère pour les AI tardives et la GvH aiguë modérée à sévère, la rechute et la neutropénie secondaire pour les AI très tardives. Bien que nous n'ayons pas de données précises sur l'usage du posaconazole prophylactique, il apparaît dans notre étude que l'incidence des AI après allogreffe n'a pas été modifiée par sa mise à disposition et son utilisation par les équipes des greffe depuis 2008. La non-prise de greffe, la neutropénie secondaire et la rechute devraient être considérés comme des facteurs de risque majeur d'AI par les centres greffeurs et la prophylaxie discutée dans ces situations, voire explorée dans des études contrôlées.

### **III. Etude d'une épidémie de *Pneumocystis jirovecii* dans un service d'hématologie**

#### **A. Introduction**

Après les facteurs de risque intrinsèques au patient, nous nous sommes intéressés au risque d'acquisition d'une infection fongique par transmission nosocomiale.

Pour cela, nous avons étudié une épidémie de pneumocystose survenue dans le service d'hématologie clinique et de thérapie cellulaire de l'hôpital Henri Mondor (Robin, Alanio et al. 2017) (Annexe 1). Le mécanisme d'acquisition de *Pneumocystis jirovecii* est actuellement débattu : soit une réactivation chez un patient colonisé avec une acquisition durant l'enfance, soit une primo-infection. L'acquisition durant l'enfance avait été évoquée devant le grand nombre d'enfants séropositifs pour le pneumocystis, proche de 100% (Morris and Norris 2012). La transmission interhumaine a été rapportée au cours d'épidémies surtout dans des services de transplantation rénale. La diffusion dans l'air de la chambre d'un patient infecté est établie avec un gradient décroissant au fur et à mesure qu'on s'éloigne du patient (Choukri, Menotti et al. 2010; Damiani, Choukri et al. 2012).

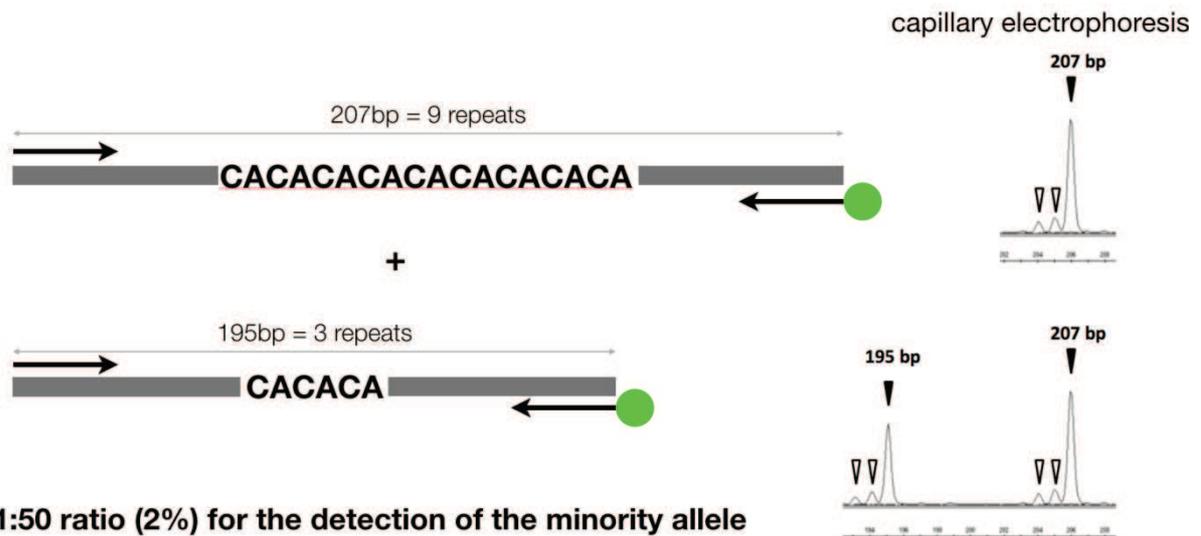
Quelques épidémies de pneumocystose ont déjà été rapportées en hématologie (Helweg-Larsen, Tsolaki et al. 1998; Ong and Jones 1998; Depypere, Saegeman et al. 2016) mais jusqu'à présent sans démonstration moléculaire de l'épidémie.

Nous avons donc rapporté une épidémie de 12 cas de pneumocystose dans le service d'hématologie et thérapie cellulaire de l'hôpital Henri Mondor de novembre 2015 à mai 2016. L'objectif était de mettre en évidence la transmission nosocomiale de la pneumocystose et pour cela, d'utiliser des outils de biologie moléculaire.

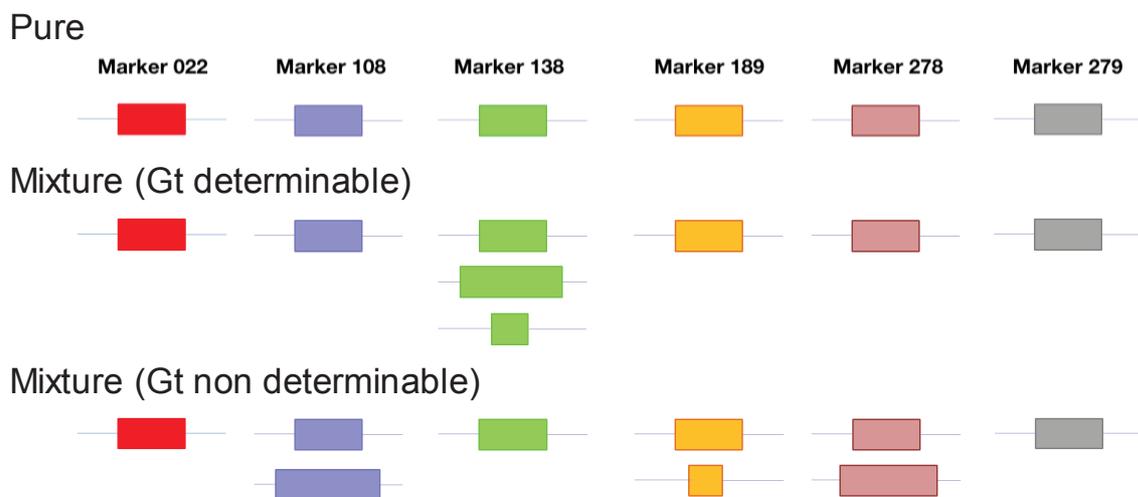
## B. Méthodes

Cf article Annexe 1

Le génotypage a été effectué au CNRMA (Centre Nationale de Référence des Mycoses et Antifongiques) à l'Institut Pasteur sous la responsabilité des Pr Bretagne et Dr Alanio, à partir d'échantillons congelés dans le laboratoire de parasitologie mycologie de l'hôpital Henri Mondor, dirigé par le Pr Botterel. Brièvement la méthode de génotypage de *Pneumocystis jirovecii* (Figures 21 et 22) (Gits-Muselli, Peraldi et al. 2015) repose sur l'analyse des microsatellites au niveau de 6 marqueurs nucléaires. La PCR est lancée à partir d'amorces fluorescentes. La taille des produits de PCR obtenus après électrophorèse dépend du nombre de répétitions d'un petit motif pour chaque marqueur, ce qui définit un allèle. Une combinaison unique d'un allèle par marqueur définit un génotype. On peut déterminer un génotype si tous les allèles sont uniques (génotype pur) ou si plusieurs allèles sont retrouvés pour un seul marqueur (mélange de plusieurs génotypes). Si plusieurs allèles sont retrouvés pour plus d'un marqueur, les génotypes ne peuvent pas être déterminés puisqu'il peut y avoir plusieurs combinaisons (mélange de plusieurs génotypes non typables). Cette technique est plus sensible pour différencier les différents génotypes car les polymorphismes sont étudiés dans les introns et ceux-ci sont soumis à moins de contraintes que les régions codantes. De plus, cette technique est plus sensible pour détecter des génotypes multiples.



**Figure 21** Analyse des microsatellites de 6 marqueurs nucléaires. La taille des produits de PCR obtenus par électrophorèse dépend du nombre de répétitions en tandem au niveau de chaque marqueur et définit un allèle. D'après (Gits-Muselli, Peraldi et al. 2015)



**Figure 22** Génotypage de *Pneumocystis jirovecii*. Une combinaison d'un allèle spécifique par marqueur définit un génotype. Un génotype peut être identifié si tous les allèles sont uniques pour un marqueur (génotype pur) ou si plusieurs allèles sont retrouvés pour un seul marqueur (génotype multiple). Si plusieurs allèles sont observés pour plus d'un marqueur, le génotype est impossible à déterminer.

## **C. Résultats**

Cf article Annexe 1

### **1. Caractéristiques des patients**

Douze patients ont été inclus de novembre 2015 à mai 2016 (Figure 23). Leurs caractéristiques sont résumées dans le tableau 14.

Tous présentaient une pneumopathie fébrile documentée par un LBA. Le scanner thoracique montrait une pneumopathie interstitielle, pour la majorité des cas diffuse, et des opacités en verre dépoli. Au diagnostic de PcP, 3 patients avaient une prophylaxie par atovaquone, 1 patient par aérosol de pentamidine et 8 n'avaient pas de prophylaxie, 5 par non indication selon les recommandations internationales (2 LA biphénotypiques et 3 LAM) et 1 en raison d'une neutropénie très profonde après allogreffe par non prise de greffe. Deux patients avaient arrêté leur prophylaxie quelques mois avant, conformément aux recommandations européennes et à celles du service. Aucun patient n'avait une prophylaxie par cotrimoxazole.

Nombre de cas/mois

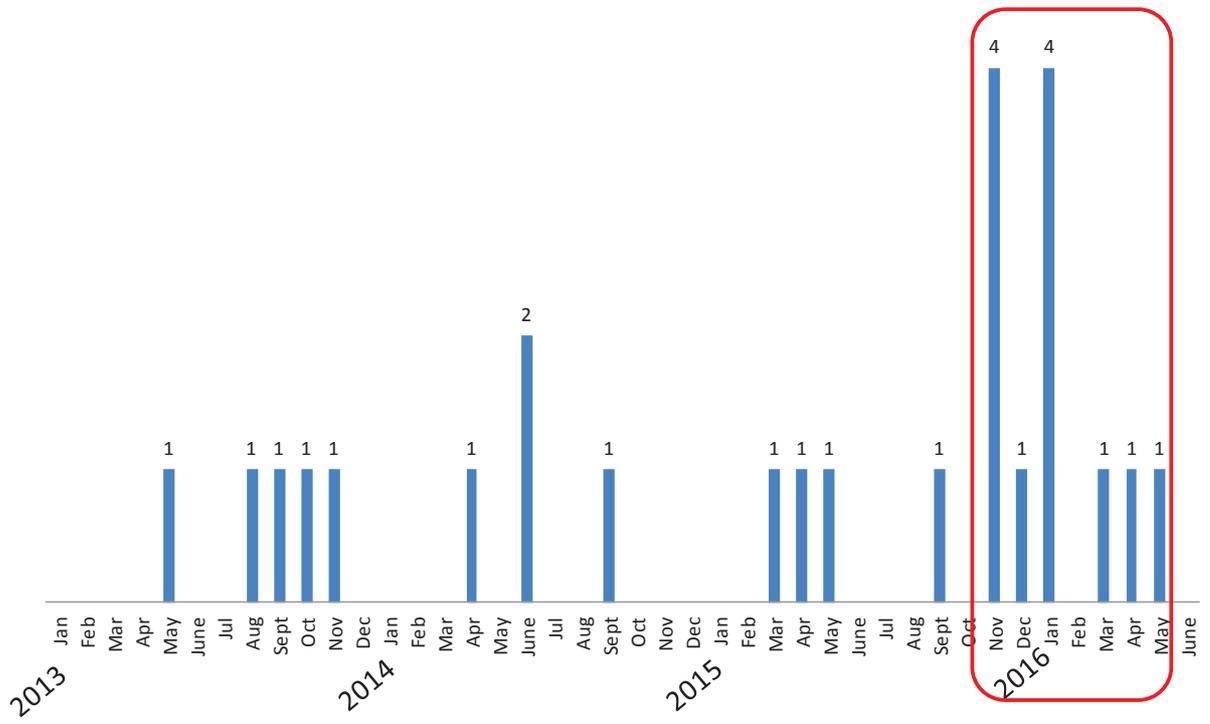


Figure 23 Nombre de cas de pneumocystose observés dans le service d'hématologie de 2013 à 2016

**Tableau 14** Caractéristiques des patients

Patient	Age	Sexe	Hémopathie	Allogreffe	Prophylaxie PcP	Autre cause possible de pneumonie	Devenir
1	27	M	LAM secondaire à SMD	Non	0	<i>A. fumigatus</i> (culture positive sur LBA)	Traité, Perdu de vue 8 jours après LBA
2	32	M	Maladie de Hodgkin	Oui Donneur non apparenté	Atovaquone (750mgX2/j)	VRS (écouvillon nasal et LBA) et <i>S. pneumoniae</i> (sang et LBA)	Traité, guéri
3	49	F	SMD	Oui 1ère : Cordon 2e : haplo-identique	0	Hémorragie alvéolaire	Traité, décédé de détresse respiratoire
4	51	M	LAL Ph+	Oui 1ère : géno-identique 2e : donneur non apparenté	0	HSV (LBA)	Traité, guéri
5	50	F	LLC	Oui Donneur non apparenté	Aérosols de pentacarinate	Rhinovirus (écouvillon nasal) <i>A. fumigatus</i> (LBA)	Traité, décédé de détresse respiratoire
6	68	F	LA Biphenotypique	Non	0	-	Traité, guéri
7	65	M	LAL	Oui Donneur non apparenté	0	-	Traité, guéri
8	55	M	LLC	Oui Géno-identique	Atovaquone (750mgx2/d)	-	Non traité, Mis sous prophylaxie par TMP-SMX Pas de rechute

9	64	M	LA Biphenotypique	Non	0	-	Traité, guéri
10	65	M	Myélofibrose secondaire à thrombocytémie essentielle	Oui Géno-identique	Atovaquone (750mgx2/j)	-	Traité, décédé de détresse respiratoire
11	66	F	LAM	Non	0	-	Traité, guéri
12	26	F	LAM (traitement de rattrapage)	Non	0	-	Non traité, Mis sous prophylaxie par TMP-SMX Pas de rechute

## 2. Génomotypages de *Pneumocystis jirovecii*

Chez 3 patients, (Patients 8, 11 et 12), *P. jirovecii* n'a pas pu être génotypé en raison d'une quantité d'ADN insuffisante (Tableau 15). Les patients 4 et 9 partageaient le même génotype Gt3 en association avec d'autres génotypes. Le patient 1 présentait le génotype 5 pur. Quatre patients (patients 2, 5, 7 et 10) partageaient le même génotype (génotype 2) qui était pur. Ce génotype n'avait jamais été observé en Europe dans une collection de plus de 300 spécimens de *P. jirovecii* (Alanio, Gits-Muselli et al. 2017).

## 3. Carte de transmission

Afin d'explorer l'hypothèse d'une transmission interhumaine, nous avons élaboré une carte de transmission des 4 patients partageant le génotype 2 (Figure 24). Nous avons collecté tous les séjours à l'hôpital, que ce soit en hôpital de jour, en consultation, ou en hospitalisation conventionnelle dans les 4 mois précédant le diagnostic. Nous avons considéré que la transmission était possible si deux patients s'étaient retrouvés dans la même pièce le même jour. Tous les contacts entre ces 4 patients ont eu lieu exclusivement en hôpital de jour. Le nombre médian de contacts entre ces 4 patients (6.5) était supérieur au nombre de contact entre les autres patients (1) ( $p=0.048$ ).

Une expectoration réalisée le 10/11/2015 chez le patient 5 dans un contexte de pneumopathie avec refus du LBA, était déjà positive pour *P. jirovecii* mais l'évolution sous antibiotiques avait été favorable et un traitement prophylactique par aérosol de pentamidine, interrompu quelques semaines auparavant, avait été repris. Le génotypage du *P. jirovecii* présent dans cette expectoration montrait déjà un génotype 2 pur. Le patient 5 a développé une nouvelle pneumopathie fébrile un mois plus tard, documentée par un LBA positif pour *P. jirovecii* en microscopie et en qPCR, d'évolution fatale.

Les patients 4 et 9 qui partageaient le même génotype 3 ne s'étaient jamais rencontrés.

**Tableau 15** Résultats biologiques des 12 patients

Patient	Date LBA	Microscopie	qPCR result (Cq)	Genotype <i>P. jirovecii</i> (Gt)	B-D-Glucane (pg/mL)
1	6/11/2015	MGG- ; IF-	37.2	Gt5	Positif (198)
2	9/11/2015	MGG-; IF-	34.6	Gt2 (pur)	Négatif (<80)
3	10/11/2015	MGG - ; IF -	40.0	Gt1 (pur)	Positif (93)
4	14/11/2015	MGG + ; IF +	29.5	Mélange (incluant Gt3)	Positif (>500)
5	21/12/2015	MGG + ; IF +	26.7	Gt2 (pur)	Positif (>500)
6	9/01/2016	MGG - ; IF -	35.6	Mélange	Positif (357)
7	12/01/ 2016	MGG - ; IF -	33.3	Gt2 (pur)	Négatif (<80)
8	14/01/2014	MGG - ; IF -	39.4	Quantité ADN insuffisante	Non fait

9	19/01/2016	MGG - ; IF -	27.6	Gt3 + Gt4 (multiple)	Non fait
10	15/03/2016	MGG + ; IF+	23.5	Gt2 (pur)	Positif (>500)
11	15/04/2016	MGG + ; IF-	32.8	Quantité ADN insuffisante	Négatif (<80)
12	11/05/ 2016	MGG - ; IF -	41.0	Quantité ADN insuffisante	Non fait

---

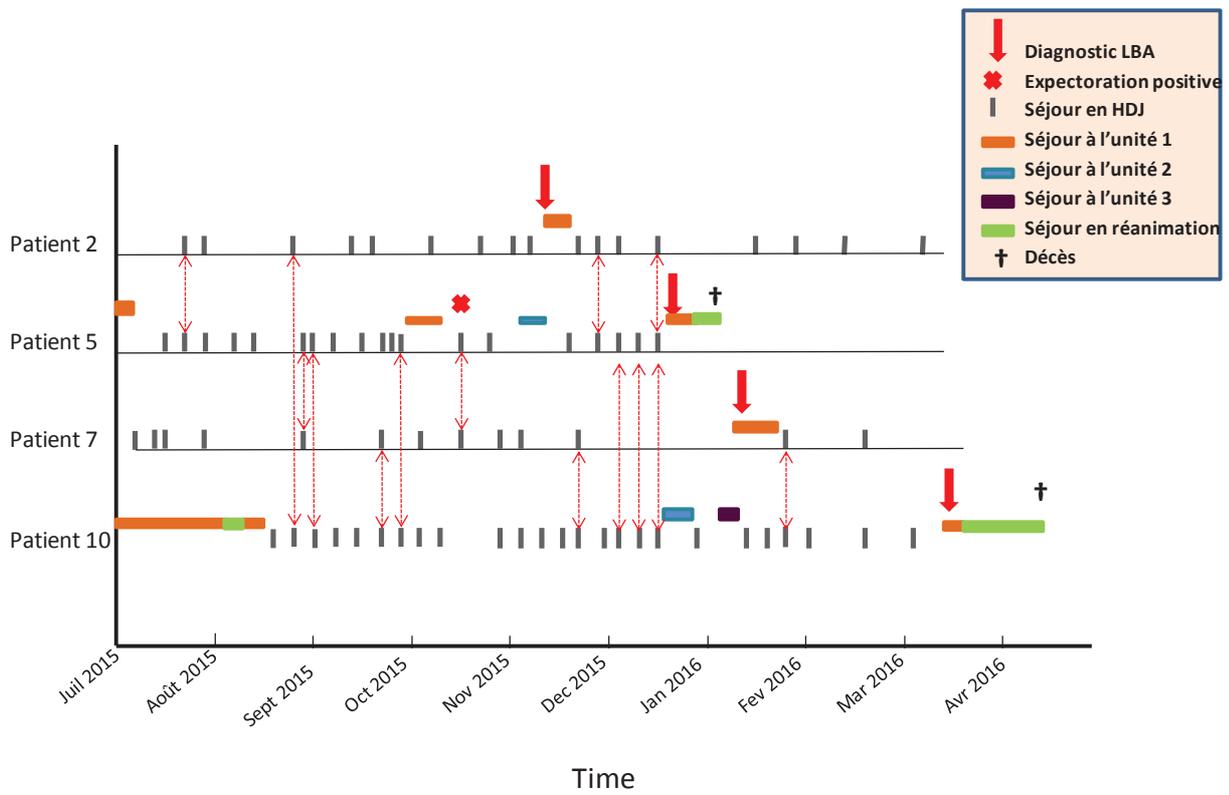


Figure 24 Carte de transmission des quatre patients infectés par le génotype 2



# Molecular Demonstration of a Pneumocystis Outbreak in Stem Cell Transplant Patients: Evidence for Transmission in the Daycare Center

## OPEN ACCESS

Edited by:

Frédéric Lamoth,

Centre Hospitalier Universitaire  
Vaudois (CHUV), Switzerland

Reviewed by:

Dionysios Nedykts,

Hôpitaux Universitaires de Genève  
(HUG), Switzerland

Olga Matos,

Universidade Nova de Lisboa,  
Portugal

\*Correspondence:

Catherine Cordonnier

catherine.cordonnier@aphp.fr

Specialty section:

This article was submitted to

Infectious Diseases,

a section of the journal

Frontiers in Microbiology

Received: 15 February 2017

Accepted: 05 April 2017

Published: 24 April 2017

Citation:

Robin C, Alanio A, Gits-Muselli M, la

Martine G, Schlemmer F, Botterel F,

Angebault C, Leclerc M, Beckerich F,

Redjou R, Pautas C, Toma A,

Maury S, Bretagne S and

Cordonnier C (2017) Molecular

Demonstration of a Pneumocystis

Outbreak in Stem Cell Transplant

Patients: Evidence for Transmission in

the Daycare Center.

Front. Microbiol. 8:700.

doi: 10.3389/fmicb.2017.00700

Christine Robin<sup>1,2</sup>, Alexandre Alanio<sup>3,4,5</sup>, Maud Gits-Muselli<sup>6,4</sup>, Giulia la Martire<sup>1</sup>, Frédéric Schlemmer<sup>2,6</sup>, Françoise Botterel<sup>6,7</sup>, Cécile Angebault<sup>2,7</sup>, Mathieu Leclerc<sup>1,2</sup>, Florence Beckerich<sup>1,2</sup>, Rabah Redjou<sup>1,2</sup>, Cécile Pautas<sup>1</sup>, Andrea Toma<sup>1</sup>, Sébastien Maury<sup>1,2</sup>, Stéphane Bretagne<sup>8,4,5</sup> and Catherine Cordonnier<sup>1,2\*</sup>

<sup>1</sup> Department of Hematology, Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, Henri Mondor Teaching Hospital, Créteil, France, <sup>2</sup> Paris-Est Créteil University, Créteil, France, <sup>3</sup> Parasitology-Mycology Laboratory, Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, Lariboisière Saint-Louis Fernand Widal Hospital, Paris, France, <sup>4</sup> Paris-Diderot, Sorbonne Paris Cité University, Paris, France, <sup>5</sup> Molecular Mycology Unit, National Reference Center of Invasive Mycosis and Antifungals, Centre National de la Recherche Scientifique, Institut Pasteur, UR43012, Paris, France, <sup>6</sup> Unit of Rheumatology, Intensive Care Department, Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, Henri Mondor Teaching Hospital, DHU A-TV8, Créteil, France, <sup>7</sup> Parasitology-Mycology Laboratory, Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, Henri Mondor Teaching Hospital, Créteil, France

*Pneumocystis jirovecii* pneumonia (PCP) is a life-threatening infection in hematology. Although occasionally reported, the role of interhuman transmission of *P. jirovecii* in PCP, compared to that of reactivation, remains an unresolved question; the recommendation to isolate PCP patients in the hematology ward are not well evidence-based. Following an unexpected increase in the number of febrile pneumonia patients with *P. jirovecii* DNA detected in respiratory samples in our hematology ward, we explored 12 consecutive patients from November 2015 to May 2016. Genotyping of *P. jirovecii* was performed using microsatellite markers. The frequency of simultaneous occupancy of these 12 patients in the same unit on the same day from 4 months prior to the first diagnosis was recorded. In three patients, the *P. jirovecii* genotype could not be determined because DNA was insufficient. One rare single genotype (Gt2) was found in four of the other nine, all allogeneic stem cell transplant recipients. The transmission map showed that these 4 patients had multiple opportunities to meet on the same day (median, 6.5; range, 4–10) at the daycare center. It was much less among the eight non-Gt2 patients (median, 1; range, 0–9;  $P = 0.048$ ). This study, based on modern molecular techniques, strongly suggests that interhuman transmission of *P. jirovecii* between allogeneic stem cell transplant recipients is possible. *P. jirovecii* DNA detected in respiratory specimens supports that isolation and respiratory precautions be recommended in such cases in the hematology ward.

Keywords: *Pneumocystis jirovecii*, genotyping, microsatellite, short tandem repeat, nosocomial infection

**Annexe 1** Molecular Demonstration of a Pneumocystis Outbreak in stem cell transplant patients : evidence for transmission in the daycare center (Robin, Alanio et al. 2017).

## INTRODUCTION

*Pneumocystis jirovecii* pneumonia (PCP) is a life-threatening fungal complication in hematology patients, particularly recipients of allogeneic hematopoietic stem cell transplantation (HSCT), where mortality is greater than 50% (Cordonnier et al., 2016). It is usually accepted that *P. jirovecii* is acquired early in life and that individuals are continuously exposed to it through the air (Gajdusek, 1957; Gigliotti and Wright, 2012; Morris and Norris, 2012). However, it is unclear whether infection is the exclusive result of recent exposure or if reactivation of the early-acquired strain could also participate in the development of PCP. Person-to-person transmission has been documented during outbreaks, especially in solid organ transplant wards (Yiannakis and Boswell, 2016). To avoid such transmission, recent guidelines for managing PCP in hematology patients published by the European Conference on Infections in Leukemia group (Alanio et al., 2016c; Maertens et al., 2016; Maschmeyer et al., 2016) state that "it seems reasonable that severely immunocompromised patients should avoid contact with patients with documented PCP." However, because data is lacking in this population, this is a C-III recommendation (e.g., there is poor evidence to support it). Similarly, the 2007 guidelines for isolation precautions from the US Centers for Disease Control and Prevention advises that PCP-infected patients should not be placed in the same room as immunocompromised patients, and other standard precautions should be taken (Siegel et al., 2007).

Genotyping studies of outbreaks in renal (Thomas and Limper, 2004; de Boer et al., 2011; Yiannakis and Boswell, 2016) or liver (Desoubeaux et al., 2016) transplant units were of major importance when reconsidering the mechanism of PCP development and supporting interhuman or environmental transmission of *P. jirovecii*. Additionally, the presence of *P. jirovecii* in the exhaled air of PCP patients (Choukri et al., 2010; Damiani et al., 2012) and the common genotype found in infected patients and colonized health care workers (Damiani et al., 2012) strongly suggest that PCP infection can also be nosocomial. However, only 16 of the reported outbreaks in kidney recipients thus far (Yiannakis and Boswell, 2016) were documented using molecular biology, and no firm statement on the transmission mode has been made.

The methods for detecting and genotyping *P. jirovecii* have greatly evolved over the last years. A PCP diagnosis increasingly relies on real-time quantitative PCR (qPCR) instead of microscopy and immunofluorescence staining (Alanio et al., 2016c). The qPCR assay increases the rate of detection and provides additional clues for elucidating the source of contamination. Various methods of genotyping have been developed (reviewed in Alanio et al., 2016c); multilocus sequence typing and internal transcribed spacer (ITS) sequencing are the most common. New genotyping methods based on short tandem repeat markers located in the nuclear genome are now available, allowing easier and more rapid analysis of clustered infections and accurate detection of mixtures (Parobek et al., 2014; Alanio et al., 2016b).

To our knowledge, this is the first possible interhuman transmission of *P. jirovecii* documented using modern molecular

tools in the hematology ward. Microsatellite marker genotyping was used during an outbreak of febrile pneumonia in a hematology ward, and positive *P. jirovecii* detection was employed. This study shows that hematology patients can be infected by *P. jirovecii* genotypes transmitted from other at-risk patients in the ward. This clearly supports a strong recommendation for isolation and respiratory precautions where *P. jirovecii* is detected in respiratory DNA specimens from patients cared for in the same hematology ward.

## MATERIALS AND METHODS

### Study Setting

The hematology department comprises 26 single-occupancy rooms for conventional hospitalization. It includes one unit (Unit 1) without air filtration that has eight beds, two units with laminar air-flow filtration that have six (Unit 2) and 12 (Unit 3) beds, and a daycare clinic, which cares for 30–50 patients daily on the upper floor. When the patients are at the daycare center, they all arrive between 8 and 9 a.m. and may stay several hours on site, sharing a unic waiting room. The department mainly recruits patients with acute leukemia, myelodysplastic syndrome, myeloproliferative disorders, and aplastic anemia. Around 40 allogeneic HSCTs are performed annually. Patients, hospital stays, and daycare center stays numbered 255, 505, and 2,450, respectively, and the median hospital stay was 20 days. These values have not appreciably varied since 2013.

Procedures for PCP prophylaxis in acute lymphoblastic leukemia and lymphoma patients and in HSCT recipients are in writing. The first-line recommended regimen is a single double-strength tablet of trimethoprim-sulfamethoxazole (TMP-SMX) thrice weekly, but if not tolerated, the second-line is atovaquone (750 mg oral suspension twice daily) or pentamidine aerosol monthly. Patients with pneumonia, except those in palliative care, are investigated by fiberoptic bronchoscopy and bronchoalveolar lavage (BAL) with a systematic search for *P. jirovecii* by May-Grünwald Giemsa (MGG) staining (RAL-555; RAL Reagents, Martillac, France) and an indirect immunofluorescence assay (IFA; MONOFLUO™ kit, *P. jirovecii*; Bio-Rad, Marnes la Coquette, France) as previously described (Botterel et al., 2012). Since 2013, a qPCR targeting the mitochondrial LSU of the rRNA of *P. jirovecii* has been routinely performed in respiratory specimens (BAL fluid or upper respiratory tract samples) (Botterel et al., 2012). Other causes of pneumonia are investigated using systematic laboratory procedures to identify bacterial, viral, and other fungal pathogens as well as alveolar hemorrhage and alveolar proteinosis. A serum (1–3)  $\beta$ -D-glucan test (Fungitell assay, Associates of Cape Cod, Inc., Cap Cod, Massachusetts), when requested, was performed according to manufacturer recommendations and was considered positive at  $>80$  pg/mL. However, the test was not routine at this time and could not be performed within 48 h of the BAL for all patients.

Figure 1 shows the frequency of febrile pneumonia and positive DNA tests for *P. jirovecii* between January 2013 and May 2016. It was 4 to 5 cases per year before the fall of 2015, but 4 cases were observed from November 6 to 14, 2015. Eight additional cases were observed from December 2015 to May

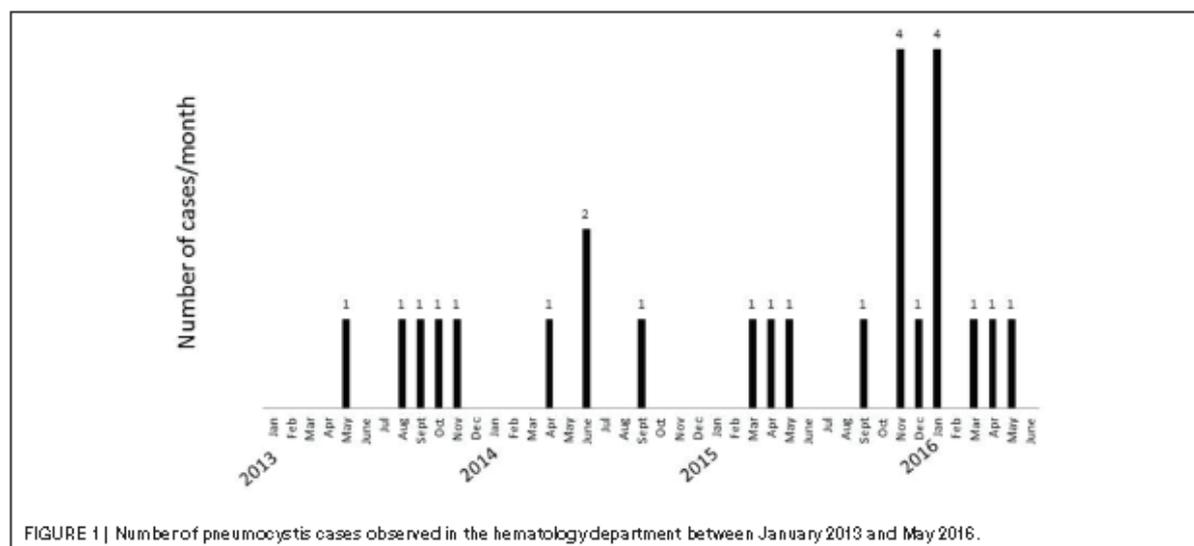


FIGURE 1 | Number of pneumocystis cases observed in the hematology department between January 2013 and May 2016.

2016. This unexpected high incidence led to a search for evidence of transmission using *P. jirovecii* genotyping and an analysis of patient presence in the ward. According to French Health Public Law (CSP Art L1121-1.1), such an investigation does not require specific informed consent or ethics committee approval.

### Molecular Typing

Molecular typing of *P. jirovecii* was performed on DNA extracted from respiratory specimen (BAL or/and sputum) that were frozen at  $-20^{\circ}\text{C}$ . Microsatellite analysis was performed according to previously published methods (Gits-Muselli et al., 2015). Briefly, tests for six nuclear microsatellite markers (#022, #108, #138, #189, #278, and #279) were performed using fluorescent primers. The size of the PCR product obtained after capillary electrophoresis depends on the number of short tandem repeats for each marker. For a given marker, the size that is proportional to the number of repeats defines an allele. A unique combination of one specific allele per marker identifies a specific genotype. The genotypes were arbitrarily attributed numbers and were considered to be found if all alleles were unique for a given marker (pure genotype) or if more than one allele was found for one marker (multiple genotypes). Otherwise (i.e., when multiple alleles were observed for more than 1 marker), the genotype could not be determined, and the result was reported as a "mixture" of various genotypes.

## RESULTS

### PCP Patients

Twelve consecutive PCP patients hospitalized from November 2015 to May 2016 were included, and their characteristics are summarized in Table 1. All were investigated by fiberoptic bronchoscopy and BAL. Seven were allogeneic HSCT recipients. At BAL, all 12 patients were symptomatic, febrile, and hypoxemic, and lung CT images were consistent with interstitial

pneumonia, mainly diffuse, patchy, ground-glass opacities. A serum (1-3)  $\beta$ -D-glucan test was available for nine patients and was positive for six (Patients 1, 3-6, and 10; Table 1). No serum (1-3)  $\beta$ -D-glucan test was performed for Patients 8, 9, and 12. At diagnosis, PCP prophylaxis was atovaquone in three patients and pentamidine aerosols in one because these patients were intolerant of TMP-SMX. Eight patients had no prophylaxis, five because of the absence of recommendations for mixed phenotype AL ( $n = 2$ ) or for AML ( $n = 3$ ) and one because of deep neutropenia after HSCT. In the other two, prophylaxis was stopped several months prior, after withdrawing immunosuppressive drugs. As a result, none of the 12 patients received TMP-SMX prophylactically.

### Genotyping Results

In three patients (Patients 8, 11, and 12), the *P. jirovecii* genotype could not be determined because insufficient amounts of DNA were obtained. In Patient 1, only one marker (#022) was amplified, but with a different allele from other patients, allowing the assumption that this patient had a specific genotype (Gt5). In the eight remaining patients, the six markers were correctly amplified. One genotype (Gt2) was found pure in four patients (Patients 2, 5, 7, and 10), all of whom were diagnosed within a timeframe of 4 months (November 9, 2015 to March 15, 2016). Of note, Gt2 had not been found in our collection of genotyped *P. jirovecii* specimens from France and Europe ( $n > 300$  in total) (Alanio et al., 2014, 2016a; Gits-Muselli et al., 2015). The various Gt2 alleles were searched for but not found in the other patients, confirming that they did not harbor it.

Patients 4 and 9 shared Gt3 genotype, in addition to other alleles in Patient 4, and in addition to Gt4 in Patient 9. Of note, Gt3 has been very rarely observed in our experience (one patient from Paris, one from Germany, and one from The Netherlands out of at least 300 patients).

TABLE 1 | Characteristics of the 12 patients who developed febrile pneumonia with positive detection of *Pneumocystis jirovecii* DNA in broncho-alveolar lavage fluid in the hematology ward between November 2015 and March 2016.

Patient No.	Age (years)	Sex	Underlying disease	Allogeneic PCP, donor type	HSCT before date of diagnostic BAL	Microscopy results	qPCR result (Cq)	<i>P. jirovecii</i> G <sup>8</sup>	Serum β-D glucose with in 4-8 h of BAL (value pg/mL)	PCP prophylaxis at time of PCP diagnosis	Possible concomitant causes of pneumonia	Outcome
1	27	M	Myelodysplastic syndrome, secondary AML	No	Nov 6, 2015	MGG-, IFA -	37.2	G85	Positive (198)	None	<i>A. fumigatus</i> (positive culture on BAL fluid)	Treated, lost to follow-up 8 days after BAL
2	32	M	Hodgkin disease	Yes Unrelated donor	Nov 9, 2015 (day 442 after HSCT)	MGG-, IFA -	34.6	G82 (pure)	Negative	Atovaquone (750 mg/2/d)	RSV (nasal swab and BAL) and <i>S. pneumoniae</i> (Blood cultures and BAL)	Treated, Recovered
3	49	F	Myelodysplastic syndrome	Yes One cord blood unit, no engraftment, 2nd haplo-identical HSCT	Nov 10, 2015 (day 90 after 1st HSCT)	MGG-, IFA -	40.0	G81 (pure)	Positive (92)	None	Alveolar hemorrhage	Treated, death from acute respiratory failure
4	51	M	ALL Ph+	Yes First HLA-identical HSCT in 2007. Relapse. Second HSCT from an unrelated donor	Nov 14, 2015 (day 304 after 2nd HSCT)	MGG+, IFA+	29.6	Mixture (including G83 alleles)	Positive (>500)	None	HSV in BAL	Treated, recovered
5	50	F	CLL	Yes Unrelated donor	Dec 21, 2015 (day 301 after HSCT)	MGG+, IFA+	26.7	G82 (pure)	Positive (>500)	Monthly aerosols of pentamidine	Rhinovirus on nasal swabs, <i>A. fumigatus</i> in BAL	Treated, death from acute respiratory failure
6	68	F	Biphenotypic AL	No	Jan 9, 2016	MGG-, IFA -	35.6	Mixture	Positive (357)	None	-	Treated, recovered
7	65	M	ALL	Yes Unrelated donor	Jan 12, 2016 (day 418 after HSCT)	MGG-, IFA -	33.3	G82 (pure)	Negative	None	-	Treated, recovered
8	55	M	CLL	Yes HLA-identical donor	Jan 14, 2016 (day 543 after HSCT)	MGG-, IFA -	39.4	Not available (insufficient fungal DNA)	ND	Atovaquone (750 mg/2/d)	-	Not treated. Switched to prophylactic TMP-SMX. No recurrence
9	64	M	Biphenotypic AL	No	Jan 19, 2016	MGG-, IFA -	27.6	G83 + G84 (multiple)	ND	None	-	Treated, recovered
10	65	M	Secondary myelofibrosis (thrombocytopenia)	Yes HLA-identical donor	Mar 15, 2016 (day 240 after HSCT)	MGG+, IFA+	23.5	G82 (pure)	Positive (>500)	Atovaquone (750 mg/2/d)	-	Treated, death from acute respiratory failure
11	66	F	AML	No	April 15, 2016	MGG+, IFA -	32.8	Not available (insufficient fungal DNA)	Negative	None	-	Treated, recovered
12	26	F	AML salvage therapy	No	May 11, 2016	MGG-, IFA -	41.0	Not available (insufficient fungal DNA)	ND	None	-	Not treated. Put on TMP-SMX on prophylaxis. No recurrence

\*Those indicated as pure showed one allele per run. Those indicated as multiple showed two alleles for more than one marker. ALL, acute lymphoblastic leukemia; AML, acute myeloid leukemia; BAL, broncho-alveolar lavage; G, genotype; Cq, quantification cycle; CLL, chronic lymphocytic leukemia; HSCT, hematopoietic stem cell transplantation; IFA, immunofluorescence assay; MGG, Meyer-Grosswald-Giemsa (8/8h); ND, not done; Ph+, chromosome Philadelphia positive; RSV, respiratory syncytial virus; TMP-SMX, trimethoprim-sulfamethoxazole.

## Transmission Map

Gt2 was first observed on November 9, 2015 in the BAL of Patient 2 (Figure 2). To explore a possible nosocomial transmission through close contact between the four Gt2 patients, we collected all the dates, times of stays, and meeting sites within the hospital from July 2015 to May 2016 (i.e., starting 4 months before and ending 6 months after the first case). Direct transmission was deemed possible if patients were found to be in the same room on the same day. All contacts between these four patients occurred in the daycare center, which has only one waiting room (Figure 2). The median number of contacts was 6.5 (range, 4–10). In contrast, the median number of contacts between the other eight patients and any Gt2 patient was significantly lower (median, 1; range, 0–9;  $P = 0.048$ ). Additionally, non-Gt2 to non-Gt2 patient contact was zero for five patients, one for one of them, and three for two of them. Figure 2 strongly suggest that either patient 2 or patient 5 was the source of Gt2 transmission.

Moreover, 1 month before diagnosis in December 2015, Patient 5 was hospitalized for fever, bronchopulmonary symptoms, and hypoxia in a different unit than Patient 2. The chest CT scan showed micronodules in the upper right lobe, indirect investigations were negative, and the patient refused fibroscopy. *P. jirovecii* was found via PCR in sputum collected on November 10, but the result of the test was missed. Improvement occurred after taking antibacterials, and prophylactic aerosols of pentamidine were reinstated, but 4 weeks later, the patient

was hospitalized for febrile dyspnea. A BAL documented full-blown PCP with positive microscopy and PCR. She died from respiratory failure. We retrospectively determined from a sputum sample that the *P. jirovecii* genotype was pure Gt2.

Although Patients 4 and 9 share the rare Gt3 genotype, they never met.

## DISCUSSION

We report here the documentation of interhuman transmission of *P. jirovecii*, which was between 4 allogeneic HSCT recipients. We used *P. jirovecii* genotyping and analysis of the transmission path in the hospital which revealed that transmission probably occurred in the daycare center (Figure 2) where the patients repeatedly met for post-transplant follow-up. Contacts between the four Gt2-patients and the concomitance of PCP infection in Patient 2 and *P. jirovecii* detection in Patient 5 makes it plausible that either Patient 2 or Patient 5 could have been the first transmitter. The Gt2 transmission could have started from the first PCP case (Patient 2), who transmitted the disease to Patients 5 and 10, either of whom could have contaminated Patient 7. Alternatively, because Patient 5 was retrospectively identified as a Gt2 carrier, she could have been the first transmitter.

This transmission likely occurred because of the absence of effective PCP prophylaxis. Indeed, out of 30 PCP outbreaks

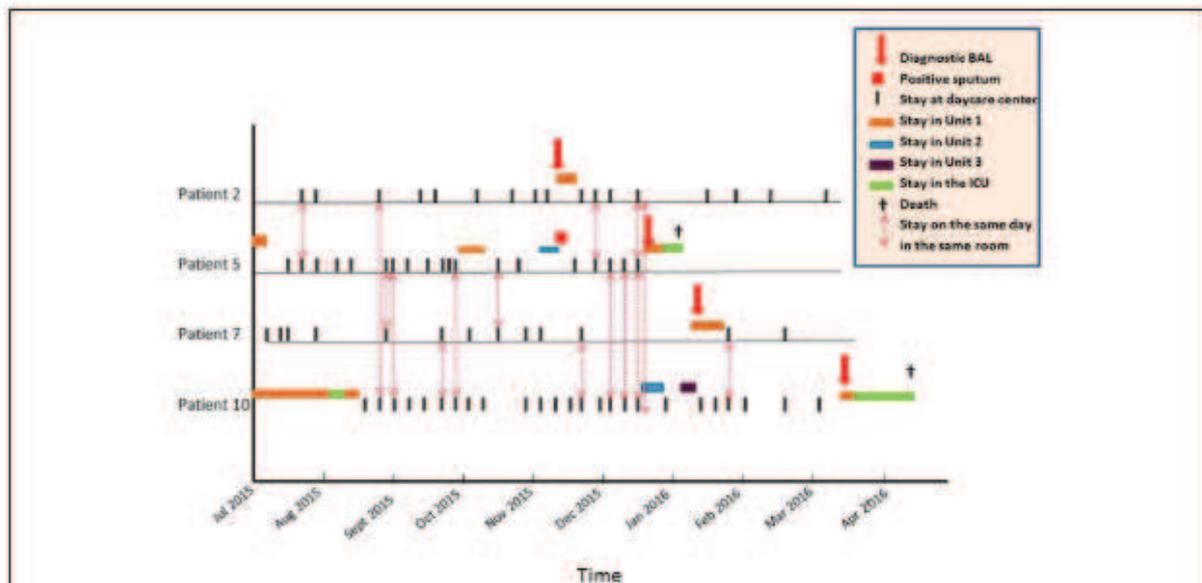


FIGURE 2 | Transmission map of the 4 patients infected with genotype 2 *Pneumocystis jirovecii* in the hematology ward, showing that any meeting between two Gt2 patients must have been in the daycare center because no 2 patients were concomitantly hospitalized in the same unit of the ward. Patient 2 met Patients 5 and 10 once each before developing PCP and twice each after developing PCP while under treatment followed by secondary prophylaxis, including once when both were met on the same day. Patient 2 never met Patient 7. Patient 5, the only one to have met all 3 others at least once, met Patient 2 three times, Patient 7 twice, and Patient 10 five times. Patient 7 met Patient 5 twice and Patient 10 three times (twice before the diagnosis of PCP, and once thereafter). Patient 7 never met Patient 2. Patient 10 met Patient 2 twice and Patient 5 five times, including one occurrence where both were met on the same day. Patient 10 met Patient 7 three times.

reviewed by Yiannakis et al., in 2016, 25 (8396) were reported in kidney transplant recipients, and most were not receiving PCP prophylaxis (Yiannakis and Boswell, 2016). In the hematology ward, there are usually written procedures for PCP prophylaxis, at least for the most at-risk patients (i.e., allogeneic HSCT recipients, acute lymphoblastic leukemia and lymphoma patients). The first-choice prophylactic regimen in at-risk patients is TMP-SMX (Stern et al., 2014; Maertens et al., 2016). However, this can be associated with side effects, poor compliance, or omission. Although the staff complies with our policies, none of the 12 patients included in this study was receiving TMP-SMX at the time of PCP diagnosis. Because all four Gt2 patients were allogeneic HSCT recipients, they might have been at higher risk because of their repetitive, often weekly, appointments at the daycare center in spite of being a minority of our study population.

Until now, only two PCP outbreaks have been reported in hematology wards. In one, five diagnoses were reported within 6 months in the same unit but without molecular investigation (Ong and Jones, 1998). In the other, nested amplification, cloning, and sequencing of ITS showed a common ITS sequence type between two of the eight hematology study patients who shared the same room (Helweg-Larsen et al., 1998). However, the genotype was also the most common found in Denmark, where the study was performed. Therefore, the authors concluded that "person-to-person transmission may occur but it may be a relatively infrequent event" (Helweg-Larsen et al., 1998). On the other hand, a 2013 Belgian survey including 21 patients with *P. jirovecii* based on PCR of BAL fluid in the same hospital with six hematology patients failed to find transmission of the same *P. jirovecii* genotype using multilocus sequence typing (Depypere et al., 2016). In our series, nosocomial transmission in the daycare center between four of the 12 patients is amply supported. First, these patients shared a unique *P. jirovecii* genotype that had never been observed in our experience on more than 300 *P. jirovecii* strains across Europe (Gits-Muselli et al., 2015; Alanio et al., 2016a) while 70–92% of PCP cases harbor mixtures of genotypes (Gits-Muselli et al., 2015; Alanio et al., 2016b; Depypere et al., 2016). Second, they had multiple opportunities to meet in the daycare center where they repetitively stayed several hours in the same, confined, waiting room. Finally, all were deeply immunosuppressed, and three were receiving no PCP prophylaxis.

Sharing the same genotype does not allow determination of the index case. Indeed, we do not know when transmission eventually occurred, but because a single pure genotype (Gt2) was found in four patients, a recent acquisition in these patients is suggested. Whether the transmission of Gt2 was direct, interhuman, the result of close contact, or was indirect through the environment can also not be determined. Healthcare workers could be the culprits, as suggested in other studies (Vargas et al., 2000; Miller et al., 2001; Valade et al., 2015), but this was not explored. Similarly, 16 outbreaks in kidney transplant patients have been documented using various molecular methods, and a single or predominant strain was found in 13 of them, supporting interhuman transmission either from patient to patient, via healthcare workers, or through the environment (Yiannakis and

Boswell, 2016). However, in none of these reports could all cases be ascribed to the same genotype, suggesting that both mechanisms of infection—reactivation and recent interhuman transmission—probably occurred concomitantly, whether or not in the setting of an outbreak. Multiple *P. jirovecii* genotypes could circulate at the same time, and from various people. As genotype mixtures are common in PCP patients (Gits-Muselli et al., 2015; Alanio et al., 2016b; Depypere et al., 2016), this precludes any conclusion about which genotype was initially present. Only monitoring of patients over a long period of time could elucidate this fact.

While it is important to note that transmission occurred between our study patients, one may consider that PCP was not confirmed in five of those included in this study. Indeed, Patients 2, 7, 8, 9, and 12 were microscopically negative using MGG or IFA staining and were serum  $\beta$ -D-glucan negative. However, all patients had clinical and imaging patterns consistent with PCP. Even if some patients are considered probable or putative cases, it does not change the possibility of *P. jirovecii* transmission among them. We do not know whether there is a minimal fungal load to contaminate another patient. It could be hypothesized that any cough generated by another bronchopulmonary infection, especially a respiratory viral infection, could contribute to increased transmission of *P. jirovecii*, whatever the fungal load. Therefore, our study confirms the interest of adding a *P. jirovecii* qPCR on respiratory samples of hematology patients with pulmonary symptoms to determine whether they are possible transmitters (Guigue et al., 2015).

To determine whether patients with low fungal loads are the source of infection or participate in the transmission chain is hampered by the inability to genotype when facing a low fungal burden. The qPCR used for *P. jirovecii* detection in respiratory samples targets a multicopy gene (mtLSUrRNA) to improve test sensitivity (Alanio et al., 2011; Botterel et al., 2012), whereas the alleles tested for genotyping are located on single-copy genes (Gits-Muselli et al., 2015). Therefore, other epidemiological links or transmission between patients harboring low fungal loads could have been missed. A typing system based on the investigation of mitochondrial markers (mainly by sequencing mtLSU or *cytb* genes) for genotyping would lead to increased sensitivity, but the reliability of this method is disputable because mitochondrial heteroplasmy and recombination could occur (Valero et al., 2016). Furthermore, the plasticity and mutation rates is known to differ between the mitochondrial genome and the nuclear genome. This is why mitochondrial genes have not been retained in the multilocus sequence typing approach for *Candida albicans*, for instance (Odds and Jacobsen, 2008).

In conclusion, this study illustrates two important features: (1) nosocomial transmission of *P. jirovecii* is possible between infected patients within the hematology ward, as illustrated in our daycare center; and (2) TMP-SMX, the optimal PCP prophylaxis (Maertens et al., 2016) is important and its absence increases the susceptibility of at-risk patients during an outbreak. This clearly supports a strong specific recommendation for isolation and respiratory precautions with PCP, and more generally, encourages reinforcing control policies when pulmonary symptoms are seen in the hematology ward.

This recommendation was, up to now, not evidence-based for PCP in hematology (Siegel et al., 2007; Maertens et al., 2016). Thus, hospitalized PCP patients should be in single-occupancy rooms and wear at least a surgical mask to prevent transmission when meeting other patients in confined waiting rooms, such as a daycare center. Wearing a mask could have prevented the onset of this outbreak. Our data support that these recommendations be extended to any PCP-at-risk patient with febrile pneumonia and the presence of *P. jirovecii*, detected using qPCR on respiratory specimens. Wearing a mask in the hospital for any hematology patient without respiratory symptom should logically decrease the transmission of any pathogen transmitted through air, and subsequently decrease the incidence of other respiratory diseases, especially during the fall-winter season. The efficacy and acceptability of such measure should, however, be carefully assessed.

## REFERENCES

- Alaino, A., Desoubeaux, G., Sarfati, C., Hamana, S., Bergeron, A., Azouby, E., et al. (2011). Real-time PCR assay-based strategy for differentiation between active *Pneumocystis jirovecii* pneumonia and colonization in immunocompromised patients. *Clin. Microbiol. Infect.* 17, 1531–1537. doi: 10.1111/j.1469-0699.12010.03400.x
- Alaino, A., Gite-Muselli, M., Calderon, E., DiCava, D., Dupont, D., Harngrecht, A., et al. (2016a). "European study on *Pneumocystis jirovecii* short tandem repeats genotyping reveals wide population diversity with geographic specificities," in *European Congress on Clinical Microbiology and Infectious Diseases* (Amsterdam). doi: 10.1016/j.ijer.2016.04.017
- Alaino, A., Gite-Muselli, M., Mercier-Dehrue, S., Dromer, F., and Bretagne, S. (2016b). Diversity of *Pneumocystis jirovecii* during infection revealed by ultra-deep pyrosequencing. *Front. Microbiol.* 7:733. doi: 10.3389/fmicb.2016.00733
- Alaino, A., Hausen, P. M., Lagrou, K., Mekhem, W. J., Helweg-Larsen, J., Mateo, O., et al. (2016c). ECIL guidelines for the diagnosis of *Pneumocystis jirovecii* pneumonia in patients with haematological malignancies and stem cell transplant recipients. *J. Antimicrob. Chemother.* 71, 2386–2396. doi: 10.1093/jac/dkw156
- Alaino, A., Morio, F., Gite-Muselli, M., Denon-Ollivier, M., Maitte, C., and Bretagne, S. (2014). "Short tandem repeat genotyping for *P. jirovecii* is more sensitive to mixed genotype than MLST," in *International Workshop on Opportunistic Protists (IWOP)* (Sevilla).
- Bottard, F., Cabaret, O., Foulet, F., Corbonnier, C., Coets, J. M., and Bretagne, S. (2012). Clinical significance of quantifying *Pneumocystis jirovecii* DNA by using real-time PCR in bronchoalveolar lavage fluid from immunocompromised patients. *J. Clin. Microbiol.* 50, 227–231. doi: 10.1128/JCM.06036-11
- Choukri, F., Menotti, J., Sarfati, C., Lucet, J. C., Nevez, G., Garin, Y. J. F., et al. (2010). Quantification and spread of *Pneumocystis jirovecii* in the surrounding air of patients with *Pneumocystis pneumonia*. *Clin. Infect. Dis.* 51, 259–265. doi: 10.1086/653933
- Corbonnier, C., Cesaro, S., Maschmeyer, G., Einsack, H., Donnelly, J. P., Alaino, A., et al. (2016). *Pneumocystis jirovecii* pneumonia: still a concern in patients with haematological malignancies and stem cell transplant recipients. *J. Antimicrob. Chemother.* 71, 2379–2385. doi: 10.1093/jac/dkw155
- Damiani, C., Choukri, F., Le Gal, S., Menotti, J., Sarfati, C., Nevez, G., et al. (2012). Possible nosocomial transmission of *Pneumocystis jirovecii*. *Emerg. Infect. Dis.* 18, 877–878. doi: 10.3201/eid1805.111432
- de Boer, M. G., de Rijter, J. W., and Kroon, F. P. (2011). Outbreaks and clustering of *Pneumocystis pneumonia* in kidney transplant recipients: a systematic review. *Med. Mycol.* 49, 673–680. doi: 10.1109/13693786.2011.571294
- Depypere, M., Saegeman, V., and Lagrou, K. (2016). Typing of *Pneumocystis jirovecii* by multilocus sequencing: evidence of outbreak? *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 35, 911–916. doi: 10.1007/s10096-016-2615-y
- Desoubeaux, G., Dominique, M., Morio, F., Thepault, R. A., Franck-Martial, C., Tellier, A. C., et al. (2016). Epidemiological outbreaks of *Pneumocystis jirovecii* pneumonia are not limited to kidney transplant recipients: genotyping confirms common source of transmission in a liver transplantation unit. *J. Clin. Microbiol.* 54, 1314–1320. doi: 10.1128/JCM.00133-16
- Gajdusek, D. C. (1957). *Pneumocystis carinii*: etiologic agent of interstitial plasma cell pneumonia of preculture and young infants. *Pediatrics* 19, 543–565.
- Gigliotti, F., and Wright, T. W. (2012). *Pneumocystis*: where does it live? *PLoS Pathog.* 8:e1003025. doi: 10.1371/journal.ppat.1003025
- Gite-Muselli, M., Peralki, M. N., de Castro, N., Dakay, V., Menotti, J., Guigue, N., et al. (2015). New short tandem repeat-based molecular typing method for *Pneumocystis jirovecii* reveals intrahospital transmission between patients from different wards. *PLoS ONE* 10:e0125763. doi: 10.1371/journal.pone.0125763
- Guigue, N., Alaino, A., Menotti, J., Castro, N. D., Hamana, S., Peyrony, O., et al. (2015). Utility of adding *Pneumocystis jirovecii* DNA detection in nasopharyngeal aspirates in immunocompromised adult patients with febrile pneumonia. *Med. Mycol.* 53, 241–247. doi: 10.1093/mmy/myp087
- Helweg-Larsen, J., Bolaki, A. G., Miller, R. F., Lundgren, B., and Wakefield, A. E. (1996). Clusters of *Pneumocystis carinii* pneumonia: analysis of person-to-person transmission by genotyping. *QJM* 91, 813–820. doi: 10.1093/qjmed/91.12.813
- Maertens, J., Cesaro, S., Maschmeyer, G., Einsack, H., Donnelly, J. P., Alaino, A., et al. (2016). ECIL guidelines for preventing *Pneumocystis jirovecii* pneumonia in patients with haematological malignancies and stem cell transplant recipients. *J. Antimicrob. Chemother.* 71, 2397–2404. doi: 10.1093/jac/dkw157
- Maschmeyer, G., Helweg-Larsen, J., Pagano, L., Robin, C., Corbonnier, C., and Schellongowski, P. (2016). ECIL guidelines for treatment of *Pneumocystis jirovecii* pneumonia in non-HIV-infected haematology patients. *J. Antimicrob. Chemother.* 71, 2405–2413. doi: 10.1093/jac/dkw158
- Miller, R. F., Ambrose, H. E., and Wakefield, A. E. (2001). *Pneumocystis carinii* f. sp. hominis DNA in immunocompetent health care workers in contact with patients with *P. carinii* pneumonia. *J. Clin. Microbiol.* 39, 3877–3882. doi: 10.1128/JCM.39.11.3877-3882.2001
- Morris, A., and Norris, K. (2012). Colonization by *Pneumocystis jirovecii* and its role in disease. *Clin. Microb. Rev.* 25, 297–317. doi: 10.1128/CMR.00013-12
- Odds, F. C., and Jacobsen, M. D. (2008). Multilocus sequence typing of pathogenic *Candida* species. *Emerg. Infect. Dis.* 14, 1075–1084. doi: 10.1128/EID1408-08
- Ong, Y. L., and Jones, F. G. (1998). A cluster of suspected *Pneumocystis carinii* pneumonia following intensive chemotherapy in a Belfast haematology unit. *Ulster Med. J.* 67, 104–109.
- Parobek, C. M., Jiang, L. Y., Patel, J. C., Alvarez-Martinez, M. J., Miao, J. M., Worodria, W., et al. (2014). Multilocus microsatellite genotyping array

- for investigation of genetic epidemiology of *Pneumocystis jirovecii*. *J. Clin. Microbiol.* 52, 1391–1399. doi: 10.1128/JCM.02531-13
- Siegel, J. D., Rhinehart, E., Jackson, M., Chiarello, L., and Health Care Infection Control Practice Advisory Committee. (2007). Guideline for isolation precautions: preventing transmission of infectious agents in health care settings. *Am. J. Infect. Control* 35(10 Suppl. 2), S65–S164. doi: 10.1016/j.ajic.2007.10.007
- Stem, A., Green, H., Paul, M., Vidal, L., and Leibovici, L. (2014). Prophylaxis for *Pneumocystis pneumonia* (PCP) in non-HIV immunocompromised patients. *Cochrane Database Syst. Rev.* 10:CD005590. doi: 10.1002/14651858.CD005590.pub3
- Thomas, C. F. Jr. and Linper, A. H. (2004). *Pneumocystis pneumonia*. *N. Engl. J. Med.* 350, 2487–2496. doi: 10.1056/NEJMe032588
- Valade, S., Azouby, E., Damiani, C., Derouin, F., Totet, A., and Menotti, J. (2015). *Pneumocystis jirovecii* airborne transmission between critically ill patients and health care workers. *Intensive Care Med.* 41, 1716–1718. doi: 10.1007/s00134-015-3835-9
- Valero, C., Buitrago, M. J., Gite-Muscilli, M., Benazza, M., Stumy-Leclerc, A., Hamana, S., et al. (2016). Copy number variation of mitochondrial DNA genes in *Pneumocystis jirovecii* according to the fungal load in BAL specimens. *Front. Microbiol.* 7:1413. doi: 10.3389/fmicb.2016.01413
- Vargas, S. L., Ponce, C. A., Gigliotti, F., Ulloa, A. V., Prieto, S., Muñoz, M. P., et al. (2000). Transmission of *Pneumocystis carinii* DNA from a patient with *P. carinii* pneumonia to immunocompetent contact health care workers. *J. Clin. Microbiol.* 38, 1536–1538.
- Yannakis, E. P., and Boswell, T. C. (2016). Systematic review of outbreaks of *Pneumocystis jirovecii* pneumonia: evidence that *P. jirovecii* is a transmissible organism and the implications for healthcare infection control. *J. Hosp. Infect.* 93, 1–8. doi: 10.1016/j.jhin.2016.01.018

**Conflict of Interest Statement:** The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Copyright © 2017 Robin, Alario, Gite-Muscilli, la Martinière, Schlemmer, Bommel, Angehardt, Leclerc, Beckerich, Redford, Pautas, Toma, Minoy, Bretagne and Cordonnier. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) or licensor are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

## **D. Discussion**

### **1. Définition d'une épidémie**

Nous avons rapporté une épidémie de pneumocystose dans un service d'hématologie. Une épidémie est définie par la survenue d'un nombre de cas supérieur au nombre de cas attendus dans une unité de temps et de lieu. En théorie, ce terme ne se limite donc pas aux maladies contagieuses ou transmissibles et on peut avoir des phénomènes épidémiques non infectieux. Il n'y a pas stricto sensu de nombre minimal de cas pour parler d'épidémie mais pour les grandes épidémies (grippe...), on parle d'épidémie quand le seuil épidémique (calculé, par exemple pour la grippe, sur la moyenne des valeurs observées les années précédentes), est franchi. Dans notre étude, le seuil épidémique dans notre service est de 4 à 5 cas/an. Ainsi au sens épidémiologique du terme, nos 12 cas de pneumocystose constituent une épidémie, même si les génotypes ne sont pas identiques et donc qu'ils ne proviennent pas de la même source.

### **2. Investigation d'une épidémie**

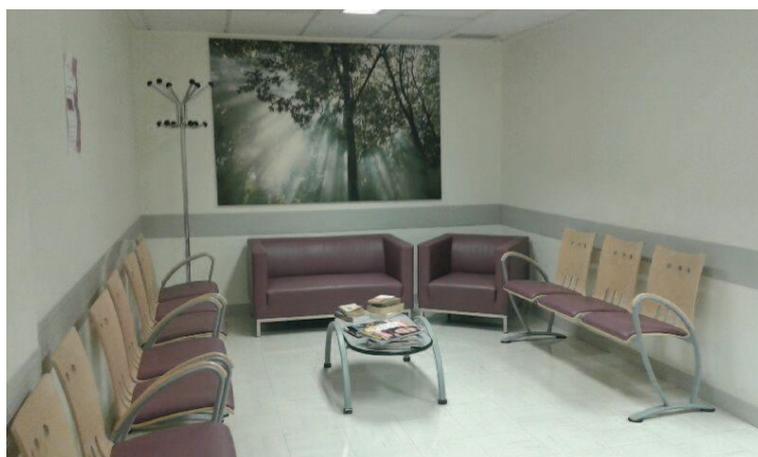
Pour étudier une épidémie, il faut identifier l'agent causal, la source, le mode de transmission, la population à risque et les facteurs de risque. L'étude d'une épidémie comprend classiquement deux étapes : la première purement descriptive et la deuxième analytique. Il faut affirmer la réalité de l'épidémie. Dans notre étude, les 4 cas du mois de novembre 2015 nous ont alertés sur l'existence d'une potentielle épidémie puisque nous avons eu en 9 jours le nombre de cas attendus sur un an. Nous avons défini les cas : tous les patients suivis dans le service ayant une pneumopathie avec une PCR pneumocystis positive,  $\pm$  un examen direct et une immunofluorescence positif(s) dans le lavage broncho-alvéolaire. Huit cas supplémentaires en 6 mois ont confirmé l'épidémie. Ces 12 cas ont été documentés par une PCR pneumocystis  $\pm$  un examen direct et une immunofluorescence positif(s) dans le lavage broncho-alvéolaire. Nous avons donc rétrospectivement collecté tous les cas du service et défini notre épidémie de novembre 2015 à mai 2016. Nous avons émis l'hypothèse d'une transmission interhumaine puisque tous nos patients étaient suivis dans les mêmes unités de lieu, en hospitalisation conventionnelle, en hospitalisation de jour ou en

consultation. Pour tester cette hypothèse nous avons cherché une preuve biologique en génotypant les souches de *Pneumocystis jirovecii* des 12 patients. Quatre patients avaient la même souche pure et rare (Gt2), jamais retrouvée sur plus de 300 souches génotypées en Europe (Alanio, Gits-Muselli et al. 2017). Pour le patient 5, nous avons rétrospectivement retrouvé ce même *Pneumocystis jirovecii* Gt2 dans des crachats deux mois avant le diagnostic de PcP, c'est-à-dire au mois de novembre 2015. Deux autres patients avaient la même souche Gt3, non pure pour l'un d'entre eux. Les 12 patients ne pouvaient pas avoir été contaminés par la même source. Sur ces critères génétiques, nous avons recentré nos recherches sur ces six (4+2) patients. Nous avons recherché tous les passages des 12 patients dans les différentes unités d'hospitalisation, de consultation, et d'hôpital de jour du service. Il n'y a pas de données précises sur la période où un patient peut transmettre *Pneumocystis jirovecii*, mais l'incubation pourrait durer 3 à 12 semaines avant le début des symptômes (Manoloff, Francioli et al. 2003; Depypere, Saegeman et al. 2016). Nous sommes donc remontés à 4 mois avant chaque diagnostic et avons défini la possibilité d'une transmission si les cas s'étaient retrouvés le même jour dans la même pièce dans les 4 mois précédant le diagnostic. Les deux patients infectés par la souche Gt3 ne s'étaient jamais rencontrés. Nous avons alors élaboré une carte de transmission pour les 4 patients Gt2. Le seul endroit où ces 4 patients se sont rencontrés est l'hôpital de jour. En hôpital de jour, les patients sont convoqués à 8 heures du matin, restent plusieurs heures dans la même salle d'attente et reçoivent la plupart des soins infirmiers dans une salle commune (Figures 25, 26 et 27). Pour ces 4 patients, nous avons donc la possibilité d'une source commune et d'une transmission interhumaine. Le fait que ces patients soient infectés avec le même génotype suggère une acquisition récente. Dans la majorité des cas de pneumocystose (70 à 92% des cas), les patients sont infectés avec plusieurs souches de façon concomitante (Gits-Muselli, Peraldi et al. 2015; Alanio, Gits-Muselli et al. 2016; Depypere, Saegeman et al. 2016). Le fait que le génotype 2 soit un génotype rare, jamais décrit sur plus de 300 souches génotypées en Europe (Alanio, Gits-Muselli et al. 2017), et que seul ce génotype ait été retrouvé (et non un mélange de plusieurs souches) chez les 4 patients infectés avec le génotype 2, est en faveur d'une transmission interhumaine récente. De plus, le nombre de contacts entre les patients Gt2 était statistiquement supérieur au nombre de contacts entre les patients non Gt2, ce qui est également en faveur d'une transmission interhumaine. Dans les enquêtes épidémiologiques classiques autour d'une épidémie à un agent pathogène connu pour être

transmissible (par exemple, une enquête autour d'une toxi-infection alimentaire), l'étape suivante est de réaliser une enquête cas-témoins en choisissant des témoins issus de la même population que les cas afin de comparer les expositions. Nous n'avons pas réalisé ce type d'enquête car l'objectif était d'affirmer la transmission interhumaine nosocomiale dans une pathologie où ce mode d'acquisition n'est pas reconnu comme majeur et non de remonter à une source contaminée non humaine (par exemple, un lot de viande dans une toxi-infection alimentaire).



**Figure 25** Salle de soins commune de l'hôpital de jour



**Figure 26** Salle d'attente de l'hôpital de jour



**Figure 27** Salle de repas de l'hôpital de jour attendant à la salle d'attente

### 3. Source de l'épidémie

Nous avons essayé de déterminer le cas index, c'est-à-dire la première personne contaminée. Deux scénarios sont possibles. Soit le patient 2 est le cas index qui a transmis la souche de *Pneumocystis jirovecii* Gt2 au patient 5 et au patient 7. Le patient 5 et/ou le patient 7 ont alors transmis cette souche au patient 10. Soit le patient 5 qui était déjà porteur (ou infecté) de la souche au mois de novembre est le cas index. Devant la multitude des contacts et des scénarios possibles, nous ne pouvons pas dater exactement les transmissions.

Les patients 2, 7, 8, 9 et 12 avaient des signes cliniques et une imagerie compatibles avec une pneumocystose et une PCR pneumocystis positive dans le lavage broncho-alvéolaire. En revanche l'examen direct, l'immunofluorescence et le  $\beta$ -D-Glucane étaient négatifs. On ne peut pas trancher à coup sûr entre colonisation et infection à *Pneumocystis jirovecii*. Néanmoins cette étude est une étude de transmission et même s'ils n'étaient que colonisés, les patients ont pu transmettre leur souche.

De plus on ne peut pas savoir si un seuil minimal de charge fongique est nécessaire pour transmettre *Pneumocystis jirovecii*. On peut supposer que la toux augmente la contagiosité en faisant remonter les kystes des alvéoles. Ceci suggère l'intérêt de rechercher *Pneumocystis jirovecii* chez les patients qui toussent, quelle qu'en soit la cause, afin de dépister un risque de contagiosité.

Enfin, les patients 8, 11 et 12 avaient une charge fongique trop faible pour permettre le génotypage de *Pneumocystis jirovecii*. On ne peut donc pas savoir s'ils étaient porteurs du génotype Gt2 et pourraient avoir participé à la transmission. Ils auraient aussi pu être porteurs du génotype Gt3 et faire partie d'une deuxième boucle de transmission.

#### 4. Mode de transmission

La transmission interhumaine de *Pneumocystis jirovecii* est très probable, mais le mode de transmission peut être direct ou indirect. Soit les 4 patients se sont transmis directement la souche, soit la souche a été véhiculée par l'environnement ou par le personnel. Nous ne pourrions pas trancher entre ces deux hypothèses car nous n'avons pas pu explorer l'environnement et le personnel du fait du caractère rétrospectif de l'étude. La transmission interhumaine de *Pneumocystis jirovecii* a déjà été rapportée, ainsi Miller et al. ont mis en évidence la transmission de *Pneumocystis jirovecii* d'une mère à son enfant de 4.5 semaines (Miller, Ambrose et al. 2002). La transmission par le personnel de santé a également été décrite (Vargas, Ponce et al. 2000; Valade, Azoulay et al. 2015). Vargas et al. (Vargas, Ponce et al. 2000) ont trouvé la même souche de *Pneumocystis jirovecii* (*carinii* à l'époque) sp *hominis* chez un enfant, sa mère et deux personnels de santé qui s'étaient occupés de l'enfant. Cette souche n'a pas été retrouvée chez 30 témoins (personnel de santé ne s'étant jamais occupé du patient). La diffusion dans l'air autour des patients infectés a également déjà été mise en évidence. Valade et al. (Valade, Azoulay et al. 2015) ont prospectivement prélevé l'air de la chambre et le personnel de santé s'étant occupé de 15 patients hospitalisés pour pneumocystose. Sept prélèvements d'air étaient positifs et 9/102 personnels de santé étaient colonisés. Choukri et al. (Choukri, Menotti et al. 2010) avaient aussi mis en évidence la diffusion de pneumocystis autour de patients infectés avec un gradient décroissant avec la distance. La diffusion dans l'air peut se faire aussi à partir d'individus colonisés. Dans une étude prospective bicentrique, Frealle et al. (Frealle, Valade et al. 2017) ont analysé des échantillons d'air des chambres de 17 patients colonisés, et l'air a été détecté positif pour les chambres de 3 patients.

De même, Yiannakis et al. (Yiannakis and Boswell 2016) ont repris 30 épidémies de pneumocystoses, parmi lesquelles 16 ont bénéficié d'une analyse moléculaire. Vingt-cinq de

ces épidémies survenaient dans des services de transplantation d'organe solide, en particulier rénale. Cet article suggère une transmission interhumaine directe ou indirecte via l'environnement ou le personnel de santé. La transmission interhumaine pourrait se faire via un patient infecté, un patient en phase prodromale donc a- ou pauci-symptomatique ou un porteur sain, colonisé.

De Boer et al. (de Boer, de Fijter et al. 2011) ont analysé 16 épidémies de PcP dans des services de transplantation rénale dont 6 avec analyse moléculaire : dans 5/6 études un génotype était prédominant au cours de l'épidémie, en faveur d'une transmission interhumaine nosocomiale.

Seules 3 épidémies de pneumocystose en hématologie ont été décrites dans la littérature. La première (Ong and Jones 1998) est survenue en 1995-1996 à Belfast dans un service d'hématologie. Cinq patients ayant reçu une chimiothérapie pour LAM, LAL, lymphome et myélome ont développé une pneumocystose sur une période de 6 mois. Tous avaient reçu des corticoïdes, y compris le patient atteint de LAM qui avait reçu de la dexaméthasone pour des vomissements résistant aux anti-émétiques usuels. Ces cinq patients ont été hospitalisés dans la même unité de quatre lits et ont été soignés par la même équipe paramédicale. La définition d'épidémie dans ce cas était purement épidémiologique puisqu'il n'y a pas eu d'analyse moléculaire.

La deuxième étude (Helweg-Larsen, Tsolaki et al. 1998) rapportait une épidémie de pneumocystose à *Pneumocystis jirovecii* sp hominis chez 8 patients d'hématologie et 6 patients VIH. L'analyse moléculaire retrouve la même souche pour 2 patients d'hématologie ayant partagé la même chambre et 2 patients VIH qui ont eu des contacts prolongés au sein du service. Cette souche de *Pneumocystis jirovecii* est la plus fréquente au Danemark et les auteurs concluent que si la transmission interhumaine est possible, ce n'est pas le mécanisme le plus fréquent.

Une troisième étude rapportait (Depypere, Saegeman et al. 2016) 21 cas de PcP survenus à l'hôpital de Leuven en Belgique en 2013, dont 6 cas chez des patients d'hématologie. L'analyse moléculaire a retrouvé des génotypes différents, infirmant la possibilité d'une transmission interhumaine nosocomiale.

Notre étude est donc la première à mettre en évidence une transmission interhumaine nosocomiale de *Pneumocystis jirovecii* au cours d'une épidémie dans un service d'hématologie.

## **5. Réservoir**

Le réservoir de *Pneumocystis jirovecii* peut être constitué des individus sains colonisés et des patients en phase prodromale. Sur une série autopsique de 77 individus issus de la population générale, 65% des adultes en bonne santé étaient colonisés à *Pneumocystis jirovecii* (Ponce, Gallo et al. 2010). Dans une série prospective, une colonisation a été retrouvée chez 20% des 50 adultes en bonne santé et sans comorbidités (Medrano, Montes-Cano et al. 2005). Un deuxième prélèvement 6 mois après n'était positif que dans 2 cas sur 9 avec un génotype différent.

## **6. Variation saisonnière**

Dans notre étude, une transmission nosocomiale a été mise en évidence pour 4 patients mais pas pour les 8 autres. Notre épidémie a eu lieu de novembre à mars donc sur les mois d'hiver. Les variations saisonnières de l'incidence des pneumocystoses sont controversées. La plus grande étude sur le sujet a étudié prospectivement 792 cas de PcP et a trouvé un pic d'incidence en janvier à Chelsea (Westminster, Royaume-Uni) (Lubis, Baylis et al. 2003). Une étude rétrospective de 536 PcP confirmait la prédominance hivernale et la corrélation inverse avec la température en Espagne (Varela, Regordan et al. 2004). Inversement, une étude rétrospective d'une centaine de cas à Londres a retrouvé une prédominance estivale et une corrélation avec la température et de faibles précipitations (Miller, Grant et al. 1992). Plus récemment une étude rétrospective de 576 cas de PcP rapportait également une prédominance estivale des PcP à Munich (Sing, Schmoldt et al. 2009).

## **7. Identification de la population à risque**

Tous les patients de l'étude étaient des patients immunodéprimés dont sept étaient allogreffés. Ces patients étaient donc plus susceptibles que d'autres de développer une pneumocystose.

Sur les 12 patients, 8 patients n'avaient pas de prophylaxie et 4 seulement avaient une prophylaxie par atovaquone ou aérosols de pentamidine. Aucun n'avait une prophylaxie par cotrimoxazole. Cela confirme que le cotrimoxazole est la prophylaxie optimale de la pneumocystose. Cette prophylaxie est fréquemment interrompue pour toxicité hématologique ou hépatique, ce qui était le cas pour ces 4 patients sous prophylaxie de deuxième intention.

Trois patients avaient une leucémie aiguë myéloïde et n'étaient pas allogreffés. Ils n'avaient donc aucune prophylaxie anti-pneumocystis car cette population n'est pas reconnue pour être à haut risque de pneumocystose chez l'adulte. Chez l'enfant en revanche, certaines équipes considèrent la LAM comme à risque de pneumocystose et donnent une prophylaxie à ces enfants (Lindemulder and Albano 2007; Kim, Dabb et al. 2008; Maertens, Cesaro et al. 2016). Une étude chinoise récente (Chang, Kuo et al. 2018) rapportait 20 cas de pneumocystose sur 291 LAM et suggérait que la LAM pourrait être aussi un facteur de risque de PcP chez l'adulte.

## **8. Les mesures prises et perspectives**

### **✓ Hygiène**

Tout d'abord nous avons informé l'équipe d'hygiène de l'hôpital de notre travail et leur avons transmis les résultats, nos conclusions et nos perspectives.

Devant la forte probabilité de transmission nosocomiale, nous avons renforcé nos mesures d'hygiène. Tous les patients avec un diagnostic de pneumocystose étaient déjà hospitalisés en chambre seule avec des précautions complémentaires de type « goutelettes ». Dans les recommandations du CDC (Siegel, Rhinehart et al. 2007) et de l'ECIL (Maertens, Cesaro et al. 2016), il est simplement mentionné qu'il ne faut pas mettre en contact un patient

immunodéprimé et un patient atteint de pneumocystose, ceci reposant sur un faible niveau de preuve. Les 12 patients ont bien été isolés dès le diagnostic. La durée de contagiosité est mal définie mais pourrait aller de plusieurs mois avant les symptômes à 1 semaine après le début du traitement (Depypere, Saegeman et al. 2016). Nous avons donc ainsi évité de contaminer d'autres patients une fois le diagnostic des cas posé.

D'autre part, nous avons instauré la mise en place systématique d'un masque chirurgical à tout patient qui tousse en hôpital de jour. En effet, la transmission a eu lieu avant que nous fassions le diagnostic de pneumocystose. De plus cela permet de diminuer la transmission d'autres pathogènes comme les virus respiratoires.

Durant une épidémie de pneumocystis, il faudrait mettre un masque à tous, patients et personnel : ainsi les personnes infectées ou colonisées ne pourraient pas transmettre et les personnes (patients et personnel) non infectées et non colonisées ne seraient pas contaminées, et ne pourraient pas transmettre à leur tour.

✓ **Recherche de *Pneumocystis jirovecii* par des méthodes non invasives.**

Nous avons déjà mis en place dans le service la recherche de *Pneumocystis jirovecii* dans des prélèvements respiratoires non invasifs au cours des pneumopathies : expectorations, lavages naso-pharyngés et expectorations « induites » après un aérosol de bicarbonates. L'intérêt du dépistage précoce de *Pneumocystis jirovecii* par des techniques non invasives était déjà montré chez les patients VIH (Samuel, Whitelaw et al. 2011) et confirmé chez les patients immunodéprimés avec une prévalence de *Pneumocystis jirovecii* dans le lavage nasopharyngé de 5% (Guigue, Alanio et al. 2015). Nous avons également commencé à étudier la colonisation des patients arrivant pour leucémie aiguë ou allogreffe.

Il faudrait également dépister les contacts afin de casser une boucle de transmission.

## ✓ Prophylaxie médicamenteuse

La prophylaxie la plus efficace est le cotrimoxazole, toutes les autres molécules, atovaquone, pentamidine, dapsons sont moins efficaces.

Cette étude nous a sensibilisés à la moindre efficacité des prophylaxies alternatives et chaque fois qu'un patient ayant une indication à une prophylaxie anti-pneumocystis, n'est pas sous cotrimoxazole, nous en cherchons précisément la raison. Dans la grande majorité des cas, il s'agissait d'une contre-indication temporaire ou une hypothèse d'intolérance au cotrimoxazole qui a été par la suite infirmée, et nous reprenons le cotrimoxazole.

D'autre part, nous avons cherché à explorer les échecs des autres prophylaxies en particulier de l'atovaquone qui est notre deuxième ligne lorsque le cotrimoxazole ne peut pas être administré. La posologie de 750 mg deux fois par jour est celle du traitement curatif, l'atovaquone n'ayant pas l'AMM en prophylaxie. L'atovaquone doit être prise avec un repas gras afin d'en améliorer l'absorption. Il n'y a pas de recommandations de dosage et les concentrations plasmatiques cibles ne sont pas bien établies. Néanmoins une concentration > 15 µg/mL (Romand, Della Bruna et al. 1996) semble corrélée à l'efficacité thérapeutique dans une étude historique (Hughes, Leoung et al. 1993). En collaboration avec le Dr Hulin, pharmacologue à l'hôpital Henri Mondor et des Dr Massias et Lê, pharmacologues à l'hôpital Bichat, nous avons effectué les dosages des concentrations résiduelles et de pic chez 33 patients sous atovaquone en prophylaxie (26 patients d'hématologie et 7 patients VIH+) (Annexe 2). Il n'y a pas de différence entre les résiduelles et les pics. Les dosages sont reproductibles. La résiduelle était en médiane à 11.3 µg/mL et le pic à 13.4 µg/mL. Il n'y avait pas de différence entre les patients d'hématologie et les patients VIH. Nous n'avons pas retrouvé de facteurs associés à un sous-dosage. A la suite de ce travail nous avons démarré un nouveau protocole de dosage de l'atovaquone avec un schéma d'adaptation des posologies en fonction des résiduelles pour optimiser l'efficacité de l'atovaquone prophylactique.

D'autre part nous avons revu nos procédures sur la prophylaxie anti-pneumocystis et allongé la période de prophylaxie parce que certains cas sont survenus plusieurs mois après l'arrêt des immunosuppresseurs et de la prophylaxie anti-pneumocystis. Dans les recommandations européennes, la période à risque durant laquelle un patient allogreffé doit

recevoir une prophylaxie est d'au moins 6 mois et tant que le patient reçoit des immunosuppresseurs (Maertens, Cesaro et al. 2016). Dans notre procédure, nous avons déjà allongé le délai à 1 an après greffe et 1 mois après arrêt des immunosuppresseurs. Dans la nouvelle version de nos procédures, nous avons encore allongé le délai à 3 mois après arrêt des immunosuppresseurs.

#### ✓ **Facteurs de risque intrinsèques de pneumocystose**

Nous nous sommes intéressés aux facteurs de risque intrinsèques de pneumocystose chez les allogreffés. Pour cela nous avons mis en place une étude prospective au sein de l'Infectious Disease Working Party de l'EBMT. Il s'agit d'une étude cas-témoins nichée dans une cohorte. Nous incluons prospectivement tous les cas de PcP survenant chez des patients allogreffés depuis moins de 2 ans. Deux témoins sont appariés sur le centre, la date de greffe, l'hémopathie sous-jacente et choisis parmi les allogreffés qui n'ont pas développé de pneumocystose à la date correspondant au délai de survenue d'une PcP chez le cas correspondant. Les inclusions sont toujours en cours.

D'autre part dans notre étude, 3 patients avaient une LAM et n'étaient pas allogreffés. Ils ne recevaient pas de prophylaxie car ils n'étaient pas considérés comme à risque. Nous allons étudier rétrospectivement les pneumocystoses chez les patients non allogreffés ayant une LAM du service, de façon à identifier les facteurs de risque dans cette population classiquement non considérée comme à risque chez l'adulte.

Enfin, l'idéal serait de pouvoir restructurer l'HDJ avec des chambres pour pouvoir isoler les patients car le caractère très confiné des locaux est de nature à favoriser les contacts très proches entre patients.

## **E. Conclusion**

Cette étude est la première démonstration moléculaire d'une épidémie de pneumocystose dans un service d'hématologie. Cette étude nous a permis d'être plus vigilants dans le choix de la molécule de prophylaxie, de revoir nos durées de prophylaxie, et de renforcer les mesures d'hygiène. Elle a été le point de départ d'une autre étude sur les dosages d'atovaquone (Annexe 2) et sur les pneumocystoses dans les LAM.

## Plasma concentrations of atovaquone given to immunocompromised patients to prevent *Pneumocystis jirovecii*

Christine Robin<sup>1,2</sup>, Minh Patrick Lê<sup>3,4</sup>, Giovanna Melica<sup>5</sup>, Laurent Massias<sup>3,4</sup>, Rabah Redjoul<sup>1</sup>, Nihel Khoudour<sup>6</sup>, Mathieu Leclerc<sup>1,2</sup>, Florence Beckerich<sup>1,2</sup>, Sébastien Maury<sup>1,2</sup>, Anne Hulin<sup>6</sup> and Catherine Cordonnier<sup>1,2\*</sup>

<sup>1</sup>Assistance Publique-Hôpitaux de Paris (AP-HP), Henri Mondor Teaching Hospital, Department of Haematology, Créteil, France; <sup>2</sup>University Paris-Est Créteil (UPEC), Créteil, France; <sup>3</sup>APHP, Bichat-Claude Bernard Teaching Hospital, Pharmacology Laboratory, Paris, France; <sup>4</sup>IAME, Inserm UMR1137, Université Paris Diderot-Sorbonne Paris Cité, Paris, France; <sup>5</sup>AP-HP, Henri Mondor Teaching Hospital, Department of Clinical Immunology, Créteil, France; <sup>6</sup>AP-HP, Henri Mondor Teaching Hospital, Department of Pharmacology, Créteil, France

\*Corresponding author. Department of Haematology, Henri Mondor University Hospital, 94000 Créteil, France. Tel: +33 149 812 059; Fax: +33 149 812 067; E-mail: catherine.cordonnier@aphp.fr

Received 15 March 2017; returned 11 May 2017; revised 24 May 2017; accepted 24 May 2017

**Objectives:** Atovaquone is one of the alternatives to trimethoprim/sulfamethoxazole for prophylaxis of *Pneumocystis jirovecii* pneumonia (PCP) in immunocompromised patients. In volunteers, there was wide inter-individual variability in atovaquone bioavailability. The aim of this study was to assess the plasma concentrations of atovaquone in immunocompromised patients under PCP prophylaxis.

**Methods:** Adult haematology or HIV-positive patients receiving atovaquone (750 mg oral suspension twice a day) for PCP prophylaxis were included. Plasma concentrations were assessed using UV-HPLC, around 12 h after the evening dose ( $C_{min}$ ) and 1.5 h after the morning dose ( $C_{max}$ ).

**Results:** A total of 82 measurements were performed in 33 patients. This included 19 HSCT recipients, 7 haematology non-transplant patients and 7 HIV-positive patients. The median  $C_{min}$  (IQR) was 11.3 µg/mL (6.2–27.8) and the median  $C_{max}$  was 13.4 µg/mL (6.0–28.3). The  $C_{min}$  and  $C_{max}$  of atovaquone were not different between HIV-negative and HIV-positive patients, or between HSCT and non-HSCT patients. Atovaquone concentrations were not influenced by the co-administration of valganciclovir ( $n = 20$ ) or ciclosporin ( $n = 11$ ), by gut graft-versus-host disease ( $n = 7$ ) or by the intake of atovaquone with food. Nineteen of the 33 (58%) patients had  $C_{min} < 15$  µg/mL, a threshold associated with a low rate of clinical response in PCP treatment.

**Conclusions:** Atovaquone is poorly absorbed in more than half of immunocompromised patients and its bioavailability varies between individuals. These unpredictable variations raise the question of therapeutic drug monitoring, in order to identify patients with low concentrations and those who could benefit from regimen adaptation or from alternatives.

### Introduction

*Pneumocystis jirovecii* pneumonia (PCP) is a life-threatening infection in immunocompromised patients. Trimethoprim/sulfamethoxazole is the gold standard for prophylaxis.<sup>1–3</sup> In case of allergy or intolerance to trimethoprim/sulfamethoxazole, atovaquone is one of the alternative regimens.<sup>2–4</sup> Seventeen percent of allogeneic HSCT recipients<sup>5</sup> and roughly half of HIV-positive patients<sup>6</sup> may need alternative regimens, which are considered to have lower efficacy compared with trimethoprim/sulfamethoxazole.<sup>2,8</sup> However, the reasons for this low efficacy are not well understood.

Atovaquone is a hydroxynaphthoquinone, a highly lipophilic compound, active *in vitro* against *Plasmodium*, *Pneumocystis* and *Toxoplasma* species by inhibiting mitochondrial pyrimidine

biosynthesis.<sup>7</sup> Its absorption is variable, increased with a meal<sup>8,9</sup> and was fat dose-dependent.<sup>9</sup> Also, atovaquone is subject to drug drug interactions with aciclovir, anti-diarrhoeals, opiates, efavirenz and PIs.<sup>10</sup> In HIV-positive patients, atovaquone was shown to have prophylactic efficacy comparable to that of dapsone, but to be better tolerated.<sup>11</sup> Atovaquone was found to be equally effective as pentamidine aerosols at the dose of 1500 mg once daily.<sup>12</sup> However, although a daily dose of 750 mg was not as efficient as a dose of 1500 mg,<sup>12</sup> none of these studies assessed the atovaquone plasma concentrations as a cause of prophylactic failure. So far, there is no recommendation for therapeutic drug monitoring (TDM) of atovaquone, despite known variable bioavailability of the drug and prophylactic failures.

The objective of this observational study was to assess the plasma concentrations of atovaquone in immunocompromised patients under PCP prophylaxis with atovaquone and evaluate whether they were in the expected ranges.

## Methods

All adult patients receiving atovaquone for PCP prophylaxis in our haematology and clinical immunology wards between May and September 2016 were proposed to be assessed for atovaquone plasma concentrations. All patients were given atovaquone (750 mg twice a day, oral suspension) for a minimum of 2 weeks, and their plasma atovaquone concentrations were therefore considered to be in a steady state. Other medication data within the last 14 days were recorded. Biological material was obtained only for routine purposes. According to the French Health Public Law (CSP Art L1121-1.1), such investigation does not require informed consent or ethics committee approval. The refusal to give additional recommendations for the drug intake was deliberate, in order to collect data in routine conditions. The first blood sample was collected ~1.2 h after the last drug intake, to assess  $C_{min}$ . Afterwards, the patients took their morning dose and a second blood sample was collected 1.5 h thereafter, in order to measure  $C_{max}$ . Plasma was immediately separated and frozen at  $-20^{\circ}\text{C}$  until proceeding to the assay.

Atovaquone plasma levels were measured using UV HPLC as well as UV detection as previously described.<sup>13</sup> In the absence of an established minimal atovaquone concentration threshold value for PCP prophylaxis, a randomized study was referred to. That study showed that the response rate to atovaquone was significantly better with a  $C_{min} > 15 \mu\text{g/mL}$  (98%) than below this threshold (68%).<sup>14</sup> Therefore, the concentrations in the patients were compared with this threshold.

## Statistical analysis

$C_{min}$  and  $C_{max}$  and all quantitative variables are presented as median (IQR). The Mann–Whitney test was used to compare the first assessment of concentrations. For patients who were assessed twice, the signed rank test was used to compare the first and second assessments of concentrations.

Univariate analysis using logistic regression was performed to investigate the relationship between atovaquone concentrations and the potential associated factors. ORs and their 95% CIs were estimated separately for each potential risk factor. All tests were two-tailed.  $P$  values  $< 0.05$  were considered to be significant. Statistical analyses were conducted with Stata statistical software 12.0 (Stata Corporation, College Station, TX, USA).

## Results

### Patients

Thirty-three patients were included in the study: 26 haematology patients (including 19 allogeneic HSCT recipients and 7 non-transplanted patients) and 7 HIV-infected patients (Table 1). All patients received atovaquone because of allergy or intolerance to trimethoprim/sulfamethoxazole.

A total of 82 measurements were performed. All patients were sampled at least once for  $C_{min}$  and 30 for  $C_{max}$ . In addition, 11 patients were sampled a second time between 1 and 8 weeks (median 4 weeks) after the first assessment.

### Plasma concentrations of atovaquone and possible associated factors

The median  $C_{min}$  of atovaquone was  $11.3 \mu\text{g/mL}$  (6.2–27.8;  $n = 33$ ) and was not significantly different from the median  $C_{max}$  [ $13.4 \mu\text{g/mL}$  (6.0–28.3;  $n = 30$ )] ( $P = 0.073$ ). Nineteen of the

**Table 1.** Characteristics of the 33 patients receiving atovaquone as *P. jirovecii* prophylaxis

Age (years)	54 (46–65)
Male/female, $n/n$ (%/%)	21/12 (64/36)
Patients with haematological diseases, $n$ (%)	26 (79)
non-transplanted patients, $n$ (%)	7 (21)
underlying disease	
ALL, $n$	3
AML, $n$	2
aplastic anaemia, $n$	2
allogeneic HSCT recipients, $n$ (%)	19 (58)
underlying disease	
AML, $n$	11
multiple myeloma, $n$	3
myeloproliferative disorder, $n$	3
lymphoma, $n$	2
GVHD, $n/n$ (%)	8/19 (42)
previous or active gut GVHD, $n/n$ (%)	7/19 (37)
HIV-positive patients, $n$ (%)	7 (21)
CD4 cells/ $\text{mm}^3$	186 (90–1077)
neutropenia (PNN <sup>o</sup> $< 500/\text{mm}^3$ ), $n$ (%)	2 (6)
albumin (g/L)	35.4 (30.0–38.0)
diarrhoea, $n$ (%)	1 (3)
concomitant medications, $n$ (%)	
valaciclovir	25 (76)
cyclosporin	11 (34)
benzodiazepine	5 (15)
posaconazole	4 (12)
anti-protease drug	3 (9)
voriconazole	1 (3)
paracetamol	1 (3)
cephalosporin	1 (3)

Values shown are median (IQR) unless indicated otherwise.

<sup>o</sup>PNN, polynuclear neutrophils.

33 (58%) patients presented  $C_{min}$  below the threshold of  $15 \mu\text{g/mL}$  (Figure 1a). The  $C_{min}$  and  $C_{max}$  were not influenced by the presence of HSCT, graft-versus-host disease (GVHD), oral intake of atovaquone with food, or concomitant administration of valaciclovir, cyclosporin or of any drug known to interfere with atovaquone metabolism (cyclosporin, paracetamol, voriconazole, posaconazole, anti-protease drugs, benzodiazepine) or with albumin, hepatic enzymes or creatinine values (Table S1, available as Supplementary data at JAC Online). HIV-positive patients showed a non-significant trend of higher concentrations than haematology patients. The time elapsed between the intake of atovaquone and the blood sample did not influence the  $C_{min}$  [median 12.6 h (11.9–13.3)] or the  $C_{max}$  [median 1.5 h (1.1–2.5)].

Among the 11 haematology patients who were sampled twice at an interval of several weeks, the second assessment of concentrations showed little variation when compared with the first assessment (Figure 1b).

## Discussion

This study shows that, with a regimen of 750 mg twice a day of atovaquone for PCP prophylaxis, the atovaquone plasma

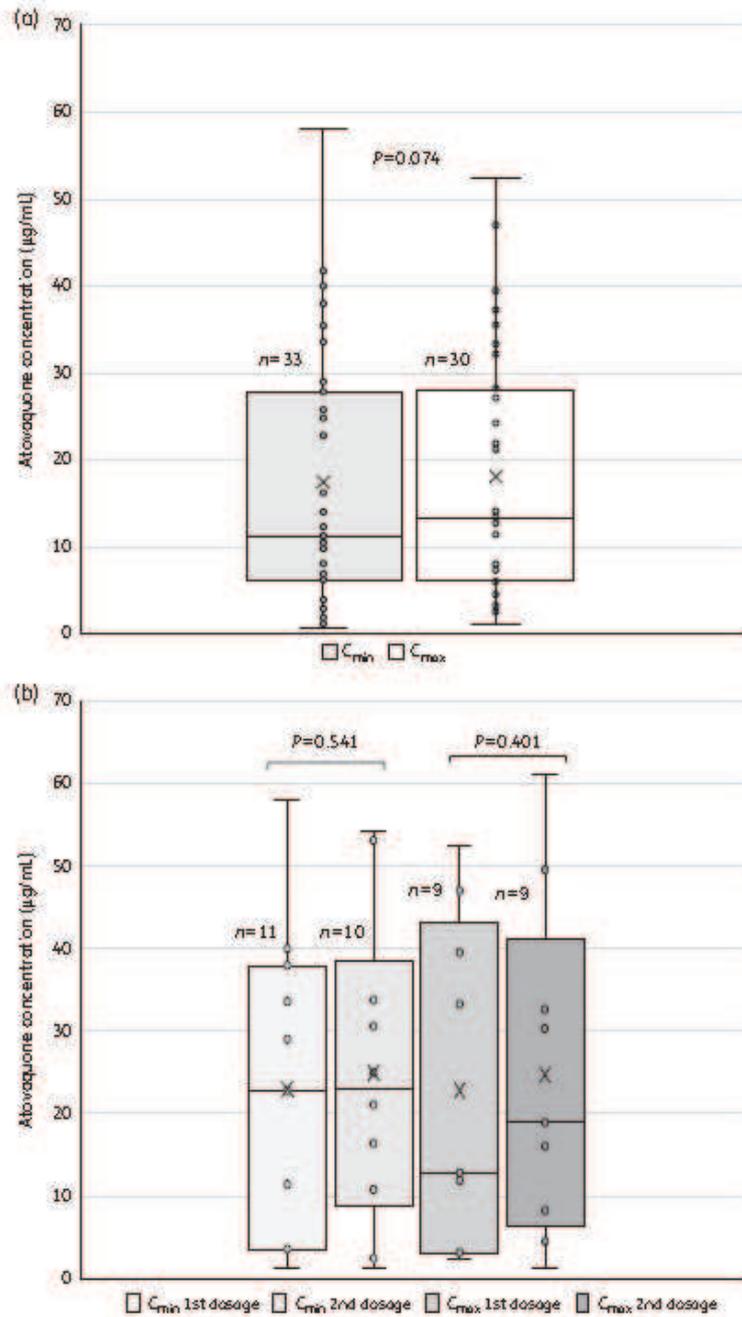


Figure 1. Concentrations of atovaquone in 33 patients with haematological diseases or HIV infection. The cross represents the mean, the horizontal line represents the median and the box represents the (QR). (a) Comparison of  $C_{\min}$  and  $C_{\max}$  of atovaquone. (b) Comparison of first and second assessment of atovaquone concentration.

concentrations (steady state and post-administration) in immunocompromised patients are low. With a mean  $C_{min}$  of 11.3 µg/mL, these findings are below the steady-state concentrations reported in HIV-positive patients taking 750 mg twice or three times a day<sup>8,14,15</sup> and below the expected  $C_{min}$  mentioned in the summary of product characteristics (SmPC) (22 µg/mL) for PCP treatment with a daily dose of 750 mg twice a day. Finally, only 42% of the patients had  $C_{min}$  levels  $\geq 15$  µg/mL, a steady-state concentration threshold associated with a probability of 98% success in a prospective study of 133 patients treated for PCP<sup>14</sup> and only 36% of patients had  $C_{min}$  levels  $\geq 22$  µg/mL.

So far, atovaquone pharmacokinetics have been studied in HIV-positive patients in Phase I and II studies<sup>8,15</sup> or in treatment studies of PCP,<sup>14</sup> but not in haematology patients.

The absorption of atovaquone varies among individuals. The recommended dose of 1500 mg per day for PCP prophylaxis<sup>1,3</sup> was supported by several studies in HIV-positive patients.<sup>8,12</sup> Unfortunately, none of these studies measured the atovaquone plasma concentrations.<sup>11,12</sup> Consequently, there is no clear indication of the optimal prophylactic concentrations of atovaquone in humans.

For malaria prophylaxis or treatment, the failures of atovaquone/proguanil have been associated with low atovaquone plasma concentration.<sup>16,17</sup> Two cases of PCP prophylaxis failure with low doses of atovaquone were reported after transplant, but these patients were not assessed for atovaquone plasma concentrations.<sup>18</sup> Although atovaquone resistance conferred by mutations of the cytochrome b gene of *P. jirovecii*<sup>19</sup> may be observed, sub-optimal serum concentrations could be another cause for drug failure in PCP prophylaxis. This hypothesis is supported by the documented relationship between atovaquone dose and PCP prophylactic effect in HIV-infected patients<sup>12</sup> and in animal models.<sup>20</sup>

Our study confirms the poor absorption of the drug and the large inter-individual variability of plasma concentrations of atovaquone. With more than half of the patients with atovaquone concentrations <15 µg/mL, the main concern is the need for TDM. On the other hand, very little intra-individual variability of concentrations among the 11 patients assessed twice was found. In case of low concentrations in optimal conditions (no drug-drug interactions, intake with a fatty meal), considering that a higher dose may not significantly increase the plasma concentrations,<sup>10</sup> and that no intravenous formulation is available, the final decision would be to switch to dapsone or aerosolized pentamidine, or to consider cautious re-introduction of trimethoprim/sulfamethoxazole. The use of atovaquone TDM could prevent the onset of PCP in high-risk patients.

There are some limitations to this study. First, the absence of any PCP cases prevented the detection of any relationship between atovaquone plasma concentrations and prophylaxis failure, and the establishment of a minimal efficient concentration. However, PCP is a very rare event even in high-risk patients. Using a threshold of 15 µg/mL established in a PCP treatment study,<sup>14</sup> more than half of our patients had a  $C_{min}$  below the threshold. It is unknown whether this threshold is clinically relevant for PCP prophylaxis. However, we can hypothesize that the cut-off for prophylaxis should be either comparable to or lower than the cut-off for therapeutic efficacy, so we may have overestimated it, but are unlikely to have underestimated it. Second, we did not record

the amount of fat ingested during intake, although taking atovaquone with a fatty meal is recommended in the SmPC. However, this recommendation may not be routinely delivered to the patients. Based on these results, it was proposed to better educate patients on the intake of the drug with fatty food.

### Conclusions

These findings illustrate the great inter-individual variability of atovaquone absorption and the low plasma concentrations in immunocompromised patients. This finding raises the question of TDM, in order to identify patients who could benefit from regimen adaptation or from alternatives. Whether these low concentrations explain some cases of prophylactic failure deserves large prospective studies using routine TDM. Only large studies will allow establishment of a minimal threshold of atovaquone plasma concentrations for an optimal prophylactic effect.

### Acknowledgements

We are grateful to the technician staff of the Pharmacology Laboratory of Henri Mondor Hospital and of the Pharmacology Laboratory of Bichat-Claude Bernard Hospital. We are indebted to the physicians of the Haematology Department and the Clinical Immunology Department. We also acknowledge Professor Stephane Bretagne, Saint Louis University Hospital, Paris, for his useful comments on the manuscript prior to submission.

### Funding

This study was carried out as part of our routine work.

### Transparency declarations

None to declare.

### Author contributions

Conception and design: C. R., A. H., G. M. and C. C. Provision of study materials or patients: C. R., G. M., R. R., F. B. and S. M. Collection and assembly of data: C. R., M. P. L., G. M., L. M., N. K., M. L., A. H. and C. C.

Data analysis and interpretation: C. R., M. P. L., G. M., L. M., A. H. and C. C. Manuscript writing: C. R., A. H. and C. C. Final approval of the manuscript: all authors.

### Supplementary data

Table S1 is available as Supplementary data at JAC Online.

### References

- 1 Guidelines for the prevention and treatment of opportunistic infections in HIV-infected adults and adolescents: recommendations from the Centers for Disease Control and Prevention, the National Institutes of Health, and the HIV Medicine Association of the Infectious Diseases Society of America. [https://aidsinfo.nih.gov/contentfiles/lvguidelines/adult\\_oi.pdf](https://aidsinfo.nih.gov/contentfiles/lvguidelines/adult_oi.pdf).
- 2 Gea Banacloche J, Masur H, Arns da Cunha C et al. Regionally limited or rare infections: prevention after hematopoietic cell transplantation. *Bone Marrow Transplant* 2009;44: 489–94.

- 3 Maertens J, Cesaro S, Maschmeyer G et al. ECIL guidelines for preventing *Pneumocystis jirovecii* pneumonia in patients with haematological malignancies and stem cell transplant recipients. *J Antimicrob Chemother* 2016; **71**: 2397–404.
- 4 Bucher HC, Griffith I, Guyatt GH et al. Meta-analysis of prophylactic treatments against *Pneumocystis carinii* pneumonia and toxoplasma encephalitis in HIV infected patients. *J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retroviral* 1997; **15**: 104–14.
- 5 Souza JP, Boeckh M, Gooley TA et al. High rates of *Pneumocystis carinii* pneumonia in allogeneic blood and marrow transplant recipients receiving dapsone prophylaxis. *Clin Infect Dis* 1999; **29**: 1467–71.
- 6 Roudier C, Caumes E, Rogeaux O et al. Adverse cutaneous reactions to trimethoprim sulfamethoxazole in patients with the acquired immunodeficiency syndrome and *Pneumocystis carinii* pneumonia. *Arch Dermatol* 1994; **130**: 1383–6.
- 7 Baggish AL, Hill DR. Antiparasitic agent atovaquone. *Antimicrob Agents Chemother* 2002; **46**: 1163–73.
- 8 Falloon J, Sargent S, Piscitelli SC et al. Atovaquone suspension in HIV infected volunteers: pharmacokinetics, pharmacodynamics, and TMP/SMX interaction study. *Pharmacotherapy* 1999; **19**: 1050–6.
- 9 Rolan PE, Mercer AJ, Weatherley BC et al. Examination of some factors responsible for a food induced increase in absorption of atovaquone. *Br J Clin Pharmacol* 1994; **37**: 13–20.
- 10 Spencer CM, Goa KL. Atovaquone. A review of its pharmacological properties and therapeutic efficacy in opportunistic infections. *Drugs* 1995; **50**: 176–96.
- 11 El Sadr WM, Murphy RL, Yurik TM et al. Atovaquone compared with dapsone for the prevention of *Pneumocystis carinii* pneumonia in patients with HIV infection who cannot tolerate trimethoprim, sulfonamides, or both. Community Program for Clinical Research on AIDS and the AIDS Clinical Trials Group. *N Engl J Med* 1998; **339**: 1889–95.
- 12 Chan C, Montaner J, Lefebvre EA et al. Atovaquone suspension compared with aerosolized pentamidine for prevention of *Pneumocystis carinii* pneumonia in human immunodeficiency virus infected subjects intolerant of trimethoprim or sulfonamides. *J Infect Dis* 1999; **180**: 369–76.
- 13 Romand S, Della Bruna C, Farinotti R, Derouin F. In vitro and in vivo effects of rifabutin alone or combined with atovaquone against *Toxoplasma gondii*. *Antimicrob Agents Chemother* 1996; **40**: 2015–20.
- 14 Hughes W, Leoung G, Kramer F et al. Comparison of atovaquone (566C80) with trimethoprim sulfamethoxazole to treat *Pneumocystis carinii* pneumonia in patients with AIDS. *N Engl J Med* 1993; **328**: 1521–7.
- 15 Falloon J, Kovacs J, Hughes W et al. A preliminary evaluation of 566C80 for the treatment of *Pneumocystis pneumonia* in patients with the acquired immunodeficiency syndrome. *N Engl J Med* 1991; **325**: 1534–8.
- 16 Boggild AK, Lau R, Reynaud D et al. Failure of atovaquone-proguanil malaria chemoprophylaxis in a traveler to Ghana. *Travel Med Infect Dis* 2015; **13**: 89–93.
- 17 Durand R, Prendki V, Calkhol J et al. *Plasmodium falciparum* malaria and atovaquone-proguanil treatment failure. *Emerg Infect Dis* 2008; **14**: 320–2.
- 18 Rodriguez M, Sifri CD, Fishman JA. Failure of low dose atovaquone prophylaxis against *Pneumocystis jirovecii* infection in transplant recipients. *Clin Infect Dis* 2004; **38**: e76–8.
- 19 Walker DJ, Wakefield AE, Dohn MN et al. Sequence polymorphisms in the *Pneumocystis carinii* cytochrome b gene and their association with atovaquone prophylaxis failure. *J Infect Dis* 1998; **178**: 1767–75.
- 20 Hughes WT, Gray VL, Gutteridge WE et al. Efficacy of a hydroxynaphthoquinone, 566C80, in experimental *Pneumocystis carinii* pneumonitis. *Antimicrob Agents Chemother* 1990; **34**: 225–8.

#### **IV. Conclusion**

Chez les patients d'hématologie, les facteurs de risque d'aspergillose invasive sont majoritairement intrinsèques au patient. Nous avons donc étudié les paramètres intrinsèques pré- et post-greffe des patients allogreffés et leur association avec la survenue d'une aspergillose invasive. Outre la prédisposition génétique que nous n'avons pas pu étudier dans notre cohorte d'aspergilloses, c'est avant tout le niveau d'immunodépression à un instant t qui est corrélé au risque fongique. Notre étude sur les facteurs de risque d'aspergillose montre que les facteurs post-greffe sont fortement associés au risque de survenue d'une aspergillose après allogreffe de cellules souches hématopoïétiques, alors que les facteurs pré-greffe sont effacés par les événements ultérieurs et ne reflètent pas l'immunodépression au moment de l'aspergillose.

Pour la pneumocystose, le degré d'immunodépression est également un facteur de risque mais l'absence de prophylaxie par cotrimoxazole est devenue le principal facteur de risque de pneumocystose, effaçant tous les autres paramètres intrinsèques. Nous avons donc étudié un paramètre extrinsèque à travers l'étude d'une épidémie de pneumocystose. Des cas de transmission nosocomiale de *Pneumocystis jirovecii* ont été rapportés dans des services où les patients étaient profondément immunodéprimés et non protégés par une prophylaxie efficace. Notre étude est néanmoins la première à apporter une preuve moléculaire de transmission dans un service d'hématologie.

## V. Bibliographie

- Al-Bader, N. and D. C. Sheppard (2016). "Aspergillosis and stem cell transplantation: An overview of experimental pathogenesis studies." Virulence **7**(8): 950-966.
- Alanio, A. and S. Bretagne (2017). "Challenges in microbiological diagnosis of invasive Aspergillus infections." F1000Res **6**.
- Alanio, A., G. Desoubeaux, et al. (2011). "Real-time PCR assay-based strategy for differentiation between active *Pneumocystis jirovecii* pneumonia and colonization in immunocompromised patients." Clin Microbiol Infect **17**(10): 1531-7.
- Alanio, A., M. Gits-Muselli, et al. (2017). "Diversity of *Pneumocystis jirovecii* Across Europe: A Multicentre Observational Study." EBioMedicine **22**: 155-163.
- Alanio, A., M. Gits-Muselli, et al. (2016). "Diversity of *Pneumocystis jirovecii* during Infection Revealed by Ultra-Deep Pyrosequencing." Front Microbiol **7**: 733.
- Alanio, A., P. M. Hauser, et al. (2016). "ECIL guidelines for the diagnosis of *Pneumocystis jirovecii* pneumonia in patients with haematological malignancies and stem cell transplant recipients." J Antimicrob Chemother **71**(9): 2386-96.
- Asai, N., S. Motojima, et al. (2012). "Early diagnosis and treatment are crucial for the survival of *Pneumocystis pneumonia* patients without human immunodeficiency virus infection." J Infect Chemother **18**(6): 898-905.
- Ascioglu, S., J. H. Rex, et al. (2002). "Defining opportunistic invasive fungal infections in immunocompromised patients with cancer and hematopoietic stem cell transplants: an international consensus." Clin Infect Dis **34**(1): 7-14.
- Atalla, A., M. Garnica, et al. (2015). "Risk factors for invasive mold diseases in allogeneic hematopoietic cell transplant recipients." Transpl Infect Dis **17**(1): 7-13.
- Aubry, A., R. Porcher, et al. (2006). "Occurrence and kinetics of false-positive *Aspergillus galactomannan* test results following treatment with beta-lactam antibiotics in patients with hematological disorders." J Clin Microbiol **44**(2): 389-94.

- Baddley, J. W. (2011). "Clinical risk factors for invasive aspergillosis." Med Mycol **49 Suppl 1**: S7-S12.
- Baddley, J. W., D. R. Andes, et al. (2010). "Factors associated with mortality in transplant patients with invasive aspergillosis." Clin Infect Dis **50**(12): 1559-67.
- Barnes, P. D. and K. A. Marr (2007). "Risks, diagnosis and outcomes of invasive fungal infections in haematopoietic stem cell transplant recipients." Br J Haematol **139**(4): 519-31.
- Baron, F., A. Ruggeri, et al. (2016). "RIC versus MAC UCBT in adults with AML: A report from Eurocord, the ALWP and the CTIWP of the EBMT." Oncotarget **7**(28): 43027-43038.
- Bart-Delabesse, E., M. Basile, et al. (2005). "Detection of Aspergillus galactomannan antigenemia to determine biological and clinical implications of beta-lactam treatments." J Clin Microbiol **43**(10): 5214-20.
- Bergeron, A., R. Porcher, et al. (2012). "The strategy for the diagnosis of invasive pulmonary aspergillosis should depend on both the underlying condition and the leukocyte count of patients with hematologic malignancies." Blood **119**(8): 1831-7.
- Bitar, D., O. Lortholary, et al. (2014). "Population-based analysis of invasive fungal infections, France, 2001-2010." Emerg Infect Dis **20**(7): 1149-55.
- Blennow, O., M. Remberger, et al. (2010). "Randomized PCR-based therapy and risk factors for invasive fungal infection following reduced-intensity conditioning and hematopoietic SCT." Bone Marrow Transplant **45**(12): 1710-8.
- Bochud, P. Y., J. W. Chien, et al. (2008). "Toll-like receptor 4 polymorphisms and aspergillosis in stem-cell transplantation." N Engl J Med **359**(17): 1766-77.
- Bollée, G., C. Sarfati, et al. (2007). "Clinical picture of Pneumocystis jirovecii pneumonia in cancer patients." Chest **132**(4): 1305-10.
- Boonsarngsuk, V., S. Sirilak, et al. (2009). "Acute respiratory failure due to Pneumocystis pneumonia: outcome and prognostic factors." Int J Infect Dis **13**(1): 59-66.

- Botterel, F., O. Cabaret, et al. (2012). "Clinical significance of quantifying *Pneumocystis jirovecii* DNA by using real-time PCR in bronchoalveolar lavage fluid from immunocompromised patients." J Clin Microbiol **50**(2): 227-31.
- Bozzette, S. A., F. R. Sattler, et al. (1990). "A controlled trial of early adjunctive treatment with corticosteroids for *Pneumocystis carinii* pneumonia in the acquired immunodeficiency syndrome. California Collaborative Treatment Group." N Engl J Med **323**(21): 1451-7.
- Caillot, D., J. F. Couaillier, et al. (2001). "Increasing volume and changing characteristics of invasive pulmonary aspergillosis on sequential thoracic computed tomography scans in patients with neutropenia." J Clin Oncol **19**(1): 253-9.
- Carvalho, A., A. De Luca, et al. (2012). "TLR3 essentially promotes protective class I-restricted memory CD8(+) T-cell responses to *Aspergillus fumigatus* in hematopoietic transplanted patients." Blood **119**(4): 967-77.
- Caselli, D., M. G. Petris, et al. (2014). "Single-day trimethoprim/sulfamethoxazole prophylaxis for *Pneumocystis pneumonia* in children with cancer." J Pediatr **164**(2): 389-92 e1.
- Chai, L. Y., M. G. de Boer, et al. (2011). "The Y238X stop codon polymorphism in the human beta-glucan receptor dectin-1 and susceptibility to invasive aspergillosis." J Infect Dis **203**(5): 736-43.
- Chamilos, G., R. E. Lewis, et al. (2008). "Delaying amphotericin B-based frontline therapy significantly increases mortality among patients with hematologic malignancy who have zygomycosis." Clin Infect Dis **47**(4): 503-9.
- Chang, H., M. C. Kuo, et al. (2018). "*Pneumocystis jirovecii* pneumonia in patients with acute myeloid leukaemia." Intern Med J **48**(1): 81-83.
- Chen, C. S., M. Boeckh, et al. (2003). "Incidence, risk factors, and mortality from pneumonia developing late after hematopoietic stem cell transplantation." Bone Marrow Transplant **32**(5): 515-22.

- Choukri, F., J. Menotti, et al. (2010). "Quantification and spread of *Pneumocystis jirovecii* in the surrounding air of patients with *Pneumocystis pneumonia*." Clin Infect Dis **51**(3): 259-65.
- Combariza, J. F., L. F. Toro, et al. (2017). "Effectiveness of environmental control measures to decrease the risk of invasive aspergillosis in acute leukaemia patients during hospital building work." J Hosp Infect **96**(4): 336-341.
- Cordonnier, C., F. Botterel, et al. (2009). "Correlation between galactomannan antigen levels in serum and neutrophil counts in haematological patients with invasive aspergillosis." Clin Microbiol Infect **15**(1): 81-6.
- Cordonnier, C., S. Cesaro, et al. (2016). "*Pneumocystis jirovecii* pneumonia: still a concern in patients with haematological malignancies and stem cell transplant recipients." J Antimicrob Chemother **71**(9): 2379-85.
- Cordonnier, C., L. Gilain, et al. (1996). "Acquired ciliary abnormalities of nasal mucosa in marrow recipients." Bone Marrow Transplant **17**(4): 611-6.
- Cordonnier, C., S. Maury, et al. (2004). "Secondary antifungal prophylaxis with voriconazole to adhere to scheduled treatment in leukemic patients and stem cell transplant recipients." Bone Marrow Transplant **33**(9): 943-8.
- Cordonnier, C., C. Pautas, et al. (2009). "Empirical versus preemptive antifungal therapy for high-risk, febrile, neutropenic patients: a randomized, controlled trial." Clin Infect Dis **48**(8): 1042-51.
- Cordonnier, C., P. Ribaud, et al. (2006). "Prognostic factors for death due to invasive aspergillosis after hematopoietic stem cell transplantation: a 1-year retrospective study of consecutive patients at French transplantation centers." Clin Infect Dis **42**(7): 955-63.
- Cordonnier, C., M. Rovira, et al. (2010). "Voriconazole for secondary prophylaxis of invasive fungal infections in allogeneic stem cell transplant recipients: results of the VOSIFI study." Haematologica **95**(10): 1762-8.

- Cornely, O. A., J. Maertens, et al. (2007). "Liposomal amphotericin B as initial therapy for invasive mold infection: a randomized trial comparing a high-loading dose regimen with standard dosing (AmBiLoad trial)." Clin Infect Dis **44**(10): 1289-97.
- Cornely, O. A., J. Maertens, et al. (2007). "Posaconazole vs. fluconazole or itraconazole prophylaxis in patients with neutropenia." N Engl J Med **356**(4): 348-59.
- Costa, J. M., F. Botterel, et al. (2012). "Association between circulating DNA, serum (1->3)-beta-D-glucan, and pulmonary fungal burden in *Pneumocystis pneumonia*." Clin Infect Dis **55**(2): e5-8.
- Cruciani, M., C. Mengoli, et al. (2015). "Polymerase chain reaction blood tests for the diagnosis of invasive aspergillosis in immunocompromised people." Cochrane Database Syst Rev(9): CD009551.
- Cummings, J. R., G. R. Jamison, et al. (2007). "Cross-reactivity of non-*Aspergillus* fungal species in the *Aspergillus* galactomannan enzyme immunoassay." Diagn Microbiol Infect Dis **59**(1): 113-5.
- Cunha, C., F. Aversa, et al. (2014). "Genetic PTX3 deficiency and aspergillosis in stem-cell transplantation." N Engl J Med **370**(5): 421-32.
- Cunha, C., M. Di Ianni, et al. (2010). "Dectin-1 Y238X polymorphism associates with susceptibility to invasive aspergillosis in hematopoietic transplantation through impairment of both recipient- and donor-dependent mechanisms of antifungal immunity." Blood **116**(24): 5394-402.
- Cunha, C., G. Giovannini, et al. (2011). "Genetically-determined hyperfunction of the S100B/RAGE axis is a risk factor for aspergillosis in stem cell transplant recipients." PLoS One **6**(11): e27962.
- Dalle, F., P. E. Charles, et al. (2005). "Cryptococcus neoformans Galactoxylomannan contains an epitope(s) that is cross-reactive with *Aspergillus* Galactomannan." J Clin Microbiol **43**(6): 2929-31.
- Damiani, C., F. Choukri, et al. (2012). "Possible nosocomial transmission of *Pneumocystis jirovecii*." Emerg Infect Dis **18**(5): 877-8.

- Damiani, C., S. Le Gal, et al. (2013). "Combined quantification of pulmonary *Pneumocystis jirovecii* DNA and serum (1->3)-beta-D-glucan for differential diagnosis of pneumocystis pneumonia and *Pneumocystis* colonization." J Clin Microbiol **51**(10): 3380-8.
- de Boer, M. G., J. W. de Fijter, et al. (2011). "Outbreaks and clustering of *Pneumocystis* pneumonia in kidney transplant recipients: a systematic review." Med Mycol **49**(7): 673-80.
- de Boer, M. G., H. Jolink, et al. (2011). "Influence of polymorphisms in innate immunity genes on susceptibility to invasive aspergillosis after stem cell transplantation." PLoS One **6**(4): e18403.
- De Castro, N., S. Neuville, et al. (2005). "Occurrence of *Pneumocystis jirovecii* pneumonia after allogeneic stem cell transplantation: a 6-year retrospective study." Bone Marrow Transplant **36**(10): 879-83.
- De Pauw, B., T. J. Walsh, et al. (2008). "Revised definitions of invasive fungal disease from the European Organization for Research and Treatment of Cancer/Invasive Fungal Infections Cooperative Group and the National Institute of Allergy and Infectious Diseases Mycoses Study Group (EORTC/MSG) Consensus Group." Clin Infect Dis **46**(12): 1813-21.
- Delclaux, C., J. R. Zahar, et al. (1999). "Corticosteroids as adjunctive therapy for severe *Pneumocystis carinii* pneumonia in non-human immunodeficiency virus-infected patients: retrospective study of 31 patients." Clin Infect Dis **29**(3): 670-2.
- Depypere, M., V. Saegeman, et al. (2016). "Typing of *Pneumocystis jirovecii* by multilocus sequencing: evidence of outbreak?" Eur J Clin Microbiol Infect Dis **35**(6): 911-6.
- Desjardins, A., P. Parize, et al. (2015). "Lack of 1-3-B-D-glucan detection in adults with bacteraemia." Med Mycol **53**(4): 405-8.
- Desoubeaux, G., M. Dominique, et al. (2016). "Epidemiological Outbreaks of *Pneumocystis jirovecii* Pneumonia Are Not Limited to Kidney Transplant Recipients: Genotyping

- Confirms Common Source of Transmission in a Liver Transplantation Unit." J Clin Microbiol **54**(5): 1314-20.
- EORTC (1989). "Empiric antifungal therapy in febrile granulocytopenic patients. EORTC International Antimicrobial Therapy Cooperative Group." Am J Med **86**(6 Pt 1): 668-72.
- Ewig, S., T. Bauer, et al. (1995). "Clinical characteristics and outcome of *Pneumocystis carinii* pneumonia in HIV-infected and otherwise immunosuppressed patients." Eur Respir J **8**: 1548-53.
- Fan, L. C., H. W. Lu, et al. (2013). "Evaluation of PCR in bronchoalveolar lavage fluid for diagnosis of *Pneumocystis jirovecii* pneumonia: a bivariate meta-analysis and systematic review." PLoS One **8**(9): e73099.
- Fisher, C. E., T. M. Hohl, et al. (2017). "Validation of single nucleotide polymorphisms in invasive aspergillosis following hematopoietic cell transplantation." Blood **129**(19): 2693-2701.
- Flori, P., B. Belleste, et al. (2004). "Comparison between real-time PCR, conventional PCR and different staining techniques for diagnosing *Pneumocystis jirovecii* pneumonia from bronchoalveolar lavage specimens." J Med Microbiol **53**(Pt 7): 603-7.
- Frealle, E., S. Valade, et al. (2017). "Diffusion of *Pneumocystis jirovecii* in the surrounding air of patients with *Pneumocystis* colonization: frequency and putative risk factors." Med Mycol **55**(5): 568-572.
- Fukuda, T., M. Boeckh, et al. (2003). "Risks and outcomes of invasive fungal infections in recipients of allogeneic hematopoietic stem cell transplants after nonmyeloablative conditioning." Blood **102**(3): 827-33.
- Fukuda, T., M. Boeckh, et al. (2004). "Invasive aspergillosis before allogeneic hematopoietic stem cell transplantation: 10-year experience at a single transplant center." Biol Blood Marrow Transplant **10**(7): 494-503.
- Gangneux, J. P., D. Lavarde, et al. (2002). "Transient aspergillus antigenaemia: think of milk." Lancet **359**(9313): 1251.

- Garcia-Hermoso, D., A. Alanio, et al. (2015). "High diversity of non-sporulating moulds in respiratory specimens of immunocompromised patients: should all the species be reported when diagnosing invasive aspergillosis?" Mycoses **58**(9): 557-64.
- Garcia-Vidal, C., A. Upton, et al. (2008). "Epidemiology of invasive mold infections in allogeneic stem cell transplant recipients: biological risk factors for infection according to time after transplantation." Clin Infect Dis **47**(8): 1041-50.
- Gayet-Ageron, A., A. Iten, et al. (2015). "In-hospital transfer is a risk factor for invasive filamentous fungal infection among hospitalized patients with hematological malignancies: a matched case-control study." Infect Control Hosp Epidemiol **36**(3): 320-8.
- Girmenia, C., A. Ferretti, et al. (2014). "Epidemiology and risk factors for invasive fungal diseases in hematopoietic stem cell transplantation." Curr Opin Hematol **21**(6): 459-65.
- Girmenia, C., A. M. Raiola, et al. (2014). "Incidence and outcome of invasive fungal diseases after allogeneic stem cell transplantation: a prospective study of the Gruppo Italiano Trapianto Midollo Osseo (GITMO)." Biol Blood Marrow Transplant **20**(6): 872-80.
- Gits-Muselli, M., M. N. Peraldi, et al. (2015). "New Short Tandem Repeat-Based Molecular Typing Method for *Pneumocystis jirovecii* Reveals Intrahospital Transmission between Patients from Different Wards." PLoS One **10**(5): e0125763.
- Glucksberg, H., R. Storb, et al. (1974). "Clinical manifestations of graft-versus-host disease in human recipients of marrow from HL-A-matched sibling donors." Transplantation **18**(4): 295-304.
- Goodrich, J. M., R. A. Bowden, et al. (1993). "Ganciclovir prophylaxis to prevent cytomegalovirus disease after allogeneic marrow transplant." Ann Intern Med **118**(3): 173-8.
- Green, H., M. Paul, et al. (2007). "Prophylaxis for *Pneumocystis pneumonia* (PCP) in non-HIV immunocompromised patients." Cochrane Database Syst Rev(3): CD005590.

- Green, H., M. Paul, et al. (2007). "Prophylaxis of Pneumocystis pneumonia in immunocompromised non-HIV-infected patients : systemic review and meta-analysis of randomized controlled trials." Mayo Clin Proc **82**(9): 1052-9.
- Grow, W. B., J. S. Moreb, et al. (2002). "Late onset of invasive aspergillus infection in bone marrow transplant patients at a university hospital." Bone Marrow Transplant **29**(1): 15-9.
- Grube, M., J. Loeffler, et al. (2013). "TLR5 stop codon polymorphism is associated with invasive aspergillosis after allogeneic stem cell transplantation." Med Mycol **51**(8): 818-25.
- Guigue, N., A. Alanio, et al. (2015). "Utility of adding Pneumocystis jirovecii DNA detection in nasopharyngeal aspirates in immunocompromised adult patients with febrile pneumonia." Med Mycol **53**(3): 241-7.
- Hahn, T., K. M. Cummings, et al. (2002). "Efficacy of high-efficiency particulate air filtration in preventing aspergillosis in immunocompromised patients with hematologic malignancies." Infect Control Hosp Epidemiol **23**(9): 525-31.
- Harrison, N., M. Mitterbauer, et al. (2015). "Incidence and characteristics of invasive fungal diseases in allogeneic hematopoietic stem cell transplant recipients: a retrospective cohort study." BMC Infect Dis **15**: 584-592.
- Hauser, P. M., J. Bille, et al. (2011). "Multicenter, prospective clinical evaluation of respiratory samples from subjects at risk for Pneumocystis jirovecii infection by use of a commercial real-time PCR assay." J Clin Microbiol **49**(5): 1872-8.
- Helweg-Larsen, J., J. S. Jensen, et al. (1998). "Diagnostic use of PCR for detection of Pneumocystis carinii in oral wash samples." J Clin Microbiol **36**(7): 2068-72.
- Helweg-Larsen, J., A. G. Tsolaki, et al. (1998). "Clusters of Pneumocystis carinii pneumonia: analysis of person-to-person transmission by genotyping." QJM **91**(12): 813-20.
- Herbrecht, R., P. Bories, et al. (2012). "Risk stratification for invasive aspergillosis in immunocompromised patients." Ann N Y Acad Sci **1272**: 23-30.

- Herbrecht, R., D. Caillot, et al. (2012). "Indications and outcomes of antifungal therapy in French patients with haematological conditions or recipients of haematopoietic stem cell transplantation." J Antimicrob Chemother **67**(11): 2731-8.
- Herbrecht, R., D. W. Denning, et al. (2002). "Voriconazole versus amphotericin B for primary therapy of invasive aspergillosis." N Engl J Med **347**(6): 408-15.
- Herbrecht, R., T. F. Patterson, et al. (2015). "Application of the 2008 definitions for invasive fungal diseases to the trial comparing voriconazole versus amphotericin B for therapy of invasive aspergillosis: a collaborative study of the Mycoses Study Group (MSG 05) and the European Organization for Research and Treatment of Cancer Infectious Diseases Group." Clin Infect Dis **60**(5): 713-20.
- Hol, J. A., T. F. Wolfs, et al. (2014). "Predictors of invasive fungal infection in pediatric allogeneic hematopoietic SCT recipients." Bone Marrow Transplant **49**(1): 95-101.
- Hosmer, D. W. and S. Lemeshow (2000). "Applied Logistic Regression, Second edition." John Wiley and Sons, New-York.
- Huang, Y. T., C. C. Hung, et al. (2007). "Detection of circulating galactomannan in serum samples for diagnosis of *Penicillium marneffeii* infection and cryptococcosis among patients infected with human immunodeficiency virus." J Clin Microbiol **45**(9): 2858-62.
- Hughes, W., G. Leoung, et al. (1993). "Comparison of atovaquone (566C80) with trimethoprim-sulfamethoxazole to treat *Pneumocystis carinii* pneumonia in patients with AIDS." N Engl J Med **328**(21): 1521-7.
- Hughes, W. T., S. Feldman, et al. (1975). "Intensity of immunosuppressive therapy and the incidence of pneumocystis carinii pneumonitis." Cancer **36**: 2004-9.
- Junghanss, C., K. A. Marr, et al. (2002). "Incidence and outcome of bacterial and fungal infections following nonmyeloablative compared with myeloablative allogeneic hematopoietic stem cell transplantation: a matched control study." Biol Blood Marrow Transplant **8**(9): 512-20.

- Karageorgopoulos, D. E., J. M. Qu, et al. (2013). "Accuracy of beta-D-glucan for the diagnosis of *Pneumocystis jirovecii* pneumonia: a meta-analysis." Clin Microbiol Infect **19**(1): 39-49.
- Kebabci, N., A. D. van Diepeningen, et al. (2014). "Fatal breakthrough infection with *Fusarium andiyazi*: new multi-resistant aetiological agent cross-reacting with *Aspergillus galactomannan* enzyme immunoassay." Mycoses **57**(4): 249-55.
- Kesh, S., N. Y. Mensah, et al. (2005). "TLR1 and TLR6 polymorphisms are associated with susceptibility to invasive aspergillosis after allogeneic stem cell transplantation." Ann N Y Acad Sci **1062**: 95-103.
- Kim, S. J., J. Lee, et al. (2014). "Prognostic factors of *Pneumocystis jirovecii* pneumonia in patients without HIV infection." J Infect **69**(1): 88-95.
- Kim, S. Y., A. A. Dabb, et al. (2008). "Intravenous pentamidine is effective as second line *Pneumocystis pneumonia* prophylaxis in pediatric oncology patients." Pediatr Blood Cancer **50**(4): 779-83.
- Ko, Y., B. H. Jeong, et al. (2014). "Outcomes of *Pneumocystis pneumonia* with respiratory failure in HIV-negative patients." J Crit Care **29**(3): 356-61.
- Kofteridis, D. P., A. Valachis, et al. (2014). "Predisposing factors, clinical characteristics and outcome of *Pneumocystis jirovecii* pneumonia in HIV-negative patients." J Infect Chemother **20**(7): 412-6.
- Kojicic, M., G. Li, et al. (2012). "Risk factors for the development of acute lung injury in patients with infectious pneumonia." Crit Care **16**(2): R46.
- Kojima, R., M. Kami, et al. (2004). "Incidence of invasive aspergillosis after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation with a reduced-intensity regimen compared with transplantation with a conventional regimen." Biol Blood Marrow Transplant **10**(9): 645-52.
- Koldehoff, M., D. W. Beelen, et al. (2013). "Increased susceptibility for aspergillosis and post-transplant immune deficiency in patients with gene variants of TLR4 after stem cell transplantation." Transpl Infect Dis **15**(5): 533-9.

- Kontoyiannis, D. P., G. Chamilos, et al. (2007). "Increased bone marrow iron stores is an independent risk factor for invasive aspergillosis in patients with high-risk hematologic malignancies and recipients of allogeneic hematopoietic stem cell transplantation." Cancer **110**(6): 1303-6.
- Kontoyiannis, D. P., K. A. Marr, et al. (2010). "Prospective surveillance for invasive fungal infections in hematopoietic stem cell transplant recipients, 2001-2006: overview of the Transplant-Associated Infection Surveillance Network (TRANSNET) Database." Clin Infect Dis **50**(8): 1091-100.
- Labbe, A. C., S. H. Su, et al. (2007). "High incidence of invasive aspergillosis associated with intestinal graft-versus-host disease following nonmyeloablative transplantation." Biol Blood Marrow Transplant **13**(10): 1192-200.
- Lamoth, F., M. Cruciani, et al. (2011). "beta-Glucan antigenemia assay for the diagnosis of invasive fungal infections in patients with hematological malignancies: a systematic review and meta-analysis of cohort studies from the Third European Conference on Infections in Leukemia (ECIL-3)." Clin Infect Dis **54**(5): 633-43.
- Leenders, A. C., S. Daenen, et al. (1998). "Liposomal amphotericin B compared with amphotericin B deoxycholate in the treatment of documented and suspected neutropenia-associated invasive fungal infections." Br J Haematol **103**(1): 205-12.
- Lemiale, V., A. Debrumetz, et al. (2013). "Adjunctive steroid in HIV-negative patients with severe *Pneumocystis pneumonia*." Respiratory Research **14**: 87-94.
- Lewis, R. E., M. Giannella, et al. (2015). "Serum galactomannan diagnosis of breakthrough invasive fungal disease." Clin Infect Dis **60**(8): 1284.
- Li, L., J. Wang, et al. (2012). "Risk factors for invasive mold infections following allogeneic hematopoietic stem cell transplantation: a single center study of 190 recipients." Scand J Infect Dis **44**(2): 100-7.
- Li, M. C., N. Y. Lee, et al. (2014). "*Pneumocystis jiroveci pneumonia* in immunocompromised patients: delayed diagnosis and poor outcomes in non-HIV-infected individuals." J Microbiol Immunol Infect **47**(1): 42-7.

- Limper, A. H., K. S. Knox, et al. (2011). "An official American Thoracic Society statement: Treatment of fungal infections in adult pulmonary and critical care patients." Am J Respir Crit Care Med **183**(1): 96-128.
- Lindemulder, S. and E. Albano (2007). "Successful intermittent prophylaxis with trimethoprim/sulfamethoxazole 2 days per week for *Pneumocystis carinii* (jiroveci) pneumonia in pediatric oncology patients." Pediatrics **120**(1): e47-51.
- Liu, Q., R. Lin, et al. (2014). "Antifungal agents for secondary prophylaxis based on response to initial antifungal therapy in allogeneic hematopoietic stem cell transplant recipients with prior pulmonary aspergillosis." Biol Blood Marrow Transplant **20**(8): 1198-203.
- Lortholary, O., J. P. Gangneux, et al. (2011). "Epidemiological trends in invasive aspergillosis in France: the SAIF network (2005-2007)." Clin Microbiol Infect **17**(12): 1882-9.
- Louis, M., J. Guitard, et al. (2015). "Impact of HIV Infection Status on Interpretation of Quantitative PCR for Detection of *Pneumocystis jirovecii*." J Clin Microbiol **53**(12): 3870-5.
- Lu, Y., G. Ling, et al. (2011). "PCR diagnosis of *Pneumocystis pneumonia*: a bivariate meta-analysis." J Clin Microbiol **49**(12): 4361-3.
- Lubis, N., D. Baylis, et al. (2003). "Prospective cohort study showing changes in the monthly incidence of *Pneumocystis carinii pneumonia*." Postgrad Med **79**: 164-6.
- Lupianez, C. B., L. M. Canet, et al. (2015). "Polymorphisms in Host Immunity-Modulating Genes and Risk of Invasive Aspergillosis: Results from the AspBIOmics Consortium." Infect Immun **84**(3): 643-57.
- Lupianez, C. B., M. T. Villaescusa, et al. (2016). "Common Genetic Polymorphisms within NFkappaB-Related Genes and the Risk of Developing Invasive Aspergillosis." Front Microbiol **7**: 1243.
- Maertens, J., S. Cesaro, et al. (2016). "ECIL guidelines for preventing *Pneumocystis jirovecii pneumonia* in patients with haematological malignancies and stem cell transplant recipients." J Antimicrob Chemother **71**(9): 2397-404.

- Maertens, J., K. Theunissen, et al. (2005). "Galactomannan and computed tomography-based preemptive antifungal therapy in neutropenic patients at high risk for invasive fungal infection: a prospective feasibility study." Clin Infect Dis **41**(9): 1242-50.
- Maertens, J. A., Raad, II, et al. (2016). "Isavuconazole versus voriconazole for primary treatment of invasive mould disease caused by *Aspergillus* and other filamentous fungi (SECURE): a phase 3, randomised-controlled, non-inferiority trial." Lancet **387**(10020): 760-9.
- Maillet, M., D. Maubon, et al. (2014). "Pneumocystis jirovecii (Pj) quantitative PCR to differentiate Pj pneumonia from Pj colonization in immunocompromised patients." Eur J Clin Microbiol Infect Dis **33**(3): 331-6.
- Maini, R., K. L. Henderson, et al. (2013). "Increasing Pneumocystis pneumonia, England, UK, 2000-2010." Emerg Infect Dis **19**(3): 386-92.
- Manoloff, E. S., P. Francioli, et al. (2003). "Risk for Pneumocystis carinii transmission among patients with pneumonia: a molecular epidemiology study." Emerg Infect Dis **9**(1): 132-4.
- Marchetti, O., F. Lamoth, et al. (2012). "ECIL recommendations for the use of biological markers for the diagnosis of invasive fungal diseases in leukemic patients and hematopoietic SCT recipients." Bone Marrow Transplant **47**(6): 846-54.
- Marr, K. A., R. A. Carter, et al. (2002). "Invasive aspergillosis in allogeneic stem cell transplant recipients: changes in epidemiology and risk factors." Blood **100**(13): 4358-66.
- Marr, K. A., R. A. Carter, et al. (2002). "Epidemiology and outcome of mould infections in hematopoietic stem cell transplant recipients." Clin Infect Dis **34**(7): 909-17.
- Marr, K. A., M. Laverdiere, et al. (2005). "Antifungal therapy decreases sensitivity of the *Aspergillus* galactomannan enzyme immunoassay." Clin Infect Dis **40**(12): 1762-9.
- Marr, K. A., H. T. Schlamm, et al. (2015). "Combination antifungal therapy for invasive aspergillosis: a randomized trial." Ann Intern Med **162**(2): 81-9.

- Marr, K. A., K. Seidel, et al. (2000). "Prolonged fluconazole prophylaxis is associated with persistent protection against candidiasis-related death in allogeneic marrow transplant recipients: long-term follow-up of a randomized, placebo-controlled trial." Blood **96**(6): 2055-61.
- Martin-Garrido, I., E. M. Carmona, et al. (2013). "Pneumocystis pneumonia in patients treated with rituximab." Chest **144**(1): 258-265.
- Martino, R., M. D. Caballero, et al. (2001). "Reduced-intensity conditioning reduces the risk of severe infections after allogeneic peripheral blood stem cell transplantation." Bone Marrow Transplant **28**(4): 341-7.
- Martino, R., R. Parody, et al. (2006). "Impact of the intensity of the pretransplantation conditioning regimen in patients with prior invasive aspergillosis undergoing allogeneic hematopoietic stem cell transplantation: A retrospective survey of the Infectious Diseases Working Party of the European Group for Blood and Marrow Transplantation." Blood **108**(9): 2928-36.
- Martino, R., M. Subira, et al. (2002). "Invasive fungal infections after allogeneic peripheral blood stem cell transplantation: incidence and risk factors in 395 patients." Br J Haematol **116**(2): 475-82.
- Maschmeyer, G., J. Helweg-Larsen, et al. (2016). "ECIL guidelines for treatment of Pneumocystis jirovecii pneumonia in non-HIV-infected haematology patients." J Antimicrob Chemother **71**(9): 2405-13.
- Maskarinec, S. A., M. D. Johnson, et al. (2016). "Genetic Susceptibility to Fungal Infections: What is in the Genes?" Curr Clin Microbiol Rep **3**(2): 81-91.
- McKinnell, J. A., A. P. Cannella, et al. (2012). "Pneumocystis pneumonia in hospitalized patients: a detailed examination of symptoms, management, and outcomes in human immunodeficiency virus (HIV)-infected and HIV-uninfected persons." Transpl Infect Dis **14**(5): 510-8.
- Medrano, F. J., M. Montes-Cano, et al. (2005). "Pneumocystis jirovecii in General Population." Emerging Infectious Disease **11**(2): 245-50.

- Mengoli, C., M. Cruciani, et al. (2009). "Use of PCR for diagnosis of invasive aspergillosis: systematic review and meta-analysis." Lancet Infect Dis **9**(2): 89-96.
- Mennink-Kersten, M. A., D. Ruegebrink, et al. (2008). "Pseudomonas aeruginosa as a cause of 1,3-beta-D-glucan assay reactivity." Clin Infect Dis **46**(12): 1930-1.
- Mennink-Kersten, M. A., A. Warris, et al. (2006). "1,3-beta-D-glucan in patients receiving intravenous amoxicillin-clavulanic acid." N Engl J Med **354**(26): 2834-5.
- Metan, G., A. N. Koc, et al. (2012). "What should be the optimal cut-off of serum 1,3-beta-D-glucan for the detection of invasive pulmonary aspergillosis in patients with haematological malignancies?" Scand J Infect Dis **44**(5): 330-6.
- Meyers, J. D., L. L. Pifer, et al. (1979). "The value of Pneumocystis carinii antibody and antigen detection for diagnosis of pneumocystis carinii pneumonia after marrow transplantation." American Review of Respiratory Disease **120**: 1283-7.
- Mezger, M., M. Steffens, et al. (2008). "Polymorphisms in the chemokine (C-X-C motif) ligand 10 are associated with invasive aspergillosis after allogeneic stem-cell transplantation and influence CXCL10 expression in monocyte-derived dendritic cells." Blood **111**(2): 534-6.
- Mihu, C. N., E. King, et al. (2008). "Risk factors and attributable mortality of late aspergillosis after T-cell depleted hematopoietic stem cell transplantation." Transpl Infect Dis **10**(3): 162-7.
- Mikulska, M., A. M. Raiola, et al. (2009). "Risk factors for invasive aspergillosis and related mortality in recipients of allogeneic SCT from alternative donors: an analysis of 306 patients." Bone Marrow Transplant **44**(6): 361-70.
- Miller, R. F., H. E. Ambrose, et al. (2002). "Probable Mother-to-Infant Transmission of Pneumocystis carinii f. sp. hominis Infection." Journal of Clinical Microbiology **40**(4): 1555-1557.
- Miller, R. F., A. D. Grant, et al. (1992). "Seasonal variation in presentation of Pneumocystis carinii pneumonia." Lancet **339**: 747-8.

- Miyazaki, T., S. Kohno, et al. (1995). "Plasma (1-->3)-beta-D-glucan and fungal antigenemia in patients with candidemia, aspergillosis, and cryptococcosis." J Clin Microbiol **33**(12): 3115-8.
- Moon, S. M., T. Kim, et al. (2011). "Outcomes of moderate-to-severe Pneumocystis pneumonia treated with adjunctive steroid in non-HIV-infected patients." Antimicrob Agents Chemother **55**(10): 4613-8.
- Morris, A. and K. A. Norris (2012). "Colonization by Pneumocystis jirovecii and its role in disease." Clin Microbiol Rev **25**(2): 297-317.
- Muhlethaler, K., K. Bogli-Stuber, et al. (2012). "Quantitative PCR to diagnose Pneumocystis pneumonia in immunocompromised non-HIV patients." Eur Respir J **39**(4): 971-8.
- Neofytos, D., D. Horn, et al. (2009). "Epidemiology and outcome of invasive fungal infection in adult hematopoietic stem cell transplant recipients: analysis of Multicenter Prospective Antifungal Therapy (PATH) Alliance registry." Clin Infect Dis **48**(3): 265-73.
- Neofytos, D., S. Treadway, et al. (2013). "Epidemiology, outcomes, and mortality predictors of invasive mold infections among transplant recipients: a 10-year, single-center experience." Transpl Infect Dis **15**(3): 233-42.
- Nucci, M., F. Carlesse, et al. (2014). "Earlier diagnosis of invasive fusariosis with Aspergillus serum galactomannan testing." PLoS One **9**(1): e87784.
- Nucci, M., M. Garnica, et al. (2013). "Invasive fungal diseases in haematopoietic cell transplant recipients and in patients with acute myeloid leukaemia or myelodysplasia in Brazil." Clin Microbiol Infect **19**(8): 745-51.
- Offner, F., C. Cordonnier, et al. (1998). "Impact of previous aspergillosis on the outcome of bone marrow transplantation." Clin Infect Dis **26**(5): 1098-103.
- Ong, Y. L. and F. G. C. Jones (1998). "A cluster of suspected pneumocystis carinii pneumonia following intensive chemotherapy in a Belfast haematology unit." The Ulster Medical Journal **67**(2): 104-9.

- Onishi, A., D. Sugiyama, et al. (2011). "Diagnostic accuracy of serum 1,3-beta-D-glucan for pneumocystis jiroveci pneumonia, invasive candidiasis, and invasive aspergillosis: systematic review and meta-analysis." J Clin Microbiol **50**(1): 7-15.
- Pagano, L., M. Caira, et al. (2007). "Fungal infections in recipients of hematopoietic stem cell transplants: results of the SEIFEM B-2004 study--Sorveglianza Epidemiologica Infezioni Fungine Nelle Emopatie Maligne." Clin Infect Dis **45**(9): 1161-70.
- Pagano, L., L. Fianchi, et al. (2002). "Pneumocystis carinii pneumonia in patients with malignant haematological disease : 10 years' experience of infection in GIMENA centres." British Journal of Haematology **117**: 379-86.
- Panackal, A. A., H. Li, et al. (2010). "Geoclimatic influences on invasive aspergillosis after hematopoietic stem cell transplantation." Clin Infect Dis **50**(12): 1588-97.
- Pareja, J. G., R. Garland, et al. (1998). "Use of Adjunctive Corticosteroids in Severe Adult Non-HIV Pneumocystis carinii Pneumonia." Chest **113**: 1215-24.
- Park, B. J., P. G. Pappas, et al. (2011). "Invasive non-Aspergillus mold infections in transplant recipients, United States, 2001-2006." Emerg Infect Dis **17**(10): 1855-64.
- Passweg, J. R., H. Baldomero, et al. (2013). "Hematopoietic SCT in Europe: data and trends in 2011." Bone Marrow Transplant **48**(9): 1161-7.
- Petraitiene, R., V. Petraitis, et al. (2011). "Galactomannan antigenemia after infusion of gluconate-containing Plasma-Lyte." J Clin Microbiol **49**(12): 4330-2.
- Pizzo, P. A., K. J. Robichaud, et al. (1982). "Empiric antibiotic and antifungal therapy for cancer patients with prolonged fever and granulocytopenia." Am J Med **72**(1): 101-11.
- Ponce, C. A., M. Gallo, et al. (2010). "Pneumocystis colonization is highly prevalent in the autopsied lungs of the general population." Clin Infect Dis **50**(3): 347-53.
- Post, M. J., C. Lass-Floerl, et al. (2007). "Invasive fungal infections in allogeneic and autologous stem cell transplant recipients: a single-center study of 166 transplanted patients." Transpl Infect Dis **9**(3): 189-95.

- Racil, Z., I. Kocmanova, et al. (2013). "Reactivity of the 1,3-beta-D-glucan assay during bacteraemia: limited evidence from a prospective study." Mycoses **56**(2): 101-4.
- Ramos, E. R., Y. Jiang, et al. (2011). "Outcome analysis of invasive aspergillosis in hematologic malignancy and hematopoietic stem cell transplant patients: the role of novel antimold azoles." Oncologist **16**(7): 1049-60.
- Ramsay, I., R. L. Gorton, et al. (2016). "Transmission of Hepatitis B Core Antibody and Galactomannan Enzyme Immunoassay Positivity via Immunoglobulin Products: A Comprehensive Analysis." Clin Infect Dis **63**(1): 57-63.
- Robert-Gangneux, F., S. Belaz, et al. (2014). "Diagnosis of *Pneumocystis jirovecii* pneumonia in immunocompromised patients by real-time PCR: a 4-year prospective study." J Clin Microbiol **52**(9): 3370-6.
- Robin, C., A. Alanio, et al. (2017). "Molecular Demonstration of a *Pneumocystis* Outbreak in Stem Cell Transplant Patients: Evidence for Transmission in the Daycare Center." Front Microbiol **8**: 700.
- Robin, C., M. P. Le, et al. (2017). "Plasma concentrations of atovaquone given to immunocompromised patients to prevent *Pneumocystis jirovecii*." J Antimicrob Chemother **72**(9): 2602-2606.
- Roblot, F. (2003). "*Pneumocystis carinii* pneumonia in patients with hematologic malignancies: a descriptive study." Journal of Infection **47**(1): 19-27.
- Roblot, F., C. Godet, et al. (2002). "Analysis of underlying diseases and prognosis factors associated with *Pneumocystis carinii* pneumonia in immunocompromised HIV-negative patients." Eur J Clin Microbiol Infect Dis **21**(7): 523-31.
- Roembke, F., H. S. Heinzow, et al. (2014). "Clinical outcome and predictors of survival in patients with *pneumocystis jirovecii* pneumonia--results of a tertiary referral centre." Clin Respir J **8**(1): 86-92.
- Romand, S., C. Della Bruna, et al. (1996). "In vitro and in vivo effects of rifabutin alone or combined with atovaquone against *Toxoplasma gondii*." Antimicrob Agents Chemother **40**(9): 2015-20.

- Roux, A., E. Canet, et al. (2014). "Pneumocystis jirovecii pneumonia in patients with or without AIDS, France." Emerg Infect Dis **20**(9): 1490-7.
- Roux, A., F. Gonzalez, et al. (2014). "Update on pulmonary Pneumocystis jirovecii infection in non-HIV patients." Med Mal Infect **44**(5): 185-98.
- Roux, A., V. Lemiale, et al. (2010). "Pneumocystis jirovecii pneumonia in non-AIDS patients." Reanimation **19**: 327-38.
- Sainz, J., L. Hassan, et al. (2007). "Interleukin-10 promoter polymorphism as risk factor to develop invasive pulmonary aspergillosis." Immunol Lett **109**(1): 76-82.
- Sainz, J., C. B. Lupianez, et al. (2012). "Dectin-1 and DC-SIGN polymorphisms associated with invasive pulmonary Aspergillosis infection." PLoS One **7**(2): e32273.
- Sainz, J., E. Perez, et al. (2008). "IL1 gene cluster polymorphisms and its haplotypes may predict the risk to develop invasive pulmonary aspergillosis and modulate C-reactive protein level." J Clin Immunol **28**(5): 473-85.
- Samuel, C. M., A. Whitelaw, et al. (2011). "Improved detection of Pneumocystis jirovecii in upper and lower respiratory tract specimens from children with suspected pneumocystis pneumonia using real-time PCR: a prospective study." BMC Infect Dis **11**: 329.
- Savani, B. N., M. Labopin, et al. (2016). "Expanding transplant options to patients over 50 years. Improved outcome after reduced intensity conditioning mismatched-unrelated donor transplantation for patients with acute myeloid leukemia: a report from the Acute Leukemia Working Party of the EBMT." Haematologica **101**(6): 773-80.
- Segal, B. H. (2009). "Aspergillosis." N Engl J Med **360**(18): 1870-84.
- Seo, K. W., D. H. Kim, et al. (2005). "Protective role of interleukin-10 promoter gene polymorphism in the pathogenesis of invasive pulmonary aspergillosis after allogeneic stem cell transplantation." Bone Marrow Transplant **36**(12): 1089-95.

- Siegel, J. D., E. Rhinehart, et al. (2007). "2007 Guideline for Isolation Precautions: Preventing Transmission of Infectious Agents in Health Care Settings." Am J Infect Control **35**(10 Suppl 2): S65-164.
- Sing, A., S. Schmoldt, et al. (2009). "Seasonal variation of *Pneumocystis jirovecii* infection: analysis of underlying climatic factors." Clin Microbiol Infect **15**(10): 957-60.
- Sipsas, N. V. and D. P. Kontoyiannis (2006). "Clinical issues regarding relapsing aspergillosis and the efficacy of secondary antifungal prophylaxis in patients with hematological malignancies." Clin Infect Dis **42**(11): 1584-91.
- Slavin, M. A., B. Osborne, et al. (1995). "Efficacy and safety of fluconazole prophylaxis for fungal infections after marrow transplantation--a prospective, randomized, double-blind study." J Infect Dis **171**(6): 1545-52.
- Souza, J. P., M. Boeckh, et al. (1999). "High Rates of *Pneumocystis carinii* Pneumonia in Allogeneic Blood and Marrow Transplant Recipients Receiving Dapsone Prophylaxis." Clinical Infectious Disease **29**: 1467-71.
- Steele, C., R. R. Rapaka, et al. (2005). "The beta-glucan receptor dectin-1 recognizes specific morphologies of *Aspergillus fumigatus*." PLoS Pathog **1**(4): e42.
- Sulahian, A., S. Touratier, et al. (2003). "False positive test for aspergillus antigenemia related to concomitant administration of piperacillin and tazobactam." N Engl J Med **349**(24): 2366-7.
- Thursky, K., G. Byrnes, et al. (2004). "Risk factors for post-engraftment invasive aspergillosis in allogeneic stem cell transplantation." Bone Marrow Transplant **34**(2): 115-21.
- Tissot, F., S. Agrawal, et al. (2017). "ECIL-6 guidelines for the treatment of invasive candidiasis, aspergillosis and mucormycosis in leukemia and hematopoietic stem cell transplant patients." Haematologica **102**(3): 433-444.
- To, K. K., S. C. Wong, et al. (2013). "Use of nasopharyngeal aspirate for diagnosis of pneumocystis pneumonia." J Clin Microbiol **51**(5): 1570-4.

- Torres, H. A., R. F. Chemaly, et al. (2006). "Influence of type of cancer and hematopoietic stem cell transplantation on clinical presentation of *Pneumocystis jiroveci* pneumonia in cancer patients." Eur J Clin Microbiol Infect Dis **25**(6): 382-8.
- Tortorano, A. M., M. C. Esposto, et al. (2012). "Cross-reactivity of *Fusarium* spp. in the *Aspergillus* Galactomannan enzyme-linked immunosorbent assay." J Clin Microbiol **50**(3): 1051-3.
- Tuan, I. Z., D. Dennison, et al. (1992). "Pneumocystis carinii pneumonitis following bone marrow transplantation." Bone Marrow Transplant **10**(3): 267-72.
- Ullmann, A. J., J. H. Lipton, et al. (2007). "Posaconazole or fluconazole for prophylaxis in severe graft-versus-host disease." N Engl J Med **356**(4): 335-47.
- Upton, A., K. A. Kirby, et al. (2007). "Invasive aspergillosis following hematopoietic cell transplantation: outcomes and prognostic factors associated with mortality." Clin Infect Dis **44**(4): 531-40.
- Valade, S., E. Azoulay, et al. (2015). "Pneumocystis jirovecii airborne transmission between critically ill patients and health care workers." Intensive Care Med **41**(9): 1716-8.
- Varela, J. M., C. Regordan, et al. (2004). "Climatic factors and *Pneumocystis jiroveci* infection in southern Spain." Clin Microbiol Infect **10**(8): 770-2.
- Vargas, S. L., C. A. Ponce, et al. (2000). "Transmission of *Pneumocystis carinii* DNA from a Patient with *P. carinii* Pneumonia to Immunocompetent Contact Health Care Workers." Journal of Clinical Microbiology **38**(4): 1536-8.
- Vasconcelles, M. J., M. V. P. Bernardo, et al. (2000). "Aerosolized pentamidine as *Pneumocystis* prophylaxis after bone marrow transplantation is inferior to other regimens and is associated with decreased survival and an increased risk of other infections." Biol Blood Marrow Transplant **6**(1): 35-43.
- Vogel, M. N., M. Vatlach, et al. (2012). "HRCT-features of *Pneumocystis jiroveci* pneumonia and their evolution before and after treatment in non-HIV immunocompromised patients." Eur J Radiol **81**(6): 1315-20.

- von Elm, E., D. G. Altman, et al. (2008). "[The Strengthening the Reporting of Observational Studies in Epidemiology (STROBE) statement: guidelines for reporting of observational studies]." Internist (Berl) **49**(6): 688-93.
- Vonberg, R. P. and P. Gastmeier (2006). "Nosocomial aspergillosis in outbreak settings." J Hosp Infect **63**(3): 246-54.
- Wakefield, A. E., F. J. Pixley, et al. (1990). "Detection of *Pneumocystis carinii* with DNA amplification." Lancet **336**: 451-53.
- Werner, J. L., A. E. Metz, et al. (2009). "Requisite role for the dectin-1 beta-glucan receptor in pulmonary defense against *Aspergillus fumigatus*." J Immunol **182**(8): 4938-46.
- Wheat, L. J., E. Hackett, et al. (2007). "Histoplasmosis-associated cross-reactivity in the BioRad Platelia *Aspergillus* enzyme immunoassay." Clin Vaccine Immunol **14**(5): 638-40.
- White, P. L., R. A. Barnes, et al. (2015). "Clinical Performance of *Aspergillus* PCR for Testing Serum and Plasma: a Study by the European *Aspergillus* PCR Initiative." J Clin Microbiol **53**(9): 2832-7.
- White, P. L., C. Parr, et al. (2017). "Predicting Invasive *Aspergillus* in Hematology Patients by Combining Clinical and Genetic Risk Factors with Early Diagnostic Biomarkers." J Clin Microbiol **56**(1): e01122-17.
- White, P. L., J. R. Wingard, et al. (2015). "*Aspergillus* Polymerase Chain Reaction: Systematic Review of Evidence for Clinical Use in Comparison With Antigen Testing." Clin Infect Dis **61**(8): 1293-303.
- Winston, D. J., W. G. Ho, et al. (1993). "Ganciclovir prophylaxis of cytomegalovirus infection and disease in allogeneic bone marrow transplant recipients. Results of a placebo-controlled, double-blind trial." Ann Intern Med **118**(3): 179-84.
- Winston, D. J., M. C. Territo, et al. (1982). "Alveolar macrophage dysfunction in human bone marrow transplant recipients." Am J Med **73**(6): 859-66.

- Wojtowicz, A., T. D. Lecompte, et al. (2015). "PTX3 Polymorphisms and Invasive Mold Infections After Solid Organ Transplant." Clin Infect Dis **61**(4): 619-22.
- Yale, S. H. and A. H. Limper (1996). "Pneumocystis carinii Pneumonia in Patients Without Acquired Immunodeficiency Syndrome: Associated Illnesses and Prior Corticosteroid Therapy." Mayo Clinic Proceedings **71**(1): 5-13.
- Yiannakis, E. P. and T. C. Boswell (2016). "Systematic review of outbreaks of Pneumocystis jirovecii pneumonia: evidence that P. jirovecii is a transmissible organism and the implications for healthcare infection control." J Hosp Infect **93**(1): 1-8.
- Zaas, A. K., G. Liao, et al. (2008). "Plasminogen alleles influence susceptibility to invasive aspergillosis." PLoS Genet **4**(6): e1000101.
- Zahar, J. R., M. Robin, et al. (2002). "*Pneumocystis carinii* pneumonia in critically ill patients with malignancy : a descriptive study." Clinical Infectious Disease **35**: 929-34.
- Zhang, P., E. L. Jiang, et al. (2010). "Risk factors and prognosis of invasive fungal infections in allogeneic stem cell transplantation recipients: a single-institution experience." Transpl Infect Dis **12**(4): 316-21.
- Zweig, M. H. (1993). "ROC plots display test accuracy, but are still limited by the study design." Clin Chem **39**(6): 1345-6.

## Résumé en français

Les infections fongiques sont une complication fréquente des patients d'hématologie et en particulier des patients ayant reçu une greffe de cellules souches hématopoïétiques (CSH). L'objectif de ce travail était d'identifier les facteurs de risque intrinsèques d'infections fongiques et les modalités de leur transmission.

Nous avons d'abord étudié l'aspergillose invasive (AI) qui est l'infection fongique la plus fréquente chez les greffés de CSH en croisant les données du registre européen des greffés ProMise et la base de données de l'étude prospective SAIF. Nous avons mené une étude cas-témoins nichée dans une cohorte de 185 cas et 651 témoins appariés. Les facteurs associés à la survenue d'une aspergillose étaient l'irradiation corporelle totale, une GvH aiguë de grade  $\geq 2$  et la rechute de l'hémopathie. Trente-cinq cas étaient précoces (<J40), 33 tardifs (entre J40 et J100) et 117 très tardifs (>J100). Le facteur associé à la survenue d'une AI précoce était l'absence de prise de greffe. Le facteur associé à la survenue d'une AI tardive était la GvH aiguë de grade 3-4. Les facteurs associés à la survenue d'une AI très tardive étaient la GvH aiguë de grade  $\geq 2$ , la rechute et la neutropénie secondaire. Tous les facteurs pré-greffe étaient effacés par les facteurs post-greffe.

Puis nous avons étudié la transmission d'infection fongique par l'étude d'une épidémie de pneumocystose survenue dans le service. Douze cas de pneumocystose sont survenus en 7 mois dans le service soit beaucoup plus qu'au cours des années précédentes. L'analyse moléculaire a permis de montrer que 4 cas appartenaient au même génotype, qui est un génotype rare jamais décrit dans une série de plus de 300 génotypes en Europe. La carte de transmission a permis de constater que ces 4 patients se sont rencontrés uniquement en hôpital de jour. Cette étude est la première démonstration moléculaire d'une épidémie de pneumocystose dans un service d'hématologie.

## Abstract in English

Fungal infections are a common complication of hematology patients and especially in hematopoietic stem cell transplantation (HSCT) recipients. The objective of this work was to identify intrinsic risk factors for fungal infections and transmission.

We first studied invasive aspergillosis (IA), which is the most common fungal infection after HSCT by crossing data from the European HSCT registry ProMise and the prospective study database SAIF. We conducted a nested case-control study in a cohort of 185 cases and 651 matched controls. Factors associated with onset of aspergillosis were total body irradiation, acute GVHD grade  $\geq 2$ , and relapse of the underlying disease. Thirty-five IA were early (<D40), 33 late (between D40 and D100) and 117 very late (> D100). The factor associated with the occurrence of an early IA was the absence of engraftment. The factor associated with the occurrence of late IA was acute grade 3-4 GvH. Factors associated with the occurrence of very late IA were acute GVHD grade  $\geq 2$ , relapse, and secondary neutropenia. All pre-transplant factors were supplanted by post-transplant factors.

Then we studied the transmission of fungal infection by studying a pneumocystosis outbreak occurring in the hematology department. Twelve cases occurred within 7 months. Molecular analysis showed that 4 of them belonged to the same genotype, which is a rare genotype never described in a series of more than 300 genotypes in Europe. The transmission map permitted to identify that these 4 patients met only in the daycare center. This study is the first molecular demonstration of a pneumocystis outbreak in a hematology ward.