



HAL
open science

Optimisation du traitement préventif et curatif de la mucormycose pulmonaire

Kévin Brunet

► **To cite this version:**

Kévin Brunet. Optimisation du traitement préventif et curatif de la mucormycose pulmonaire. Médecine humaine et pathologie. Université de Poitiers, 2020. Français. NNT : 2020POIT1802 . tel-03101351

HAL Id: tel-03101351

<https://theses.hal.science/tel-03101351>

Submitted on 7 Jan 2021

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.

THÈSE

Pour l'obtention du Grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE POITIERS

(Faculté de Médecine et Pharmacie)
(Diplôme National - Arrêté du 25 mai 2016)

École Doctorale : Sciences Biologiques et Santé

Secteur de Recherche : Aspects moléculaires et cellulaires de la Biologie

Présentée par :

Kévin BRUNET

Optimisation du traitement préventif et curatif de la mucormycose pulmonaire

Directrices de Thèse :

Madame le Professeur Blandine RAMMAERT
Madame le Professeur Sandrine MARCHAND

Soutenue le 20 Octobre 2020

devant la Commission d'Examen

JURY

Professeur Boualem SENDID
Docteur Éric DANNAOUI
Professeur Olivier LORTHOLARY
Professeur Christine IMBERT
Docteur Florent MORIO
Docteur Estelle PERRAUD
Professeur Blandine RAMMAERT
Professeur Sandrine MARCHAND

Université de Lille
Université de Paris
Université de Paris
Université de Poitiers
Université de Nantes
Université de Poitiers
Université de Poitiers
Université de Poitiers

Rapporteur
Rapporteur
Examineur
Examineur
Examineur
Examineur
Directrice de thèse
Directrice de thèse

Remerciements

Au Pr Boualem Sendid et au Dr Éric Dannaoui, je vous remercie sincèrement d'avoir accepté d'être rapporteurs de cette thèse. Soyez assurés de ma reconnaissance.

Au Pr Lortholary, je vous remercie de l'honneur que vous me faites en acceptant de juger ce travail.

Au Pr Imbert, je vous remercie d'avoir accepté d'évaluer ce travail. Merci pour vos enseignements qui ont participé à me faire aimer la mycologie.

Au Dr Morio, je te remercie d'avoir accepté de faire partie de ce jury. Merci également pour ton encadrement lors de mon stage dans le service de Parasitologie-Mycologie du CHU de Nantes au cours duquel j'ai beaucoup appris et merci pour tes conseils.

Au Dr Perraud, merci Estelle d'avoir accepté de faire partie de ce jury et d'évaluer ce travail. Merci pour ton aide, tes conseils précieux et ta sympathie. Merci de me permettre de poursuivre une carrière hospitalo-universitaire à tes côtés.

Au Pr Marchand, merci Sandrine pour l'accueil au laboratoire, pour le temps que tu m'accordes, pour tes conseils toujours pertinents et ta rigueur dans le travail. J'ai été très heureux de réaliser cette thèse sous ta co-direction.

Au Pr Rammaert, merci beaucoup Blandine, merci de m'avoir proposé une thèse sur un sujet passionnant, merci pour nos discussions scientifiques et médicales toujours enrichissantes, merci pour ton temps, ta disponibilité et ta sympathie. Cela a été un réel plaisir de réaliser cette thèse avec toi.

Au Pr William Couet, merci de m'avoir fait confiance et accueilli au sein de votre équipe. Merci pour vos conseils et merci de me laisser l'opportunité de pouvoir continuer à travailler dans votre unité.

Au Pr Rodier, merci de m'avoir accueilli dans votre service et permis d'entreprendre une carrière hospitalo-universitaire. Merci pour votre aide, vos conseils et votre sympathie.

Aux Drs Thomas, François et Jean-Philippe, merci beaucoup pour votre aide dans la réalisation de cette thèse, j'ai été chanceux et ravi de partager cette aventure avec vous.

Merci à tous les membres de l'unité U1070 pour votre aide. Vous m'avez tous permis, de façon directe ou indirecte, de réaliser cette thèse. Merci également pour la bonne ambiance au laboratoire, c'est un réel plaisir de faire partie de cette équipe.

Merci à tous les doctorants et post-doctorants, rencontrés au cours de cette thèse, pour votre aide et pour tous les bons moments passés ensemble.

Merci à tous mes amis, rencontrés avant et pendant cette thèse, pour votre amitié et votre soutien.

Merci à ma famille, et tout particulièrement à mes parents et à ma sœur, sans qui je ne serai pas là.

Enfin, merci à toi Céline, pour ta présence et ton soutien.

Table des matières

Liste des communications	7
Liste des abréviations	9
Liste des tableaux	11
Liste des figures	12
Introduction.....	13
I. Contexte	13
1. Les mucormycoses, des infections rares mais émergentes	13
2. La mucormycose pulmonaire, forme prédominante en France	14
3. <i>Lichtheimia sp</i> , un genre dominant dans la mucormycose pulmonaire	15
4. Un rôle prépondérant des macrophages alvéolaires dans la réponse immunitaire anti- <i>Mucorales</i>	16
5. Une maladie de mauvais pronostic.....	18
6. Un diagnostic difficile	19
7. Un traitement curatif et une prévention peu efficaces	21
8. Comment optimiser la prise en charge de la mucormycose pulmonaire ?	22
a. Développer des modèles expérimentaux pertinents	22
b. Comprendre l'impact des corticoïdes sur la fonction phagocytaire	24
c. Étudier et prévenir le phénomène de réactivation	25
d. Rechercher des combinaisons antifongiques synergiques.....	26
II. Revues	28
Revue 1: « Mucormycosis treatment: recommendations, latest advances, and perspectives » (1).....	28
Revue 2: « Reactivation of dormant/latent fungal infection » (2)	37

Objectifs	44
Travail expérimental.....	45
I. Développement et caractérisation d'un modèle murin de mucormycose pulmonaire aigüe à <i>Lichtheimia corymbifera</i>	45
II. Rôle des corticoïdes dans la physiopathologie de l'infection	64
Article 1 : "Corticosteroids alter anti- <i>Lichtheimia corymbifera</i> response of alveolar macrophages in an <i>ex vivo</i> mouse model"	64
III. Intérêt de l'amphotéricine B en décolonisation.....	85
Article 2 : « <i>Lichtheimia corymbifera</i> Colonization Leading to Pulmonary Infection Can Be Prevented with Liposomal Amphotericin B in a New Murine Model ».....	85
IV. Potentialisation de l'effet de l'amphotéricine B	95
Article 3 : « Polyethylene glycol (15)-hydroxystearate enhances activity of amphotericin B against <i>Mucorales</i> "	95
Discussion.....	106
Trois nouveaux modèles animaux originaux pour étudier la mucormycose pulmonaire.....	106
Les corticoïdes, inhibiteurs des fonctions macrophagiques	109
Le phénomène de réactivation, un phénomène à prendre en compte dans la stratégie de prophylaxie.....	110
PEG15HS – amphotéricine B, une combinaison synergique <i>in vitro</i> contre les <i>Mucorales</i>	112
Le modèle Emax pour caractériser les associations antifongiques : un outil précieux.....	113
Les aérosols d'amphotéricine B : un potentiel thérapeutique intéressant ?.....	115
Conclusion et perspectives.....	117
Annexes	118
Autorisations de reproduction des figures et des tableaux	118
Références.....	128
Abstract	143
Résumé.....	144

Liste des communications

Revues

1. **Brunet K**, Rammaert B. Mucormycosis treatment: Recommendations, latest advances, and perspectives. *J Mycol Med.* 20 juin 2020;101007 (1). **Publié.**
2. **Brunet K**, Alanio A, Lortholary O, Rammaert B. Reactivation of dormant/latent fungal infection. *J Infect.* 2018;77(6):463-8 (2). **Publié.**

Articles

1. **Kévin Brunet**, François Arrivé, Jean-Philippe Martellosio, Isabelle Lamarche, Grégory Jouvion, Sandrine Marchand, Blandine Rammaert. Corticosteroids alter anti-*Lichtheimia corymbifera* response of alveolar macrophages in an *ex vivo* mouse model. **Soumis.**
2. Brunet T*, **Brunet K***, Jouvion G, Cateau E, Marchand S, Rammaert B (***co-premiers auteurs**). *Lichtheimia corymbifera* Colonization Leading to Pulmonary Infection Can Be Prevented with Liposomal Amphotericin B in a New Murine Model. *Antimicrob Agents Chemother.* août 2019;63(8) (3). **Publié.**
3. Polyethylene glycol (15)-hydroxystearate enhances activity of amphotericin B against *Mucorales*. **En écriture.**

Communications orales

1. **Kévin Brunet**, Thomas Brunet, Grégory Jouvion, Estelle Cateau, Sandrine Marchand, Blandine Rammaert. La décolonisation par l'amphotéricine B liposomale prévient la survenue des mucormycoses pulmonaires à *Lichtheimia corymbifera*. Congrès des Sociétés Françaises de Parasitologie et Mycologie Médicale, Tours, Mai 2019.
2. François Arrivé, **Kévin Brunet**, Jean-Philippe Martellosio, Sandrine Marchand, Blandine Rammaert. Impact de la corticothérapie sur l'interaction entre macrophages alvéolaires et *Mucorales*. Réunion interdisciplinaire de chimiothérapie anti-infectieuse, Paris, Décembre 2019. *Prix du meilleur abstract, section « clinique »*.
3. **Kévin Brunet**, François Arrivé, Jean-Philippe Martellosio, Sandrine Marchand, Blandine Rammaert. Impact of corticosteroids on alveolar macrophage interaction with *Mucorales*. European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, Paris, 2020.

Posters

1. **Kévin Brunet**, Thomas Brunet, Grégory Jouvion, Estelle Cateau, Sandrine Marchand, Blandine Rammaert. La décolonisation par l'amphotéricine B liposomale prévient la survenue des mucormycoses pulmonaires à *Lichtheimia corymbifera*. Congrès des Sociétés Françaises de Parasitologie et Mycologie Médicale, Tours, Mai 2019.
2. **Kévin Brunet**, Alexia Chauzy, Nicolas Grégoire, Frédéric Tewes, William Couet, Sandrine Marchand, Blandine Rammaert. Polyethylene glycol (15)-hydroxystearate enhances amphotericin B activity against *Mucorales*. European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, Paris, 2020.
3. **Kévin Brunet**, Jean-Philippe Martellosio, François Arrivé, Thomas Brunet, Isabelle Lamarche, Sandrine Marchand, Blandine Rammaert. A new *Lichtheimia corymbifera* mouse model close to human pathophysiology to test antifungal drugs. European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, Paris, 2020.
4. **Kévin Brunet**, François Arrivé, Jean-Philippe Martellosio, Isabelle Lamarche, William Couet, Sandrine Marchand, Blandine Rammaert. Les corticoïdes altèrent la réponse des macrophages alvéolaires contre *Lichtheimia corymbifera* dans un modèle murin *ex vivo*. Journées Nationales d'Infectiologie, Poitiers, Septembre 2020.

Liste des abréviations

Ac : Anticorps

AmB : Amphotéricine B

AmBd : Amphotéricine B deoxycholate

AmBL : Amphotéricine B Liposomale

API : Aspergillose Pulmonaire Invasive

BSA : Bovine Serum Albumin (Albumine de sérum bovin)

CMI : Concentration Minimale Inhibitrice

CNR : Centre National de Référence

CPA : Cyclophosphamide

DCF-DA : 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate

ECMM : European Confederation of Medical Mycology (Confédération européenne de mycologie médicale)

EDTA : Acide Ethylène Diamine Tétracétique

EORTC : European Organisation for Research and Treatment of Cancer (Organisation européenne pour la recherche et le traitement sur le cancer)

FSC-A : Forward Scatter area

FSC-H : Forward Scatter height

FDA : Food and Drug Administration (Agence américaine des produits alimentaires et des médicaments)

FIC index : Fractional Inhibitory Concentration index (Indice de concentration inhibitrice fractionnée)

IMReD : Introduction, Matériels et Méthodes, Résultats et Discussion

IP : Intrapéritonéal

IFI : Infection Fongique Invasive

IT : Intratrachéal

JO : Jour de l'inoculation

L. corymbifera : *Lichtheimia corymbifera*

LB : Lymphocyte B

LBA : Lavage Broncho-Alvéolaire

LT : Lymphocyte T

MA : Macrophage Alvéolaire

MFI : Median Fluorescence Intensity (Intensité de fluorescence médiane)

NS : Non Significatif

PBS : Phosphate Buffer Saline (Solution saline tamponnée au phosphate)

PBS/Tween 20 : Phosphate Buffer Saline/Tween 20

PBS/Tween 80 : Phosphate Buffer Saline/Tween 80

PCR : Polymerase Chain Reaction (Réaction de polymérisation en chaîne)

PD : Pharmacodynamique

PDA : Potatoe Dextrose Agar (Gélose dextrosée à la pomme de terre)

PFA : Paraformaldéhyde

PK : Pharmacocinétique

PK/PD : Pharmacocinétique/ Pharmacodynamique

PNN : Polynucléaires Neutrophiles

qPCR : quantitative Polymerase Chain Reaction (Réaction de polymérisation en chaîne quantitative)

ROS : Reactive Oxygen Species (Dérivés réactifs de l'oxygène)

SI : Système Immunitaire

Liste des tableaux

Tableau 1 : Formes cliniques décrites suivant les principales maladies sous-jacentes retrouvées dans les 101 cas de mucormycoses de l'étude française RetroZygo, avec surligné en gris les associations fortes, adapté de (19).....	15
Tableau 2 : Mortalité selon la forme clinique de mucormycose dans deux études rétrospectives, adapté de (19) et (21).....	18
Tableau 3 : Maladies sous-jacentes et facteurs prédisposant retrouvés dans une revue de la littérature de 851 cas de mucormycoses, adapté de (21).	25
Tableau 4 : Caractéristiques des modèles expérimentaux développés.....	108

Liste des figures

Figure 1 : A - Filaments de <i>Mucorales</i> (x 400). B - Organe de production des spores : sporange porté par un sporangiophore (x 400). C - Spores de <i>Mucorales</i> (x 1000). Adaptée de (9) et (10).	13
Figure 2 : Principaux facteurs de risque et part de la forme pulmonaire dans les 301 cas de mucormycoses enregistrés au centre national de référence des mycoses invasives et antifongiques (CNRMA) français, sur la période 2012-2018, adaptée de (25)..	14
Figure 3 : Répartition des espèces de <i>Mucorales</i> en causes dans toutes les formes de mucormycoses selon les continents dans une revue de la littérature de 851 cas de mucormycoses, extraite de (21).16	
Figure 4 : Signe du « halo inversé » (flèche noire), vue axiale sans contraste sur une image de tomодensitométrie, extraite de (51).	19
Figure 5 : Filaments de <i>Mucorales</i> dans une biopsie cérébrale après coloration de Gomori-Grocott, extraite de (56).	20
Figure 6 : Activité <i>in vitro</i> et <i>in vivo</i> sur les <i>Mucorales</i> de combinaisons entre molécules antifongiques et non-antifongiques, extraite de (109).	27
Figure 7 : Méthode de calcul du FIC index.	113
Figure 8 : Indices pharmacocinétiques/pharmacodynamiques (PK/PD).	114

Introduction

I. Contexte

1. Les mucormycoses, des infections rares mais émergentes

Les mucormycoses sont des infections fongiques invasives (IFI) dues à des champignons filamenteux de l'Ordre des *Mucorales*. Ce sont des saprophytes de l'environnement, retrouvés dans le sol et sur les matières organiques en décomposition (4–6). Ils sont caractérisés par des filaments hyalins, larges (5 à 20 μm), à bords non parallèles (7) (Figure 1A). Ces filaments sont peu ou pas septés et ramifiés à angles droits, ce qui les différencie des champignons des genres *Aspergillus sp*, *Scedosporium sp* ou *Fusarium sp*. Ces champignons se reproduisent principalement selon un mode asexué mais une reproduction sexuée est possible. Lors de la reproduction asexuée, les filaments produisent des structures appelées sporanges (Figure 1B), portées par des sporangiophores, à l'intérieur desquels vont être produites les spores (Figure 1C). Ces spores disséminent et filamentent dans l'environnement en donnant un mycélium (ensemble de filaments) dont la vitesse de croissance est très élevée (8).

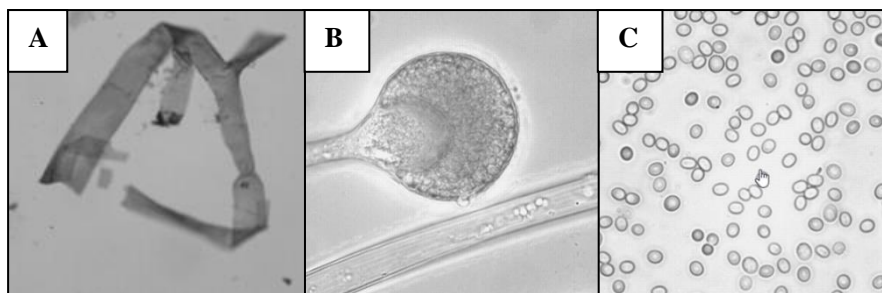


Figure 1 : A - Filaments de *Mucorales* (x 400). B - Organe de production des spores : sporange porté par un sporangiophore (x 400). C - Spores de *Mucorales* (x 1000). Adaptée de (9) et (10).

Les mucormycoses sont essentiellement diagnostiquées chez des patients présentant des facteurs de risque ou des associations de facteurs de risque. Parmi ceux-ci, les plus fréquemment retrouvés sont la neutropénie profonde, l'hyperglycémie et l'acidocétose diabétique (11,12). D'autres facteurs prédisposant sont associés aux mucormycoses invasives tels que l'utilisation de certaines thérapeutiques immunosuppressives, les traumatismes, les brûlures étendues, les états de surcharge en fer, la malnutrition ou le traitement préalable par voriconazole (13–16). En Europe, en Amérique du Nord et en Amérique du Sud, ces facteurs de risque sont principalement retrouvés chez les patients atteints d'hémopathies malignes (45 à 61% des cas), chez les patients souffrant de diabète et chez les

victimes de traumatismes (17–19). En Asie, le diabète est la maladie sous-jacente la plus souvent retrouvée (20,21).

L'incidence de ces infections est faible mais en augmentation depuis plusieurs années du fait de l'augmentation du nombre de patients immunodéprimés, de la hausse du nombre de patients diabétiques et de traitements immunosuppresseurs et chimiothérapies de plus en plus agressifs (22,23). L'incidence mondiale annuelle est estimée à plus de 10 000 cas (24). Les mucormycoses représentent 2.8% de toutes les IFI recensées par le centre national de référence des mycoses invasives et antifongiques (CNRMA) français sur la période 2012-2018, soit 301 cas (25). Il s'agit de la cinquième cause d'IFI en France (26) et la deuxième cause d'IFI à champignon filamenteux après *Aspergillus sp* sur cette même période (25).

2. La mucormycose pulmonaire, forme prédominante en France

La forme pulmonaire est la forme la plus rencontrée en France et est très associée aux patients atteints d'hémopathies malignes. D'après les données du CNRMA français, sur la période 2012-2018, sur les 301 cas de mucormycoses recensés, la forme pulmonaire était retrouvée dans plus de 50% des cas au total (52%) et était la forme majoritaire chez les patients atteints d'hémopathies malignes (71.3%) (Figure 2) (25).

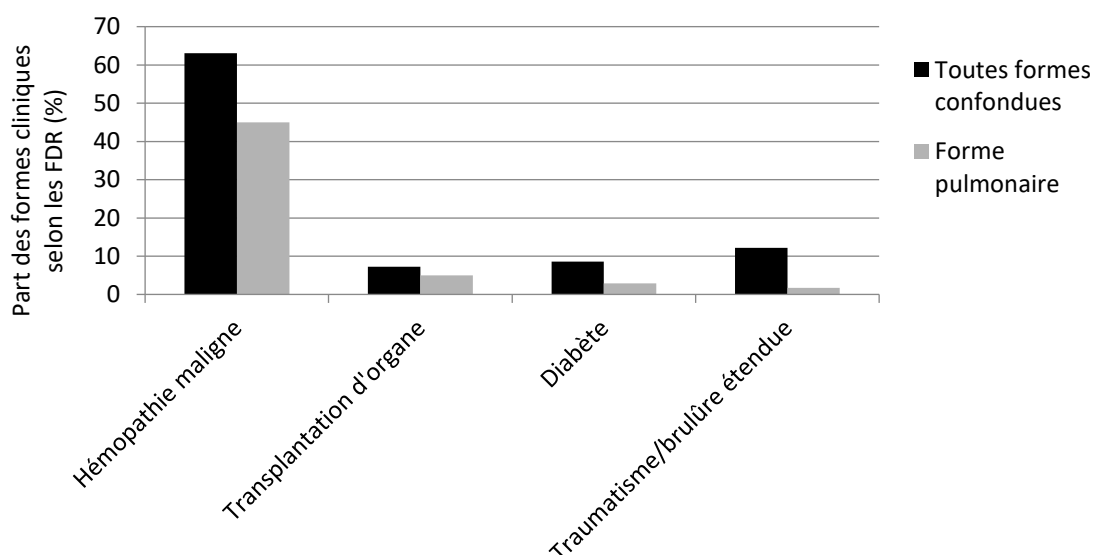


Figure 2 : Principaux facteurs de risque et part de la forme pulmonaire dans les 301 cas de mucormycoses enregistrés au centre national de référence des mycoses invasives et antifongiques (CNRMA) français, sur la période 2012-2018, adaptée de (25). FDR : facteur de risque.

Dans l'étude française RetroZygo, dont l'objectif était de décrire les caractéristiques épidémiologiques des mucormycoses en France et recensant 101 cas de mucormycoses de 2005 à 2007, 78% des formes pulmonaires étaient retrouvées chez des patients atteints d'hémopathies malignes et 44% des patients souffrant d'hémopathies malignes présentaient une forme pulmonaire (Table 1) (19).

Tableau 1 : Formes cliniques décrites suivant les principales maladies sous-jacentes retrouvées dans les 101 cas de mucormycoses de l'étude française RetroZygo, avec surligné en gris les associations fortes, adapté de (19).

Forme clinique	Nombre (%) de patients					
	Maladie hématologique (n = 50)	Diabète (n = 23)	Traumatisme (n = 18)	Greffe d'organe solide (n = 3)	Autre (n = 7)	Total (n = 101)
Pulmonaire	22 (44)	3 (13)	0	1	2	28 (28)
Rhino- cérébrale	6 (12)	16 (70)	1 (6)	0	2	25 (25)
Cutanée	4 (8)	0	15 (83)	0	1	20 (20)
Disséminée	13 (26)	2 (9)	1 (6)	1	1	18 (18)
Autre	5 (10)	2 (9)	1 (6)	1	1	10 (10)

Les autres formes fréquemment rencontrées sont la forme sinusienne, pouvant s'étendre aux cavités orbitaires voire au cerveau (forme rhino-orbito-cérébrale) et la forme cutanée (27,28). Des formes gastro-intestinales, rénales, cardiaques, cérébrales isolées ou ostéoarticulaires sont également décrites dans la littérature (23,27). Enfin, les formes disséminées surviennent le plus souvent chez les patients atteints d'hémopathies malignes, lors des neutropénies profondes et prolongées (19,21).

3. *Lichtheimia* sp, un genre dominant dans la mucormycose pulmonaire

L'Ordre des *Mucorales* comprend plusieurs genres et espèces et au moins 38 espèces ont été rapportées comme impliquées dans des infections humaines (29). Il existe une spécificité d'espèce qui varie selon la localisation géographique et la forme clinique.

Rhizopus sp est le genre le plus fréquent dans le monde. *Lichtheimia* sp est quant à lui le deuxième genre le plus fréquent en Europe (Figure 3) (21), alors qu'*Apophysomyces* sp et *Mucor* sp occupent cette place en Inde (23) et en Amérique du Nord (21) respectivement (Figure 3).

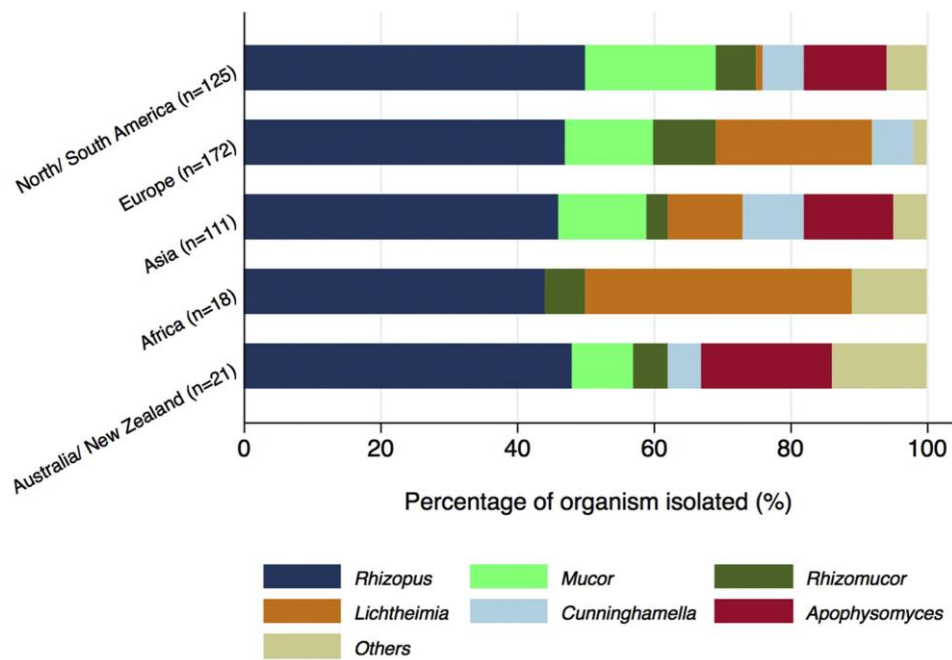


Figure 3 : Répartition des espèces de Mucorales en causes dans toutes les formes de mucormycoses selon les continents dans une revue de la littérature de 851 cas de mucormycoses, extraite de (21).

Il existe également une spécificité d'espèce selon la forme clinique, qui fait de *Lichtheimia sp*, l'un des genres les plus souvent retrouvés dans la forme pulmonaire en France (19). Il semblerait qu'il partage ce tropisme avec *Rhizomucor sp* également très fréquemment retrouvé dans la mucormycose pulmonaire en France (25). D'après les données du CNRMA, sur la période 2012 – 2018, 25% des mucormycoses des patients atteints d'hémopathies malignes étaient dues à *L. corymbifera* et 27% étaient dues à *Rhizomucor pusillus*.

4. Un rôle prépondérant des macrophages alvéolaires dans la réponse immunitaire anti-Mucorales

La porte d'entrée des *Mucorales* est essentiellement respiratoire, la faible taille de leurs spores (3-11 μm) leur permettant de pénétrer jusqu'aux alvéoles pulmonaires (5). Les macrophages alvéolaires (MA) constituent ensuite la première ligne de défense de la réponse immunitaire innée après la barrière mucociliaire. Leur action est multiple, directe et indirecte. Ils vont agir par leurs capacités de phagocytose et de « killing », notamment par l'intermédiaire de mécanismes oxydatifs (30). Ils sont également à l'interface de la réponse immunitaire innée et acquise, en permettant le

recrutement des effecteurs de l'inflammation, notamment les polynucléaires neutrophiles (PNN), par la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires (31).

La capacité des macrophages à détruire les spores de *Mucorales* dépend du stade de germination de ces spores (32). Pendant la germination, les spores de *Mucorales* passent d'un état de spores dormantes à un état de spores gonflées, ayant une taille et une activité métabolique accrues, avant de former des filaments (33). Il a été montré dans des modèles murins, que les macrophages inhibent la germination des spores dormantes mais sont incapables de les tuer alors qu'ils pourraient dégrader les spores en croissance (33,34). Les PNN n'ont pas non plus d'activité contre les spores dormantes mais induisent des dommages aux spores en croissance (30). Ces spores dormantes apparaissent résistantes aux peptides cationiques produits par les polynucléaires neutrophiles et ne déclencheraient qu'une réaction pro-inflammatoire Th1 faible et pas de réponse Th17 (35,36). Elles n'entraînent également qu'un chimiotactisme réduit vis-à-vis des PNN (37).

Après filamentation, la reconnaissance précoce des antigènes de surface des filaments dépend essentiellement des Toll-like receptors (TLR), récepteurs présents sur les macrophages et cellules dendritiques, et notamment du TLR2 (38–40). Cette reconnaissance entraîne une réaction inflammatoire Th-1 et Th-17 par production de TNF-alpha, interleukine-1-bêta (IL-1-beta) et IL-23 notamment. Les PNN détruisent les filaments via la libération de peptides cationiques et de dérivés réactifs de l'oxygène (ROS) (41), alors que les macrophages, les cellules NK et les monocytes peuvent reconnaître les filaments et les endommager mais ne les éliminent pas (33).

Le rôle de l'immunité acquise n'a que très peu été étudié mais elle jouerait également un rôle dans la lutte contre ces champignons (30). Les plaquettes pourraient également altérer les filaments et les cellules endothéliales pourraient, par l'intermédiaire de leur récepteur GRP78, phagocytter les spores (41).

En cas de dysfonction de l'immunité locale et générale, les spores vont donc filamenter et envahir les tissus. Du fait de la vitesse de croissance très élevée de ces champignons et de leur caractère hautement angioinvasif dû à leur interaction spécifique avec les cellules endothéliales (42), l'infection entraînera une atteinte rapide et sévère avec des lésions de types hémorragiques, thrombotiques et nécrotiques voire une dissémination secondaire (43). Les protéines COtH des *Mucorales* ont notamment été identifiées comme le ligand du récepteur endothélial GRP78 permettant aux *Mucorales* d'adhérer aux cellules endothéliales et responsable de leur action angioinvasive (44). Des auteurs ont également mis en évidence la liaison entre la protéine CotH7 et l'intégrine β 1 des cellules épithéliales alvéolaires qui faciliterait l'invasion cellulaire (45).

5. Une maladie de mauvais pronostic

La problématique majeure de la mucormycose pulmonaire reste la mortalité très élevée malgré les traitements (19,21) (Tableau 2). Dans l'étude RetroZygo, la mortalité était de 48% dans la forme pulmonaire, contre 25% dans les formes rhino-orbito-cérébrales et 22% dans la forme cutanée (19). De la même manière, dans une étude épidémiologique rétrospective internationale reprenant 851 cas de mucormycoses, la mortalité était de 51% dans la forme pulmonaire (21).

Tableau 2 : Mortalité selon la forme clinique de mucormycose dans deux études rétrospectives, adapté de (19) et (21).

Forme clinique	Jeong <i>et al.</i> (Monde)	Lanternier <i>et al.</i> (France)
Rhino-orbito-cérébrale	42%	25%
Localisée sinus	34%	0%
Localisée orbitale	33%	
Localisée cérébrale	69%	*
Rhino-orbitale	43%	20%
Rhino-cérébrale	75%	*
Rhino-orbito-cérébrale	67%	*
Pulmonaire	51%	48%
Localisée	50%	
Extension profonde	75%	
Cutanée	31%	22%
Localisée	31%	
Extension profonde	32%	
Disséminée	68%	79%
Gastro-intestinale	54%	
Autre	46%	

* 56% avec atteinte CNS

La mortalité importante dans la forme pulmonaire s'explique par des pathologies sous-jacentes de mauvais pronostic, une dissémination fréquente (27) et par des difficultés diagnostiques. En effet, les données du CNRMA indiquent une mortalité supérieure à 50% chez les patients présentant des hémopathies malignes (70.4%) ou chez les patients transplantés (68.4%), chez qui la forme pulmonaire est prédominante (25). Chez les patients avec d'autres terrains où cette forme est minoritaire, la mortalité est inférieure à 50%, avec 40.9% de mortalité chez les diabétiques et 36.7% chez les brûlés/accidentés. De plus, la forme disséminée qui apparaît comme la plus redoutable, avec

un pronostic très sombre, résulte le plus souvent d'une localisation primaire pulmonaire. Les formes disséminées représentaient 18% des cas dans l'étude RetroZygo, avec 79% de mortalité (19). Cette dissémination entraîne le plus fréquemment des atteintes pulmonaires, cérébrales, sinusiennes, hépatiques ou rénales (46).

6. Un diagnostic difficile

Le pronostic sombre de la mucormycose pulmonaire peut être expliqué en partie par un diagnostic difficile. Ce diagnostic repose sur l'association de facteurs d'hôte, d'arguments clinico-radiologiques compatibles et des résultats des prélèvements biologiques (biopsies, prélèvements respiratoires, prélèvements sanguins) (47,48).

Les signes cliniques de mucormycose pulmonaire sont très peu spécifiques, une fièvre persistante sous antibiothérapie accompagnée de symptômes respiratoires (toux, douleur thoracique, dyspnée, hémoptysie) sont généralement retrouvés (27,49). Un épanchement pleural et des saignements endobronchiques sont également fréquemment présents (6).

L'imagerie repose quant à elle sur la présence de nodules ou de masses, d'un épanchement pleural et du signe du « halo inversé » inconstant mais fortement évocateur (Figure 4) (50,51). Ce signe du halo est constitué d'une plage d'aspect en « verre dépoli » entourée d'un anneau de consolidation.

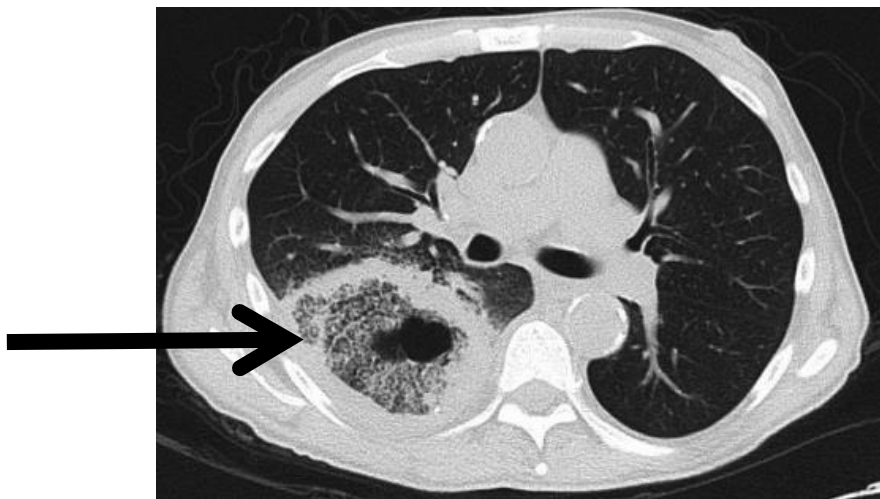


Figure 4 : Signe du « halo inversé » (flèche noire), vue axiale sans contraste sur une image de tomodensitométrie, extraite de (51).

L'analyse histopathologique permet de mettre en évidence des filaments épais (10 – 20 µm), à bords non parallèles, non ou peu septés et branchés à angle droit, à différencier d'*Aspergillus* qui forme des filaments fins, septés et branchés à angles aigus à 45° (7) (Figure 5). De par le temps de rendu, cette analyse n'est cependant pas très adaptée à l'urgence nécessaire dans la prise en charge de la mucormycose pulmonaire. L'examen direct et la culture de biopsies ou prélèvements respiratoires peuvent également être contributifs mais restent peu sensibles (15). Le séquençage peut être utilisé pour déterminer l'espèce isolée en culture, le séquençage de la région ITS (internal transcribed spacer) de l'ADN de l'ARN ribosomal 18S étant le plus fréquemment effectué (21). Le marqueur pan-fongique bêta-D-glucan est quant à lui négatif dans la mucormycose (52). Enfin, la détection de l'ADN circulant représente un excellent outil diagnostique, précoce et sensible, utilisable sur le sang ou les prélèvements respiratoires et détectant les principaux genres (*Mucor sp*, *Rhizopus sp*, *Lichtheimia sp*, *Rhizomucor sp*, *Cunninghamella sp*) (53,54), mais n'étant pas disponible dans tous les centres.

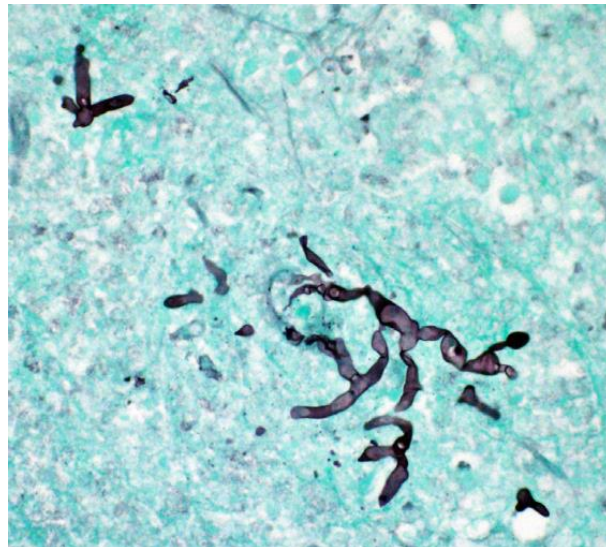


Figure 5 : Filaments de Mucorales dans une biopsie cérébrale après coloration de Gomori-Grocott, extraite de (55).

7. Un traitement curatif et une prévention peu efficaces

Le pronostic sombre de cette maladie trouve également son origine dans la faible efficacité des traitements disponibles (1) (**Revue 1 : « Mucormycosis treatment: recommendations, latest advances, and perspectives », page 28**).

Le traitement de la mucormycose repose sur une triade associant traitement antifongique, chirurgie précoce et agressive, et correction des facteurs sous-jacents (arrêt ou diminution des traitements immunosuppresseurs ou correction de l'acidocétose du diabète mal contrôlé par exemple) (1,48). Parmi ces traitements antifongiques, des nouveautés sont récemment apparus. L'isavuconazole, un antifongique triazolé à large spectre, et deux nouvelles formes galéniques du posaconazole (forme intraveineuse et forme orale à libération retardée) ont récemment été commercialisés. Ces nouvelles formes galéniques du posaconazole sont censées apporter par leur meilleure pharmacocinétique une plus grande efficacité. En effet, la première forme commercialisée du posaconazole, la solution buvable, présente une très grande variabilité interindividuelle et intraindividuelle au niveau de son absorption, notamment influencée par la composition du repas. Cependant, devant l'absence de preuves d'une supériorité vis-à-vis du traitement de référence, l'amphotéricine B (AmB), l'isavuconazole et le posaconazole ne sont pas recommandés en première intention (1,48). La chirurgie est une étape majeure à considérer quand celle-ci est réalisable. Toutefois, elle n'est pas souvent réalisable car difficile à pratiquer sur des lésions pulmonaires souvent multi-lobaires (1,56). Enfin, les stratégies adjuvantes telles que les facteurs de croissance hématopoïétiques ou l'oxygène hyperbare n'ont pas apporté de preuves de leur bénéfice chez l'animal (1,57–59), ou l'Homme (1,60–64).

L'AmB apparaît donc comme la meilleure arme malgré sa modeste efficacité (1). L'AmB est un antifongique à large spectre, de la famille des polyènes, présentant une forte affinité pour l'ergostérol, principal stérol composant les membranes fongiques. Son mécanisme d'action repose sur une altération de la perméabilité des membranes fongiques par formation de canaux transmembranaires, sur la séquestration de l'ergostérol et sur la stimulation de la production de dérivés réactifs de l'oxygène dans les cellules fongiques (65,66).

L'AmB existe sous plusieurs formes, une forme deoxycholate (AmBd), et diverses formulations lipidiques mises au point pour limiter la néphrotoxicité de l'AmB. Parmi ces formulations, la forme liposomale (AmBL) est la plus utilisée (66,67). Étant donné la très faible biodisponibilité par voie orale de l'AmB, seule une voie intraveineuse est disponible. Même si aucune étude prospective n'a comparé l'efficacité de la forme deoxycholate et de la forme liposomale, plusieurs études rétrospectives ont

montré la supériorité de l'AmBL et une toxicité rénale moindre (68,69). L'AmBL est de ce fait recommandée en première intention (1,70).

In vitro, l'AmB est la molécule la plus efficace sur la plupart des souches, excepté pour quelques souches de *Cunninghamella sp* et *Apophysomyces sp* plus sensibles au posaconazole (71,72). Les données sur la corrélation *in vitro* - *in vivo* sont cependant faibles même s'il semble y avoir un lien dans une étude de 2016 (73). Les auteurs retrouvaient un meilleur pronostic chez les patients infectés par des souches de champignons filamenteux, non-*Aspergillus*, ayant une concentration minimale inhibitrice (CMI) à l'AmB inférieure à 0.5 mg/L.

En ce qui concerne la prévention, les dernières recommandations de l'European Confederation of Medical Mycology préconisent une prophylaxie antifongique non spécifique chez les patients neutropéniques, allogreffés ou atteints de maladie du greffon contre l'hôte (48). Cette prévention repose sur le posaconazole et la prévention de la contamination par l'hospitalisation en chambre à air filtré (74). Cependant, malgré ces mesures de prophylaxie, des cas de mucormycoses surviennent (75).

8. Comment optimiser la prise en charge de la mucormycose pulmonaire ?

a. Développer des modèles expérimentaux pertinents

La faible incidence des mucormycoses, leur mortalité élevée, la variété des formes cliniques, ainsi que la multitude d'espèces rencontrées en font des maladies très complexes à étudier chez l'Homme (19). Ainsi, il n'existe que de rares études prospectives dans la littérature (76–78). Les modèles animaux sont dans ce contexte un outil indispensable à toute étude préliminaire. Il existe cependant une très grande hétérogénéité dans les modèles disponibles.

Les modèles animaux ont été développés pour trois raisons principales. Ils sont utilisés pour des études physiopathologiques permettant d'étudier les interactions hôte-champignon (79,80), pour le développement et l'évaluation d'outils diagnostiques (81) et pour tester de nouveaux traitements (82,83). L'évaluation *in vivo* de nouveaux traitements est requise après l'étude *in vitro* et avant la mise place d'essais cliniques. Les études *in vivo* permettent d'évaluer l'efficacité, la pharmacocinétique et la toxicité de nouveaux traitements (84).

De nombreux types d'animaux ont été utilisés dans ces modèles (souris, lapin, rat, cochon-d'Inde, bœuf, singe, crapaud, œuf embryonné, poisson, drosophile, vers) (85). Le modèle murin est le

plus fréquent car son utilisation se fait à un coût abordable, les souris sont faciles à manipuler et elles possèdent un fond génétique bien connu (86–89). Le modèle murin reste majoritaire dans la littérature même si les modèles insectes ou poissons, qui posent moins de considérations éthiques, sont de plus en plus utilisés (90,91). Deux types de souris sont majoritairement retrouvés dans ces modèles, les souris consanguines ou les souris non-consanguines. Les souris non consanguines ont une variabilité génétique intéressante qui imite la diversité génétique humaine (92). Néanmoins, il existe des problèmes de reproductibilité et d'homogénéité dus à une importante variabilité interindividuelle, qui nécessite d'utiliser un nombre important d'animaux pour mettre en évidence des différences. Les modèles de mucormycose sur souris non-consanguines ont été développés avec les souches CD-1 et OF1 principalement (81,93–95). Les souris consanguines ont le même bagage génétique ce qui offre plusieurs avantages (96). Elles ont une faible variabilité biologique permettant d'avoir une grande puissance pour détecter des différences, de nombreuses lignées génétiquement modifiées sont disponibles et il est possible d'identifier des gènes et allèles responsables de différences phénotypiques. Le principal problème des lignées consanguines est cependant l'extrapolation des résultats d'une souche de souris à une autre. Les souris BALB/c ont été les plus utilisées parmi les souris consanguines (84,97,98). Le sexe des souris influencera également les caractéristiques du modèle. Le sexe masculin est ainsi un facteur de risque pour toutes les IFI, y compris la mucormycose (19). De plus, il a été prouvé dans certains modèles animaux de maladies fongiques invasives que les hormones féminines jouent un rôle protecteur (99).

La posologie du traitement sous-jacent immunosuppresseur influence également les résultats des modèles en impactant de façon plus ou moins importante l'immunodépression et la survie des animaux. Les modèles pulmonaires de mucormycose sont le plus souvent induit avec du cyclophosphamide (CPA) et des corticoïdes (85).

La voie d'inoculation doit également être soigneusement choisie. Les modèles de mucormycose pulmonaire sont généralement induit par voie intratrachéale ou par voie intranasale (84,85,95). Bien que la voie intranasale semble être plus proche de la voie de contamination naturelle, l'inoculation intratrachéale offre plus d'avantages. La suspension de spores est ainsi délivrée directement dans les poumons permettant un meilleur contrôle de l'inoculum et une meilleure reproductibilité. Il est à noter que les modèles pulmonaires peuvent conduire à une dissémination secondaire. En effet, certains auteurs ont détecté le champignon dans le cerveau et les reins des souris après une inoculation intranasale ou intratrachéale (95,100).

L'une des problématiques majeures pour la reproductibilité et la comparaison entre les études est l'absence de souches de référence pour la majorité des espèces de *Mucorales*. L'utilisation de souches cliniques non standardisées engendre des différences de virulence entre souches d'une même

espèce. Certaines souches sont issues de patients ayant été exposés à des conditions modifiant la virulence des souches comme un traitement par voriconazole par exemple, reconnu pour augmenter la virulence des *Mucorales* (101).

Etant donné la grande variabilité des formes de mucormycoses, il apparaît essentiel de développer des modèles dont le design (facteur sous-jacent, voie d'infection, espèce de *Mucorales*) est adapté aux questions spécifiquement posées. De plus, il semble indispensable de caractériser ces modèles sur le plan histologique et immunitaire pour les utiliser au mieux. Ces modèles doivent permettre d'étudier la relation champignon-hôte-antifongique dont la compréhension est primordiale pour améliorer la prise en charge de cette maladie (102).

b. Comprendre l'impact des corticoïdes sur la fonction phagocytaire

Les facteurs de risque de mucormycoses ne sont que partiellement explorés. Comme évoqué précédemment, les hémopathies malignes représentent les pathologies sous-jacentes les plus fréquentes dans la mucormycose pulmonaire (17,19). Les thérapeutiques à base d'agents cytopéniants, utilisés dans la prise en charge de ces maladies, entraînent une neutropénie qui est clairement identifiée comme un facteur de risque majeur de l'infection et est directement dû à l'absence de PNN pour contenir l'infection. Cependant, il se pourrait qu'au-delà de la neutropénie, certaines thérapeutiques favorisent également ce type d'infection sans passer par un mécanisme de type neutropéniant. Il existe par exemple dans le diabète un déficit qualitatif des cellules immunitaires avec un défaut d'attachement des macrophages sur les hyphes (34). L'utilisation de corticoïdes, fréquemment retrouvée chez les patients souffrant d'hémopathies malignes et atteints de mucormycose pulmonaire (30 à 50%) (16,21) (Tableau 3), pourrait exercer un effet de ce type (103).

Tableau 3 : Maladies sous-jacentes et facteurs prédisposant retrouvés dans une revue de la littérature de 851 cas de mucormycoses, adapté de (21).

Variabes	n (%)
Conditions sous-jacentes	
Diabètes	340 (40%)
Hémopathie maligne	275 (33%)
Transplantation d'organe solide	116 (14%)
Transplantation de CSH	90 (11%)
Maladie hépatique	27 (3%)
Autre condition sous-jacente	51 (6%)
Pas de condition sous-jacente	156 (18%)
Facteur prédisposant	
Utilisation de corticoïdes	273 (33%)
Neutropénie	169 (20%)
Traumatisme majeur	85 (10%)
Traumatisme mineur	81 (10%)
Utilisation de chimiothérapie anti-cancéreuse	149 (18%)
Utilisation d'inhibiteur de calcineurine	133 (16%)
Utilisation d'immunothérapie	60 (7%)
Utilisation d'immunosuppresseur pour greffe rénale	27 (3%)
Autre facteur prédisposant	19 (2%)
Prophylaxie antifongique antérieure	92 (11%)

Les MA étant la première ligne de défense dans la forme pulmonaire, il semblerait pertinent d'étudier les effets qu'induisent les corticoïdes sur les fonctions macrophagiques. Il a déjà été démontré que les corticoïdes diminuent la phagocytose, la synthèse des ROS et la synthèse des cytokines pro-inflammatoires (104). Cependant, ce déficit fonctionnel induit par la corticothérapie n'a été que très peu étudié dans le cas des infections à *Mucorales*. La compréhension de ce facteur de risque pourrait permettre de le prévenir et ainsi d'améliorer la prise en charge des mucormycoses.

c. Étudier et prévenir le phénomène de réactivation

Un nouveau concept physiopathologique pourrait compliquer la prise en charge des mucormycoses et expliquer l'efficacité incomplète de la prophylaxie. Les *Mucorales* seraient capables de se réactiver chez les patients, au moment de leur immunosuppression, après des périodes de

latence asymptomatiques dont le délai est inconnu (2) (**Revue 2 : « Reactivation of dormant/latent fungal infection », page 37**).

À l'image de certaines autres maladies, telles que la tuberculose ou l'histoplasmosse, les spores de *Mucorales* seraient capables d'infecter des individus immunocompétents qui resteraient asymptomatiques, puis d'entrer en latence chez ces individus, selon des modalités pour l'instant inconnues (2). En cas de baisse de l'immunité, lors d'une chimiothérapie par exemple, elles pourraient se réactiver et entraîner une mucormycose. Ce phénomène est complexe à confirmer chez l'Homme mais les preuves associées aux modèles animaux et les cas de mucormycoses sous prophylaxie, en chambre à air filtré, sont très évocateurs.

Si les *Mucorales* sont capables de se réactiver après une période de latence, la protection par air filtré serait inefficace chez une partie des patients qui pourraient se contaminer avant leur entrée en secteur protégé. Dans ce cas, l'élimination, si elle est possible, du champignon à l'état dormant ou colonisant à l'entrée en hospitalisation, pourrait prévenir la survenue ultérieure de la maladie.

d. Rechercher des combinaisons antifongiques synergiques

Plusieurs axes d'améliorations de la thérapeutique à base d'AmB sont actuellement à l'étude (1). L'idée d'utiliser des combinaisons d'antifongiques apparaissait comme judicieuse mais n'a pas montré de supériorité par rapport à la monothérapie dans les études publiées (1). D'autres auteurs se sont donc intéressés à l'optimisation des antifongiques par association à des traitements ou adjuvants sans effet antifongique propre. Parmi ceux-ci, plusieurs ont montré des effets potentialisant *in vitro* et *in vivo* sur l'activité de l'AmB (Figure 6) (1).

Une des combinaisons les plus efficaces *in vitro* et *in vivo* chez la souris est celle associant AmB et inhibiteurs de calcineurine (ciclosporine et tacrolimus) ou de mTor (sirolimus) (105,106). Le caractère immunosuppresseur de ces traitements est cependant un problème dans le cadre d'une maladie accentuée par l'immunodépression. D'autres combinaisons ont également eu un développement freiné par diverses problématiques. Par exemple, le MGCD290, un antifongique inhibiteur d'histone désacétylase, dont l'effet semble synergique avec le posaconazole n'est pas encore validé pour l'usage chez l'homme (107). La lovastatine (hypolipidémiant de la famille des statines) est quant à elle synergique avec le voriconazole, cependant ce dernier augmenterait la virulence des *Mucorales* (101). Enfin, l'une des associations les plus prometteuses *in vitro* et *in vivo* chez l'animal, celle de l'AmB avec les chélateurs du fer (déférasirox et déféripone), s'est révélée être un échec lors d'une étude clinique, même si la méthodologie de cette étude reste critiquable (76). En

effet, les deux bras de cette étude ne comportaient pas les mêmes populations, avec des patients de plus mauvais pronostic dans le groupe traité par chélateur du fer.

	SLM	CyA	TLM	AmB	CFG	MFG	PCZ	ISZ	RCZ	ITZ	VCZ	FCZ	DFX	MGC	NKM	CPZ	TPZ	LST	MFS	RFP	TFX	CFX	
SLM	■			S	I		A	I	I	I													
CyA		■		S	S		S	I															
TLM			■	I	I		I	S/I	I	I													
AmB				■												A	S			S			
CFG					■																		
MFG				S*		■									I								
PCZ			S				■							S						S/I			
ISZ								■															
RCZ									■														
ITZ										■													
VCZ											■			S					S	I			
FCZ												■		I									
DFX				S*			S						■										
MGC														■									
NKM															■								
CPZ																■							
TPZ																	■						
LST											S							■					
MFS																			■				
RFP																				■			
TFX													S								■		
CFX												S										■	

Figure 6 : Activité *in vitro* et *in vivo* sur les *Mucorales* de combinaisons entre molécules antifongiques et non-antifongiques, extraite de (108).

S, synergie; I, indifférence; A, antagonisme; S/I, 50% synergie et 50% indifférence

AmB, amphotéricine B; CFG, caspofungine; FCZ, fluconazole; ISZ, isavuconazole; ITZ, itraconazole; MFG, micafungine; PCZ, posaconazole ; RCZ, ravuconazole; VCZ, voriconazole

CFX, ciprofloxacine; CPZ, chlorpromazine; CyA, ciclosporine A; DFX, deferasirox; LST, lovastatine; MFS, miltefosine; MGC, MGCD290; NKM, nikkomycine Z; RFP, rifampicine; SLM, sirolimus; TFX, trovafloxacine; TLM, tacrolimus; TPZ, trifluoperazine.

Cette voie de recherche doit être poursuivie pour tenter d'optimiser l'utilisation de l'AmB, molécule la plus puissante disponible actuellement dans le traitement des mucormycoses (108).

II. Revues

Revue 1 : « Mucormycosis treatment: recommendations, latest advances, and perspectives » (1).

- **Revue publiée : Brunet K, Rammaert B. Mucormycosis treatment: Recommendations, latest advances, and perspectives. J Mycol Med. 20 juin 2020;101007 (1).**

Résumé en français :

Les mucormycoses sont des infections fongiques graves affectant les patients immunodéprimés et diabétiques. Malgré le traitement, la mortalité due à ces infections reste élevée. Cette revue présente les dernières avancées sur la prise en charge des mucormycoses. Les dernières recommandations préconisent fortement l'utilisation d'amphotéricine B liposomale en première intention, associée à la chirurgie lorsque cela est possible. L'isavuconazole et la forme intraveineuse ou à libération retardée du posaconazole sont quant à elles positionnées en seconde ligne. Plusieurs molécules sont actuellement en développement pour lutter contre ces infections fongiques invasives mais peu ont démontré leur efficacité. Malgré une efficacité *in vitro*, les associations de traitements antifongiques n'ont quant à elles pas montré de supériorité vis-à-vis de la monothérapie. Enfin, l'intérêt des thérapies adjuvantes est particulièrement complexe à démontrer en l'absence d'études prospectives randomisées, complexes à mettre en place devant la faible incidence et la forte mortalité des mucormycoses. Les perspectives sont cependant encourageantes. De nouvelles approches utilisant la relation champignon-hôte-antifongique ou le développement de nouvelles voies d'administration des antifongiques, comme les aérosols, pourraient en effet améliorer le traitement.



Available online at
ScienceDirect
www.sciencedirect.com

Elsevier Masson France
EM|consulte
www.em-consulte.com



General review

Mucormycosis treatment: Recommendations, latest advances, and perspectives

K. Brunet^{a,b,c,*}, B. Rammaert^{a,b,d}

^aINSERM U1070, Poitiers, France

^bFaculté de médecine et pharmacie, université de Poitiers, Poitiers, France

^cService de mycologie-parasitologie, département des agents infectieux, CHU de Poitiers, Poitiers, France

^dService de maladies infectieuses et tropicales, CHU de Poitiers, Poitiers, France

ARTICLE INFO

Article history:

Received 13 January 2020

Accepted 15 June 2020

Available online 20 June 2020

Keywords:

Mucorales

Antifungal drugs

Nebulization

Polyenes

Azoles

Prophylaxis

ABSTRACT

Mucormycosis are life-threatening fungal infections especially affecting immunocompromised or diabetic patients. Despite treatment, mortality remains high (from 32 to 70% according to organ involvement). This review provides an update on mucormycosis management. The latest recommendations strongly recommend as first-line therapy the use of liposomal amphotericin B (≥ 5 mg/kg) combined with surgery whenever possible. Isavuconazole and intravenous or delayed-release tablet forms of posaconazole have remained second-line. Many molecules are currently in development to fight against invasive fungal diseases but few have demonstrated efficacy against *Mucorales*. Despite *in vitro* efficacy, combinations of treatment have failed to demonstrate superiority versus monotherapy. Adjuvant therapies are particularly complex to evaluate without prospective randomized controlled studies, which are complex to perform due to low incidence rate and high mortality of mucormycosis. Perspectives are nonetheless encouraging. New approaches assessing relationships between host, fungi, and antifungal drugs, and new routes of administration such as aerosols could improve mucormycosis treatment.

© 2020 Elsevier Masson SAS. All rights reserved.

1. Introduction

Mucormycosis are life-threatening invasive fungal diseases (IFD) due to fungi belonging to *Mucorales* order [1]. Mucormycosis lead to many clinical manifestations, ranging from localized to disseminated infection. Pulmonary or disseminated diseases are commonly found in immunosuppressed patients (hematological malignancy, hematopoietic stem cell transplantation), rhino-orbito-cerebral form in diabetic patients, and cutaneous forms in patients having trauma [2]. Other localizations (gastrointestinal, endocarditis, osteoarticular or isolated cerebral infections) are less frequent. Treatment is based on surgery when possible, correction of underlying factors, and aggressive antifungal drug therapy [3]. In contrast to other fungi, few molecules are active. Amphotericin B (AmB), posaconazole (PSZ), and isavuconazole (ISZ) have shown *in vitro* efficacy while voriconazole (VCZ) and echinocandins are inefficient [4,5]. The reference method for antifungal susceptibility testing (AST) is broth microdilution

method with the methodology of the European Committee for Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) [6] or the Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) [7]. However, a major concern with AST is the lack of clinical breakpoints. Prognosis remains poor, mortality ranging from 32 to 70%, and is linked to underlying diseases and clinical forms [2]. Therapeutic improvement is therefore mandatory [8]. The aim of this review is to focus on latest recommendations, advances and perspectives on mucormycosis treatment.

2. Recent and new antifungal drugs

2.1. Current recommendations

The European Conference on Infections in Leukemia (ECIL) published mucormycosis treatment guidelines in 2017 [9] and the European Confederation of Medical Mycology (ECMM) provided an update in 2019 [10]. Both societies strongly recommend liposomal Amphotericin B (L-AmB) for first-line treatment in adults (A II) (Table 1). Another lipid formulation, Amphotericin B lipid complex (ABLC) could be used in mucormycosis but without central nervous system (CNS) involvement according to the ECIL (B II) [9]. For

* Corresponding author at: INSERM U 1070, pôle biologie santé, UFR de médecine et pharmacie, université de poitiers, 1, rue Georges-Bonnet, 86022 Poitiers cedex, France.

E-mail address: kevin.brunet@univ-poitiers.fr (K. Brunet).

neonates and pediatric population, L-AmB and ABLC were strongly recommended as first-line treatment (A II) [10].

One issue to be addressed is the dose regimen of L-AmB. The ECMM recommends 5–10 mg/kg and 10 mg/kg in the event of CNS involvement [10]. In a prospective pilot study (Ambizygo), high doses of L-AmB were tested as first-line treatment of mucormycosis [11]. Response rate was 43% (12/28) in patients who received ≥ 7.5 mg/kg/day during the first week compared with 0% (0/5) in patients who did not. A high dose of L-AmB (10 mg/kg), combined with surgery in 71% of cases, led to an overall response rate of 36% at week 4 and 45% at week 12. Compared to another study using L-AmB ≥ 5 mg/kg in mucormycosis treatment, response was similar at week 4 (36% vs 40%) but was better at week 12 (45% vs 35%) [12]. Mortality rates were equivalent at week 12 (38% vs 42%). A major side effect with L-AmB high dose was creatinine level doubling in 40% of patients.

The ECMM recommended dose should not be slowly increased over several days but a full dose must be given from the first day of daily treatment [10].

ISZ per os (PO) or intravenous (IV), PSZ delayed-release (DR) tablets or IV forms have been recommended with moderate strength (B II) and PSZ oral suspension have been marginally recommended (C II) [10]. Moreover, the ECMM strongly discouraged the use of AmB deoxycholate (AmBd) (D II).

Treatment should be started as soon as possible, as delayed AmB therapy is linked to increased mortality [13]. Moreover, it must be continued until complete response on imaging and permanent reversal of immunosuppression [10]. Treatment duration necessary to treat mucormycosis is unknown and further studies are needed to better determine it. To facilitate treatment in stable disease, ISZ PO or PSZ DR tablets are strongly recommended. Time between induction phase with AmB and introduction of azoles depends on clinical and imaging responses. Some authors recommend at least 3 weeks of induction with parenteral AmB [14].

The ECMM has addressed recommendations concerning prophylaxis (Table 2). In neutropenic or GvHD, PSZ DR tablets or IV form are moderately supported (B II, B III) and PSZ oral suspension marginally recommended (C II) while ISZ is marginally supported in neutropenic patients (C II). Finally, in solid organ transplant (SOT) recipients, PSZ and ISZ are marginally recommended in prophylaxis (C III, C II).

2.2. Recent drugs

ISZ, a new azole, was approved in the United States and in Europe in 2015 for the treatment of mucormycosis [3,15]. ISZ is available in oral and IV formulations, and presents some advantages: linear pharmacokinetics, few interactions with cytochrome P450 isoenzymes leading to few drug–drug interactions, QT decrease, no nephrotoxic cyclodextrin in the IV formulation (different from posaconazole IV form), no need for dose adjustment in kidney or liver failure and in obesity, and excellent oral bioavailability with no food requirements [3]. Although ISZ has shown higher minimal inhibitory concentrations (MIC) than posaconazole [16], it is demonstrably as effective as AmB to decrease fungal burden and to improve survival in a neutropenic mouse model of mucormycosis [17]. ISZ was tested in VITAL study, a phase 3, single-arm, open-label, non-comparative study. This study assessed safety and efficacy of ISZ in the treatment of mucormycosis [18]. Case-control analysis with historic controls treated with AmB included in the Fungiscope registry showed similar survival benefit. However, some biases are noticeable. A total of 21 patients treated with ISZ were compared to 33 matched controls who had received AmB. AmB was administered through AmBd formulation in 7 controls. This formulation is appreciably less efficient than the liposomal one. Other drawbacks could be

emphasized in the use of ISZ. Breakthrough *Mucorales* infections in patients receiving ISZ have been reported [19]. Moreover, some authors have shown in *Drosophila* model of mucormycosis that preexposure to ISZ enhances the virulence of *Mucorales* [20,21]. In a large study including 147 patients, ISZ prophylaxis was less effective than VCZ or PSZ against IFD. Two patients who received ISZ as prophylaxis presented mucormycosis [22]. Although ISZ seems to be less hepatotoxic than other mould-active azoles and present a better tolerance profile than L-AmB [23], the ECMM recommends only moderately ISZ as first-line treatment [10].

Regarding central nervous system (CNS) infections, treatment is based on L-AmB due to clinical experience and *in vitro* data [24]. It has been demonstrated that ISZ penetrates the blood-brain barrier in animal models [25], while AmB displays limited penetration. Concentration of ISZ in the necrotic center of brain abscess has been shown low, but concentration in inflammatory brain tissue surrounding the abscess was adequate, equivalent to predicted plasma concentration [26]. A recent retrospective study has shown that ISZ is effective in *Mucorales* CNS infections [27]. This result has to be confirmed with larger studies.

IV and DR tablets of PSZ were recently developed and lead to better bioavailability and drug exposure than previous oral solution [28–30]. This increased drug exposure has been related to increased PSZ efficiency [31]. Moreover, DR tablets lead to less variability in absorption and compared to oral suspension are not affected by food [32]. Due to higher serum level, suspension DR tablets and IV forms are moderately recommended while oral suspension is only marginally recommended by the ECMM as first-line treatment [10]. There is no safety concern compared to oral suspension for the two new forms, since there is no correlation between serum level and safety [29–32]. However, IV form is solubilized in cyclodextrin and may lead to renal issues [31]. In a matched-paired analysis of patients treated for invasive mucormycosis, new formulations of PSZ were evaluated [33]. The authors showed that PSZ new formulations are as effective as AmB as first-line treatment and as oral suspension in salvage therapy. However, these results should be interpreted with caution. Numerous biases can be noted such as small sample size, retrospective design, heterogeneity of infectious sites, lack of drug monitoring, and pre-exposure to other antifungal drugs.

Routine therapeutic drug monitoring (TDM) is strongly recommended for patients treated by PSZ [10]. Serum trough PSZ concentrations of 1 mg/L or higher are recommended. However, there is currently no conclusive evidence for routine TDM with ISZ. It could be useful in case of suspected toxicity, treatment failure, drug interactions, obesity, or after a switch from IV to PO therapy [10].

2.3. New drugs

Some new antifungal drugs are under clinical evaluation include Rezafungin, SCY-078, orlofom, and enochleated amphotericin B [34]. Rezafungin, a new echinocandin has not been tested against *Mucorales*. SCY-078, member of a new glucan synthase inhibitor subclass is poorly or not active against *Mucorales* [35]. Olorofom is a member of the orotomides, a new antifungal class inhibiting dihydroorotate dehydrogenase (DHODH), a key enzyme in pyrimidine biosynthesis. It is also poorly active against *Mucorales* [36]. Enochleated amphotericin B is a new oral formulation of amphotericin B [34]. It has been shown to be well-tolerated, and is currently tested for cryptococcosis treatment in developing countries (clinical trial NCT04031833). No studies on *Mucorales* efficacy are available.

Other antifungal drugs with activity against *Mucorales* are being developed. VT-1161 is a novel inhibitor of the fungal CYP 51 with *in vitro* activity against *Mucorales*. VT-1161 used as curative or

Table 1

Recommendations for treatment of invasive mucormycosis from European Conference on Infections in Leukemia 6 (ECIL-6) (2017) and European Confederation of Medical Mycology (ECMM) (2019), adapted from [9,10].

	ECIL-6 2017	Grade	ECMM 2019	Grade
First-line antifungal therapy				
Liposomal amphotericin B	5 mg/kg	B II	5–10 mg/kg	A II
Amphotericin B lipid complex	Without CNS involvement	B II	For CNS involvement: 10 mg/kg Any without CNS involvement SOT: 10 mg/kg	A III B II A III
Amphotericin B deoxycholate		C II		D II
Posaconazole		C III	DR tablet or IV: 300 mg b.i.d, day 1; 300 mg/d from day 2	B II
Isavuconazole			Oral suspension (4 × 200 mg or 2 × 400 mg)	C II
Combination therapy		C III	200 mg t.i.d, day 1–2; 200 mg/d from day 3 Liposomal amphotericin B + caspofungin and/or posaconazole	B II C II - C III
Control of underlying conditions				
Diabetes	Control of diabetes	A II	Control of hyperglycaemia and Ketoacidosis	A III
Immuno-suppression	Discontinuation/tapering of steroids, reduction of immunosuppressive therapy	A II	Rapidly taper glucocorticosteroid dose to discontinue, if feasible, or reduce dose to minimum required	A II
Surgery				
	Rhino-orbito-cerebral infection	A II	Repeated surgery in addition to antifungal treatment	A II
	Soft tissue infection	A II		
	Localized pulmonary lesion	B III		
	Disseminated infection	C III		

SOT: solid organ transplantation; CNS: central nervous system; DR: delayed-release; IV: intravenous; b.i.d: twice a day; t.i.d: three times a day.

Table 2

Prophylaxis recommendation from European Confederation of Medical Mycology (ECMM) (2019), adapted from [10].

ECMM 2019	Grade
Primary	
Neutropenic, GvHD	
Posaconazole DR tablet (300 mg b.i.d day1, 300 mg/d from day2)	B II
Posaconazole IV (300 mg b.i.d day1, 300 mg/d from day2)	B III
Posaconazole oral suspension (200 mg t.i.d)	C II
Neutropenic	
Isavuconazole PO or IV (200 mg t.i.d day1–2, 200 mg/d from day3; or 200 mg/d from day1)	C II
SOT	
Isavuconazole PO/IV (200 mg t.i.d day1–2, 200 mg/d from day3; or 200 mg/d from day1)	C II
Posaconazole IV (300 mg b.i.d day1, 300 mg/d from day2)	C III
Posaconazole oral suspension (200 mg t.i.d)	C III
All induction chemotherapy	
Liposomal amphotericin B	D I
Neutropenic or GvHD	
Fluconazole, itraconazole, voriconazole	D II
Secondary	
Last effective drug in the same patient	A III

SOT: solid organ transplantation. DR: delayed-release. IV: intravenous. PO: per os. GvHD: graft versus host disease. d: day. b.i.d: twice a day. t.i.d: three times a day.

prophylactic treatment has prolonged survival of neutropenic mice in *Rhizopus arrhizus* models [37,38]. SCH 42427 a broad-spectrum triazole was found to be effective in a murine model [39]. APX001A (Fosmanogepix) (formerly E1210) is an antifungal agent targeting protein Gwt1. Gwt1 is a surface protein of the glycosylphosphatidylinositol post-translational modification pathway. Although MICs against *Mucorales* are high [40,41], several authors have shown that APX001A is as effective as AmB to protect mice in a *R. delamar* model [3,42]. Finally, PC1244 a new long-acting fungicidal azole, has shown antifungal activity against *Mucorales* with MICs from 0.25 to 2 mg/L [43] but has not been tested *in vivo*. Among antibiotics, colistin has presented modest *in vitro* and *in vivo* activity against *Mucorales* [44].

2.4. New therapeutic approaches

New approaches have recently emerged regarding relationship between fungus, antifungal agent, and host [45]. For example, some authors have emphasized the capacity of PSZ to accumulate within leukocyte membrane due to its lipophilic properties. Cells from HL-60 leukemia cell line differentiated to neutrophil-like phenotype have been loaded with PSZ and used in an aspergillosis mouse model to deliver PSZ directly to the infectious site [46]. However, this new approach has not been tested in a *Mucorales* model. Bioengineering has made great improvement, especially in genetically modified cytotoxic T-cells. These modified cells can specifically target beta-glucan of fungus cell wall [47]. However, this approach has only been tested in an aspergillosis model.

Recently, a *Mucorales* peptide named Coth3 was found to be linked to mucormycosis endothelial invasion by binding the endothelial cell receptor GRP78. Authors generated antibodies against Coth3 to prevent endothelial invasion. Anti-Coth3 antibodies protected neutropenic and diabetic mice from mucormycosis and acted synergistically with antifungal drugs [48]. Moreover, other authors have shown that blocking GRP78 cell receptor by GRP78-specific immune serum may protect diabetic mice from mucormycosis [49]. This peptide-receptor interaction may be a new therapeutic way of research.

2.5. New concepts may guide antifungal prophylaxis

Several authors have hypothesized that *Mucorales*, such as *Histoplasma* sp. or *Cryptococcus* sp., can remain latent in immunocompetent patients and lead to active disease when a patient becomes immunosuppressed [50,51]. Authors have shown that *Mucorales* spores might remain dormant in cutaneous granulomatous lesions in an immunocompetent rabbit model [52] and inside innate granuloma in a Zebrafish model [51]. In the event of immunodepression, spores were reactivated. In a murine model of latent mucormycosis, L-AmB was effective to prevent reactivation in *Lichtheimia corymbifera* colonized mice [53]. This concept must be verified in human to evaluate if decolonization of

Table 3
Adjunctive therapy recommendations for treatment of invasive mucormycosis from European Conference on Infections in Leukemia 6 (ECIL-6) (2017) and European Confederation of Medical Mycology (ECMM) (2019), adapted from [9,10].

ECIL-6 2017		ECMM 2019	
Adjunctive therapy			
Against use of deferasirox	All	Deferasirox (other than haematology)	C II
		Deferasirox (haematology)	D II
		Deferoxamine	D II
Hyperbaric oxygen	C III	Exposure to 100% hyperbaric oxygen (haematology)	C II
		Exposure to 100% hyperbaric oxygen (diabetes)	B II
Hematopoietic growth factor if neutropenia	A II	G-CSF (haematology, ongoing neutropenia)	B II
		Granulocyte transfusion (haematology, ongoing neutropenia)	C II
		Granulocyte transfusion + IFN γ 1b (haematology, ongoing neutropenia)	C III
		GM-CSF (diabetes)	C III
		Adoptive immunotherapy, T cells generated in response to <i>R. arrhizus</i> antigens	C III
		Nivolumab + interferon- γ	C III

G-CSF: granulocyte colony stimulating factor; GM-CSF: granulocyte macrophage colony stimulating factor.

patients before immunosuppression could reduce the risk of reactivation.

3. Combinations

Combination are not currently recommended for first-line therapy due to lack of evidence of their efficacy (C II, C III) (Table 1) [54]. They could nonetheless represent a major way of increasing antifungal treatment efficacy [55].

Combinations of antifungal agents have been largely tested *in vitro*. Most combinations were indifferent, except for AmB + caspofungin (CAS), PSZ + CAS and ISZ + CAS, which were synergistic [55–57]. For azoles + echinocandins, few *in vivo* studies have been performed, showing lack of synergy [58,59]. Among AmB + echinocandins, more data are available *in vivo*. *In vitro* data have been confirmed in a ketoacidotic mouse model where L-AmB and echinocandins (micafungin and anidulafungin) appeared synergistic [60]. Combination of L-AmB and echinocandins prolonged survival and decreased fungal burden of mice in an IV model of *R. arrhizus* infection. These data were confirmed with ABLC + caspofungin in a ketoacidotic mouse model with improvement of survival but without fungal clearance in organs [61]. Case reports of combinations have been published and five retrospective clinical studies have been performed on antifungal combinations. AmB + CAS and/or PSZ combinations have been evaluated. Four of the five studies showed indifference [62–65] and one showed synergy [66]. However, the latter included only rhino-orbito-cerebral forms and a small number of patients.

Some non-antifungal agents combined with antifungals drugs have shown interesting synergy. Iron chelators have shown high synergy with antifungal drugs *in vitro* and *in vivo* [59,67,68], but this has not been confirmed in patients [12]. Calcineurin inhibitors (cyclosporine A and tacrolimus), which have immunosuppressive effects, have shown synergy with AmB, PSZ or ISZ *in vitro* and *in vivo* [69–71]. Other agents such as MGCD290 (a Hos2 Histone Deacetylase Inhibitor), not yet FDA-approved, have shown synergy *in vitro* with PSZ [72]. Although lovastatin has shown synergy *in vitro* and *in vivo* with voriconazole [73], the latter is known to enhance *Mucorales* virulence [21]. Ciprofloxacin and fluconazole have shown synergy in mouse models [74], while miltefosine and azoles, and rifampicine and AmB have presented synergistic effects *in vitro* on $\leq 50\%$ [75] and 56 to 83% [76,77] of tested strains respectively.

Randomized, placebo-controlled clinical trials are needed to determine combination therapy efficacy [78]. Added toxicity, drug interactions, and cost-benefit balance of combinations remain unclear [10].

4. Adjunctive treatment

4.1. Current recommendations

The ECMM and the ECIL-6 strongly recommend surgery and control of underlying disease including management of ketoacidosis and hyperglycemia in diabetic patients, modulation of corticosteroids and immunosuppressive drugs, and reduction of neutropenia duration using hematopoietic growth factor if possible (A II, All) (Table 3) [9,10]. Granulocyte colony-stimulating factor (G CSF) and hyperbaric oxygen are moderately recommended in case of neutropenia and in diabetic patients respectively (B II), while iron chelators are strongly discouraged.

4.2. Surgery

Surgery remains easier to perform in rhino-orbital or cutaneous localizations than in cerebral, pulmonary or disseminated disease. Surgery is precluded in critical ill patients [79]. In patients with unifocal pulmonary mucormycosis, lobectomy or pneumonectomy have provided benefit [80]. However, in case of multifocal or close to great vessels lesions, benefit is less established and surgery is most complicated to perform. In rhino-orbito-cerebral forms, surgery is strongly linked to treatment outcome [81,82]. In a clinico-epidemiological review over 10 years, surgery was performed in 65.2% of 184 patients but only in 21.4% of hematological patients [83]. Surgical debridement in combination with medical therapy was associated with a better outcome than medical therapy only. Attention must be paid to the fact that only retrospective studies and epidemiological data are available. However, the benefits of surgery are presumed and is highly recommended whenever possible (A II) [10].

4.3. Adjunctive therapies

Adjunctive therapy is used to reverse immunosuppression. Granulocyte (macrophage) colony-stimulating factor (G(M)-CSF) or interferon- γ increases the activity of granulocytes against *Mucorales* such as hyphae damage [84,85]. However, several authors have shown that G-CSF or GM-CSF did not improve antifungal activity of PSZ or L-AmB in a neutropenic murine model [86,87]. Clinical data on this topic are very poor and few cases are published [88–91]. Clear benefit has yet to be established.

Iron chelators have been tested in adjunctive therapy as means of reducing iron availability and thereby inhibiting fungal growth. Deferoxamine, an iron chelator, has been associated with increased mucormycosis incidence. Deferoxamine acts as a xenosiderophore, whereas the two other iron chelators, deferiprone and deferasirox,

do not [92]. Ibrahim et al. have shown that deferasiprone protected diabetic mice from mucormycosis [93]. Deferasirox shared the same effect in diabetic and neutropenic mice and acted synergistically with AmB [67]. Triple therapy using L-AmB, micafungin, and deferasirox was also found to be effective [68]. Moreover, deferasirox increased PSZ activity in a neutropenic mouse model [59]. These promising results led to a clinical study assessing deferasirox + LAmB efficacy [12]. However, patients with mucormycosis treated with deferasirox + L-AmB had a higher mortality rate at 90 days than patients treated with L-AmB alone. However, patients treated with deferasirox had more active malignancy, neutropenia and corticosteroid therapy compared to the placebo group. Population imbalance between deferasirox and placebo groups did not allow for clear conclusions. Unlike iron chelators, zinc chelators have not shown synergy with AmB and have shown poor synergy with PSZ [94].

Hyperbaric oxygen treatment has been shown to deploy direct antimicrobial activity. It exerts a synergistic effect with antimicrobial agents, and enhances cellular immune system and tissue repair in some infectious diseases [95]. In a mucormycosis mouse model, addition of hyperbaric oxygen to AmB did not improve survival [96]. However, in this model, mice were neither immunosuppressed nor diabetic and infection was performed by IV route. In a review of 28 published cases, authors showed that while hyperbaric oxygen improved survival in diabetic patients, it was ineffective in neutropenic patients [97]. However, hyperbaric oxygen treatment failure may be underestimated due to publication bias. Up until now, there has been no randomized study with control group to evaluate efficacy of hyperbaric oxygen so far.

5. New routes of administration

Nebulized antifungal agents may be a new way of research to improve mucormycosis therapy. The pulmonary aerosolization of antifungal agents can theoretically increase their concentration at the infectious site, which could improve efficacy while limiting their systemic exposure and toxicity. [98]. Administration of L-AmB aerosol was evaluated in a neutropenic mouse model of *R. arrhizus* pulmonary infection [99]. The authors showed that aerosolized L-AmB is effective as a means of decreasing fungal burden and improving survival when administered from day 1 to 5 after infection compared to placebo. However, aerosolized L-AmB was not compared to systemic L-AmB. More animal studies are needed to assess aerosols efficacy alone and in combination with systemic treatment. Few human cases of mucormycosis treated with AmB aerosols are reported in the literature [100–104]. AmBd has been the most used formulation. Dosage of nebulized AmBd ranges from 6 mg three times a day to 30 mg twice a week, in combination with AmB systemic treatment and surgical treatment. ABLC has also been used in *Rhizomucor* sp. infection treatment (50 mg twice daily) [104].

Topical AmB has been used in a few clinical cases [105–107], particularly in burned patients [108]. It has been employed in different forms: washes [109], 5% sulfamylon–amphotericin B (2 µg/ml) dressings [110], daily topical infusions through dressings (50 mg L-AmB diluted in 1L of sterile water) [111], soaks [112] or gauze soaked in 0.2% AmB solution [113]. Nystatin cream was used in one case report [114]. AmB nanoemulsion was developed to use AmB as topical route of administration, but it has not been tested on *Mucorales* [115,116]. Other authors have developed nanoemulsions containing surfactant to mechanically disrupt microbial membranes. For example, nanoemulsion NB-201, containing refined soybean oil, water, glycerol, EDTA, Tween 20, and the surfactant benzalkonium chloride has shown *in vitro* activity against *Mucorales* [117].

Other routes of administration for AmB are anecdotal: eye drop in *Mucorales* keratitis [118], oral administration in gastrointestinal mucormycosis [119], intradiaphyseal incorporation cement beads in osteomyelitis [120], intrathecal administration in cerebral abscess [121], percutaneous injection in cutaneous lesions [122].

6. Conclusion

Mucormycosis treatment recommendations were recently updated by the ECMM. L-AmB remains the first-line drug in mucormycosis therapy. ISZ and new PSZ formulations have been added to the guidelines but remain in second-line treatment following L-AmB due to some remaining issues. Few anti-*Mucorales* drugs are currently under development. Moreover, evidence for adjunctive therapies is scarce and doubts on their effectiveness persist due to a lack of randomized prospective controlled studies. They are particularly complex to implement in a context of low incidence disease. Few advances have been made on mucormycosis treatment. However, empowering new concepts and new routes of administration to fight this devastating disease appear promising and are to be encouraged.

Disclosure of interest

B.R. received travel grants for conferences from Pfizer and MSD, speaker's fees from MSD, Basilea, Gilead, Astellas, Iqone.

K.B. received travel grants for conferences from Pfizer, MSD and Gilead.

Acknowledgments

We thank Jeffrey Arsham for English revision.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at <https://doi.org/10.1016/j.mycmed.2020.101007>.

References

- [1] Farmakiotis D, Kontoyiannis DP. Mucormycoses. *Infect Dis Clin North Am* 2016;30:143–63. <http://dx.doi.org/10.1016/j.idc.2015.10.011>.
- [2] Serris A, Danion F, Lantermier F. Disease entities in Mucormycosis. *J Fungi (Basel)* 2019;5:23. <http://dx.doi.org/10.3390/jof5010023>.
- [3] Sipsas NV, Gamaletsou MN, Anastasopoulou A, Kontoyiannis DP. Therapy of Mucormycosis. *J Fungi (Basel)* 2018;4. <http://dx.doi.org/10.3390/jof4030090>.
- [4] Alastruey-Izquierdo A, Castelli MV, Cuesta I, Zaragoza O, Monzón A, Mellado E, et al. *In vitro* activity of antifungals against Zygomycetes. *Clin Microbiol Infect* 2009;15:71–6. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1469-0691.2009.02984.x>.
- [5] Guinea J, Peláez T, Recio S, Torres-Narbona M, Bouza E. *In vitro* antifungal activities of isavuconazole (BAL4815), voriconazole, and flucanazole against 1007 isolates of zygomycete, *Candida*, *Aspergillus*, *Fusarium*, and *Scedosporium* species. *Antimicrob Agents Chemother* 2008;52:1396–400. <http://dx.doi.org/10.1128/AAC.01512-07>.
- [6] Subcommittee on Antifungal Susceptibility Testing of the ESCMID European Committee for Antimicrobial Susceptibility Testing. EUCAST Technical Note on the method for the determination of broth dilution minimum inhibitory concentrations of antifungal agents for conidia-forming moulds. *Clin Microbiol Infect* 2008;14:982–4. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1469-0691.2008.02086.x>.
- [7] CLSI. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of filamentous fungi. M38-A2. Wayne, Pa: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2008.
- [8] Prakash H, Chakrabarti A. Global epidemiology of Mucormycosis. *J Fungi (Basel)* 2019;5:26. <http://dx.doi.org/10.3390/jof5010026>.
- [9] Tissot F, Agrawal S, Pagano L, Petrikos G, Groll AH, Skiada A, et al. ECIL-6 guidelines for the treatment of invasive candidiasis, aspergillosis and mucormycosis in leukemia and hematopoietic stem cell transplant patients. *Haematologica* 2017;102:433–44. <http://dx.doi.org/10.3324/haematol.2016.152900>.
- [10] Cornely OA, Alastruey-Izquierdo A, Arenz D, Chen SCA, Dannaoui E, Hochhegger B, et al. Global guideline for the diagnosis and management of mucormycosis: an initiative of the European Confederation of Medical Mycology in cooperation with the Mycoses Study Group Education and Research

- Consortium. *Lancet Infect Dis* 2019;19:e405–21. [http://dx.doi.org/10.1016/S1473-3099\(19\)30312-3](http://dx.doi.org/10.1016/S1473-3099(19)30312-3).
- [11] Lanternier F, Poiree S, Elie C, Garcia-Hermoso D, Bakouboula P, Sitbon K, et al. Prospective pilot study of high-dose (10 mg/kg/day) liposomal amphotericin B (L-AMB) for the initial treatment of mucormycosis. *J Antimicrob Chemother* 2015;70:3116–23. <http://dx.doi.org/10.1093/jac/dkv236>.
- [12] Spellberg B, Ibrahim AS, Chin-Hong PV, Kontoyiannis DP, Morris MI, Perfect JR, et al. The Deferasirox-Ambisome Therapy for Mucormycosis (DEFEAT Mucor) study: a randomized, double-blinded, placebo-controlled trial. *J Antimicrob Chemother* 2012;67:715–22. <http://dx.doi.org/10.1093/jac/dkr375>.
- [13] Chamilos G, Lewis RE, Kontoyiannis DP. Delaying amphotericin B-based frontline therapy significantly increases mortality among patients with hematologic malignancy who have zygomycosis. *Clin Infect Dis* 2008;47:503–9. <http://dx.doi.org/10.1086/590004>.
- [14] Kontoyiannis DP, Lewis RE. How I treat mucormycosis. *Blood* 2011;118:1216–24. <http://dx.doi.org/10.1182/blood-2011-03-316430>.
- [15] Donnelley MA, Zhu ES, Thompson GR. Isavuconazole in the treatment of invasive aspergillosis and mucormycosis infections. *Infect Drug Resist* 2016;9:79–86. <http://dx.doi.org/10.2147/IDR.S81416>.
- [16] Arendrup MC, Jensen RH, Meletiadis J. In vitro activity of isavuconazole and comparators against clinical isolates of the mucorales order. *Antimicrob Agents Chemother* 2015;59:7735–42. <http://dx.doi.org/10.1128/AAC.01919-15>.
- [17] Luo G, Gebremariam T, Lee H, Edwards JE, Kovanda L, Ibrahim AS. Isavuconazole therapy protects immunosuppressed mice from Mucormycosis. *Antimicrob Agents Chemother* 2014;58:2450–3. <http://dx.doi.org/10.1128/AAC.02301-13>.
- [18] Marty FM, Ostrosky-Zeichner L, Cornely OA, Mullane KM, Perfect JR, Thompson GR, et al. Isavuconazole treatment for mucormycosis: a single-arm open-label trial and case-control analysis. *Lancet Infect Dis* 2016;16:828–37. [http://dx.doi.org/10.1016/S1473-3099\(16\)00071-2](http://dx.doi.org/10.1016/S1473-3099(16)00071-2).
- [19] Rausch CR, DiPippo AJ, Bose P, Kontoyiannis DP. Breakthrough fungal infections in patients with leukemia receiving isavuconazole. *Clin Infect Dis* 2018;67:1610–3. <http://dx.doi.org/10.1093/cid/ciy406>.
- [20] Wurster S, Lewis RE, Albert ND, Kontoyiannis DP. Preexposure to isavuconazole increases the virulence of mucorales but not *Aspergillus fumigatus* in a *Drosophila melanogaster* infection model. *Antimicrob Agents Chemother* 2019;63. <http://dx.doi.org/10.1128/AAC.01896-18>. e01896-18.
- [21] Lamarin GA, Ben-Ami R, Lewis RE, Chamilos G, Samonis G, Kontoyiannis DP. Increased virulence of Zygomycetes organisms following exposure to voriconazole: a study involving fly and murine models of zygomycosis. *J Infect Dis* 2009;199:1399–406. <http://dx.doi.org/10.1086/597615>.
- [22] Fontana L, Perlin DS, Zhao Y, Noble BN, Lewis JS, Strasfeld L, et al. Isavuconazole prophylaxis in patients with hematologic malignancies and hematopoietic-cell transplant recipients. *Clin Infect Dis* 2019;70:723–30. <http://dx.doi.org/10.1093/cid/ciz282>.
- [23] Jenks JD, Mehta SR, Hoenigl M. Broad spectrum triazoles for invasive mould infections in adults: which drug and when? *Med Mycol* 2019;57:S168–78. <http://dx.doi.org/10.1093/mmy/myy052>.
- [24] Chikley A, Ben-Ami R, Kontoyiannis DP. Mucormycosis of the central nervous system. *J Fungi (Basel)* 2019;5:59. <http://dx.doi.org/10.3390/jof5030059>.
- [25] Schmitt-Hoffmann A-H, Kato K, Townsend R, Potchoiba MJ, Hope WW, Andes D, et al. Tissue distribution and elimination of isavuconazole following single and repeat oral-dose administration of isavuconazonium sulfate to rats. *Antimicrob Agents Chemother* 2017;61. <http://dx.doi.org/10.1128/AAC.01292-17>. e01292-17.
- [26] Lamoth F, Mercier T, André P, Pagani JL, Pantet O, Maduri R, et al. Isavuconazole brain penetration in cerebral aspergillosis. *J Antimicrob Chemother* 2019;74:1751–3. <http://dx.doi.org/10.1093/jac/dkz050>.
- [27] Schwartz S, Cornely OA, Hamed K, Marty FM, Maertens J, Rahav G, et al. Isavuconazole for the treatment of patients with invasive fungal diseases involving the central nervous system. *Med Mycol* 2019;58:417–24. <http://dx.doi.org/10.1093/mmy/myz103>.
- [28] Skiada A, Lass-Floerl C, Klimko N, Ibrahim A, Roilides E, Petrikos G. Challenges in the diagnosis and treatment of mucormycosis. *Med Mycol* 2018;56:S93–101. <http://dx.doi.org/10.1093/mmy/myx101>.
- [29] Cornely OA, Robertson MN, Haider S, Grigg A, Geddes M, Aoun M, et al. Pharmacokinetics and safety results from the Phase 3 randomized, open-label, study of intravenous posaconazole in patients at risk of invasive fungal disease. *J Antimicrob Chemother* 2017;72:3406–13. <http://dx.doi.org/10.1093/jac/dkx263>.
- [30] Cornely OA, Duarte RF, Haider S, Chandrasekar P, Helfgott D, Jiménez JL, et al. Phase 3 pharmacokinetics and safety study of a posaconazole tablet formulation in patients at risk for invasive fungal disease. *J Antimicrob Chemother* 2016;71:718–26. <http://dx.doi.org/10.1093/jac/dkv380>.
- [31] Maertens J, Cornely OA, Ullmann AJ, Heinz WJ, Krishna G, Patino H, et al. Phase 1B study of the pharmacokinetics and safety of posaconazole intravenous solution in patients at risk for invasive fungal disease. *Antimicrob Agents Chemother* 2014;58:3610–7. <http://dx.doi.org/10.1128/AAC.02686-13>.
- [32] Duarte RF, López-Jiménez J, Cornely OA, Laverdiere M, Helfgott D, Haider S, et al. Phase 1b study of new posaconazole tablet for prevention of invasive fungal infections in high-risk patients with neutropenia. *Antimicrob Agents Chemother* 2014;58:5758–65. <http://dx.doi.org/10.1128/AAC.03050-14>.
- [33] Salmanton-García J, Seidel D, Koehler P, Mellinghoff SC, Herbrecht R, Klimko N, et al. Matched-paired analysis of patients treated for invasive mucormycosis: standard treatment versus posaconazole new formulations (MoveOn). *J Antimicrob Chemother* 2019;74:3315–27. <http://dx.doi.org/10.1093/jac/dkz344>.
- [34] Van Daele R, Spriet I, Wauters J, Maertens J, Mercier T, Van Hecke S, et al. Antifungal drugs: what brings the future? *Med Mycol* 2019;57:S328–43. <http://dx.doi.org/10.1093/mmy/myz012>.
- [35] Lamoth F, Alexander BD. Antifungal activities of SCY-078 (MK-3118) and standard antifungal agents against clinical non-*Aspergillus* mold isolates. *Antimicrob Agents Chemother* 2015;59:4308–11. <http://dx.doi.org/10.1128/AAC.00234-15>.
- [36] Jørgensen KM, Astvad KMT, Hare RK, Arendrup MC. EUCAST determination of olorofim (F901318) susceptibility of mold species, method validation, and MICs. *Antimicrob Agents Chemother* 2018;62. <http://dx.doi.org/10.1128/AAC.00487-18>.
- [37] Gebremariam T, Wiederhold NP, Fothergill AW, Garvey EP, Hoekstra WJ, Schotzinger RJ, et al. VT-1161 Protects Immunosuppressed Mice from *Rhizopus arrhizus* var. *arrhizus* Infection. *Antimicrob Agents Chemother* 2015;59:7815–7. <http://dx.doi.org/10.1128/AAC.01437-15>.
- [38] Gebremariam T, Alkhazraji S, Lin L, Wiederhold NP, Garvey EP, Hoekstra WJ, et al. Prophylactic treatment with VT-1161 protects immunosuppressed mice from *Rhizopus arrhizus* var. *arrhizus* Infection. *Antimicrob Agents Chemother* 2017;61. <http://dx.doi.org/10.1128/AAC.00390-17>. e00390-17.
- [39] Goldani LZ, Sugar AM. Treatment of murine pulmonary mucormycosis with SCH 42427, a broad-spectrum triazole antifungal drug. *J Antimicrob Chemother* 1994;33:369–72. <http://dx.doi.org/10.1093/jac/33.2.369>.
- [40] Miyazaki M, Horii T, Hata K, Watanabe N-A, Nakamoto K, Tanaka K, et al. In vitro activity of E1210, a novel antifungal, against clinically important yeasts and molds. *Antimicrob Agents Chemother* 2011;55:4652–8. <http://dx.doi.org/10.1128/AAC.00291-11>.
- [41] Rivero-Menendez O, Cuenca-Estrella M, Alastruey-Izquierdo A. In vitro activity of APX001A against rare moulds using EUCAST and CLSI methodologies. *J Antimicrob Chemother* 2019;74:1295–9. <http://dx.doi.org/10.1093/jac/dkz022>.
- [42] Gebremariam T, Alkhazraji S, Alqarhi A, Wiederhold NP, Shaw KJ, Patterson TF, et al. Fosmanogepix (APX001) is effective in the treatment of pulmonary murine mucormycosis due to *Rhizopus arrhizus*. *Antimicrob Agents Chemother* 2020;64. <http://dx.doi.org/10.1128/AAC.00178-20>.
- [43] Colley T, Sehra G, Chowdhary A, Alanio A, Kelly SL, Kizawa Y, et al. In vitro and in vivo efficacy of a novel and long-acting fungicidal azole, PC1244, on *Aspergillus fumigatus* infection. *Antimicrob Agents Chemother* 2018;62. <http://dx.doi.org/10.1128/AAC.01941-17>. e01941-17.
- [44] Ben-Ami R, Lewis RE, Tarrand J, Leventakos K, Kontoyiannis DP. Antifungal activity of colistin against mucorales species in vitro and in a murine model of *Rhizopus oryzae* pulmonary infection. *Antimicrob Agents Chemother* 2010;54:484–90. <http://dx.doi.org/10.1128/AAC.00956-09>.
- [45] Lamoth F, Kontoyiannis DP. Therapeutic challenges of non-*Aspergillus* invasive mold infections in immunosuppressed patients. *Antimicrob Agents Chemother* 2019;63. <http://dx.doi.org/10.1128/AAC.01244-19>. e01244-19.
- [46] Baistrocchi SR, Lee MJ, Lehoux M, Ralph B, Snarr BD, Robitaille R, et al. Posaconazole-loaded leukocytes as a novel treatment strategy targeting invasive pulmonary aspergillosis. *J Infect Dis* 2017;215:1734–41. <http://dx.doi.org/10.1093/infdis/jiw513>.
- [47] Kumaresan PR, Manuri PR, Albert ND, Maiti S, Singh H, Mi T, et al. Bioengineering T cells to target carbohydrate to treat opportunistic fungal infection. *Proc Natl Acad Sci USA* 2014;111:10660–5. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.1312789111>.
- [48] Gebremariam T, Alkhazraji S, Soliman SSM, Gu Y, Jeon HH, Zhang L, et al. Anti-CoH3 antibodies protect mice from mucormycosis by prevention of invasion and augmenting opsonophagocytosis. *Sci Adv* 2019;5:eaaaw1327. <http://dx.doi.org/10.1126/sciadv.aaw1327>.
- [49] Liu M, Spellberg B, Phan QT, Fu Y, Fu Y, Lee AS, et al. The endothelial cell receptor GRP78 is required for mucormycosis pathogenesis in diabetic mice. *J Clin Invest* 2010;120:1914–24. <http://dx.doi.org/10.1172/JCI42164>.
- [50] Brunet K, Alanio A, Lortholary O, Rammaert B. Reactivation of dormant/latent fungal infection. *J Infect* 2018;77:463–8. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jinf.2018.06.016>.
- [51] Inglesfield S, Jasiulewicz A, Hopwood M, Tyrrell J, Youlden G, Mazon-Moya M, et al. Robust phagocyte recruitment controls the opportunistic fungal pathogen *Mucor circinelloides* in innate granulomas in vivo. *MBio* 2018;9. <http://dx.doi.org/10.1128/mBio.02010-17>. e02010-17.
- [52] Sheldon WH, Bauer H. Activation of quiescent mucormycotic granulomata in rabbits by induction of acute alloxan diabetes. *J Exp Med* 1958;108:171–8. <http://dx.doi.org/10.1084/jem.108.1.171>.
- [53] Brunet T, Brunet K, Jouvion G, Cateau E, Marchand S, Rammaert B. Lichtheimia corymbifera colonization leading to pulmonary infection can be prevented with liposomal amphotericin B in a new murine model. *Antimicrob Agents Chemother* 2019;63. <http://dx.doi.org/10.1128/AAC.02544-18>. e02544-18.
- [54] Jeong W, Keighley C, Wolfe R, Lee WL, Slavin MA, Chen SC-A, et al. Contemporary management and clinical outcomes of mucormycosis: a systematic review and meta-analysis of case reports. *Int J Antimicrob Agents* 2019;53:589–97. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2019.01.002>.
- [55] Schwarz P, Cornely OA, Dannaoui E. Antifungal combinations in Mucorales: a microbiological perspective. *Mycoses* 2019;62:746–60. <http://dx.doi.org/10.1111/myc.12909>.

- [56] Zhang S, Li R, Yu J. Drug combinations against *Mucor irregularis* in vitro. *Antimicrob Agents Chemother* 2013;57:3395–7. <http://dx.doi.org/10.1128/AAC.02612-12>.
- [57] Guembe M, Guinea J, Peláez T, Torres-Narbona M, Bouza E. Synergistic effect of posaconazole and caspofungin against clinical zygomycetes. *Antimicrob Agents Chemother* 2007;51:3457–8. <http://dx.doi.org/10.1128/AAC.00595-07>.
- [58] Gebremariam T, Wiederhold NP, Alqarihi A, Uppuluri P, Azie N, Edwards JE, et al. Monotherapy or combination therapy of isavuconazole and micafungin for treating murine mucormycosis. *J Antimicrob Chemother* 2017;72:462–6. <http://dx.doi.org/10.1093/jac/dkw433>.
- [59] Lewis RE, Albert ND, Kontoyiannis DP. Comparative pharmacodynamics of posaconazole in neutropenic murine models of invasive pulmonary aspergillosis and mucormycosis. *Antimicrob Agents Chemother* 2014;58:6767–72. <http://dx.doi.org/10.1128/AAC.03569-14>.
- [60] Ibrahim AS, Gebremariam T, Fu Y, Edwards JE, Spellberg B. Combination echinocandin-polyene treatment of murine mucormycosis. *Antimicrob Agents Chemother* 2008;52:1556–8. <http://dx.doi.org/10.1128/AAC.01458-07>.
- [61] Spellberg B, Fu Y, Edwards JE, Ibrahim AS. Combination therapy with amphotericin B lipid complex and caspofungin acetate of disseminated zygomycosis in diabetic ketoacidotic mice. *Antimicrob Agents Chemother* 2005;49:830–2. <http://dx.doi.org/10.1128/AAC.49.2.830-832.2005>.
- [62] Abidi MZ, Sohail MR, Cummins N, Wilhelm M, Wengenack N, Brumble L, et al. Stability in the cumulative incidence, severity and mortality of 101 cases of invasive mucormycosis in high-risk patients from 1995 to 2011: a comparison of eras immediately before and after the availability of voriconazole and echinocandin-amphotericin combination therapies. *Mycoses* 2014;57:687–98. <http://dx.doi.org/10.1111/myc.12222>.
- [63] Kyvermitakis A, Torres HA, Jiang Y, Chamilos G, Lewis RE, Kontoyiannis DP. Initial use of combination treatment does not impact survival of 106 patients with haematologic malignancies and mucormycosis: a propensity score analysis. *Clin Microbiol Infect* 2016;22:811e1–8. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cmi.2016.03.029>.
- [64] van Burik J-AH, Hare RS, Solomon HF, Corrado ML, Kontoyiannis DP. Posaconazole is effective as salvage therapy in zygomycosis: a retrospective summary of 91 cases. *Clin Infect Dis* 2006;42:e61–5. <http://dx.doi.org/10.1086/500212>.
- [65] Lanternier F, Dannaoui E, Morizot G, Elie C, Garcia-Hermoso D, Huerre M, et al. A global analysis of mucormycosis in France: the RetroZygo Study (2005–2007). *Clin Infect Dis* 2012;54:S35–43. <http://dx.doi.org/10.1093/cid/cir880>.
- [66] Reed C, Bryant R, Ibrahim AS, Edwards J, Filler SG, Goldberg R, et al. Combination polyene-caspofungin treatment of rhino-orbital-cerebral mucormycosis. *Clin Infect Dis* 2008;47:364–71. <http://dx.doi.org/10.1086/589857>.
- [67] Ibrahim AS, Gebremariam T, Fu Y, Lin L, Hussein MI, French SW, et al. The iron chelator deferasirox protects mice from mucormycosis through iron starvation. *J Clin Invest* 2007;117:2649–57. <http://dx.doi.org/10.1172/JCI32338>.
- [68] Ibrahim AS, Gebremariam T, Luo G, Fu Y, French SW, Edwards JE, et al. Combination therapy of murine mucormycosis or aspergillosis with iron chelation, polyenes, and echinocandins. *Antimicrob Agents Chemother* 2011;55:1768–70. <http://dx.doi.org/10.1128/AAC.01577-10>.
- [69] Dannaoui E, Schwarz P, Lortholary O. In vitro interactions between antifungals and immunosuppressive drugs against zygomycetes. *Antimicrob Agents Chemother* 2009;53:3549–51. <http://dx.doi.org/10.1128/AAC.00184-09>.
- [70] Lewis RE, Ben-Ami R, Best L, Albert N, Walsh TJ, Kontoyiannis DP. Tacrolimus enhances the potency of posaconazole against *Rhizopus oryzae* in vitro and in an experimental model of mucormycosis. *J Infect Dis* 2013;207:834–41. <http://dx.doi.org/10.1093/infdis/jis767>.
- [71] Schwarz P, Schwarz PV, Felske-Zech H, Dannaoui E. In vitro interactions between isavuconazole and tacrolimus, cyclosporin A or sirolimus against *Mucorales*. *J Antimicrob Chemother* 2019;74:1921–7. <http://dx.doi.org/10.1093/jac/dkz102>.
- [72] Pfaller MA, Messer SA, Georgopapadaku N, Martell LA, Besterman JM, Diekema DJ. Activity of MGC290, a Hos2 histone deacetylase inhibitor, in combination with azole antifungals against opportunistic fungal pathogens. *J Clin Microbiol* 2009;47:3797–804. <http://dx.doi.org/10.1128/JCM.00618-09>.
- [73] Chamilos G, Lewis RE, Kontoyiannis DP. Lovastatin has significant activity against zygomycetes and interacts synergistically with voriconazole. *Antimicrob Agents Chemother* 2006;50:96–103. <http://dx.doi.org/10.1128/AAC.50.1.96-103.2006>.
- [74] Sugar AM, Liu XP. Combination antifungal therapy in treatment of murine pulmonary mucormycosis: roles of quinolones and azoles. *Antimicrob Agents Chemother* 2000;44:2004–6. <http://dx.doi.org/10.1128/aac.44.7.2004-2006.2000>.
- [75] Biswas C, Sorrell TC, Djordjevic JT, Zuo X, Jolliffe KA, Chen SC-A. In vitro activity of miltefosine as a single agent and in combination with voriconazole or posaconazole against uncommon filamentous fungal pathogens. *J Antimicrob Chemother* 2013;68:2842–6. <http://dx.doi.org/10.1093/jac/dkt282>.
- [76] Dannaoui E, Afeltra J, Meis JFGM, Verweij PE, Eurofung Network. In vitro susceptibilities of zygomycetes to combinations of antimicrobial agents. *Antimicrob Agents Chemother* 2002;46:2708–11. <http://dx.doi.org/10.1128/aac.46.8.2708-2711.2002>.
- [77] Christenson JC, Shaliti I, Welch DF, Guruswamy A, Marks MI. Synergistic action of amphotericin B and rifampin against *Rhizopus* species. *Antimicrob Agents Chemother* 1987;31:1775–8. <http://dx.doi.org/10.1128/aac.31.11.1775>.
- [78] Spellberg B, Ibrahim A, Roilides E, Lewis RE, Lortholary O, Petrikos G, et al. Combination therapy for mucormycosis: why, what, and how? *Clin Infect Dis* 2012;54:S73–8. <http://dx.doi.org/10.1093/cid/cir885>.
- [79] Lin E, Moua T, Limper AH. Pulmonary mucormycosis: clinical features and outcomes. *Infection* 2017;45:443–8. <http://dx.doi.org/10.1007/s15010-017-0991-6>.
- [80] Tedder M, Spratt JA, Anstadt MP, Hegde SS, Tedder SD, Lowe JE. Pulmonary mucormycosis: results of medical and surgical therapy. *Ann Thorac Surg* 1994;57:1044–50.
- [81] Gamaletsou MN, Sipsas NV, Roilides E, Walsh TJ. Rhino-orbital-cerebral mucormycosis. *Curr Infect Dis Rep* 2012;14:423–34. <http://dx.doi.org/10.1007/s11908-012-0272-6>.
- [82] Vironneau P, Kania R, Morizot G, Elie C, Garcia-Hermoso D, Herman P, et al. Local control of rhino-orbital-cerebral mucormycosis dramatically impacts survival. *Clin Microbiol Infect* 2014;20:O336–9. <http://dx.doi.org/10.1111/1469-0691.12408>.
- [83] Manesh A, Rupali P, Sullivan MO, Mohanraj P, Rupa V, George B, et al. Mucormycosis—A clinicoepidemiological review of cases over 10 years. *Mycoses* 2019;62:391–8. <http://dx.doi.org/10.1111/myc.12897>.
- [84] Gil-Lamaignere C, Simitsopoulou M, Roilides E, Maloukou A, Winn RM, Walsh TJ. Interferon-gamma and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor augment the activity of polymorphonuclear leukocytes against medically important zygomycetes. *J Infect Dis* 2005;191:1180–7. <http://dx.doi.org/10.1086/428503>.
- [85] Liles WC, Huang JE, van Burik JA, Bowden RA, Dale DC. Granulocyte colony-stimulating factor administered in vivo augments neutrophil-mediated activity against opportunistic fungal pathogens. *J Infect Dis* 1997;175:1012–5. <http://dx.doi.org/10.1086/513961>.
- [86] Saoulidis S, Simitsopoulou M, Dalakouridou M, Walsh TJ, Wheat LJ, Papaioannidou P, et al. Antifungal activity of posaconazole and granulocyte colony-stimulating factor in the treatment of disseminated zygomycosis (mucormycosis) in a neutropenic murine model. *Mycoses* 2011;54:e486–92. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1439-0507.2010.01958.x>.
- [87] Rodríguez MM, Calvo E, Mariné M, Pastor FJ, Fernández-Ballart J, Guarro J. Efficacy of liposomal amphotericin B combined with gamma interferon or granulocyte-macrophage colony-stimulating factor for treatment of systemic zygomycosis in mice. *Antimicrob Agents Chemother* 2009;53:3569–71. <http://dx.doi.org/10.1128/AAC.00456-09>.
- [88] Ma B, Seymour JF, Januszewicz H, Slavin MA. Cure of pulmonary *Rhizopus* pusillus infection in a patient with hairy-cell leukemia: role of liposomal amphotericin B and GM-CSF. *Leuk Lymphoma* 2001;42:1393–9. <http://dx.doi.org/10.3109/10428190109097768>.
- [89] Sahin B, Paydaş S, Coşar E, Biçakçı K, Hazer B. Role of granulocyte colony-stimulating factor in the treatment of mucormycosis. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1996;15:866–9. <http://dx.doi.org/10.1007/bf01691218>.
- [90] Garcia-Diaz JB, Palau L, Pankey GA. Resolution of rhinocerebral zygomycosis associated with adjunct administration of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. *Clin Infect Dis* 2001;32:e145–50. <http://dx.doi.org/10.1086/320767>.
- [91] Abzug MJ, Walsh TJ. Interferon-gamma and colony-stimulating factors as adjunct therapy for refractory fungal infections in children. *Pediatr Infect Dis J* 2004;23:769–73. <http://dx.doi.org/10.1097/01.inf.0000134314.65398.bf>.
- [92] Symeonidis AS. The role of iron and iron chelators in zygomycosis. *Clin Microbiol Infect* 2009;15:26–32. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1469-0691.2009.02976.x>.
- [93] Ibrahim AS, Edwards JE, Fu Y, Spellberg B. Deferiprone iron chelation as a novel therapy for experimental mucormycosis. *J Antimicrob Chemother* 2006;58:1070–3. <http://dx.doi.org/10.1093/jac/dkl350>.
- [94] Leonardelli F, Macedo D, Dudiuk C, Theill L, Cabeza MS, Gamarra S, et al. In vitro activity of combinations of zinc chelators with amphotericin B and posaconazole against six mucorales species. *Antimicrob Agents Chemother* 2019;63. <http://dx.doi.org/10.1128/AAC.00266-19>.
- [95] Tragiannidis A, Groll AH. Hyperbaric oxygen therapy and other adjunctive treatments for zygomycosis. *Clin Microbiol Infect* 2009;15:82–6. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1469-0691.2009.02986.x>.
- [96] Barratt DM, Van Meter K, Asmar P, Nolan T, Trahan C, Garcia-Covarrubias L, et al. Hyperbaric oxygen as an adjunct in zygomycosis: randomized controlled trial in a murine model. *Antimicrob Agents Chemother* 2001;45:3601–2. <http://dx.doi.org/10.1128/AAC.45.12.3601-3602.2001>.
- [97] John BV, Chamilos G, Kontoyiannis DP. Hyperbaric oxygen as an adjunctive treatment for zygomycosis. *Clin Microbiol Infect* 2005;11:515–7. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1469-0691.2005.01170.x>.
- [98] Takazono T, Izumikawa K, Mihara T, Kosai K, Saijo T, Imamura Y, et al. Efficacy of combination antifungal therapy with intraperitoneally administered micafungin and aerosolized liposomal amphotericin B against murine invasive pulmonary aspergillosis. *Antimicrob Agents Chemother* 2009;53:3508–10. <http://dx.doi.org/10.1128/AAC.00285-09>.
- [99] Mihara T, Kakeya H, Izumikawa K, Obata Y, Nishino T, Takazono T, et al. Efficacy of aerosolized liposomal amphotericin B against murine invasive pulmonary mucormycosis. *J Infect Chemother* 2014;20:104–8. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jiac.2013.09.002>.
- [100] Alfageme I, Reina A, Gallego J, Reyes N, Torres A. Endobronchial instillations of amphotericin B: complementary treatment for pulmonary mucormycosis. *J Bronchology Interv Pulmonol* 2009;16:214–5. <http://dx.doi.org/10.1097/LBR.0b013e3181aa2583>.
- [101] Furco A, Mouchet B, Carbonnelle M, Vallerand H. [Pulmonary mucormycosis: benefit of aerosol amphotericin B?] *Rev Mal Respir* 2001;18:309–13.
- [102] McGuire FR, Grinnan DC, Robbins M. Mucormycosis of the bronchial anastomosis: a case of successful medical treatment and historic review. *J Heart Lung Transplant* 2007;26:857–61. <http://dx.doi.org/10.1016/j.healun.2007.05.010>.

- [103] Safdar A, O'Brien S, Kouri IF. Efficacy and feasibility of aerosolized amphotericin B lipid complex therapy in caspofungin breakthrough pulmonary zygomycosis. *Bone Marrow Transplantation* 2004;34:467–8. <http://dx.doi.org/10.1038/sj.bmt.1704552>.
- [104] Safdar A, Rodriguez GH. Aerosolized amphotericin B lipid complex as adjunctive treatment for fungal lung infection in patients with cancer-related immunosuppression and recipients of hematopoietic stem cell transplantation. *Pharmacotherapy* 2013;33:1035–43. <http://dx.doi.org/10.1002/phar.1309>.
- [105] Di Pentima MC, Chan S, Powell J, Napoli JA, Walter AW, Walsh TJ. Topical amphotericin B in combination with standard therapy for severe necrotizing skin and soft-tissue mucormycosis in an infant with bilineal leukemia: case report and review. *J Pediatr Hematol Oncol* 2014;36:e468–70. <http://dx.doi.org/10.1097/MPH.000000000000166>.
- [106] Cohen-Ludmann C, Kerob D, Feuilhade M, Chaine B, Guermazi A, Janier M, et al. Zygomycosis of the penis due to *Rhizopus oryzae* successfully treated with surgical debridement and a combination of high-dose liposomal and topical amphotericin B. *Arch Dermatol* 2006;142:1657–8. <http://dx.doi.org/10.1001/archderm.142.12.1657>.
- [107] Steve AK, Hurdle VA, Brown JY. Orbitomaxillofacial mucormycosis requiring complex multifactorial management. *Plast Reconstr Surg Glob Open* 2018;6:e1927. <http://dx.doi.org/10.1097/GOX.0000000000001927>.
- [108] Devauchelle P, Jeanne M, Fréalle E. Mucormycosis in burn patients. *J Fungi (Basel)* 2019;5. <http://dx.doi.org/10.3390/jof5010025>.
- [109] Thielen BK, Barnes AMT, Sabin AP, Huebner B, Nelson S, Wesenberg E, et al. Widespread Lichtheimia infection in a patient with extensive burns: opportunities for novel antifungal agents. *Mycopathologia* 2019;184:121–8. <http://dx.doi.org/10.1007/s11046-018-0281-6>.
- [110] Farmer AR, Murray CK, Driscoll IR, Wickes BL, Wiederhold N, Sutton DA, et al. Combat-Related *Pythium aphanidermatum* invasive wound infection: case report and discussion of utility of molecular diagnostics. *J Clin Microbiol* 2015;53:1968–75. <http://dx.doi.org/10.1128/JCM.00410-15>.
- [111] Piazza RC, Thomas WL, Stawski WS, Ford RD. Mucormycosis of the face. *J Burn Care Res* 2009;30:520–3. <http://dx.doi.org/10.1097/BCR.0b013e3181a28d2f>.
- [112] Atty C, Alagiozian-Angelova VM, Kowal-Vern A. Black plaques and white nodules in a burn patient. *Fusarium and Mucormycosis*. *JAMA Dermatol* 2014;150:1355–6. <http://dx.doi.org/10.1001/jamadermatol.2014.2463>.
- [113] Tang D, Wang W. Successful cure of an extensive burn injury complicated with mucor wound sepsis. *Burns* 1998;24:72–3. [http://dx.doi.org/10.1016/S0305-4179\(97\)00099-5](http://dx.doi.org/10.1016/S0305-4179(97)00099-5).
- [114] Constantinides J, Misra A, Nassab R, Wilson Y. *Absidia corymbifera* fungal infection in burns: a case report and review of the literature. *J Burn Care Res* 2008;29:416–9. <http://dx.doi.org/10.1097/BCR.0b013e318166da78>.
- [115] Hussain A, Singh VK, Singh OP, Shafaat K, Kumar S, Ahmad FJ. Formulation and optimization of nanoemulsion using antifungal lipid and surfactant for accentuated topical delivery of Amphotericin B. *Drug Deliv* 2016;23:3101–10. <http://dx.doi.org/10.3109/10717544.2016.1153747>.
- [116] Sosa L, Clares B, Alvarado HL, Bozal N, Domenech O, Calpena AC, et al. releasing topical nanoemulsion for the treatment of candidiasis and aspergillosis. *Nano-medicine* 2017;13:2303–12. <http://dx.doi.org/10.1016/j.nano.2017.06.021>.
- [117] Garcia A, Fan YY, Vellanki S, Huh EY, Vanegas D, Wang SH, et al. Nanoemulsion as an effective treatment against human-pathogenic fungi. *MSphere* 2019;4. <http://dx.doi.org/10.1128/mSphere.00729-19>.
- [118] Mesa Varona D, Celis Sánchez J, Alfaya Muñoz L, Avendaño Cantos EM, Romero Moraleda L. Keratitis caused by *Absidia corymbifera* in an immunocompetent male with no corneal injuries. *Arch Soc Esp Ophthalmol* 2015;90:139–41. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ofal.2014.02.020>.
- [119] Anderson A, McManus D, Perreault S, Lo Y-C, Seropian S, Topal JE. Combination liposomal amphotericin B, posaconazole and oral amphotericin B for treatment of gastrointestinal Mucorales in an immunocompromised patient. *Med Mycol Case Rep* 2017;17:11–3. <http://dx.doi.org/10.1016/j.mmcr.2017.05.004>.
- [120] Parize P, Mamez A-C, Garcia-Hermoso D, Dumaine V, Poirée S, Kauffmann-Lacroix C, et al. Successful treatment of *Saksenea* sp. osteomyelitis by conservative surgery and intradiaphyseal incorporation of amphotericin B cement beads. *Antimicrob Agents Chemother* 2018;63. <http://dx.doi.org/10.1128/AAC.01006-18>. e01006-18.
- [121] Grannan BL, Yanamadala V, Venteicher AS, Walcott BP, Barr JC. Use of external ventriculostomy and intrathecal anti-fungal treatment in cerebral mucormycotic abscess. *J Clin Neurosci* 2014;21:1819–21. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jocn.2014.01.008>.
- [122] Fu M-H, Liu J, Liang G-Z, Li C-R, Zhu X-M, Wang L, et al. Successful treatment of eczema-like mucormycosis in a child by combination of intravenous drip and percutaneous injection amphotericin B. *Mycopathologia* 2019;184:309–13. <http://dx.doi.org/10.1007/s11046-018-0273-6>.

Revue 2 : « Reactivation of dormant/latent fungal infection » (2)

- **Revue publiée : Brunet K, Alanio A, Lortholary O, Rammaert B.** Reactivation of dormant/latent fungal infection. *J Infect.* 2018;77(6):463-8 (2).

Résumé en français :

Objectif : Les infections latentes sont bien décrites dans le cas des bactéries telles que *Mycobacterium tuberculosis*, des virus tels que les *Herpesviridae* ou des parasites tels que *Leishmania sp* ou *Toxoplasma gondii*. Ces infections latentes sont cependant moins étudiées chez les champignons responsables d'infections invasives qui peuvent également entrer en latence et se réactiver. Le but de cette revue est de décrire ce concept pour les principales infections fongiques invasives.

Méthodes : Une recherche des publications parues entre 1980 et 2017, et comportant les mots clés suivants : "fungi", "reactivation", "latency", "dormancy", "granuloma", "Aspergillus", "Mucorales", "Dimorphic fungi", "Histoplasma", "Cryptococcus", "Pneumocystis", "Yeast", "Candida" and "Mold" a été effectuée sur PubMed.

Résultats : Après une primo-infection et un contrôle du champignon par le système immunitaire, une réactivation peut survenir après une période de latence. Deux conditions doivent être réunies : dormance/survie du champignon et immunosuppression de l'hôte. La réactivation fongique est facilement démontrable pour les champignons dimorphiques, lorsque les patients ayant voyagé en zone endémique ne sont plus exposés aux champignons au moment où ils développent la maladie. Pour les champignons cosmopolites, tels que *Cryptococcus neoformans*, *Aspergillus* ou certains champignons émergents, les données cliniques et les modèles animaux ont apporté des preuves de leur capacité de réactivation. La survie à l'intérieur des macrophages et la formation de granulomes semblent être les conditions prédominantes de la latence. Cependant, bien que le granulome puisse servir de réservoir à certains champignons comme *Histoplasma sp* ou *Cryptococcus sp*, son rôle dans la réactivation des moisissures n'est pas encore pleinement établi.

Conclusion : Le risque de réactivation fongique doit être pris en compte dans la prise en charge des patients, en particulier en cas de transplantation d'organe solide ou de traitement immunosuppresseur à long terme.



Reactivation of dormant/latent fungal infection

Kevin Brunet^{a,b,*}, Alexandre Alanio^{c,d}, Olivier Lortholary^{c,e}, Blandine Rammaert^{b,f,g}

^aLaboratoire de Mycologie Médicale, CHU de Poitiers, Poitiers, France

^bINSERM U1070, Université de Poitiers, Poitiers, France

^cCNRS, Unité de Mycologie Moléculaire, Centre National de Référence Mycoses et Antifongiques, Institut Pasteur, URA3012 Paris, France

^dLaboratoire de mycologie et parasitologie, AP-HP, Hôpital Saint Louis, Université Paris Diderot, Sorbonne Paris Cité, Paris, France

^eAPHP, Service des Maladies Infectieuses et Tropicales, Hôpital Necker-Enfants Malades, Centre d'Infectiologie Necker-Pasteur, Institut Imagine, Université Paris-Descartes, Paris, France

^fFaculté de médecine et pharmacie, Université de Poitiers, Poitiers, France

^gService de maladies infectieuses et tropicales, CHU de Poitiers, Poitiers, France



ARTICLE INFO

Article history:

Accepted 25 June 2018

Available online 6 July 2018

Keywords:

Reactivation

Latency

Dormancy

Invasive fungal disease

Granuloma

SUMMARY

Objectives: Latent infections are well-known for bacteria such as *Mycobacterium tuberculosis* and for viruses such as *Herpesviridae* and parasites like *Leishmania* spp. or *Toxoplasma gondii*. However, invasive fungi may also be latent and come to reactivate. The aim of this review is to clarify the reactivation concept in major fungal invasive diseases.

Method: We have searched for PUBMED publications from 1980 to 2017 with the keywords “fungi”, “reactivation”, “latency”, “dormancy”, “granuloma”, “*Aspergillus*”, “*Mucorales*”, “Dimorphic fungi”, “*Histoplasma*”, “*Cryptococcus*”, “*Pneumocystis*”, “Yeast”, “*Candida*” and “Mold”.

Results: After primary infection and immune control of the fungus, reactivation can occur following a period of latency. Two conditions must be present: dormancy/survival of the fungi and immunosuppression of the host. Fungal reactivation is easily demonstrated for dimorphic fungi when patients travelling in endemic areas are no longer exposed to fungi at the time they when develop the disease. For cosmopolitan fungi, such as *Cryptococcus neoformans*, *Aspergillus* or some emerging fungi, clinical data and animal models have brought some evidence of reactivation. Survival inside macrophages and granuloma formation appear to be predominant conditions to latency. Although granuloma may act as a reservoir for some fungi like *Histoplasma* or *Cryptococcus*, its role in mold reactivation has yet to be fully established.

Conclusions: The risk of fungal reactivation should be taken into account in patient management, especially in cases of solid organ transplantation or long-term immunosuppressive treatment.

© 2018 The British Infection Association. Published by Elsevier Ltd. All rights reserved.

Introduction

Some pathogenic microorganisms of infectious diseases may remain latent to escape the host immune response. After lag time, in the event of major immune deficiency, these pathogens may be reactivated, leading to symptoms. This type of mechanism is well-known for bacteria, such as *Mycobacterium tuberculosis*,¹ parasites like *Toxoplasma gondii*² or *Leishmania* spp.³ and viruses like *Herpesviridae*.⁴ Some fungi act as well. In correlation with the definition given for latent tuberculosis, latent fungal infection could be defined as a condition in which an individual is infected with a fungus but does not currently have an active disease.⁵ Latent in-

fection implies a risk of reactivation. Reactivation is defined as a new occurrence of symptoms after a symptomatic or asymptomatic primary infection having occurred weeks, months or years before, and that may or not have been treated. Reactivation differs from relapse by the fact that (i) the time lag between infection and relapse of infection is generally shorter, (ii) relapse is often due to treatment failure, (iii) relapse does not specifically involve a change in the patient's underlying condition such as occurrence of an impaired immune response (Fig. 1).

The incidence of invasive fungal diseases (IFD) is increasing due to the use of potent immunosuppressive therapies in treatment of cancers or autoimmune diseases and to the growing incidence of solid organ or hematopoietic stem cell transplantations.^{6,7} Reactivation has been clearly established for dimorphic fungi. Prior travel or residence in dimorphic fungus endemic areas may be a concern during the course of HIV disease, treatment for hematological malignancies or solid organ transplantation. For some cosmopolitan/ubiquitous fungi, such as *Cryptococcus neoformans*,

* Corresponding author at: Service de Parasitologie et Mycologie Médicale, Centre hospitalier universitaire de Poitiers, Bâtiment UBM, 2 rue de la Milétrie, CS 90577, 86021 Poitiers France.

E-mail address: kevin.brunet@univ-poitiers.fr (K. Brunet).

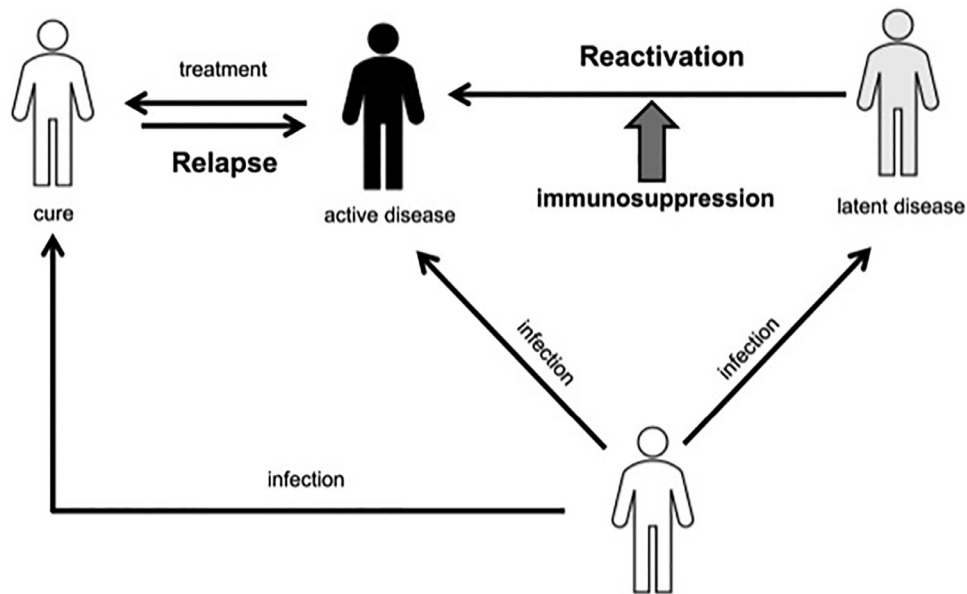


Fig. 1. Schematic description of reactivation and relapse.

Following an infection, the immune system can rapidly eliminate the fungus, leading to cure. If the immune system is impaired (i.e. immunosuppressive drugs, neutropenia), an active disease occurs. Fungus may also remain latent without providing any symptoms probably depending on the genetic susceptibility of the host, the host immune system, or fungus species. In cases of immunosuppression, fungus can be reactivated leading to active disease with symptoms. Relapse may occur due to insufficient treatment duration or low diffusion of antifungal drugs in tissues due to necrosis. Relapse does not imply a change in immune status.

Aspergillus spp. or *Mucorales*, there exists clinical evidence of reactivation, at times corroborated using experimental animal models. For *Candida*, the concept of reactivation is difficult to apply as it is a commensal pathogen. As a result, there is currently no clear evidence of reactivation for *Candida* spp. The aim of this review is to clarify the reactivation concept in invasive fungal diseases (IFD) and to provide an overview on fungi that may remain latent.

Evidence of reactivation

Reactivation is easily demonstrated for dimorphic fungi inasmuch as geographical areas of infection may be distinct from areas where clinical manifestations occur (i.e. active disease). Some patients develop a dimorphic fungal active disease several years after having traveled in endemic areas. *Histoplasma* spp. establish a latent disease and can be reactivated if the cell-mediated immune response is compromised, as can occur in HIV infection, cytotoxic chemotherapy, immunosuppressive drugs, corticosteroid or anticytokine therapies.^{8,9} Histoplasmosis has been reported up until fifty years after initial exposure without any return to the endemic country in the meantime.¹⁰ Reactivation has also been described for *Blastomyces* spp.,¹¹ *Coccidioides* spp.^{12,13} and *Talaromyces* (formerly *Penicillium*) *marneffeii*¹⁴ in immunocompromised patients.¹⁵ Some dematiaceous fungi show a similar trend. For example, *Rhinocladiella mackenzii* infection was diagnosed in an Afghani woman who did not return to her birth country for 20 years.¹⁶

For *Cryptococcus neoformans*, some authors have reported epidemiological evidence of reactivation using molecular typing as a key method. Indeed, typing of *Cryptococcus* has revealed significant clustering of isolated subtypes based on the geographical origin of the patient.^{17,18} Randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis and restriction fragment length polymorphism (RFLPs) analysis have been the most widely used techniques.^{17,18} RAPD amplifies random DNA sequences of the genome. DNA lengths are subsequently compared with electrophoresis. On the contrary, RFLP uses restriction enzymes to cut DNA into fragments. DNA fragment sizes are then compared. Patients' strains present close lengths of randomly amplified sequences and close lengths of DNA frag-

ments between restriction sites if they have a common geographical origin. Specificity of clustering depends on the technique and primers selected. It is possible to distinguish strains of different origins only when experimental conditions are well-chosen.¹⁷ A variety of *C. neoformans* presents in Africa could lead to active disease in migrants years after their departure from their birth country.¹⁹ In the study by Garcia-Hermoso et al., the authors used RAPD and RFLP to analyze *Cryptococcus* strains from patients living in France.¹⁷ Among 29 patients, they individualized nine African patients with close strains distant from those of Caucasian patients. In the nine African patients, the median time living in France was 110 months and some had not returned to Africa for 13 years. This study demonstrates that the acquisition of *Cryptococcus* strains probably took place long before their arrival in France. In addition, some studies have shown high prevalence of *Cryptococcus* seropositivity in healthy children endemic countries, a condition indicating infection during childhood. The disease may be reactivated in the event of immunosuppression.^{20,21} Thus, some authors have shown that one half of the transplant recipients who developed cryptococcosis had positive serology for *Cryptococcus* before transplantation.²² Comparing patients with and without serological evidence, those with positive serology developed cryptococcosis after transplantation earlier (on average 5.6 ± 3.4 months after transplantation) than those without serological evidence (40.6 ± 63.8 months; $p = 0.0011$). These findings support the hypothesis of reactivation for some patients with cryptococcosis.²² Contrary to *C. neoformans*, *C. gattii* mainly affects non-immunosuppressed patients.²³ Nevertheless, epidemiological data and molecular typing have also highlighted reactivations of *C. gattii*.^{24,25} Hagen et al. studied 32 European cases of *C. gattii* infections reported since 1995. Among the 32 strains of *C. gattii*, 24 were linked by multilocus sequence typing to endemic regions outside of Europe. The authors observed that the patients developed a subclinical infection with *C. gattii* in endemic areas that was reactivated many years after travel. The scientific community currently recognizes this phenomenon.²⁵

For molds such as *Aspergillus* or *Mucorales*, reactivation is more difficult to demonstrate. Inhalation of airborne *Aspergillus* conidia is the predominant route of infection. A higher incidence of inva-

sive pulmonary aspergillosis (IPA) occurs in immunocompromised patients after environmental exposure such as during building construction.²⁶ To reduce its incidence, air filtration and protective measures were instituted years ago in hematological units. However, notwithstanding strict air control measures, some patients have developed IPA while remaining in air-controlled rooms. Furthermore, *Aspergillus* spp. is rarely cultured from air sample, which indicates possible acquisition outside hospital settings. In addition, patients who were cured from a first IPA are at higher risk of developing a new one during new chemotherapy course or stem cell transplantation.^{27,28} Relapse risk of IPA in this context may be as high as 30–50%.^{29,30} Some of these cases may actually be attributed to reactivation. After neutrophil recovery, clinical and radiological signs of IPA are resolved. However, dormant conidia of *Aspergillus* may persist in the lungs and be reactivated once a new neutropenic episode occurs.²⁷ To support these clinical findings, experimental animal models have been developed in mice and rats.^{31–33} In a study by Leleu et al., immunocompetent mice were infected with *Aspergillus*. Clearance of *Aspergillus* conidia was demonstrated by negative lung culture after 10 days and by negative galactomannan level in serum after 21 days. After a lag period of 10 days, the animals received immunosuppressive therapy and reactivation of *Aspergillus* occurred, whereas mice were housed in sterile conditions from the beginning until the end of the experiment. An active disease was observed in all mice after 28 days. Prophylactic intravenous amphotericin B reduced the reactivation rate from 100% to 44%.³¹

As for *Aspergillus*, we can hypothesize that *Mucorales* can remain dormant before being reactivated. Mucormycosis may develop during chemotherapy-induced neutropenia in patients with acute leukemia or during the graft-versus-host disease phase in hematopoietic stem cell recipients.³⁴ Like *Aspergillus*, some *Mucorales* spores might remain dormant in tissues and undetectable with non-invasive methods. Sheldon and Bauer (1958) have shown that *Rhizopus oryzae*, for example, may indeed remain dormant in cutaneous granulomatous lesion in immunocompetent rabbit and be reactivated in case of diabetes induction.^{35,36} This study provides an evidence of *Mucorales* capacity to remain quiescent and reactivate in case of host metabolism change. Moreover, some authors have recently demonstrated in a *Mucor circinelloides* Zebrafish model that fungi are controlled inside innate granuloma and remain latent.³⁷ The macrophages that are major components of the granuloma are unable to kill the spores; they only prevent their germination, thereby leading to latency. In case of immunodepression with dexamethasone, the disease is reactivated. This is another example of how *Mucorales* can remain latent and be reactivated in case of immunodepression. In addition, inhaled spores of *Mucorales* are able to disseminate in different organs of immunocompetent mice.³⁸ We can hypothesize that many organs may consequently be a source of dormant spores, which may lead to disseminated disease once the immune system has been altered.

Among other molds, *Scedosporium* may be reactivated.^{39,40} Ahmed et al. reported reactivation occurring within 4 months following kidney re-transplantation and 3 years after the first scedosporiosis.³⁹ Unfortunately, no genotypic comparison between different strains was performed. However, infection reoccurred in the same skin site as in the primary episode. The authors suggested the use of secondary antifungal prophylaxis to avoid scedosporiosis reactivation.³⁹

Traditionally, *Pneumocystis* pneumonia has been considered as the result of reactivation from a childhood infection due to immunosuppression. This assumption is based on the high level of *Pneumocystis* seropositivity in children and *Pneumocystis* detection in non-immunosuppressed patients.⁴¹ *Pneumocystis* is also involved in long-term lung colonization. *Pneumocystis* can vary his major

surface glycoprotein and thereby evade the immune system.^{41–44} A rat model confirmed this type of long-term colonization.⁴⁵ However, recent data have indicated that de novo infection rather than reactivation seem to be the major phenomenon leading to the disease.^{46,47} Indeed, mice cured of *Pneumocystis* pneumonia did not reactivate when immunosuppressed.^{48,49} In addition, recent genotypic studies have shown that the clusters of *Pneumocystis* responsible for the disease are associated with place of diagnosis rather than place of birth.^{47,50,51} Some authors have also observed that recurrences of *Pneumocystis* disease are due to different strains in the same patient.^{52,53}

Evidence for fungus reactivation can easily be observed in organ transplant recipients. IFD may be due to direct exposure to the fungus during immunosuppressive treatment or to reactivation of a previous infection from the recipient or the organ of the donor.⁵⁴ For instance, serology has provided evidence that cryptococcosis reactivation is possible in solid-organ transplant recipients.²² A transplant can also be the source of reactivation, as has been described regarding *Cryptococcus* spp.,^{55,56} *Aspergillus* spp.,^{57,58} *Histoplasma* spp.,^{56,59} *Coccidioides* spp.,^{60,61} *Mucorales*,⁶² *Scedosporium* spp.⁶³ and *Talaromyces marneffeii*.⁶⁴ These fungi are present in the donor organ, due to initially asymptomatic dissemination or a sub-clinical disease. Once the organ is transplanted and given to the high level of immunosuppression required, these fungi may be reactivated and cause severe diseases.

Granuloma is one of the host responses to fungi

Fungi are able to trigger granuloma formation. A granuloma is a local structure in interface between the host and the pathogen resulting from the inability of the innate and adaptive immune systems to eliminate the pathogen. Granuloma contains inflammatory cells and pathogens surrounded by an extracellular matrix. Some molds use granuloma to chronically infect the dermis,^{65–67} eyes,^{68,69} sinus⁷⁰ or bones.⁷¹ In these cases, granuloma enhances chronic active diseases, like Majocchi's disease, which is symptomatic and are consequently entirely different from reactivation phenomena. In the reactivation process the main role of granuloma is to contain the infection but, paradoxically, they also provide a protective environment enhancing pathogen dormancy.

Histoplasmosis may cause granuloma formation to remain latent, whatever the variety of *capsulatum* or *duboisii* involved.^{72–74} Heninger et al. have developed a mouse model of *Histoplasma* granuloma.⁷² They showed that interferon-gamma (IFN- γ) activated macrophages are the major cells (70%) from the beginning to the chronic phase of granuloma formation. Dendritic cells and T cells are also involved. Among T cells, CD4+ are more present at the beginning of the infection whereas CD8+ T cells trend to proliferate during the chronic phase. Although B lymphocytes were less present at the beginning of granuloma formation, they increased to 20% at the 50th day. Th1 is the pathway most directly leading to granuloma formation. IFN- γ and Tumor necrosis factor alpha (TNF- α) are produced at high levels by T cells and macrophages, respectively. These cytokines are crucial to the maintenance of granuloma structure integrity. Inflammatory IL-1 and IL-6 are also found in large quantities in the environment of granuloma. Macrophages are activated by T cells through IFN- γ to control infection. Th2 pathway is activated to regulate inflammation through the production of IL-5. Anti-inflammatory cytokines, IL-10 and TGF-beta (TGF- β), are found at high levels in granuloma. In addition, high level of IL-17 signals the involvement of Th17 pathway in *Histoplasma* granuloma⁷² (Fig. 2).

Other authors have shown in a murine model the role of Th17 pathway in the formation of *Paracoccidioides brasiliensis*

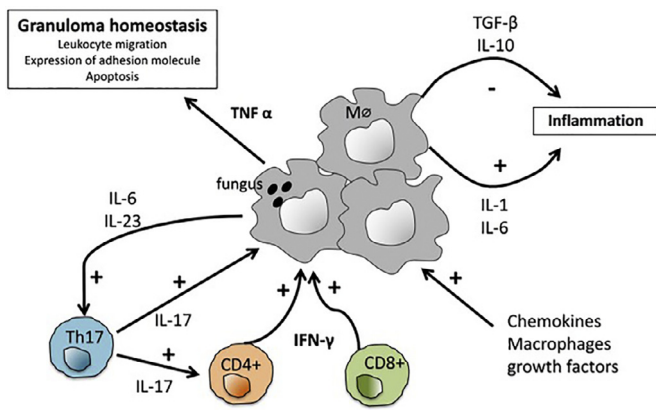


Fig. 2. Fungal granuloma structure.

CD4⁺ and CD8⁺ T cells produce IFN- γ which stimulates macrophages in TNF- α secretion. TNF- α is a key cytokine in granuloma homeostasis through its role in regulation of leukocyte migration, expression of adhesion molecules, and apoptosis. The Th1 pathway accompanied by a significant production of TNF- α and IFN- γ is therefore the major pathway involved in the granuloma. Th17 pathway is also involved through IL-17 secretion that stimulates both macrophages and IFN- γ production. Finally, homeostasis is also maintained through a balance between pro-inflammatory and anti-inflammatory cytokines in the granuloma.

granuloma.⁷⁵ It is stimulated by the production of IL-6 and IL-23 by the macrophages, and can enhance the production of TNF- α and IFN- γ , thereby promoting granuloma formation.⁷⁵

The same conclusions have been drawn from cryptococcal animal models.^{76–78} Th1 pathway with IFN- γ and TNF- α counterbalanced by Th2 pathway have been identified as predominant in the formation and maintenance of granuloma. Macrophages, histiocytes and giant multinucleated cells represent the main components of *Cryptococcus* granuloma,⁷⁹ which is less inflammatory than *Mycobacterium* granuloma and may lead to poor immune response consistent with a dormant infection. Indeed, histopathological data have shown that *Cryptococcus* produced less necrosis than *M. tuberculosis* in the granuloma.⁸⁰ The inflammatory reaction is reduced with a low neutrophil response and no suppurative disease.⁸⁰ Macrophages present in granuloma enhance the persistence of *Cryptococcus*.⁸¹ When the immune response of the host is impaired, macrophages are no longer able to keep *Cryptococcus* internalized or in a dormant state and disease may occur.⁸²

Granuloma formation is impaired in the event of immunosuppression; pathogens can thereby be reactivated and disseminate.⁷² The link between granuloma formation and reactivation of pathogen has been well-described in *M. tuberculosis*.⁸³ It has been shown that TNF blockade by anti-TNF- α increases the risk of tuberculosis.^{84,85} In murine models of tuberculosis, when anti-TNF- α was administered to mice, increase of cellular recruitment and inflammatory response were highlighted and disorganization of granuloma, widespread dissemination of mycobacteria, and death occurred.^{84,85} Case reports of histoplasmosis, disseminated cryptococcal infections and paracoccidioidomycosis have also been reported in association with the use of TNF- α inhibitors.^{84,86,87} Alemtuzumab, an anti-lymphocyte B and T, has been associated with cases of cryptococcosis and histoplasmosis.⁸⁸ HIV infection, which leads to a decrease in CD4⁺ T cells, can also cause disorganization of granuloma due to the major role of CD4⁺ T cells.^{72,89} Some authors have shown in a histopathological study that patients with AIDS and cryptococcosis are lacking in typical granuloma formation and undergoing extensive capillary invasion. In contrast, HAART initiation leads to decreased in capillary invasion and the appearance of granuloma.⁷⁹

Fungal dormancy, an intricate mechanism leading to disease latency

In addition to granuloma formation, survival inside macrophages or other phagocytic cells may help to explain the persistence of the fungi. Their action requires complex adaptive systems. Macrophages may play a dual role by at once containing an infection and providing an enabling environment for replication and/or dormancy. *Histoplasma* may be dormant in macrophages by residing and replicating in modified phagosomes. *Histoplasma* survives in this very hostile milieu using strategies such as inhibition of phagolysosome fusion, alkalization of the milieu, inhibition of burst oxidative production and development of iron acquisition mechanisms.^{8,90–92} *Blastomyces* is likewise able to survive inside macrophages. Although widely considered as an extracellular pathogen, *Blastomyces* can replicate inside alveolar macrophages, adopting an intracellular lifestyle.⁹³

Macrophages play a paradoxical role in cryptococcosis. While able to kill *Cryptococcus* by phagocytosis, they can also exacerbate the virulence and persistence of *Cryptococcus*⁸¹ and be the vector of dissemination of the yeast.^{94,95} Conversely to other pathogens, *Cryptococcus* does not hamper phagolysosome acidification. The yeast develops other strategies to survive in this environment. Cryptococcal polysaccharide capsule and laccase activity/melanin production increase resistance to reactive oxygen species and antimicrobial peptides. Moreover, a large number of enzymes, proteins or carbohydrates including superoxide dismutase, phospholipase, and sphingolipids help to avoid acidic, nitrosoactive and oxidative stress and protect from degradation. Finally, membrane-associated transporters and acquisition systems of nutrients, iron, and copper, may be upregulated, allowing fungi to survive inside macrophages.⁸²

Fungi have the ability to modulate their metabolism or to phenotypically change to survive inside the host. A mechanism called microevolution may be involved.⁹⁶ It is defined by phenotypical changes without molecular changes in isolates. Microevolution of *Cryptococcus* spp. may reduce phagocytosis efficacy and crosstalk between immune cells by phenotypical modifications such as higher production of extracellular enzymes. For example, some authors have compared the levels of protease and phospholipase activity of two strains from the same patient leading to disease at a three-year interval. The first strain was responsible for the initial infection. The second strain was genetically very close to the first, supporting the hypothesis of reactivation. In the second strain, which remained latent for three years, the activity of phospholipase and protease was higher than in the first. These enzymes, of which the production capacity increased, may play a presently largely unknown role in latency.⁹⁶ Other authors have hypothesized that metabolically heterogeneous populations of *Cryptococcus* cells coexist in tissues. Among the latter, slow metabolism cells have been described in the lungs and may correspond to dormant cells.⁹⁷ Other studies have underlined the role of titan cells which would appear likely to promote persistence of *Cryptococcus*.^{98,99} They are very large yeasts with a capsule structure differing from that of normal yeast cells. They may be less effective in stimulation of the immune system promoting *Cryptococcus* survival. The remaining questions regarding host-induced morphological change should be addressed in future studies.⁹⁹

Molecular studies have begun to better characterize *Aspergillus* dormancy. Dormancy is associated with a fermentative metabolism, whereas exit from dormancy results in a shift to a respiratory metabolism improving protein synthesis.¹⁰⁰ Studies of transcriptomes have provided some keys to the understanding of dormancy. Gene expression between grown conidia and latent conidia differs, with AtfA bZip-type transcription factor being highly involved in the persistence of conidial dormancy. On the other

hand, calA-family genes encoding a thaumatin-like protein have been shown to be highly involved in germination.^{101,102}

Conclusion

Reactivation and dormancy are clearly described mechanisms for *Cryptococcus* and some dimorphic fungi. Connecting data from experimental animal models, as well as clinical and histopathological studies, support the concept of reactivation with regard to mold infections. Although granuloma is closely linked to chronic diseases, it could nevertheless enhance latency. Survival inside macrophages and dormancy are currently better and better understood as strategies to escape the immune system. Based on the concept of reactivation, the indication and timing of antifungal prophylaxis in highly immunocompromised patients should be studied in view of decreasing fungal infection incidence.

Conflict of interest

None.

This research did not receive any specific grant from funding agencies in the public, commercial, or not-for-profit sectors.

References

- Philips JA, Ernst JD. Tuberculosis pathogenesis and immunity. *Annu Rev Pathol* 2012;**7**:353–84.
- Evering T, Weiss LM. The immunology of parasite infections in immunocompromised hosts. *Parasite Immunol* 2006;**28**(11):549–65.
- Martínez-Valencia AJ, Daza-Rivera CF, Rosales-Chilama M, Cossio A, Casadiego Rincón EJ, Desai MM, et al. Clinical and parasitological factors in parasite persistence after treatment and clinical cure of cutaneous leishmaniasis. *PLoS Negl Trop Dis* 2017;**11**(7):e0005713.
- Reese TA. Coinfections: Another variable in the herpesvirus latency-reactivation dynamic. *J Virol* 2016;**90**(12):5534–7.
- Society AT, CfDca Prevention, IDSo America. American thoracic society/centers for disease control and prevention/infectious diseases society of America: controlling tuberculosis in the United States. *Am J Respir Crit Care Med* 2005;**172**(9):1169–227.
- Pappas PG, Alexander BD, Andes DR, Hadley S, Kauffman CA, Freifeld A, et al. Invasive fungal infections among organ transplant recipients: results of the Transplant-Associated Infection Surveillance Network (TRANSNET). *Clin Infect Dis* 2010;**50**(8):1101–11.
- Kontoyiannis DP, Marr KA, Park BJ, Alexander BD, Anaissie EJ, Walsh TJ, et al. Prospective surveillance for invasive fungal infections in hematopoietic stem cell transplant recipients, 2001–2006: overview of the Transplant-Associated Infection Surveillance Network (TRANSNET) Database. *Clin Infect Dis* 2010;**50**(8):1091–100.
- Woods JP. Revisiting old friends: developments in understanding *Histoplasma capsulatum* pathogenesis. *J Microbiol* 2016;**54**(3):265–76.
- Peigne V, Dromer F, Elie C, Lidove O, Lortholary O, Group FMS. Imported acquired immunodeficiency syndrome-related histoplasmosis in metropolitan France: a comparison of pre-highly active anti-retroviral therapy and highly active anti-retroviral therapy eras. *Am J Trop Med Hyg* 2011;**85**(5):934–41.
- Ashbee HR, Evans EG, Viviani MA, Dupont B, Chryssanthou E, Surmont I, et al. Histoplasmosis in Europe: report on an epidemiological survey from the European Confederation of Medical Mycology Working Group. *Med Mycol* 2008;**46**(1):57–65.
- Winqvist EW, Walmsley SL, Berinstein NL. Reactivation and dissemination of blastomycosis complicating Hodgkin's disease: a case report and review of the literature. *Am J Hematol* 1993;**43**(2):129–32.
- Stockamp NW, Thompson GR. Coccidioidomycosis. *Infect Dis Clin North Am* 2016;**30**(1):229–46.
- Arbeloa-Gutierrez L, Kuberski T, Johnson SM, Sagastibelza I, Alaez JJ, Pappagianis D. Reactivation of coccidioidomycosis: a prosthetic joint infection in Spain. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2016;**35**(2):183–6.
- Cooper CR, Vanittanakom N. Insights into the pathogenicity of *Penicillium marneffei*. *Future Microbiol* 2008;**3**(1):43–55.
- Kauffman CA. Endemic mycoses in patients with hematologic malignancies. *Semin Respir Infect* 2002;**17**(2):106–12.
- Cristini A, García-Hermoso D, Celard M, Albrand G, Lortholary O. Cerebral phaeohyphomycosis caused by *Rhinocladiella mackenziei* in a woman native to Afghanistan. *J Clin Microbiol* 2010;**48**(9):3451–4.
- García-Hermoso D, Janbon G, Dromer F. Epidemiological evidence for dormant *Cryptococcus neoformans* infection. *J Clin Microbiol* 1999;**37**(10):3204–9.
- Beale MA, Sabiiti W, Robertson EJ, Fuentes-Cabrejo KM, O'Hanlon SJ, Jarvis JN, et al. Genotypic diversity is associated with clinical outcome and phenotype in cryptococcal meningitis across Southern Africa. *PLoS Negl Trop Dis* 2015;**9**(6):e0003847.
- Dromer F, Mathoulin S, Dupont B, Letenneur L, Ronin O. Individual and environmental factors associated with infection due to *Cryptococcus neoformans* serotype D. French Cryptococcosis Study Group. *Clin Infect Dis* 1996;**23**(1):91–6.
- Abadi J, Pirofski L. Antibodies reactive with the cryptococcal capsular polysaccharide glucuronoxylomannan are present in sera from children with and without human immunodeficiency virus infection. *J Infect Dis* 1999;**180**(3):915–19.
- Goldman DL, Khine H, Abadi J, Lindenberg DJ, La Pirofski, Niang R, et al. Serologic evidence for *Cryptococcus neoformans* infection in early childhood. *Pediatrics* 2001;**107**(5):E66.
- Saha DC, Goldman DL, Shao X, Casadevall A, Husain S, Limaye AP, et al. Serologic evidence for reactivation of cryptococcosis in solid-organ transplant recipients. *Clin Vaccine Immunol* 2007;**14**(12):1550–4.
- Chen SC, Slavin MA, Heath CH, Playford EG, Byth K, Marriott D, et al. Clinical manifestations of *Cryptococcus gattii* infection: determinants of neurological sequelae and death. *Clin Infect Dis* 2012;**55**(6):789–98.
- Dromer F, Ronin O, Dupont B. Isolation of *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* from an Asian patient in France: evidence for dormant infection in healthy subjects. *J Med Vet Mycol* 1992;**30**(5):395–7.
- Hagen F, Colom MF, Swinne D, Tintelnot K, Iatta R, Montagna MT, et al. Autochthonous and dormant *Cryptococcus gattii* infections in Europe. *Emerg Infect Dis* 2012;**18**(10):1618–24.
- Hajjeh RA, Warnock DW. Counterpoint: invasive aspergillosis and the environment—rethinking our approach to prevention. *Clin Infect Dis* 2001;**33**(9):1549–52.
- Robertson MJ, Larson RA. Recurrent fungal pneumonias in patients with acute nonlymphocytic leukemia undergoing multiple courses of intensive chemotherapy. *Am J Med* 1988;**84**(2):233–9.
- Martino R, Nomdedéu J, Altés A, Sureda A, Brunet S, Martínez C, et al. Successful bone marrow transplantation in patients with previous invasive fungal infections: report of four cases. *Bone Marrow Transpl* 1994;**13**(3):265–9.
- Cordonnier C, Maury S, Pautas C, Bastié JN, Chehata S, Castaigne S, et al. Secondary antifungal prophylaxis with voriconazole to adhere to scheduled treatment in leukemic patients and stem cell transplant recipients. *Bone Marrow Transpl* 2004;**33**(9):943–8.
- Fukuda T, Boeckh M, Guthrie KA, Mattson DK, Owens S, Wald A, et al. Invasive aspergillosis before allogeneic hematopoietic stem cell transplantation: 10-year experience at a single transplant center. *Biol Blood Marrow Transpl* 2004;**10**(7):494–503.
- Leleu C, Menotti J, Meneceur P, Choukri F, Sulahian A, Garin YJ, et al. Efficacy of liposomal amphotericin B for prophylaxis of acute or reactivation models of invasive pulmonary aspergillosis. *Mycoses* 2013;**56**(3):241–9.
- Niki Y, Bernard EM, Edwards FF, Schmitt HJ, Yu B, Armstrong D. Model of recurrent pulmonary aspergillosis in rats. *J Clin Microbiol* 1991;**29**(7):1317–22.
- Nawada R, Amitani R, Tanaka E, Niimi A, Suzuki K, Murayama T, et al. Murine model of invasive pulmonary aspergillosis following an earlier stage, noninvasive *Aspergillus* infection. *J Clin Microbiol* 1996;**34**(6):1433–9.
- Farmakiotis D, Kontoyiannis DP. Mucormycoses. *Infect Dis Clin North Am* 2016;**30**(1):143–63.
- Sheldon WH, Bauer H. Activation of quiescent mucormycotic granulomata in rabbits by induction of acute alloxan diabetes. *J Exp Med* 1958;**108**(1):171–8.
- Ibrahim AS, Voelz K. The mucormycete-host interface. *Curr Opin Microbiol* 2017;**40**:40–5.
- Inglesfield S, Jasiulewicz A, Hopwood M, Tyrrell J, Youlden G, Mazon-Moya M, et al. Robust phagocyte recruitment controls the opportunistic fungal pathogen. *MBio* 2018;**9**:2.
- Waldorf AR, Halde C, Vedros NA. Murine model of pulmonary mucormycosis in cortisone-treated mice. *Sabouraudia* 1982;**20**(3):217–24.
- Ahmed J, Ditmars DM, Sheppard T, del Busto R, Venkat KK, Parasuraman R. Recurrence of *Scedosporium apiospermum* infection following renal re-transplantation. *Am J Transpl* 2004;**4**(10):1720–4.
- Ezzedine K, Wissing KM, Jacobs F, Rodriguez H, Malvy D, Simonart T. Recurrent *Scedosporium apiospermum* skin infection in a renal transplant recipient. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 2009;**23**(1):95–6.
- Morris A, Norris KA. Colonization by *Pneumocystis jirovecii* and its role in disease. *Clin Microbiol Rev* 2012;**25**(2):297–317.
- Sunkin SM, Stringer JR. Translocation of surface antigen genes to a unique telomeric expression site in *Pneumocystis carinii*. *Mol Microbiol* 1996;**19**(2):283–95.
- Gigliotti F. Host species-specific antigenic variation of a mannoseylated surface glycoprotein of *Pneumocystis carinii*. *J Infect Dis* 1992;**165**(2):329–36.
- Daly K, Koch J, Respaldiza N, de la Horra C, Montes-Cano MA, Medrano FJ, et al. Geographical variation in serological responses to recombinant *Pneumocystis jirovecii* major surface glycoprotein antigens. *Clin Microbiol Infect* 2009;**15**(10):937–42.
- Frenkel JK, Good JT, Shultz JA. Latent *Pneumocystis* infection of rats, relapse, and chemotherapy. *Lab Invest* 1966;**15**(10):1559–77.
- Alanio A, Bretagne S. *Pneumocystis jirovecii* detection in asymptomatic patients: what does its natural history tell us? *F1000Res*. 2017;**6**:739.
- Gits-Muselli M, Peraldi MN, de Castro N, Delcey V, Menotti J, Guigue N, et al. New short tandem repeat-based molecular typing method for *Pneumocystis jirovecii* reveals intrahospital transmission between patients from different wards. *PLoS One* 2015;**10**(5):e0125763.
- Chen W, Gigliotti F, Harmsen AG. Latency is not an inevitable outcome of infection with *Pneumocystis carinii*. *Infect Immun* 1993;**61**(12):5406–9.

49. Vargas SL, Hughes WT, Wakefield AE, Oz HS. Limited persistence in and subsequent elimination of *Pneumocystis carinii* from the lungs after *P. carinii* pneumonia. *J Infect Dis* 1995;**172**(2):506–10.
50. Beard CB, Carter JL, Keely SP, Huang L, Pieniazek NJ, Moura IN, et al. Genetic variation in *Pneumocystis carinii* isolates from different geographic regions: implications for transmission. *Emerg Infect Dis* 2000;**6**(3):265–72.
51. Miller RF, Lindley AR, Copas A, Ambrose HE, Davies RJ, Wakefield AE. Genotypic variation in *Pneumocystis jirovecii* isolates in Britain. *Thorax* 2005;**60**(8):679–82.
52. Keely SP, Stringer JR, Baughman RP, Linke MJ, Walzer PD, Smulian AG. Genetic variation among *Pneumocystis carinii* hominis isolates in recurrent pneumocystosis. *J Infect Dis* 1995;**172**(2):595–8.
53. Alanio A, Gits-Muselli M, Mercier-Delarue S, Dromer F, Bretagne S. Diversity of *Pneumocystis jirovecii* during infection revealed by ultra-deep pyrosequencing. *Front Microbiol* 2016;**7**:733.
54. Singh N, Huprikar S, Burdette SD, Morris MI, Blair JE, Wheat LJ, et al. Donor-derived fungal infections in organ transplant recipients: guidelines of the American Society of Transplantation, infectious diseases community of practice. *Am J Transpl* 2012;**12**(9):2414–28.
55. Baddley JW, Schain DC, Gupte AA, Lodhi SA, Kayler LK, Frade JP, et al. Transmission of *Cryptococcus neoformans* by organ transplantation. *Clin Infect Dis* 2011;**52**(4):e94–8.
56. Ison MG, Hager J, Blumberg E, Burdick J, Carney K, Cutler J, et al. Donor-derived disease transmission events in the United States: data reviewed by the OPTN/UNOS Disease Transmission Advisory Committee. *Am J Transpl* 2009;**9**(8):1929–35.
57. Keating MR, Guerrero MA, Daly RC, Walker RC, Davies SF. Transmission of invasive aspergillosis from a subclinically infected donor to three different organ transplant recipients. *Chest* 1996;**109**(4):1119–24.
58. Mueller NJ, Weisser M, Fehr T, Wüthrich RP, Müllhaupt B, Lehmann R, et al. Donor-derived aspergillosis from use of a solid organ recipient as a multi-organ donor. *Transpl Infect Dis* 2010;**12**(1):54–9.
59. Cuellar-Rodriguez J, Avery RK, Lard M, Budev M, Gordon SM, Shrestha NK, et al. Histoplasmosis in solid organ transplant recipients: 10 years of experience at a large transplant center in an endemic area. *Clin Infect Dis* 2009;**49**(5):710–16.
60. Dierberg KL, Marr KA, Subramanian A, Nace H, Desai N, Locke JE, et al. Donor-derived organ transplant transmission of coccidioidomycosis. *Transpl Infect Dis* 2012;**14**(3):300–4.
61. Kusne S, Taranto S, Covington S, Kaul DR, Blumberg EA, Wolfe C, et al. Coccidioidomycosis transmission through organ transplantation: a report of the OPTN Ad Hoc disease transmission advisory committee. *Am J Transpl* 2016;**16**(12):3562–7.
62. Alexander BD, Schell WA, Siston AM, Rao CY, Bower WA, Balajee SA, et al. Fatal *Apophysomyces elegans* infection transmitted by deceased donor renal allografts. *Am J Transpl* 2010;**10**(9):2161–7.
63. van der Vliet JA, Tidow G, Kootstra G, van Saene HF, Krom RA, Sloof MJ, et al. Transplantation of contaminated organs. *Br J Surg* 1980;**67**(8):596–8.
64. Hermans F, Ombelet S, Degezelle K, Testelmans D, Van Raemdonck DE Verleden GM, et al. First-in-man observation of *Talaromyces marneffei*-transmission by organ transplantation. *Mycoses* 2017;**60**(3):213–17.
65. Rammaert B, Angebault C, Scemla A, Fraïtag S, Lerolle N, Lecuit M, et al. *Mucor irregularis*-associated cutaneous mucormycosis: case report and review. *Med Mycol Case Rep* 2014;**6**:62–5.
66. Vinay K, Chandrasegaran A, Kanwar AJ, Saikia UN, Kaur H, Shivaprakash MR, et al. Primary cutaneous mucormycosis presenting as a giant plaque: uncommon presentation of a rare mycosis. *Mycopathologia* 2014;**178**(1–2):97–101.
67. Ilkit M, Durdu M, Karakaş M. Majocchi's granuloma: a symptom complex caused by fungal pathogens. *Med Mycol* 2012;**50**(5):449–57.
68. Jain V, Dabir S, Shome D, Dadu T, Natarajan S. *Aspergillus* iris granuloma: a case report with review of literature. *Surv Ophthalmol* 2009;**54**(2):286–91.
69. Smith WM, Fahle G, Nussenblatt RB, Sen HN. A rare case of endogenous *Aspergillus* conicus endophthalmitis in an immunocompromised patient. *J Ophthalm Inflamm Infect* 2013;**3**(1):37.
70. Montone KT. Pathology of fungal rhinosinusitis: a review. *Head Neck Pathol* 2016;**10**(1):40–6.
71. Yoon KW, Kim YJ. Lumbar *Aspergillus* osteomyelitis mimicking pyogenic osteomyelitis in an immunocompetent adult. *Br J Neurosurg* 2015;**29**(2):277–9.
72. Heninger E, Hogan LH, Karman J, Macvilay S, Hill B, Woods JP, et al. Characterization of the *Histoplasma capsulatum*-induced granuloma. *J Immunol* 2006;**177**(5):3303–13.
73. Richaud C, Chandresris MO, Lanternier F, Benzaquen-Forner H, Garcia-Hermoso D, Picard C, et al. Imported African histoplasmosis in an immunocompetent patient 40 years after staying in a disease-endemic area. *Am J Trop Med Hyg* 2014;**91**(5):1011–14.
74. Fernandez C, Gazaille V, Werbrouck-Chiraux A, Belmonte O, Sultan-Bichat N, Agape P, et al. [American histoplasmosis: clinicopathological features in immunocompetent and immunocompromised patients. A report of two cases of infection by *Histoplasma capsulatum* on Reunion Island]. *Rev Mal Respir* 2014;**31**(5):447–53.
75. Tristão FSM, Rocha FA, Carlos D, Ketelut-Carneiro N, Souza COS, Milanezi CM, et al. Th17-inducing cytokines IL-6 and IL-23 are crucial for granuloma formation during experimental paracoccidioidomycosis. *Front Immunol* 2017;**8**:949.
76. Farnoud AM, Bryan AM, Kechichian T, Tuberto C, Del Poeta M. The granuloma response controlling cryptococcosis in mice depends on the sphingosine kinase 1-sphingosine 1-phosphate pathway. *Infect Immun* 2015;**83**(7):2705–13.
77. Zhang Y, Wang F, Bhan U, Huffnagle GB, Toews GB, Standiford TJ, et al. TLR9 signaling is required for generation of the adaptive immune protection in *Cryptococcus neoformans*-infected lungs. *Am J Pathol* 2010;**177**(2):754–65.
78. Kobayashi M, Ito M, Sano K, Koyama M. Granulomatous and cytokine responses to pulmonary *Cryptococcus neoformans* in two strains of rats. *Mycopathologia* 2001;**151**(3):121–30.
79. Shibuya K, Hirata A, Omuta J, Sugamata M, Katori S, Saito N, et al. Granuloma and cryptococcosis. *J Infect Chemother* 2005;**11**(3):115–22.
80. Baker RD, Haugen RK. Tissue changes and tissue diagnosis in cryptococcosis; a study of 26 cases. *Am J Clin Pathol* 1955;**25**(1):14–24.
81. Coelho C, Bocca AL, Casadevall A. The intracellular life of *Cryptococcus neoformans*. *Annu Rev Pathol* 2014;**9**:219–38.
82. McQuiston TJ, Williamson PR. Paradoxical roles of alveolar macrophages in the host response to *Cryptococcus neoformans*. *J Infect Chemother* 2012;**18**(1):1–9.
83. Gupta A, Kaul A, Tsolaki AG, Kishore U, Bhakta S. *Mycobacterium tuberculosis*: immune evasion, latency and reactivation. *Immunobiology* 2012;**217**(3):363–74.
84. Giles JT, Bathon JM. Serious infections associated with anticytokine therapies in the rheumatic diseases. *J Intensive Care Med* 2004;**19**(6):320–34.
85. Chan J, Flynn J. The immunological aspects of latency in tuberculosis. *Clin Immunol* 2004;**110**(1):2–12.
86. Wood KL, Hage CA, Knox KS, Kleiman MB, Sannuti A, Day RB, et al. Histoplasmosis after treatment with anti-tumor necrosis factor- α therapy. *Am J Respir Crit Care Med* 2003;**167**(9):1279–82.
87. Covre LCP, Hombre PM, Falqueto A, Peçanha PM, Valim V. Pulmonary paracoccidioidomycosis: a case report of reactivation in a patient receiving biological therapy. *Rev Soc Bras Med Trop* 2018;**51**(2):249–52.
88. Nath DS, Kandaswamy R, Gruessner R, Sutherland DE, Dunn DL, Humar A. Fungal infections in transplant recipients receiving alemtuzumab. *Transpl Proc* 2005;**37**(2):934–6.
89. Flynn JL, Chan J. Tuberculosis: latency and reactivation. *Infect Immun* 2001;**69**(7):4195–201.
90. Woods JP. Knocking on the right door and making a comfortable home: *Histoplasma capsulatum* intracellular pathogenesis. *Curr Opin Microbiol* 2003;**6**(4):327–31.
91. Garfoot AL, Rappleye CA. *Histoplasma capsulatum* surmounts obstacles to intracellular pathogenesis. *FEBS J*. 2016;**283**(4):619–33.
92. Brummer E, Katsuhiko K. *Histoplasma capsulatum*: master evader of innate immunity. *Med Mycol J*. 2014;**55**(4):E57–62.
93. Sterkel AK, Mettelman R, Wüthrich M, Klein BS. The unappreciated intracellular lifestyle of *Blastomyces dermatitidis*. *J Immunol* 2015;**194**(4):1796–805.
94. Charlier C, Nielsen K, Daou S, Brigitte M, Chretien F, Dromer F. Evidence of a role for monocytes in dissemination and brain invasion by *Cryptococcus neoformans*. *Infect Immun* 2009;**77**(1):120–7.
95. Alanio A, Desnos-Ollivier M, Dromer F. Dynamics of *Cryptococcus neoformans*-macrophage interactions reveal that fungal background influences outcome during cryptococcal meningoencephalitis in humans. *MBio* 2011;**2**(4).
96. Blasi E, Brozzetti A, Francisci D, Neglia R, Cardinali G, Bistoni F, et al. Evidence of microevolution in a clinical case of recurrent *Cryptococcus neoformans* meningoencephalitis. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2011;**20**(8):535–43.
97. Alanio A, Vernel-Pauillac F, Sturny-Leclère A, Dromer F. *Cryptococcus neoformans* host adaptation: toward biological evidence of dormancy. *MBio*. 2015;**6**(2).
98. Crabtree JN, Okagaki LH, Wiesner DL, Strain AK, Nielsen JN, Nielsen K. Titan cell production enhances the virulence of *Cryptococcus neoformans*. *Infect Immun* 2012;**80**(11):3776–85.
99. O'Meara TR, Alspaugh JA. The *Cryptococcus neoformans* capsule: a sword and a shield. *Clin Microbiol Rev* 2012;**25**(3):387–408.
100. Lamarre C, Sokol S, Debeaupuis JP, Henry C, Lacroix C, Glaser P, et al. Transcriptomic analysis of the exit from dormancy of *Aspergillus fumigatus* conidia. *BMC Genom* 2008;**9**:417.
101. Hagiwara D, Takahashi H, Kusuya Y, Kawamoto S, Kamei K, Gono T. Comparative transcriptome analysis revealing dormant conidia and germination associated genes in *Aspergillus* species: an essential role for AtfA in conidial dormancy. *BMC Genom* 2016;**17**(1):358.
102. Wong Sak Hoi J, Lamarre C, Beau R, Meneau I, Berepiki A, Barre A, et al. A novel family of dehydrin-like proteins is involved in stress response in the human fungal pathogen *Aspergillus fumigatus*. *Mol Biol Cell* 2011;**22**(11):1896–906.

Objectifs

L'objectif de cette thèse était d'améliorer la prise en charge de la mucormycose pulmonaire sur différents aspects, à la fois préventifs et curatifs.

Ce travail s'est focalisé sur la mucormycose pulmonaire et sur une espèce de *Mucorales* en particulier, *L. corymbifera*. En effet, la forme pulmonaire de mucormycose est la forme majoritaire en France, essentiellement retrouvée chez les patients atteints d'hémopathies malignes (19), et est très associée au genre *Lichtheimia sp* (19).

Les objectifs de cette thèse étaient de :

- **Partie I** : Développer un modèle murin de mucormycose pulmonaire aigüe à *L. corymbifera* caractérisé sur le plan histologique et immunitaire pour améliorer la compréhension de la relation hôte-champignon-antifongique. *Cette partie n'a pas fait en l'état l'objet d'une publication et se présente sous format IMReD (Introduction, Matériels et Méthodes, Résultats et Discussion) en français. Une partie des données de développement du modèle est publiée dans l'article 1 (Partie II).*
- **Partie II** : Comprendre le rôle des corticoïdes dans la physiopathologie de l'infection pour ouvrir des pistes à un traitement préventif. *Cette partie fait l'objet d'un **article soumis** dont le manuscrit est présenté (Article 1).*
- **Partie III** : Évaluer l'intérêt de l'AmB en décolonisation pour prévenir la réactivation fongique. *Cette partie fait l'objet d'un **article publié** dont le format PDF est inclus (Article 2).*
- **Partie IV** : Augmenter l'efficacité de l'AmB par l'intermédiaire de traitements ou d'adjuvants potentialisant son action. *Cette partie fait l'objet d'un **article en cours d'écriture** dont le manuscrit est présenté (Article 3).*

Travail expérimental

I. Développement et caractérisation d'un modèle murin de mucormycose pulmonaire aiguë à *Lichtheimia corymbifera*

- Partie non publiée, présentée sous format IMReD en français. Une partie des données de développement du modèle est présentée dans l'article 1 (Partie II).

Résumé

Dans l'optique d'améliorer les connaissances physiopathologiques sur la mucormycose pulmonaire à *L. corymbifera*, d'en optimiser le traitement et la prévention, la mise au point d'un modèle murin caractérisé sur les plans histologiques et immunologiques apparaît comme essentielle.

Des souris mâles BALB/c ont été immunodéprimées selon plusieurs protocoles à base de cyclophosphamide (CPA) et/ou de corticoïdes, puis inoculées à J0 avec différents inocula de spores de *L. corymbifera*. La présence de filaments mycéliens dans les poumons, témoin d'une infection invasive, a été explorée par marquage au calcofluor et par coloration argentique. Par la suite, la survie des souris a été évaluée dans les protocoles à base de corticoïdes permettant d'obtenir une infection invasive. Un traitement par amphotéricine B liposomale intrapéritonéal (AmBL, 15 mg/kg/j, IP) a ensuite été réalisé, puis la survie, la charge fongique pulmonaire et le recrutement des cellules immunitaires dans le LBA ont été caractérisés par qPCR et cytométrie en flux respectivement.

Le CPA seul n'a pas permis de déclencher d'infection invasive à la différence des protocoles à bases de corticoïdes seuls ou associés au CPA. La survie des souris dans les deux modèles n'utilisant que des corticoïdes a ensuite été comparée. La posologie de 250 mg/kg à J-3, J0, J3 et J6 n'a entraîné que 20% de mortalité à 21 jours alors que la posologie à 500 mg/kg à J-3, J0, J3 et J6 a entraîné 100% de mortalité à 10 jours. Ce dernier protocole a donc été conservé pour la suite des expérimentations. Le traitement par AmBL (15mg/kg, IP, J3, J4, J5, J6) a amélioré la survie des souris, avec 60% de survie à 21 jours, mais la qPCR n'a pas mis en évidence de diminution de la charge fongique pulmonaire. L'AmBL a également eu pour conséquence de diminuer le recrutement des polynucléaires neutrophiles à J6 (4.9% vs 20.4%, $p = 0,02$), mais n'a pas eu d'effet sur le recrutement des macrophages alvéolaires.

Ce modèle *in vivo* d'infection aigüe permettra d'explorer la relation triangulaire hôte-champignon-antifongique.

Introduction

La mucormycose pulmonaire est une maladie très complexe à étudier chez l'Homme du fait de sa faible incidence et de sa forte mortalité. L'utilisation des modèles animaux est donc indispensable pour étudier cette maladie. Il apparaît donc pertinent de développer un modèle de mucormycose pulmonaire aigüe à *L. corymbifera* pour étudier la relation champignon-hôte-antifongique.

Matériels et méthodes

Souche de *Mucorales* et préparation de l'inoculum. La souche de *Mucorales* utilisée était une souche clinique de *Lichtheimia corymbifera* (Centre national de référence des Mycoses invasives et antifongiques [CNRMA], Paris, France, 2011.1047). Cette souche était conservée par congélation à -80°C sur cryobilles. A chaque utilisation une bille était mise en culture dans des flasques de Potato Dextrose Agar (Becton Dickinson, Franklin Lakes, USA). Après 7 jours de culture à 37°C, les spores étaient collectées en inondant la flasque avec 10 mL de tampon phosphate (PBS, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) additionné de 0,05% de Tween 80 (PBS/Tween 80, Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA) pour éviter l'agglutination des spores. La suspension était ensuite filtrée sur un filtre en nylon de 11 µm (Millipore, Kenilworth, USA) pour éliminer les filaments. Les spores étaient ensuite comptées sur une cellule de Kova. La concentration de l'inoculum était alors ajustée par dilution dans du PBS/Tween 80 de façon à obtenir la concentration désirée.

Animaux et considérations éthiques. Des souris BALB/c mâles, âgées de huit semaines, de poids moyen 22 g, ont été utilisées (Janvier Labs, Le Genest-Saint-Isle, France). Les souris étaient reçues cinq jours avant l'expérimentation, ce qui leur permettait de s'acclimater aux conditions et avait un accès libre à l'eau et la nourriture pendant toute la durée des expérimentations.

Les règles éthiques et de bonnes pratiques définies par la directive européenne de 2010 (2010/63/EU) ont été suivies tout au long du projet. Le projet a reçu un avis favorable du comité d'éthique local COMETHEA Poitou-Charentes et a été enregistré par le ministère de l'éducation nationale, de l'enseignement supérieur et de la recherche sous le numéro 201602111555901.

Les souris étaient euthanasiées lorsqu'elles atteignaient les points limites suivant : perte de poids de plus de 20% par rapport au poids moyen, tremblements, prostration, signes de souffrance neurologique (paralysie des membres, troubles de l'équilibre), fin de la durée d'expérimentation.

Etape A : Développement d'un modèle murin de mucormycose pulmonaire aigüe invasive.

Cette première étape a consisté à déterminer un protocole d'immunosuppression et un inoculum fongique permettant le développement d'une infection invasive chez 100% des souris. L'infection invasive a été définie par la présence de filaments pulmonaires et leur délai d'apparition a été évalué.

Immunosuppression. Les agents immunosuppresseurs utilisés étaient l'acétate de cortisone (Sigma-Aldrich) et le cyclophosphamide (CPA, Sigma-Aldrich) dissout dans du PBS contenant 0,01% de Tween 20 (PBS/Tween 20). Ils étaient administrés par voie intrapéritonéale (IP). Les différents protocoles testés sont détaillés dans le tableau 1.

Tableau 1 : Protocoles d'immunosuppression et inocula fongiques testés.

J0 : jour de l'inoculation. CPA : cyclophosphamide.

Groupe	Protocole d'immunosuppression	Ref	Inoculum (spores/souris)
1	CPA 150 mg/kg J-4 +	(109)	5×10^6
2	CPA 150 mg/kg J-1 +		2.5×10^6
3	acétate de cortisone 300 mg/g J-1		5×10^6
4	puis CPA 100 mg/kg tous les 3j à partir de J+2		10^5
5	CPA 100 mg/kg J-3 J0	(82,93)	5×10^6
6	CPA 200 mg/kg J-2		5×10^6
7			10^6
8	Acétate de cortisone 250 mg/kg J-3 J0 J+3 J+6	(97,101,110)	2.5×10^6
9	Acétate de cortisone 500 mg/kg J-3 J0 J+3 J+6	(56)	2.5×10^6

Infection. Cinq inocula fongiques de *L. corymbifera* ont été testés par voie intratrachéale (IT) : 10^5 , 5.10^5 , 10^6 , $2.5.10^6$ et 5.10^6 spores/souris (Tableau 1). Pour cela, les souris ont été anesthésiées avec de l'isoflurane gazeux (AbbVie, Rungis, France). Elles ont ensuite été placées en position déclive à 45°, suspendues par les incisives, et inoculées avec 50 μ L de suspension de spores fongiques en introduisant une canule de 24G par la bouche jusque dans la trachée. Un réveil complet de la souris était attendu avant sa remise en cage.

Analyse histopathologique. Lors de l'expérimentation, le critère de validation a été l'objectivation de filaments mycéliens pulmonaires sur la totalité des souris d'un groupe. À différents temps (J1 à J5), les

souris ont été euthanasiées et les poumons prélevés. La recherche de filaments mycéliens, signant une infection invasive, a été réalisée selon deux techniques.

Marquage au calcofluor-white (Kit Mycetfluor®, SR2B, Avrille, France) : les poumons étaient prélevés, séparés en plusieurs fragments puis déposés sur des lames de microscopie. Chaque fragment était ensuite mis au contact de 25 µL d'agent dissociant fourni dans le kit pendant 30 minutes, puis mis au contact de 40 µL de colorant pendant 15 minutes. Après cela, une lamelle était ajoutée et les lames étaient observées au microscope à fluorescence (filtre d'excitation à 490 nm et filtre d'émission à 545 nm ; grossissement x200) à la recherche de filaments fluorescents.

Analyse par coloration argentique : le poumon était fixé dans du formaldéhyde 4% (VWR Chemicals, Radnor, USA). Après 24 h de fixation, le poumon était plongé dans de l'éthanol à 70%. Des coupes de 5 µm d'épaisseur ont été réalisées et colorées par une solution argentique (Gomori Grocott). Les lames ont été observées au microscope à la lumière blanche par le Dr Grégory Jouvion (Unité d'histopathologie humaine et modèles animaux, Institut Pasteur, Paris).

Analyse de survie. La survie des souris dans les groupes sélectionnés a été évaluée sur 21 jours.

Cinq souris ont été utilisées par groupe pour l'analyse histologique et dix souris par groupe pour l'analyse de survie.

Etape B : Caractérisation de l'effet de l'AmBL sur la survie, la charge fongique pulmonaire et le recrutement des cellules immunitaires broncho-alvéolaires des souris.

Cette étape a consisté à étudier l'effet de l'AmBL sur la survie, la charge fongique pulmonaire et le recrutement cellulaire broncho-alvéolaire des souris du modèle développé dans l'étape A.

Traitement par AmBL intrapéritonéal (IP). L'AmBL (Gilead Sciences, Foster City, USA) a été préparé sous forme de solution à 3 mg/mL dans de l'eau stérile, puis dans du sérum glucosé stérile à 5% pour obtenir une concentration finale de 1,5 mg/mL. L'AmBL a été administrée par injection IP de 200 µL soit 15 mg/kg. Les souris témoins non traitées ont reçu des injections IP de sérum glucosé stérile à 5% (placebo).

a) Effet sur la survie

Pour l'analyse de survie, la survie des souris a été évaluée sur 21 jours. 10 souris ont été traitées par AmBL IP (15mg/kg) à J3, J4, J5 et J6 et 10 souris ont reçu le placebo à J3, J4, J5 et J6.

b) Mesure de la charge fongique.

La mesure de la charge fongique a été réalisée par qPCR sur les poumons des souris à J6. La technique de qPCR utilisée a été adaptée de la littérature (111).

Le broyage des deux poumons entiers a été réalisé dans un pot de broyage, contenant 5 mL d'eau stérile et 5 billes en acier de 3 à 4 mm, placé dans un vibro-broyeur Retsch MM 400 (Retsch, Haan, Germany) programmé pour 30 mouvements par seconde, pendant 2 min 30. Puis, une pré-lyse externe a été réalisée selon un protocole d'extraction avec un kit Roche MagNa Pure Bacteria Lysis Buffer (Roche, Bâle, Suisse). Le protocole était le suivant : 200 µL de tampon ajouté à 200 µL de broyat et 40 µL de protéinase K ont été mis en contact à 65°C pendant 3 heures, puis mélangés et mis à 100°C pendant 10 mn. Enfin, une lyse chimique a été effectuée par un extracteur automatique MagNA Pure Compact Instrument (Roche). A la fin du processus d'extraction automatique, 100 µL d'éluat ont été obtenus.

Les amorces et sondes utilisées ont été tirées d'une publication et permettait d'amplifier l'ADN de l'ADNr 18S de *L. corymbifera* (111). La qPCR a été réalisée sur un StepOnePlus System (Thermo Fisher Scientific). Les réactions ont été effectuées dans des plaques MicroAmp 0.1 mL de 96 puits (Thermo Fisher Scientific). La quantification a été effectuée à l'aide d'une gamme de six points préparée à partir de suspensions de concentrations établies de spores de *L. corymbifera* (10^2 à 10^7 spores/ml) et les résultats exprimés en équivalent de spores par milligramme de tissu (eq spores/mg tissu).

Sept souris ont été utilisées dans le groupe traité par placebo et neuf souris ont été utilisées dans le groupe traité par AmBL.

c) Analyse immunitaire

Lavages broncho-alvéolaires. Les souris ont été sacrifiées par une administration IP de Pentobarbital Sodique (Vetoquinol, Magny-Vernois, France) à la dose de 150 mg/kg à différents temps pour réalisation d'un lavage broncho-alvéolaire (LBA) : J0 pour les souris contrôles, non infectées, non traitées (contrôles J0) ; J3 et J6 pour les souris infectées, non traitées; et J6 pour les souris infectées et traitées à J3 par une dose d'AmBL IP à 15 mg/kg. Les expérimentations ont été réalisées en duplicats. Le LBA a été réalisé grâce à l'injection douce de 2 mL (de 0,5 mL en 0,5 mL) de PBS froid (4°C) additionné d'EDTA 2 mM (PBS-EDTA 2mM) par un cathéter 18G. Le produit de lavage a été aspiré après une minute de contact et stocké à 4°C. Le LBA était ensuite centrifugé à 500 g, pendant 5 minutes, à 4°C, pour récupérer le culot cellulaire puis les cellules étaient resuspendues dans 500 µL de PBS et le surnageant éliminé. Les LBA hémorragiques ont été exclus afin d'analyser exclusivement les populations cellulaires du LBA et non celles du sang, comme cela a été effectué dans de précédentes études (37,103).

Marquage de viabilité. 300 µL de la suspension cellulaire issue du culot du LBA ont été incubés avec 3 µL d'un marqueur de viabilité cellulaire dilué au 1/10^{ème} dans du PBS (Allophycocyanine (APC)-Cyanine

7, Fixable Viability Dye eFluor® 780, Thermo Fisher Scientific) pendant 10 min, à température ambiante et à l'abri de la lumière (1 µL de marqueur pour 10⁶ cellules). Les cellules ont alors été lavées avec 300 µL de PBS-BSA 1% et 100 µL ont été successivement déposés dans 3 puits d'une plaque 96 puits à fond conique (Nunc Microwell, Fisher Scientific) : un puits « marquage de viabilité uniquement », un puits « isotype » et un puits « multimarquage ».

Marquage anticorps. Pour éviter les fixations non spécifiques, les cellules des puits « isotype » et « multimarquage » ont été marquées avec 1 µL d'un anticorps (Ac) de rat anti-souris CD16/CD32 (Becton Dickinson) lors d'une incubation de 10 minutes à 4°C. Les cellules du puits « multimarquage » ont ensuite été marquées par 1 µL de chacun des Ac conjugués suivants : CD11c – PerCP-Cy5.5 (Thermo Fisher Scientific), Ly6-G/C – PE-Cy7 (Becton Dickinson), CD11b – APC (BioLegend, San Diego, USA), B220/CD45R – FITC (Becton Dickinson), CD3 – Horizon V500 (Becton Dickinson) et NK1.1 – PE (BioLegend). Les cellules du puits « isotype » ont quant à elles été marquées par 1 µL des isotypes κ des anticorps respectifs. L'incubation était de 30 minutes, suivie d'un lavage avec 200 µL de PBS-BSA 1%. L'ensemble des cellules, y compris les cellules non marquées, ont été resuspendues dans 200 µL de solution de PBS-paraformaldéhyde 4% (PBS-PFA 4%, Sigma Aldrich) pour permettre la fixation. Après transfert des cellules dans les tubes FACS (Corning Science, Corning, USA), une étape de décollement des cellules restant adhérentes au fond des puits a été effectuée par 200 µL de PBS-EDTA 5 mM pendant 20 minutes à 4°C. Au total, 400 µL par puits ont été transférés dans les tubes FACS. Les tubes ont été stockés à +4°C à l'abri de la lumière. La lecture a été réalisée sur un cytomètre FACS Verse (Becton Dickinson). Une acquisition de 400 µL par condition (cellules « non marquées », « marquage de viabilité uniquement », « marquage isotype », « multimarquage ») a été effectuée. Les voltages ont été réglés de façon à limiter l'intensité de l'autofluorescence des macrophages alvéolaires en FITC et PE à 10³ maximum. Le logiciel d'acquisition des données était BD FACSDiva® (Becton Dickinson) 8.0 et le logiciel d'analyse FlowJo® v10 (Becton Dickinson).

Compensations. Lors d'une analyse en cytométrie de flux, l'un des risques est le chevauchement spectral lorsque le signal lumineux émit par un fluorochrome déborde dans le canal de détection qui est censé enregistrer le signal émis par un autre fluorochrome en produisant une réponse faussement positive. Pour éviter ce phénomène on réalise une compensation qui permet d'éliminer électroniquement le signal erroné. Pour effectuer les compensations, des billes de compensation OneComp eBeads (Thermo Fisher Scientific) ont été utilisées. 1 µL de chaque anticorps et une goutte de bille de compensation étaient déposés dans un tube eppendorf de 1,5 mL. Les tubes étaient alors mis à incuber pendant 20 minutes à 4°C, puis lavés avec 1 mL de PBS-BSA 1% et enfin les billes étaient resuspendues dans 300 µL de PBS-BSA 1%, puis la suspension était analysée dans le cytomètre.

Stratégie de séparation des cellules « gating ». Les populations cellulaires d'intérêt ont été sélectionnées en excluant les débris. Les doublets ont été éliminés en utilisant le FSC-A et FSC-H. Les cellules vivantes, négatives pour le marqueur de viabilité (APC-Cy7), ont été sélectionnées. Les populations cellulaires suivantes ont été isolées d'après la publication de Becher et al. (112): MA (CD11c+, CD11b-), polynucléaires neutrophiles (PNN) (CD11c-, CD11b+, Ly6-G+), monocytes (CD11c-, CD11b+, Ly6-G-), cellules dendritiques conventionnelles et macrophages interstitiels (CD11c+, CD11b+), lymphocytes B (LB) (B220+), lymphocytes T (LT) (CD3+), cellules NK (CD11b+, NK1.1+).

Pour l'analyse immunologique, 4 souris n'ont été ni infectées ni traitées et sacrifiées à J0 (contrôles J0); 5 souris ont été infectées, non traitées et sacrifiées à J3 ; 7 souris ont été infectées, non traitées et sacrifiées à J6 ; et 6 souris ont été infectées, traitées à J3 par une dose d'AmBL IP 15mg/kg et sacrifiées à J6.

Statistiques. Les analyses statistiques ont été effectuées à l'aide du logiciel GraphPad Prism v8.0 (GraphPad Software, San Diego, USA). Les courbes de survie ont été comparées à l'aide du test log-rank. Les moyennes de cellules et de charges fongiques ont été comparées à l'aide d'un test de Mann-Whitney.

Résultats

L'immunosuppression par corticoïdes est nécessaire et suffisante pour entraîner une mucormycose pulmonaire invasive chez la souris.

Les souris immunodéprimées par corticoïdes seuls (groupes 8 et 9), ou corticoïdes associés au CPA (groupes 1, 2, 3, 4), ont développé une infection invasive avec présence de filaments mycéliens pulmonaires chez 100% des souris à J3 (Figure 1). Les souris immunodéprimées par CPA seul n'ont pas développé de mucormycose pulmonaire invasive.

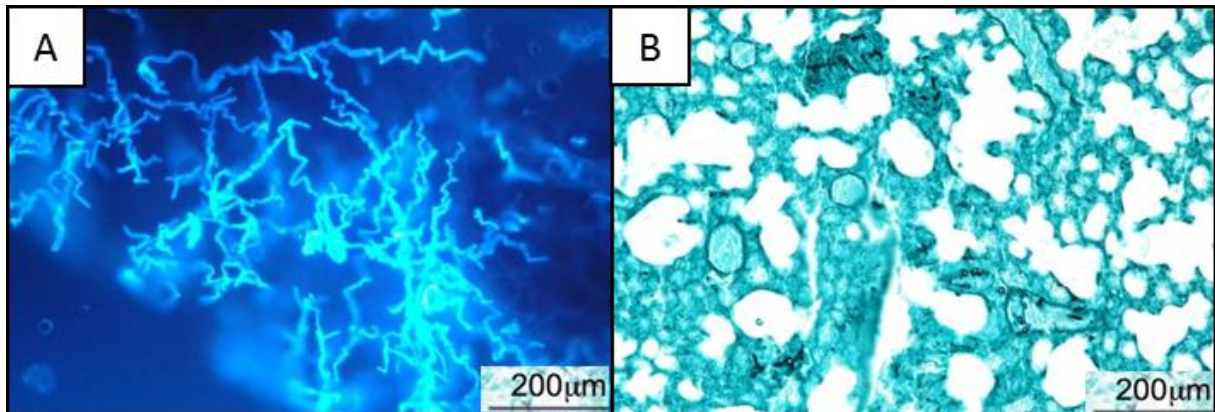


Figure 1 : Mise en évidence de filaments mycéliens dans les poumons de souris à J3, colorés par calcofluor-white (A) ou coloration argentique de Gomori Grocott (B).

*Exemple d'une souris du groupe 9, immunodéprimée par acétate de cortisone à 500 mg/kg à J-3, J0, J3, J6 et inoculée en intratrachéal à J0 par $2,5 \cdot 10^6$ spores de *L. corymbifera*.*

La survie des souris est modulée par la posologie des corticoïdes.

Pour la suite des expérimentations, il a été fait le choix de conserver un modèle d'immunodépression ne reposant que sur les corticoïdes. La survie dans les deux modèles n'utilisant que cet agent immunosuppresseur a donc ensuite été comparée. La posologie de 250 mg/kg à J-3, J0, J3 et J6 n'a entraîné que 20% de mortalité à 21 jours alors que la posologie à 500 mg/kg à J-3, J0, J3 et J6 a entraîné 100% de mortalité à 10 jours ($p < 0.001$) (Figure 2). Ce dernier modèle a été conservé pour la suite du projet estimant qu'il se rapprochait plus de la physiopathologie humaine.

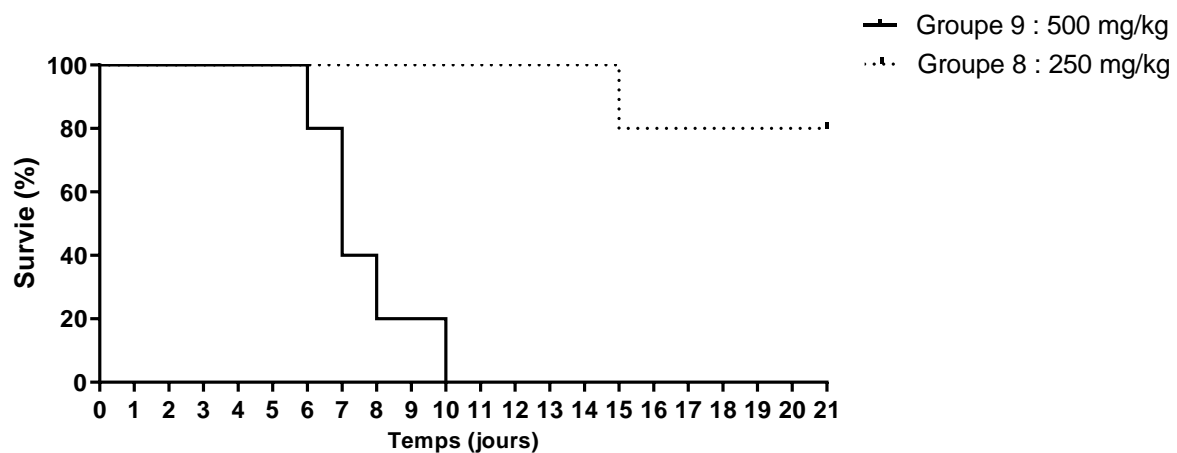


Figure 2 : Courbes de survie des groupes de souris immunodéprimées par corticoïdes seuls.

Souris des groupe 8 (immunodéprimées par acétate de cortisone à 250 mg/kg à J-3, J0, J+3, et J+6 et inoculées à J0 par 2.5×10^6 spores/souris en intratrachéal) et groupe 9 (immunodéprimées par acétate de cortisone à 500 mg/kg à J-3, J0, J+3, et J+6 et inoculées à J0 par 2.5×10^6 spores/souris en intratrachéal). 10 souris ont été utilisées dans chaque groupe.

La composition de la population immunitaire broncho-alvéolaire varie selon le délai post-infection.

Le nombre moyen de cellules vivantes par millilitre était de $15\,037 \pm 8\,986$ à J0 pour les souris contrôles non infectées, $29\,922 \pm 26\,696$ à J3 pour les souris infectées non traitées, $42\,760 \pm 13\,118$ à J6 pour les souris infectées non traitées et $31\,773 \pm 14\,755$ à J6 pour les souris infectées traitées par une dose d'AmBL IP à J3. La viabilité moyenne des cellules était respectivement de $90,5 \pm 5,6 \%$; $93,3 \pm 4,0 \%$; $92,3 \pm 4,3 \%$ et $92,8 \pm 4,5 \%$.

La population de MA était la population majoritaire ($87,2 \pm 3,4 \%$) dans le LBA des souris contrôles à J0. Les autres populations étaient négligeables avec $0,6 \pm 0,1\%$ de PNN ; $0,3 \pm 0,1 \%$ de LB ; $0,5 \pm 0,3 \%$ de LT ; $1,7 \pm 1,3 \%$ de cellules NK ; $0,4 \pm 0,1 \%$ de cellules dendritiques et macrophages interstitiels et $0,4 \pm 0,1 \%$ de monocytes.

Le taux et le nombre de MA à J3 chez les souris infectées non traitées étaient significativement supérieurs à ceux des souris contrôles à J0 ($12,0 \pm 8,4 \%$ contre $87,2 \pm 3,4 \%$; $2\,755 \pm 1\,953$ cellules/mL vs $13\,250 \pm 8\,342$ cellules/mL ; $p = 0.016$) (Figure 3A), alors que ceux de PNN étaient significativement supérieurs ($58,4 \pm 12,6 \%$ vs. $0,6 \pm 0,1 \%$; $16\,989 \pm 15\,482$ cellules/mL vs $86,8 \pm 60,7$ cellules/mL ; $p = 0.016$) (Figure 3B).

A J6, le taux et le nombre de MA étaient significativement plus haut qu'à J3 chez les souris infectées non traitées ($44,8 \pm 20,6 \%$ vs $12,0 \pm 8,4 \%$; $18\,308 \pm 9\,616$ cellules/mL vs $2\,755 \pm 1\,953$ cellules/mL ; $p = 0.003$) (Figure 3A), alors que le nombre de PNN n'était pas significativement différent de celui de J3 ($20,4 \pm 16,9 \%$ vs $58,4 \pm 12,6 \%$; $9\,398 \pm 9\,948$ cellules/mL vs $18\,308 \pm 9\,616$ cellules/mL ; $p = 0.43$) (Figure 3B).

Aucune variation significative n'a été constatée dans les autres populations cellulaires.

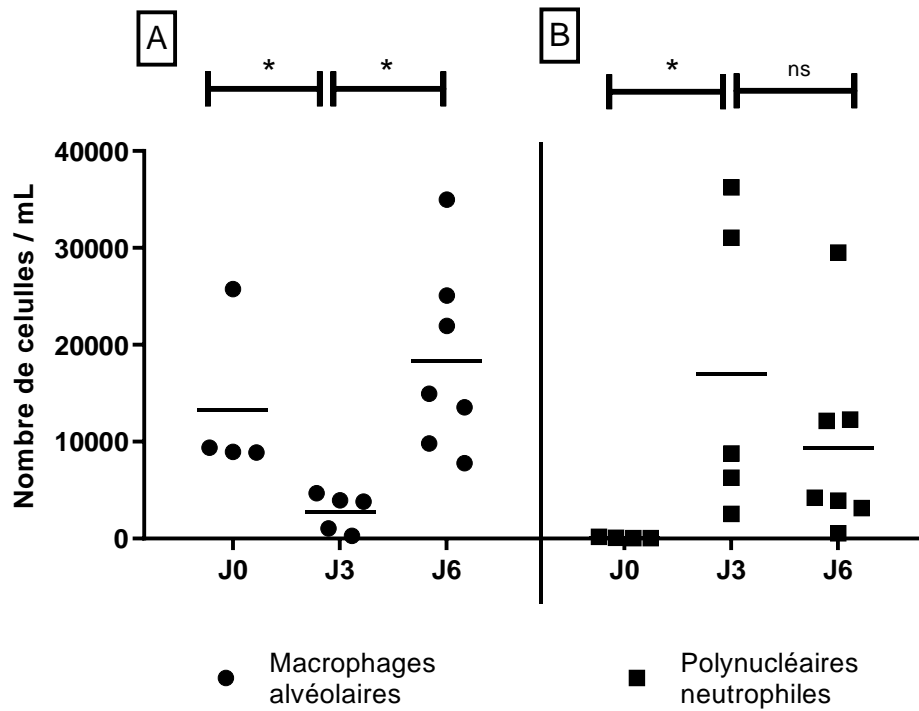


Figure 3 : Nombre de macrophages alvéolaires (A) et polynucléaires neutrophiles(B) dans le lavage broncho-alvéolaire des souris contrôles à J0 et des souris infectées à J3 et J6.

Souris immunodéprimées par acétate de cortisone à 500 mg/kg à J-3, J0, J3, J6. Souris contrôles J0 non infectées, souris J3 et J6 inoculées en intratrachéal à J0 par $2,5 \cdot 10^6$ spores. Chaque point et carré représente le LBA d'une souris et la barre horizontale représente la moyenne. * $p < 0.05$. ns : non significatif.

L'AmBL IP à 15mg/kg permet d'augmenter la survie des souris mais ne diminue pas la charge fongique.

Dans ce modèle, le traitement par 15mg/kg d'AmBL IP de J3 à J6 a amélioré la survie des souris à J21 (60% vs 0 % ; $p < 0.001$) (Figure 4). Cependant, l'analyse de la charge fongique pulmonaire n'a pas montré de différence significative à J6 entre les souris traitées et non-traitées (Figure 5).

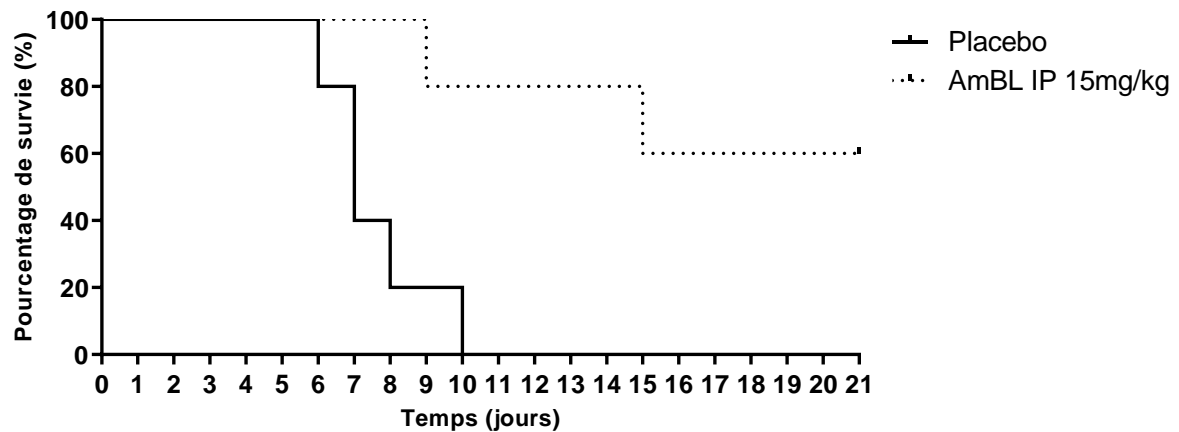


Figure 4 : Courbes de survie des souris traitées par AmBL IP versus placebo.

Souris immunodéprimées par acétate de cortisone à 500 mg/kg à J-3, J0, J+3 et J+6, et inoculées en intratracheal à J0 par 2.5×10^6 spores/souris, traitées par AmBL IP 15 mg/kg de J3 à J6 versus souris traitées par placebo IP. 10 souris ont été utilisées dans chaque groupe.

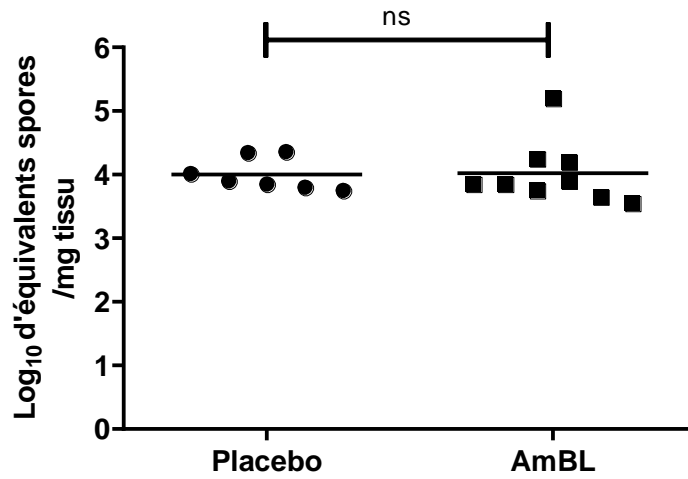


Figure 5 : Charge fongique pulmonaire des souris traitées par AmBL IP versus placebo.

Souris immunodéprimées par acétate de cortisone à 500 mg/kg à J-3, J0, J+3 et J+6, et inoculées en intratracheal à J0 par 2.5×10^6 spores/souris, traitées par AmBL IP 15 mg/kg de J3 à J6 versus souris traitées par placebo IP. 7 souris ont été utilisées dans le groupe traité par placebo et 9 souris ont été utilisées dans le groupe traité par AmBL. ns : non significatif.

L'AmBL IP à 15mg/kg diminue le recrutement des PNN à J6 mais pas celui des MA.

Il n'a pas été retrouvé de différence significative à J6 dans la proportion et le nombre de MA dans le LBA des souris infectées traitées par une dose d'AmBL IP à J3 par rapport aux souris infectées non traitées ($56.4 \pm 17.7\%$ vs $44.8 \pm 20.6\%$; $18\,832 \pm 10\,598$ cellules/mL vs $18\,308 \pm 10\,598$ cellules/mL ; $p = 1.0$) (Figure 6A). Cependant, une diminution significative du nombre de PNN a été mise en évidence ($4,9 \pm 7.2\%$ vs $20,4 \pm 16.9\%$; $2\,044 \pm 3\,612$ cellules/mL vs $9\,398 \pm 9\,948$ cellules/mL ; $p = 0.035$) (Figure 6B).

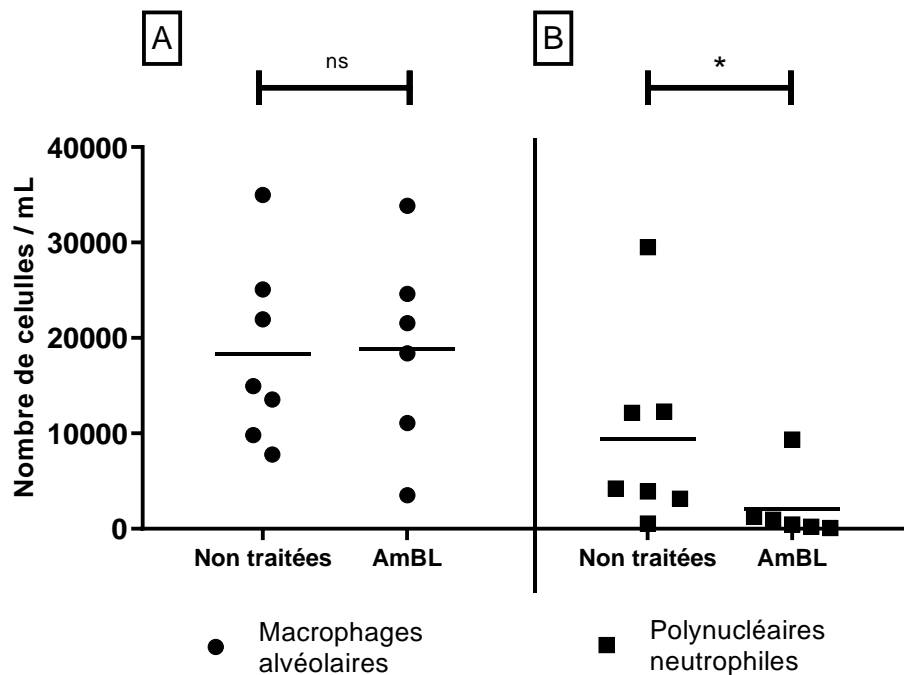


Figure 6 : Nombre de macrophages alvéolaires et polynucléaires neutrophiles à J6 dans le lavage broncho-alvéolaire des souris traitées par AmBL à J3 et des souris non traitées.

Souris immunodéprimées par acétate de cortisone à 500 mg/kg à J-3, J0, J3, J6 et inoculées en intratrachéal à J0 par $2,5 \cdot 10^6$ spores, traitées par une dose d'AmBL IP 15 mg/kg à J3 (AmBL) versus souris non traitées (non traitées).

* $p < 0.05$. ns : non significatif. Chaque point et carré représente le LBA d'une souris et la barre horizontale représente la moyenne.

Discussion

Le premier objectif de cette étude était de mettre au point un modèle murin de mucormycose pulmonaire aigüe invasive à *L. corymbifera*. Il n'existe dans la littérature que cinq modèles d'infection pulmonaire à *L. corymbifera*. Trois de ces modèles utilisent une inoculation par voie intranasale qui est moins efficace qu'une voie intratrachéale pour maîtriser l'inoculum administré (100,113,114). Parmi les deux modèles utilisant une voie d'inoculation intratrachéale (81,93,115), l'un n'est pas caractérisé sur les plans histologiques et immunitaires (81,115), et le second n'a été établi que sur 18h, après ce délai les souris étant euthanasiées (93). Un modèle d'inoculation intratrachéale caractérisé sur les plans histologiques et immunitaires a donc été développé.

De manière intéressante, l'utilisation du CPA seul n'a pas permis le développement d'une infection invasive. Le CPA est un agent immunosuppresseur dont l'un des métabolites agit par alkylation de l'ADN des cellules en division ce qui provoque leur apoptose (116). Le CPA inhibe donc la formation de nouvelles cellules immunes par destruction de leurs précurseurs. Les PNN ayant une durée de vie courte (demi-vie estimée de 6 à 12h) et leurs précurseurs étant détruits par le CPA, une neutropénie s'installe rapidement (117). Les MA ayant une durée de vie plus longue (plusieurs jours à plusieurs mois), ce contingent cellulaire se maintiendra plus longtemps protégeant les souris de la filamentation des spores de *Mucorales* dans le poumon (118,119). Les corticoïdes quant à eux possèdent une action par l'intermédiaire de trois mécanismes d'action, ils vont entraîner une augmentation de la production de protéines anti-inflammatoires, inhiber des facteurs de transcription tels que NF-kappa B, NF-IL6, AP-1 et STAT responsables de la transcription de protéines inflammatoires ou activer des protéines anti-inflammatoires (120). Ces mécanismes sont actifs sur l'ensemble des cellules immunitaires, avec pour conséquence une action anti-inflammatoire et immunosuppressive rapide et puissante (121). Ils entraînent notamment une diminution de la production de cytokines inflammatoires et de la capacité de « killing » des macrophages, une diminution du chimiotactisme et de la capacité des PNN à éliminer les microorganismes, une lymphopénie et une altération fonctionnelle des cellules dendritiques. Dans les modèles murins, les corticoïdes seraient donc nécessaires pour diminuer l'activité des MA et permettre l'infection pulmonaire (85). Dans la plupart des modèles murins retrouvés dans la littérature, les corticoïdes sont ainsi utilisés seuls (85,97,101,122), ou associés au CPA (85,115).

Les modèles utilisant du CPA associé aux corticoïdes ou utilisant des corticoïdes seuls ont permis d'obtenir une infection invasive (Figure 1). Seuls les deux modèles permettant d'avoir une infection invasive à J3 et utilisant uniquement des corticoïdes ont été initialement retenus. La survie des souris dans le modèle utilisant des corticoïdes à la dose de 250 mg/kg tous les 3 jours s'est révélée

significativement plus longue que celle du modèle à 500 mg/kg (Figure 2), ce qui est cohérent avec les données de la littérature. En effet, les auteurs ayant utilisé un protocole à base de corticoïdes à 250 mg/kg, pour développer des modèles d'infection pulmonaire avec d'autres genres de *Mucorales*, ont obtenu des mucormycoses subaigües et non létales (97,101). L'impact des corticoïdes sur les fonctions immunitaires semble ainsi être dose dépendant. Le modèle de mucormycose pulmonaire développé avec des administrations répétées de corticoïdes à 500 mg/kg a mené à une infection létale chez 100% des souris. C'est le modèle qui se rapproche le plus du pronostic retrouvé chez l'Homme, c'est donc le modèle qui a été conservé pour l'ensemble de l'étude. Ce protocole reposant uniquement sur les corticoïdes permettra d'étudier l'impact des corticoïdes dans la physiopathologie de l'infection pulmonaire (*Partie II de la thèse*).

Le modèle offre la possibilité de tester de nouveaux traitements à J3 lorsque l'infection invasive est établie. Dans la plupart des modèles retrouvés dans la littérature, les traitements sont démarrés sans avoir objectivé le caractère invasif de l'infection au niveau tissulaire (85). Cependant, il apparaît plus pertinent d'évaluer un traitement sur la forme invasive et donc filamenteuse des *Mucorales* que sur la forme spore. Ce délai de filamentation peut varier selon plusieurs paramètres, tels que le type de souris, les doses et le type d'immunosuppresseurs, l'inoculum et la souche de *Mucorales* (93,115,123). Dans notre étude, un délai de trois jours a permis d'observer une filamentation au niveau pulmonaire avec toutefois comme limite potentielle le caractère focal des lésions de mucormycose qui a été retrouvé chez les souris en début de maladie et qui diminue la sensibilité de l'évaluation histologique de la filamentation.

Lors de la caractérisation du modèle, les souris non infectées avaient des proportions de MA compatibles avec les données de la littérature, les MA représentant 85 à 98% des cellules du LBA (37,124). En présence de *Mucorales* au niveau alvéolaire, le taux de PNN augmente fortement entre J0 et J3 (Figure 3), cette augmentation initiale est probablement due à une réponse inflammatoire déclenchée par le gonflement des spores et le début de filamentation de celles-ci (33). La cinétique des MA semble quant à elle inverse (Figure 3). Cela pourrait s'expliquer par l'incapacité des MA traités par corticoïdes à inhiber la germination des spores phagocytées. Ces spores, en produisant des filaments, détruiraient les MA. L'augmentation du taux de MA après J3 (Figure 6), pourrait être due à un recrutement de macrophages dérivés de monocytes sanguins ou de macrophages interstitiels qui se seraient ensuite différenciés en MA (125). A notre connaissance, une seule étude a étudié la cinétique de recrutement des cellules immunitaires en présence de *Mucorales* (37). Dans ce modèle pulmonaire d'infection à *Rhizopus oryzae* chez la souris non-immunodéprimée, les auteurs ont comparé les taux de PNN et MA après inoculation intranasale de spores dormantes et gonflées. Le recrutement de PNN était quasi inexistant après inhalation de spores dormantes alors qu'il était

maximal à 18 h avec les spores gonflées. Il est cependant difficile de comparer ce modèle à notre modèle car l'immunosuppression retarde la réponse innée (126). Les autres populations cellulaires (cellules dendritiques, lymphocytes, cellules NK) n'ont été retrouvées qu'en très faible quantité, en effet, elles sont très minoritaires et circulent peu à l'étage broncho-alvéolaire (127). Une limite de cette étude immunologique est cependant le délai (3 jours) entre les différentes caractérisations de la population immunitaire alvéolaire. Il semblerait intéressant de décrire l'évolution de cette population sur des intervalles plus courts pour mieux caractériser l'évolution immunologique au niveau alvéolaire.

L'effet de l'AmBL IP a ensuite été évalué sur le modèle développé. Après 21 jours, 60% des souris traitées étaient vivantes alors qu'aucune ne survivaient sans traitement (Figure 4). Cela confirme les données d'efficacité partielle de l'AmBL issues des modèles animaux, les pourcentages de survie retrouvés dans les différentes études font en effet état de 25 à 90% de survie lors du traitement par AmBL (82,83,109,110,115,128). Cependant, aucun modèle n'a évalué l'effet de l'AmBL sur la survie des souris dans la mucormycose pulmonaire à *L. corymbifera*. En ce qui concerne la charge fongique pulmonaire, il n'a pas été mis en évidence de différence en fin de traitement entre souris traitées et non traitées (Figure 5). Cette donnée est discordante avec la plupart des études similaires. Dans plusieurs modèles ayant évalué l'effet de l'AmBL, les charges fongiques pulmonaires étaient diminuées après traitement (82,83,109,110,115,128). Cependant dans l'étude de Luo et coll. par exemple, le traitement est démarré beaucoup plus précocement, 16 h après l'infection et avec un inoculum plus faible (2.5×10^5) (115). Il est probable que dans notre modèle, la charge fongique initiale dix fois plus importante et le début de traitement plus tardif (J3), entraînent une prolifération plus importante du champignon et donc une quantité d'ADN fongique plus importante au niveau pulmonaire. Dans ce cadre, même si le traitement est efficace, l'ADN du champignon mort sera présent en très grande quantité, et étant donné sa rémanence importante dans les tissus et le fait que la PCR ne distingue pas l'ADN du champignon vivant et l'ADN du champignon mort, il est difficile d'objectiver la diminution de charge fongique. Il s'agit d'une limite majeure de ce modèle. Cela prive le modèle d'un marqueur pharmacodynamique plus fin que l'analyse de survie pour effectuer des analyses pharmacocinétiques/pharmacodynamiques (PK/PD). Un marqueur utilisable dans ce modèle devra donc être développé pour le rendre plus apte à l'étude de nouvelles molécules antifongiques. Plusieurs options pourraient être envisagées. Une analyse transcriptomique pourrait être effectuée pour quantifier un ARN messager (ARNm) (129). Une souche fluorescente de *Mucorales* pourrait également être mise au point comme cela a été le cas dans un modèle d'infection invasive à *Aspergillus fumigatus* pour suivre l'évolution de l'infection en temps réel (130). Cela est cependant complexe à développer car les *Mucorales* présentent une faible capacité à intégrer du matériel génétique étranger (131). Le dosage d'un disaccharide pan-fongique dont la détection par spectrométrie de masse a été mise au

point pourrait être une autre piste de travail pour quantifier le champignon (132).

L'effet de l'AmBL après administration systémique sur les populations immunitaires broncho-alvéolaires a ensuite été évalué (Figure 6). De précédentes études ont déjà montré l'effet anti-inflammatoire de cette forme liposomale qui augmenterait la voie de réponse anti-inflammatoire Th2 (133–135). Une diminution de recrutement des PNN au sixième jour de l'infection a été mise en évidence dans notre modèle après traitement par AmBL IP mais aucun effet n'a été visualisé sur les MA. L'immunomodulation induite par l'AmB semble dose dépendante (136), or l'AmBL diffuse peu au niveau alvéolaire (137), ce qui pourrait expliquer le faible effet observé. Une utilisation de l'AmB par voie nébulisée pourrait permettre d'augmenter l'effet immunomodulateur en augmentant les concentrations alvéolaires d'AmBL (137). Une diminution de la charge fongique par l'AmBL pourrait également expliquer une diminution du recrutement des PNN.

En conclusion, un modèle de mucormycose pulmonaire aigüe a été développé pour étudier la physiopathologie de cette infection. La caractérisation immunologique du recrutement alvéolaire devra être poursuivie et permettra également d'étudier l'effet immunomodulateur des antifongiques, une nouvelle voie de recherche dans la lutte contre les mucormycoses. Ce travail devra être poursuivi par la recherche d'un marqueur pharmacodynamique nous permettant d'utiliser au mieux ce modèle dans le test de nouvelles molécules antifongiques.

II. Rôle des corticoïdes dans la physiopathologie de l'infection

Article 1 : "Corticosteroids alter anti-*Lichtheimia corymbifera* response of alveolar macrophages in an *ex vivo* mouse model"

- **Article soumis : Kévin Brunet, François Arrivé, Jean-Philippe Martellosio, Isabelle Lamarche, Grégory Jouvion, Sandrine Marchand, Blandine Rammaert.** Corticosteroids alter anti-*Lichtheimia corymbifera* response of alveolar macrophages in an *ex vivo* mouse model.

Résumé en français :

Les macrophages alvéolaires (MA) sont en première ligne dans la défense immunitaire pulmonaire contre les *Mucorales*. L'utilisation de corticoïdes étant un facteur de risque connu de mucormycose, le but de cette étude était de décrire l'impact des corticoïdes sur la capacité des MA à contrôler la croissance des spores de *Lichtheimia corymbifera*, à l'aide d'un nouveau modèle murin *ex vivo*.

Premièrement, un modèle murin *in vivo* a été développé chez des souris mâles BALB/c pour déterminer la dose d'acétate de cortisone capable d'engendrer une infection pulmonaire invasive. Par la suite, dans le modèle *ex vivo*, les MA ont été prélevés par lavage broncho-alvéolaire chez des souris mâles BALB/c prétraitées par corticoïdes à la posologie précédemment déterminée dans le modèle *in vivo*. Les MA issus de souris traitées par corticoïdes et les MA contrôles issus de souris non traitées ont ensuite été incubés *in vitro* avec des spores de *L. corymbifera* (rapport 1 : 5). La capacité des MA à inhiber la croissance des spores, ainsi que leur capacité de phagocytose et de génération de dérivés réactifs de l'oxygène ont ensuite été évalués respectivement par mesure de densité optique, cytométrie en flux et mesure de fluorescence.

L'acétate de cortisone à 500 mg/kg, à J-3 et à J0, a conduit à une infection pulmonaire invasive à J3. Dans le modèle *ex vivo*, les puits contenant les MA issus de souris traitées par corticoïdes et incubés avec les spores avaient une absorbance (croissance fongique) significativement plus élevée que les spores incubées avec les MA contrôles, à 24 h ($p = 0,025$), 36 h ($p = 0,004$) et 48 h ($p = 0,001$). La colocalisation des spores avec les MA issus de souris traitées par corticoïdes était significativement plus faible que pour les MA contrôles ($7,6 \pm 1,9\%$ vs $22,3 \pm 5,8\%$; $p = 0,003$), reflétant une inhibition de la phagocytose. Enfin, la production de dérivés réactifs de l'oxygène était significativement augmentée lorsque les MA contrôles étaient incubés avec des spores ($p = 0,029$), alors que les corticoïdes ont inhibé cette augmentation ($p = 0,321$).

Les corticoïdes ont diminué la capacité des MA à contrôler la croissance des spores de *L. corymbifera* par inhibition de la phagocytose et de la production de dérivés réactifs de l'oxygène dans notre modèle *ex vivo*.

**Corticosteroids alter alveolar macrophage control of *Lichtheimia corymbifera* spores
in an *ex vivo* mouse model.**

Kévin Brunet^{1,2,3}, François Arrivé^{1,2,6}, Jean-Philippe Martellosio^{1,2,6}, Isabelle Lamarche¹,
Grégory Jouvion⁴, Sandrine Marchand^{1,2,5}, Blandine Rammaert^{1,2,6}

¹ INSERM U1070, Poitiers, France

² Université de Poitiers, Faculté de médecine et pharmacie, Poitiers, France

³ CHU Poitiers, service de Mycologie-Parasitologie, Département des agents infectieux, Poitiers, France

⁴ Unité de neuropathologie expérimentale, Institut Pasteur, Paris, France

⁵ CHU Poitiers, service de Toxicologie et Pharmacocinétique, Poitiers, France

⁶ CHU Poitiers, service de Maladies infectieuses et tropicales, Poitiers, France

Corresponding author:

Pr Blandine Rammaert, MD, PhD

Service de médecine interne et maladies infectieuses et tropicales

Centre hospitalier universitaire de Poitiers

2 rue de la Milétrie

CS 90577

86021 Poitiers cedex

Tel : +33 (0)5 49 44 44 22 Fax : +33 (0)5 49 44 43 83

Email: blandise.rammaert.paltrie@univ-poitiers.fr

Abstract

Alveolar macrophages (AM) are first-line lung defense against *Mucorales* in pulmonary mucormycosis. Since corticosteroid use is a known risk factor for mucormycosis, the aim of this study was to describe the role of corticosteroids on AM capacities to control *Lichtheimia corymbifera* spore growth using a new *ex vivo* model.

An *in vivo* mouse model was developed to determine the acetate cortisone dose able to trigger pulmonary invasive infection. Then, in the *ex vivo* model, male BALB/c mice were pre-treated with the corticosteroid regimen triggering invasive infection, before AM collection through bronchoalveolar lavage. Corticosteroid-treated AMs and untreated control AMs were then exposed to *L. corymbifera* spores *in vitro* (ratio 1:5). AM control of fungal growth, phagocytosis and oxidative burst were assessed using optical densities by spectrophotometer, flow cytometry, and 2', 7'-dichlorofluoresceine diacetate fluorescence, respectively.

Cortisone acetate at 500 mg/kg, at D-3 and at D0, led to pulmonary invasive infection at D3. Co-incubated spores and corticosteroid-treated AMs had significantly higher absorbance (fungal growth) than co-incubated spores and control AMs, at 24 h ($p= 0.025$), 36 h ($p= 0.004$), and 48 h ($p= 0.001$). Colocalization of spores with corticosteroid-treated AMs was significantly lower than for control AMs ($7.6 \pm 1.9\%$ vs $22.3 \pm 5.8\%$; $p=0.003$), reflecting phagocytosis inhibition. Finally, oxidative burst was significantly increased when control AMs were incubated with spores ($p = 0.029$), while corticosteroids hampered oxidative burst from treated AMs ($p = 0.321$).

Corticosteroids enhanced fungal growth of *L. corymbifera* through AM phagocytosis inhibition and burst oxidative decrease in our *ex vivo* model.

Keywords

Corticosteroids, alveolar macrophage, *Mucorales*, *Lichtheimia corymbifera*, *ex vivo* model, fungal immunity

Introduction

Alveolar macrophages (AM) are primary effectors of innate immune response during pulmonary infections, and particularly during mold infections such as mucormycosis.¹⁻³ Quantitative and/or qualitative deficits are the two mechanisms impairing AM functions. For example, diabetes, one major risk factor for mucormycosis, leads to qualitative defect altering attachment of macrophages to hyphae.⁴ Although quantitative deficit is predominant during hematological malignancies due to tumor infiltration and cytotoxic chemotherapy, immune qualitative defect, such as phagocytosis or killing alterations, is induced by immunosuppressive drugs.⁵

Corticosteroid therapy is an established isolated or associated risk factor for mucormycosis, involved in one third of the patients who develop the disease.^{6,7} Corticosteroids have multiple immunosuppressive effects on macrophages such as decrease in phagocytosis or in synthesis of reactive oxygen species (ROS).^{8,9} Nonetheless, the role of corticosteroid therapy in AM and *Mucorales* spore interaction remains poorly defined. It seems to be one of the keys to understanding susceptibility to mucormycosis in corticosteroid immunocompromised patients.¹⁰

We hypothesized that alteration of AM qualitative functions by corticosteroid therapy could be an essential factor in the development of mucormycosis. The aim of this study was to evaluate alterations induced by corticosteroid therapy on murine AM functions against spores of *L. corymbifera* using an *ex vivo* model. To develop this *ex vivo* model, we first developed an *in vivo* model to determine the doses of corticosteroid leading to pulmonary invasive infection. Then, we used the *ex vivo* model to study the impact of corticosteroids on AM control of fungal growth, phagocytosis and oxidative burst.

Materials and methods

Strain. A clinical strain of *Lichtheimia corymbifera* (Institut Pasteur CNRMA 11/1047, France), stored frozen (-80°C), was used. Strain was subcultured during 72h, at 37°C, on 75-cm³ flask containing Potato Dextrose Agar (Becton Dickinson, Franklin Lakes, USA). Spores were collected by flooding the flask with 10 mL of sterile water. The suspension was filtered on 11-µm nylon filter (Millipore, Kenilworth, USA) to remove hyphal elements. The spores were counted using a Kova hemocytometer. Then, concentration of spore suspension was diluted to desired concentration in sterile water.¹¹

Animals and ethical statement. Male BALB/c congenic mice (6-8 weeks), housed in protected environment with food and water *ad libitum* were used (Janvier Labs, Le Genest-Saint-Isle, France). Experimental protocol was approved by the local ethics committee and have been registered by the French Ministry of Higher Education and Research (number 015110516595628). All investigations were performed in accordance with prevailing regulations regarding the care and use of laboratory animals from the European Commission (directive 2010/63/EU). The mice were euthanized when they reached the limit points, i.e., weight loss of more than 20% compared with the average weight, passive position in environment, or prostration, or limb palsy, or impossibility to feed.

Determination of corticosteroid regimen leading to invasive lung infection and evaluation of mouse survival. Mice were immunosuppressed with two intraperitoneal (IP) regimens of cortisone acetate (Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA), 250 mg/kg or 500 mg/kg at day three before spore inoculation (D-3), at day of inoculation (D0) and then at D3. Corticosteroid injection was continued until D6 post-inoculation in survival experiments. Cortisone acetate powder was diluted in Phosphate Buffered Saline (PBS; Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) with the help of 0.01% of Tween 20 (Sigma-Aldrich) to obtain a 50 mg/mL solution. Mice were then intratracheally inoculated at D0 using a blunt-end, 24-gauge needle with 2.5×10^6 spores/mouse of *L. corymbifera* in 50 µl of PBS/Tween 80, following a short anesthesia with isoflurane as previously described¹¹. To determine which protocol of immunosuppression provided invasive infection in 100% of mice, i.e. presence of hyphae in lung

tissue, lungs were collected at various times from D1 post-inoculation to D5. Presence of hyphae in tissue was assessed by calcofluor white staining on fresh tissue on five mice per group and confirmed by histopathological examination using Grocott methenamine silver staining, as previously described¹¹. Survival of 10 mice/group pre-treated with cortisone acetate 250 mg/kg or 500 mg/kg was followed up until D21.

Ex vivo model. Uninfected mice were immunosuppressed at D-3 and D-1 with 500 mg/kg of IP cortisone acetate (Sigma Aldrich) diluted in 200 μ L of PBS/0.01% Tween 20 (Sigma-Aldrich). Uninfected non-immunosuppressed mice constituted the control group. Mice were euthanized at D0 with 150 mg/kg of IP pentobarbital sodium (AbbVie, Rungis, France). AMs were collected by bronchoalveolar lavage (BAL). BAL was performed with 2 mL of PBS/EDTA 2 mM at 4°C. BAL fluid was centrifuged 5 min at 4°C (400 g). Supernatant was eliminated and pellet suspended in 1 mL of PBS. Number of cells was evaluated in KOVA hemocytometer and diluted in culture medium to desired concentration. Culture medium was composed of 95% Dulbecco Modified Eagle Medium (Corning, Tewksbury, USA) without phenol red and 5% of fetal bovine serum (Sigma-Aldrich) added of 1% of penicillin/streptomycin (Sigma-Aldrich). AMs represented > 90% of BAL fluid cells.

Inhibition of fungal growth. AMs from corticosteroid-treated mice and from control group were diluted at 5×10^5 cells/mL in culture medium. *L. corymbifera* inoculum was diluted to 2.5×10^6 spores/mL in culture medium. To obtain a ratio of 5 spores for 1 MA¹⁰, 100 μ L of diluted cells suspension was incubated with 100 μ L of *L. corymbifera* inoculum in 96-wells plate (Sarstedt, Nümbrecht, Allemagne). Absorbance was read with plate reader (TECAN Infinite Pro 200, Tecan Group Ltd, Männedorf, Suisse) at 680 nm, 37°C, 5% of CO₂, every 30 min during 48 h. Experiment was performed in quadruplicate with four corticosteroid-treated mice and four control mice with 4 wells/mouse.

Phagocytosis assay. Phagocytosis was evaluated qualitatively by confocal microscopy and quantitatively by flow cytometry. Spores were labeled by fluorescein isothiocyanate-5 (FITC, Sigma-

Aldrich) with a solution at 200 µg/mL in 0.1 M sodium bicarbonate and 0.05% Tween 80. Incubation was performed 18 h at 4°C with sinusoidal agitation (Movil-Rod, JP Selecta, Barcelone, Espagne). Collected AMs from corticosteroid-treated mice and control group were diluted at $5 \cdot 10^5$ cells/ml in 200 µL of culture medium and distributed on a 96-well plate (Greiner Bio-One, Frickenhausen, Allemagne). AMs were pre-incubated 120 min at 37°C, in 5% CO₂. FITC-labeled *L. corymbifera* inoculum was diluted at 10^7 spores/mL in culture medium and 50 µL of this suspension was added to wells containing AMs (ratio of five spores for one AM). Centrifugation (1 min, 400 g, 37°C) was carried out to optimize AMs/spores contact. Plate was incubated at 37°C, with 5% CO₂, for 60 min. Spores and AMs were washed with PBS and incubated with 1 µL of viability marker (Allophycocyanine-Cyanine 7, Fixable Viability Dye eFluor[®] 780, eBiosciences), for 15 min, at room temperature, protected from light. After another washing with PBS, 200 µL of PBS/BSA 4% was added to wells and cells were labeled with 1 µL of anti-C11c PerCP-Cy5.5 antibodies (Fixable Viability Dye eFluor[®] 780, eBiosciences, Paris, France). After 30 min of incubation, at 4°C, protected from light, cells and spores were washed and resuspended in 200 µL of 5 mM PBS/EDTA for confocal microscopy or in 400 µL of 5 mM PBS/EDTA for flow cytometry. Confocal microscopy was performed with Olympus FV1000 (Olympus Europa, Hambourg, Allemagne), on a 15 µL suspension of labeled cells and labeled spores in a cell culture dish, and acquired and processed using FluoView software (Olympus). Flow cytometry data were acquired with a BD FACS Verse cytometer (Becton Dickinson), using BD FACSuite software and processed using FlowJo 10 software (Becton Dickinson). A total of five experiments were carried out, each of them comparing a control mouse with a corticosteroid-treated mouse.

Evaluation of oxidative burst (ROS production). AMs from the two groups (corticosteroid-treated mice and control group) were suspended at 1×10^5 cells/mL, in 250 µL of culture medium, and distributed on a 96-well plate (Greiner Bio-One). After 120 min of pre-incubation, cells were washed with 200 µL of PBS before being incubated with 100 µL of a 20 µM solution of 2', 7'-dichlorofluoresceine diacetate (DCF-DA), for 45 min, at 37°C, protected from light. Then, cells were washed twice with PBS. AMs were incubated without or with 200 µL of *L. corymbifera* spore suspension at 6.25×10^5 spores/mL (ratio of

1:5). A short centrifugation (400 g, 1 min) was carried out to optimize spores/AMs contacts. After 60 min of incubation, fluorescence intensity reading was carried out (wavelengths emission at 485 nm and excitation at 535 nm) using plate reader (TECAN Infinite Pro 200, Tecan Group Ltd). AMs incubated with spores but without DCF-DA were carried out simultaneously in order to be able to subtract, from the marked conditions, AM autofluorescence.

Fluorescence levels were compared between AMs from corticosteroid-treated incubated with spores and without spores, and same experiment was conducted with control AMs. Four mice were used in corticosteroid-treated group and six mice in control group.

Statistical analysis. GraphPad Prism 8.0.1 (GraphPad Software, sand Diego, USA) was used for all analyses. For inhibition of fungal growth, means were compared with Mann-Whitney test; results were expressed as mean \pm SD. For evaluation of phagocytosis, paired t tests were used after verification of distribution normality by Kolmogorov–Smirnov test; results were expressed as mean \pm SD. For evaluation of ROS production, evaluation was performed with ratio paired t tests after verification of distribution normality by Kolmogorov–Smirnov test.

Results

Corticosteroid immunosuppression leads to pulmonary mucormycosis. 100% (5/5) of mice receiving 250 mg/kg or 500 mg/kg of IP cortisone acetate, at D-3 and D0, and intratracheally inoculated with 2.5×10^6 spores/mouse, developed a pulmonary invasive infection at D3 (Figure 1). All animals receiving 500 mg/kg of cortisone acetate died before D10 while only 20% of mice receiving 250 mg/kg died at D21 (Figure 2).

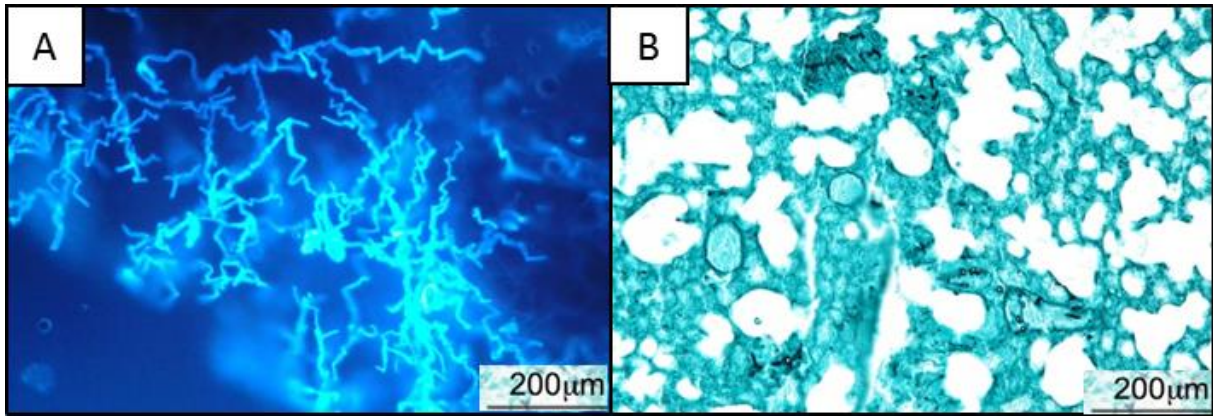


Figure 1: Fungal hyphae invading mouse lung parenchyma at D3.

Example of a mouse immunosuppressed by 500 mg/kg of intraperitoneal cortisone acetate at D-3 and D0, intratracheally inoculated by 2.5×10^6 spores of *L. corymbifera*, and sacrificed at D3 to retrieve the lungs. A: calcofluor white staining on fresh tissue. B: histopathological examination using Grocott methenamine silver staining.

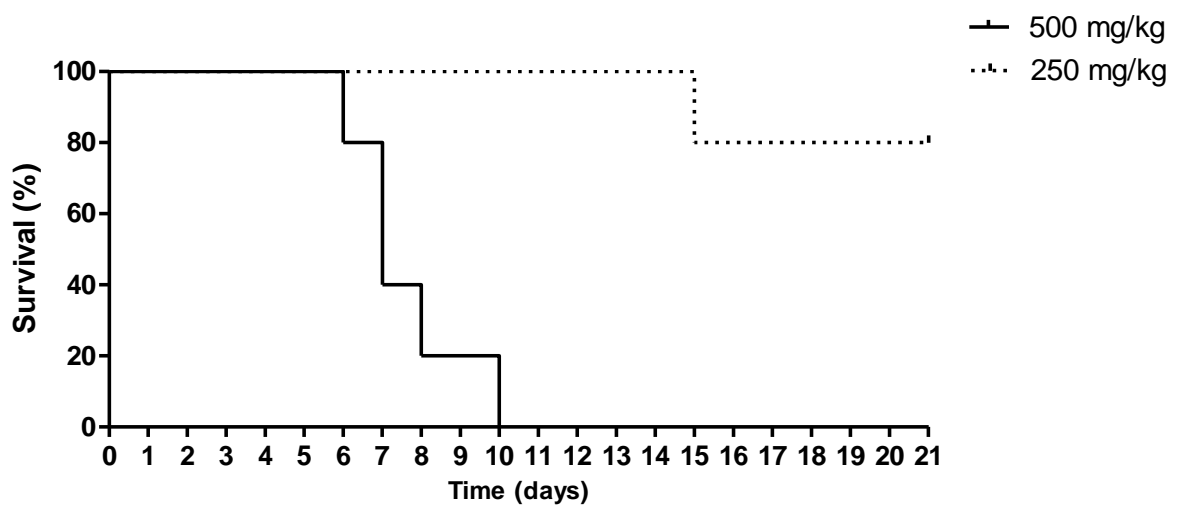


Figure 2: Survival curves of mice immunosuppressed by cortisone acetate and inoculated by *L. corymbifera*.

Mice were immunosuppressed by cortisone acetate, at 250 mg/kg or 500 mg/kg, on D-3, D0, D+3, and D+6 and intratracheally inoculated on D0 by 2.5×10^6 spores of *L. corymbifera*/mice. Survival was followed up until 21 days. 10 mice were used in each group.

Corticosteroids alter inhibition of fungal growth. Mean absorbance of wells containing AMs from corticosteroid-treated mice incubated with fungal spores was significantly higher compared to control condition at 24 h (0.219 ± 0.025 vs 0.200 ± 0.013 ; $p = 0.025$), at 36 h (0.364 ± 0.054 vs 0.311 ± 0.032 ; $p = 0.004$) and at 48 h (0.497 ± 0.084 vs 0.428 ± 0.029 ; $p = 0.001$) (Figure 3).

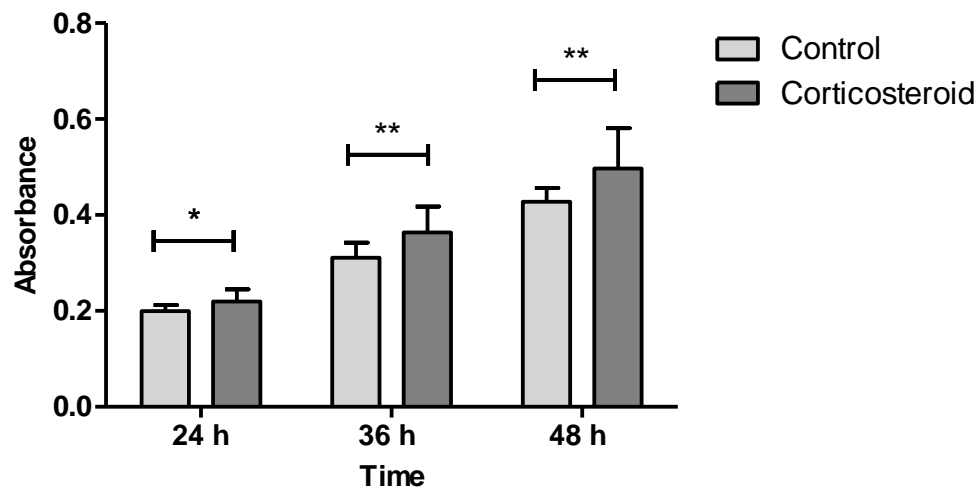


Figure 3: Absorbance of alveolar macrophages (AMs) from corticosteroid-treated mice and control AMs, co-incubated with *L. corymbifera* spores.

Mean absorbance of wells containing AMs from corticosteroid-treated mice and control AMs, incubated with spores, at 24 h, 36 h and 48 h. $100 \mu\text{L}$ of 5×10^5 AMs/mL was incubated with $100 \mu\text{L}$ of 2.5×10^6 *L. corymbifera* spores/mL. Absorbance was read at 680 nm, 37°C , 5% of CO_2 , every 30 min during 48 h. Experiment was performed in quadruplicate with four corticosteroid-treated mice and four control mice, with 4 wells/mouse. Results are expressed as mean \pm SD. * $p < 0.05$ ** $p < 0.005$.

Corticosteroids decrease phagocytosis by alveolar macrophages. After 60 min of spores and AM coincubation, spores were free in the media or collocated with AMs in confocal two-dimensional images (Figure 4a). Colocalization of spores with AMs from corticosteroid-treated mice was significantly lower than with control AMs ($7.6 \pm 1.9\%$ vs $22.3 \pm 5.8\%$; $p=0.003$), reflecting phagocytosis inhibition (Figure 4b).

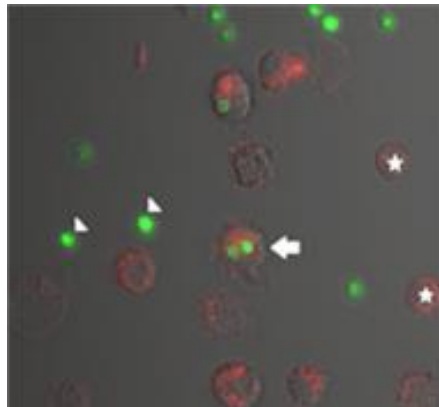


Figure 4a: Observation in confocal two-dimensional microscopy of *L. corymbifera* spore and control alveolar macrophage (AM) coincubation.

L. corymbifera spores and control AMs were coincubated at a ratio of five spores for one AM (5×10^5 spores and 1×10^5 AMs) and observed after 60 min. Spores were free in the media (star) or collocated with AMs (arrow). Confocal microscopy was performed with Olympus FV1000 ($\times 300$) on a $15 \mu\text{L}$ suspension of PerCP-Cy5.5 labeled AMs and fluorescein isothiocyanate-5 labeled *L. corymbifera* spores, in a cell culture dish, and acquired and processed using FluoView software.

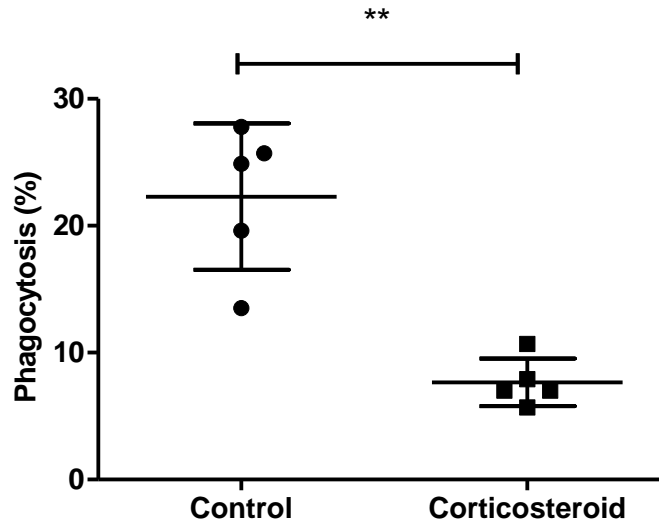


Figure 4b: Colocalization of spores with alveolar macrophages (AMs) from corticosteroid-treated mice and control AMs.

Percentage of AMs from corticosteroid-treated mice and control AMs colocalized with *L. corymbifera* spores, reflecting phagocytosis, evaluated by flow cytometry after 60 min of incubation, at 37°C, with 5% CO₂. Spores were labeled by fluorescein isothiocyanate-5 and AMs were labeled by PerCP-Cy5.5 and coincubated at a final ratio of five spores for one AM (5×10^5 spores and 1×10^5 AMs). Flow cytometry data were acquired with a BD FACS Verse cytometer. A total of 5 experiments were carried out, each of them with a control mouse and a corticosteroid-treated mouse.

Results are expressed as mean \pm SD. ** $p < 0.005$. Each point represents a well.

Corticosteroids decrease oxidative burst of AMs. Fluorescence of AMs from corticosteroid-treated mice incubated with spores was not different from those incubated without spores ($p = 0.321$) (Figure 7), while fluorescence of control AMs incubated with spores was significantly higher than those incubated without spores ($p = 0.029$) (Figure 5).

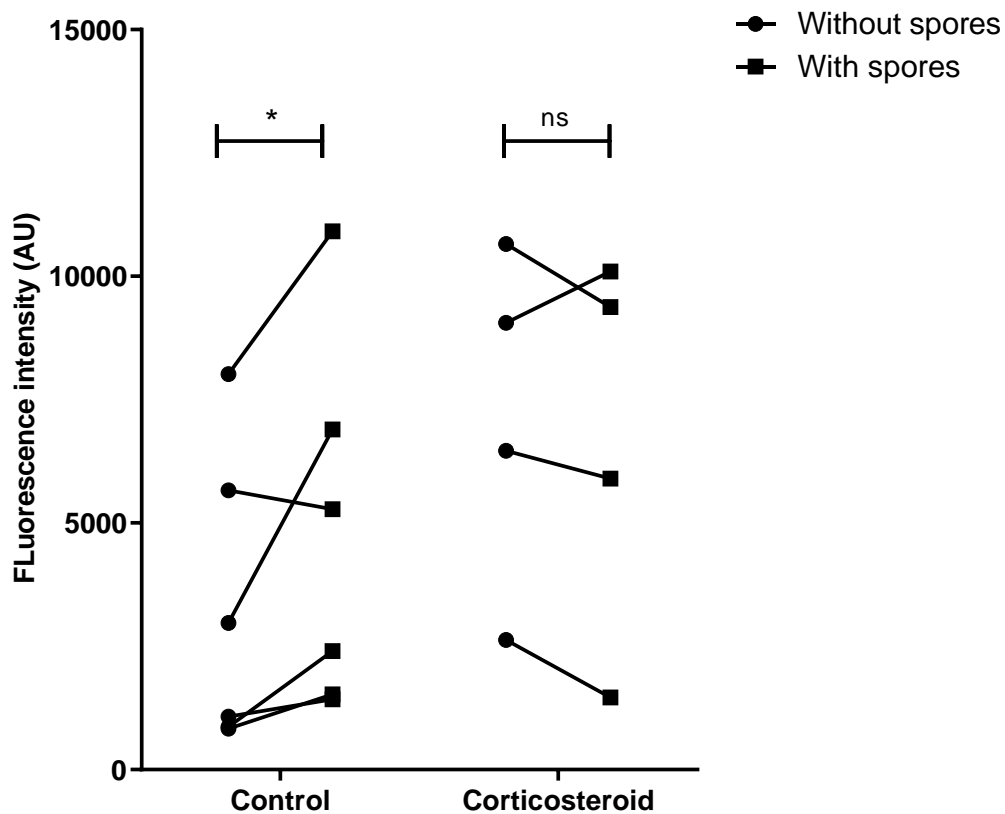


Figure 5: Fluorescence generated by DCF-DA labeled alveolar macrophages (AMs) from corticosteroid-treated mice and control AMs incubated with and without *L. corymbifera* spores.

Fluorescence generated by DCF-DA labeled AMs, from corticosteroid-treated mice and from control mice, incubated with and without *L. corymbifera* spores. AMs were labeled by 2', 7'-dichlorofluoresceine diacetate (DCF-DA) and incubated with or without *L. corymbifera* spore suspension at a final ratio of five spores for one AM (1.25×10^5 spores and 2.5×10^4 AMs). After 60 min of incubation, fluorescence intensity was read (wavelengths emission at 485 nm and excitation at 535 nm). Four mice were used in corticosteroid group and six mice in control group.

* $p < 0.05$. AU: arbitrary unity. Each connected points represent one mouse.

Discussion

Since corticosteroids could be an essential factor in the development of pulmonary mucormycosis, an *ex vivo* mouse model was developed to evaluate their impact on anti-*Lichtheimia corymbifera* AM functions. We showed that corticosteroids reduced the ability of AMs to control *L. corymbifera* growth by phagocytosis inhibition and oxidative burst decrease.

The *ex vivo* model was developed by collecting AMs from mice exposed to a corticosteroid dose able to trigger pulmonary invasive infection and by studying *in vitro* interaction of AMs and spores. Compared to an *in vitro* model where corticosteroids are incubated in culture medium with AMs^{12,13}, an *ex vivo* model presents the advantage of studying the effect of corticosteroids at physiopathological doses. In addition, *in vitro* and *in vivo* effects of corticosteroids on AMs may be different. Corticosteroid immunomodulation is thus more accurately studied using an *ex vivo* model in conditions closer to the *in vivo* environment. Finally, unlike an *in vivo* study, an *ex vivo* model can focus on a selected cell population not influenced by other cell types. *Ex vivo* models studying corticosteroids role are rare in the literature^{14,15}, and to the best of our knowledge, only one model evaluating corticosteroid impact on AM capacities to control *Mucorales* growth on an *ex vivo* model has been published.¹⁰ However, this model cannot be used to study interactions between AM and *L. corymbifera* spore since it was designed with another *Mucorales* species, *Rhizopus oryzae*.

To develop our *ex vivo* model, the corticosteroid regimen leading to invasive lung infection should be determined in an *in vivo* model. We chose to develop our model with *L. corymbifera* species since it is one of the major species involved in pulmonary mucormycosis in Europe.^{6,7} Only one *L. corymbifera* pulmonary model using corticosteroid immunosuppressed mice has been published in the literature.¹⁶ However, in this model less than 50% of mice died, while in human infection, invasive mucormycosis leads to death in 100% of patients without therapy. This model appeared far from human physiopathology. Moreover, intranasal inoculation was performed leading to less accurate control of spore inoculum than intratracheal challenge.¹⁷ Although other *Mucorales* species models

using only corticosteroids as immunosuppressive drugs have been found in the literature^{18,19}, virulence differs between *Mucorales* species.²⁰ Therefore, an invasive pulmonary model of *L. corymbifera* needed to be developed to determine the corticosteroid regimen leading to *L. corymbifera* lethal invasive infection. Two corticosteroid regimens were tested leading to pulmonary invasive infection at D3. Regimens were adapted from studies using BALB/c models of *R. oryzae* inoculated by intranasal route.^{18,21} In our model, the higher dose of corticosteroid, i.e. 500 mg/kg had a negative impact on mouse survival. This is consistent with previous published models.^{18,21} Some authors have used protocol with 250 mg/kg of cortisone acetate with other *Mucorales* species and have reached subacute non-lethal models. The regimen at 500 mg/kg was considered closer to human pulmonary mucormycosis prognosis with 100% of mortality at D10 and used in the *ex vivo* model.

In the *ex vivo* model, mice were pre-exposed to corticosteroid regimen, previously determined in our *in vivo* model, which can trigger pulmonary invasive mucormycosis before AM collection. Alteration of AM capacity to control fungal growth induced by corticosteroid therapy was highlighted. This was consistent with a previous publication on interactions between AMs and *Mucorales*.¹⁰ Waldorf *et al.* found that AMs from corticosteroid-treated mice were unable to inhibit *R. oryzae* spore germination; however, their data were only qualitative using microscopy. Our data and this last study show that corticosteroids seem to exert an independent role in mucormycosis pathophysiology by inhibiting AM control of fungal growth.

After highlighting the decreased ability of AM to control *L. corymbifera* growth induced by corticosteroids, we evaluated which AM functions were altered. For phagocytosis analysis, validity of the experimental protocol was checked by confocal microscopy, confirming that labeling spores did not alter the phagocytosis phenomenon. A significant decrease in the phagocytosis capacities of AMs from corticosteroid-treated mice was highlighted *ex vivo* by flow cytometry. The only existing *in vitro* model evaluating the impact of corticosteroid therapy on *Mucorales* phagocytosis is a macrophage model derived from *Drosophila sp.* S2 embryogenic phagocytic cell line. In this model, a complete blockage of *R. oryzae* spore phagocytosis after dexamethasone treatment of cell line was shown.¹³ In

a recent study, authors have shown that AMs prevented mucormycosis in mice by inhibiting resting spore germination and not by the killing of these spores.²² This mechanism seemed to be intracellular consecutive to phagocytosis. Anti-*Mucorales* immunity is thereby considered to be fungistatic due to a major role of phagocytosis. In this context, alteration of AM phagocytosis capacities will then lead to high impact on *Mucorales* growth. The mechanism of phagocytosis inhibition by corticosteroids is poorly explored in literature but several authors have shown that corticosteroids can inhibit phagocytosis by inhibition of phagolysosomal fusion.⁸ However, our study was not designed to demonstrate whether corticosteroids lead to a phagocytosis deficit before internalization or if spores are phagocytized and escape from AM due to lack of phagolysosomal fusion.

To evaluate oxidative burst, we evaluated ROS production in corticosteroid-treated and untreated AMs incubated with and without spores. Corticosteroids seemed to hamper oxidative burst in corticosteroid-treated AMs, while in the case of untreated mice, oxidative burst increased when AMs were incubated with spores. The role of ROS in *Mucorales* spore clearance is less known than in anti-*Aspergillus* immunity.⁹ Several authors have shown that infectious resting spores are not susceptible to killing by AMs. However, ROS could play a role in the alteration of non-phagocytized germinated spores and hyphae but it remains unclear.⁵ Several mechanisms have been shown to be implicated in the ROS production decrease induced by corticosteroids. Kleinert *et al.* have shown that glucocorticoids induced downregulation of NFkappaB resulting in decreased expression of a gene that encodes for nitric oxide synthase.²³ Other authors have shown that downregulation of NFkappaB decreased ROS production via suppression of the NADPH oxidase p47 subunit.²⁴ In addition, a recent study has shown that corticosteroids blocked dectin-1/syk kinase signaling by a nongenetic mechanism of inhibition of tyrosine kinase phosphorylation leading to downstream production of ROS.²⁵

The *ex vivo* model has some limitations. Using an *ex vivo* model leads to some bias due to the lack of lung microenvironment impossible to reproduce *ex vivo*. This could explain the growth of fungi in the presence of control AMs due to the absence of other immune effectors such as neutrophils, monocytes, lymphocytes and antimicrobial peptides.^{26,27} In this *ex vivo* model we focused only on AMs.

AMs are at the interface of the innate and acquired immune response. AM contact with spores leads to recruitment of inflammatory effectors such as neutrophils and to secretion of pro-inflammatory cytokines.^{26,27} Studies examining the effect of corticosteroids on interaction of AMs with other immune cells could be interesting. In addition, high fungal inoculum, i.e. five spores for one AM, was used to obtain the maximum AM/spore contacts, while the inoculum leading to mucormycosis in human is not known (10). Finally, our model was developed with *L. corymbifera* and our data must be extrapolated to other species with caution. It is known that *Mucorales* species present several differences in virulence and immune response.²⁸

In conclusion, an *ex vivo* model was developed and appears relevant to study the interactions between AMs and *Mucorales* spores. This kind of model is very precious to promote knowledge about mucormycosis susceptibility induced by different drugs. Data about AMs and *Mucorales* spore interaction in immunocompromised state are poor. Before our study, few *ex vivo*¹⁰ or *in vitro*¹³ studies have been published. These studies and our data have highlighted inability of corticosteroid-treated AMs to control spore germination by phagocytosis inhibition and oxidative burst decrease, which appear to be fundamental to the establishment of mucormycosis. It would be crucial to understand in which conditions (dose of corticosteroid, spore-AM ratio, difference between *Mucorales* species) and by which mechanisms (mechanism of phagocytosis inhibition, role of ROS production) immunocompromised state leads to AM inability to control fungal growth in view of developing therapeutic and preventive perspectives against this devastating disease.

Acknowledgments

We thank Jeffrey Arsham for English revision. This work has benefited from the facilities and expertise of the PREBIOS and ImageUp platforms (University of Poitiers).

Disclosure of interest

No potential conflict of interest was reported by the authors.

Funding

This work didn't receive any funding.

References

1. Chamilos G, Lewis RE, Lamaris G, Walsh TJ, Kontoyiannis DP. Zygomycetes hyphae trigger an early, robust proinflammatory response in human polymorphonuclear neutrophils through toll-like receptor 2 induction but display relative resistance to oxidative damage. *Antimicrob Agents Chemother*. 2008;52(2):722-724.
2. Netea MG, Van der Meer JWM, Kullberg B-J. Role of the dual interaction of fungal pathogens with pattern recognition receptors in the activation and modulation of host defence. *Clin Microbiol Infect*. 2006;12(5):404-409.
3. Byrne AJ, Mathie SA, Gregory LG, Lloyd CM. Pulmonary macrophages: key players in the innate defence of the airways. *Thorax*. 2015;70(12):1189-1196.
4. Waldorf AR, Ruderman N, Diamond RD. Specific susceptibility to mucormycosis in murine diabetes and bronchoalveolar macrophage defense against *Rhizopus*. *J Clin Invest*. 1984;74(1):150-160.
5. Ghuman H, Voelz K. Innate and Adaptive Immunity to *Mucorales*. *J Fungi (Basel)*. 2017;3(3).
6. Lanternier F, Dannaoui E, Morizot G, et al. A global analysis of mucormycosis in France: the RetroZygo Study (2005-2007). *Clin Infect Dis*. 2012;54 Suppl 1:S35-43.
7. Jeong W, Keighley C, Wolfe R, et al. The epidemiology and clinical manifestations of mucormycosis: a systematic review and meta-analysis of case reports. *Clin Microbiol Infect*. 2019;25(1):26-34.
8. Lionakis MS, Kontoyiannis DP. Glucocorticoids and invasive fungal infections. *Lancet*. 2003;362(9398):1828-1838.
9. Ibrahim AS, Kontoyiannis DP. Update on mucormycosis pathogenesis. *Curr Opin Infect Dis*. 2013;26(6):508-515.
10. Waldorf AR, Levitz SM, Diamond RD. In vivo bronchoalveolar macrophage defense against *Rhizopus oryzae* and *Aspergillus fumigatus*. *J Infect Dis*. 1984;150(5):752-760.

11. Brunet T, Brunet K, Jouvion G, Cateau E, Marchand S, Rammaert B. *Lichtheimia corymbifera* Colonization Leading to Pulmonary Infection Can Be Prevented with Liposomal Amphotericin B in a New Murine Model. *Antimicrob Agents Chemother.* 2019;63(8).
12. Meier-Osusky I, Schoedon G, Bläuer F, Schneemann M, Schaffner A. Comparison of the antimicrobial activity of deactivated human macrophages challenged with *Aspergillus fumigatus* and *Listeria monocytogenes*. *J Infect Dis.* 1996;174(3):651-654.
13. Chamilos G, Lewis RE, Hu J, et al. *Drosophila melanogaster* as a model host to dissect the immunopathogenesis of zygomycosis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2008;105(27):9367-9372.
14. Philippe B, Ibrahim-Granet O, Prevost MC, et al. Killing of *Aspergillus fumigatus* by Alveolar Macrophages Is Mediated by Reactive Oxidant Intermediates. *Infection and Immunity.* 2003;71(6):3034-3042.
15. Nakamura Y, Murai T, Ogawa Y. Effect of in vitro and in vivo administration of dexamethasone on rat macrophage functions: comparison between alveolar and peritoneal macrophages. *Eur Respir J.* 1996;9(2):301-306.
16. Kitz DJ, Embree RW, Cazin J. Comparative virulence of *Absidia corymbifera* strains in mice. *Infect Immun.* 1981;33(2):395-400.
17. Jacobsen ID. Animal Models to Study Mucormycosis. *J Fungi (Basel).* 2019;5(2).
18. Lamarin GA, Ben-Ami R, Lewis RE, Chamilos G, Samonis G, Kontoyiannis DP. Increased virulence of Zygomycetes organisms following exposure to voriconazole: a study involving fly and murine models of zygomycosis. *J Infect Dis.* 2009;199(9):1399-1406.
19. Sugar AM, Liu XP. Combination antifungal therapy in treatment of murine pulmonary mucormycosis: roles of quinolones and azoles. *Antimicrob Agents Chemother.* 2000;44(7):2004-2006.
20. Luo G, Gebremariam T, Lee H, et al. Efficacy of liposomal amphotericin B and posaconazole in intratracheal models of murine mucormycosis. *Antimicrob Agents Chemother.* 2013;57(7):3340-3347.
21. Lewis RE, Leventakos K, Liao G, Kontoyiannis DP. Efficacy of caspofungin in neutropenic and corticosteroid-immunosuppressed murine models of invasive pulmonary mucormycosis. *Antimicrob Agents Chemother.* 2011;55(7):3584-3587.
22. Andrianaki AM, Kyrmizi I, Thanopoulou K, et al. Iron restriction inside macrophages regulates pulmonary host defense against *Rhizopus* species. *Nat Commun.* 2018;9(1):3333.
23. Kleinert H, Euchenhofer C, Ihrig-Biedert I, Förstermann U. Glucocorticoids inhibit the induction of nitric oxide synthase II by down-regulating cytokine-induced activity of transcription factor nuclear factor-kappa B. *Mol Pharmacol.* 1996;49(1):15-21.
24. Dandona P, Aljada A, Ghanim H, Mohanty P, Hamouda W, Al-Haddad W. Acute suppressive effect of hydrocortisone on p47 subunit of nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase. *Metab Clin Exp.* 2001;50(5):548-552.

25. Kyrmizi I, Gresnigt MS, Akoumianaki T, et al. Corticosteroids block autophagy protein recruitment in *Aspergillus fumigatus* phagosomes via targeting dectin-1/Syk kinase signaling. *J Immunol.* 2013;191(3):1287-1299.
26. Byrne AJ, Mathie SA, Gregory LG, Lloyd CM. Pulmonary macrophages: key players in the innate defence of the airways. *Thorax.* 2015;70(12):1189-1196.
27. Ibrahim AS, Voelz K. The mucormycete-host interface. *Curr Opin Microbiol.* 2017;40:40-45.
28. Gil-Lamaignere C, Simitsopoulou M, Roilides E, Maloukou A, Winn RM, Walsh TJ. Interferon-gamma and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor augment the activity of polymorphonuclear leukocytes against medically important *zygomycetes*. *J Infect Dis.* 2005;191(7):1180-1187.

III. Intérêt de l'amphotéricine B en décolonisation

Article 2 : « *Lichtheimia corymbifera* Colonization Leading to Pulmonary Infection Can Be Prevented with Liposomal Amphotericin B in a New Murine Model »

- **Article publié** : Brunet T*, Brunet K*, Jouvion G, Cateau E, Marchand S, Rammaert B (***co-premiers auteurs**). *Lichtheimia corymbifera* Colonization Leading to Pulmonary Infection Can Be Prevented with Liposomal Amphotericin B in a New Murine Model. *Antimicrob Agents Chemother.* août 2019;63(8) (3).

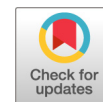
Résumé en français :

L'incidence de la mucormycose pulmonaire est en constante augmentation chez les patients atteints d'hémopathies malgré l'hospitalisation en chambres à air filtré. Cela pourrait être expliqué par la colonisation pulmonaire de spores inhalées avant l'hospitalisation qui entraîneraient une maladie invasive après que le patient ai été traité par immunosuppresseur. Un nouveau modèle murin de colonisation pulmonaire par *L. corymbifera* a été développé pour évaluer l'intérêt d'une décolonisation par traitement antifongique.

Des souris naïves immunocompétentes ont été inoculées par voie intratrachéale avec des spores de *Lichtheimia corymbifera*. La durée de colonisation pulmonaire a ensuite été évaluée par culture des poumons. Les souris ont ensuite été immunodéprimées par des corticoïdes et du cyclophosphamide à différents temps (3 et 4 jours) après l'inoculation de spores de *L. corymbifera* et le nombre de souris développant la maladie a été évaluée. Par la suite, un médicament antifongique a été administré le jour de l'immunosuppression et la survie a été évaluée.

La colonisation pulmonaire s'est prolongée au moins 44 jours. Toutes les souris qui ont reçu des corticoïdes et du cyclophosphamide 3 jours après l'inoculation des spores ont développé la maladie, alors que seulement 5% de l'inoculum initial était présent dans les poumons. L'injection d'une dose unique de 15 mg/kg d'amphotéricine B liposomale intrapéritonéal au moment de l'immunosuppression a amélioré la survie et a diminué la charge fongique pulmonaire par rapport aux souris contrôles, contrairement au posaconazole administré par voie orale à la dose de 80 mg/kg.

Ces résultats montrent qu'une dose unique d'amphotéricine B liposomale offre un réel potentiel en décolonisation pour prévenir l'infection dans ce modèle murin de colonisation pulmonaire à *L. corymbifera*.



Lichtheimia corymbifera Colonization Leading to Pulmonary Infection Can Be Prevented with Liposomal Amphotericin B in a New Murine Model

Thomas Brunet,^{a,b} Kévin Brunet,^{a,b,d} Grégory Jouvion,^c Estelle Cateau,^d  Sandrine Marchand,^{a,b,e}  Blandine Rammaert^{a,b,f}

^aINSERM U1070, Poitiers, France

^bFaculté de Médecine et Pharmacie, Univ Poitiers, Poitiers, France

^cUnité de Neuropathologie Expérimentale, Institut Pasteur, Paris, France

^dUnité de Mycologie-Parasitologie, Département des Agents Infectieux, CHU Poitiers, Poitiers, France

^eLaboratoire de Toxicologie-Pharmacocinétique, CHU Poitiers, Poitiers, France

^fService de Maladies Infectieuses et Tropicales, CHU Poitiers, Poitiers, France

ABSTRACT The incidence of pulmonary mucormycosis is constantly increasing, especially in hematological patients staying in high-efficiency particulate air-filtered rooms. Pulmonary inhalation of spores may occur outside the hospital, leading to invasive disease once patients received chemotherapies. We developed a new pulmonary mucormycosis mouse model mimicking the expected pathophysiology in human to study antifungal drugs. Naive mice were inoculated intratracheally with *Lichtheimia corymbifera* spores. After 3 days, mice received corticosteroids and cyclophosphamide and secondarily developed the disease, while only 5% of the initial inoculum was present in the lungs at day 3. Lung colonization with *L. corymbifera* spores in immunocompetent mice can last at least 44 days. Antifungal drug was administered the day of immunosuppression. Injection of a single 15 mg/kg of body weight dose of liposomal amphotericin B significantly improved survival and pulmonary fungal burden compared with controls, whereas 80 mg/kg oral posaconazole did not. These results show that a unique dose of liposomal amphotericin B offers a real potential decolonization treatment to prevent infection in our mouse model of *L. corymbifera* lung colonization followed by lung infection.

KEYWORDS antifungal agents, invasive fungal disease, *Mucorales*, mucormycosis, prophyllaxis

Despite marked progress in the diagnosis and treatment of invasive fungal diseases (IFDs), prognosis of mucormycosis remains very poor, with an overall mortality of 50% (1). This rate can reach 80% to 100% in patients with prolonged neutropenia (2). Since the primary route of human infection is inhalation of airborne spores, sinus and pulmonary involvement are the most prevalent sites of infection. In a French series of 101 mucormycosis cases, lung localization occurred in 28% of the cases, mostly in patients with hematological malignancies (3). Although *Lichtheimia corymbifera* was the second most common pathogen after *Rhizopus oryzae* responsible for mucormycosis, it is known to be more associated with pulmonary involvement and hematological malignancies (4). In the hematological setting, mucormycosis accounted for 7.2% of IFD, with a higher prevalence of pulmonary mucormycosis (5). However, the incubation period between environmental exposure to spores and development of mucormycosis is unknown, and disease may occur in patients staying for days or weeks in an air-filtrated room. By analogy with *Pneumocystis jirovecii* pneumonia, an unknown length of colonization could precede the invasive disease (6). Spores could also remain

Citation Brunet T, Brunet K, Jouvion G, Cateau E, Marchand S, Rammaert B. 2019. *Lichtheimia corymbifera* colonization leading to pulmonary infection can be prevented with liposomal amphotericin B in a new murine model. Antimicrob Agents Chemother 63:e02544-18. <https://doi.org/10.1128/AAC.02544-18>.

Copyright © 2019 American Society for Microbiology. All Rights Reserved.

Address correspondence to Blandine Rammaert, blandine.rammaert.paltrie@univ-poitiers.fr.

T.B. and K.B. contributed equally to the work.

Received 5 December 2018

Returned for modification 23 March 2019

Accepted 17 May 2019

Accepted manuscript posted online 28 May 2019

Published 25 July 2019

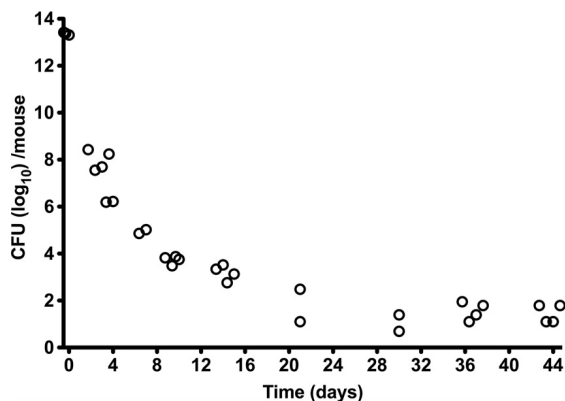


FIG 1 Kinetics of *L. corymbifera* clearance in the lungs of immunocompetent BALB/c mice. A total of 35 BALB/c mice were inoculated intratracheally with 10^6 spores of *L. corymbifera*/mouse. Groups of two mice were euthanized at various times postinoculation. CFUs in the lungs were then enumerated. Each circle represents a mouse.

dormant in the lung inside granuloma and reactivate once the patient is exposed to immunosuppressive therapies, as it has been shown for other fungi, such as dimorphic fungi (7). Because controlling the inhalation of spores is difficult, efficient mucormycosis prevention is crucial.

Posaconazole (PCZ) is currently indicated as IFD prophylaxis during graft-versus-host disease in hematopoietic stem cell transplant (HSCT) recipients and in patients undergoing heavily cytotoxic intensive chemotherapy (8). However, several cases of mucormycosis have been described, which are linked to insufficient PCZ plasma concentrations or due to PCZ resistance (9, 10). In addition, this azole provides numerous drug-drug interactions due to inhibition of several cytochrome P450 isoenzymes (11). Another antifungal drug, liposomal amphotericin B (L-AmB), is the current recommended first line for mucormycosis treatment (12). It could be an alternative for PCZ as mucormycosis prophylaxis. Since mouse models are the gold standard to study IFD, they can help to test the efficacy of antifungal drugs (13).

Therefore, we designed a pulmonary model of *L. corymbifera* colonization that includes a period of colonization followed by an immunosuppression period to develop the disease. This model was then used to test antifungal drugs, namely, PCZ and L-AmB, as decolonization treatment.

RESULTS

Lung colonization after *L. corymbifera* intratracheal inoculation in immunocompetent mice. After intratracheal inoculation of 10^6 spores/mouse, the number of CFUs at 2 hours postinoculation in the lungs of mice was $6.3 \times 10^5 \pm 0.6 \times 10^5$ per mouse, representing 63% of the initial inoculum. Pulmonary fungal cultures at day 3 postinoculation (D3pi) were positive, with a mean of $3.1 \times 10^3 \pm 1.3 \times 10^3$ CFU per mouse, representing 5% of the initial inoculum. However, fungal cultures of lungs remained positive 44 days after exposure, with a mean of 4.5 ± 1.7 CFU (Fig. 1).

Timing of immunosuppressive drug administration to induce pulmonary mucormycosis. When the immunosuppressive drugs were administered at D4pi, the mortality rate was 66.7% at D21pi (Fig. 2). To reach the endpoint of 100% mortality at D21pi, cortisone acetate and cyclophosphamide were administered to groups of 8 mice a day earlier, i.e., at D3pi. The mortality rate of infected immunosuppressed mice was 100% at day 18. Since the mice started to die after D10pi, a histopathological examination of the lungs was performed at D9pi. Lungs showed heterogenous profiles of infection, from swollen spores to hyphae invading the lung tissue (Fig. 3). D9pi was then chosen to assess fungal burden in the lungs after decolonization treatment.

Decolonization efficacy in the mouse model. The efficacy of a single and unique dose of L-AmB and PCZ as decolonization treatment was determined using survival

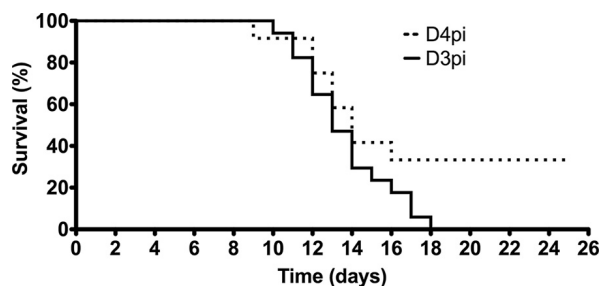


FIG 2 Survival curves of BALB/c mice to determine the day of immunosuppression. A total of 28 BALB/c mice were inoculated intratracheally with 10^6 spores of *L. corymbifera*/mouse. Then, 12 mice were immunosuppressed at day 4 postinoculation (D4pi) and 16 mice at D3pi, with 500 mg/kg cortisone acetate and 200 mg/kg cyclophosphamide. Immunosuppressive drugs were then administered every 5 days.

curves (Fig. 4) and quantification of fungal tissue burden at D9pi (Fig. 5). L-AmB significantly improved survival compared with placebo (mean survival of 20 days versus 13 days; $P = 0.0008$) (Fig. 4A). The median survival time was similar between PCZ and controls ($P = 0.097$) (Fig. 4B). A single administration of L-AmB resulted in a significant decrease in pulmonary fungal burden compared with controls (2.1 ± 0.2 versus $3.1 \pm 0.8 \log_{10}$ of spore eq/mg of lung; $P = 0.043$) (Fig. 5A), whereas PCZ did not (3.7 ± 1.8 versus $2.8 \pm 0.7 \log_{10}$ of spore equivalents/mg of lung; $P = 0.748$) (Fig. 5B).

DISCUSSION

We developed a mouse model of primary pulmonary colonization by *Mucorales* resulting in invasive disease after immune system disruption. Our results showed that *L. corymbifera* could persist up to 44 days in the lungs of immunocompetent mice. The model was used to test fungal decolonization at the same day of immunosuppression with a single and unique dose of antifungal drug. Systemic L-AmB may be a more effective decolonization treatment than oral PCZ in immunosuppressed mice.

The originality of our model relies on fungal colonization resulting in invasive disease when mice are immunosuppressed. As in humans, mice eliminate spores of fungi when inhaled. Early elimination is mainly due to phagocytosis and mucociliary elevator (14). Even a low quantity of spores colonizing the lungs is able to germinate and invade lung parenchyma after immunosuppression. No experimental models of mucormycosis in the literature used this approach that could yet be relevant in human

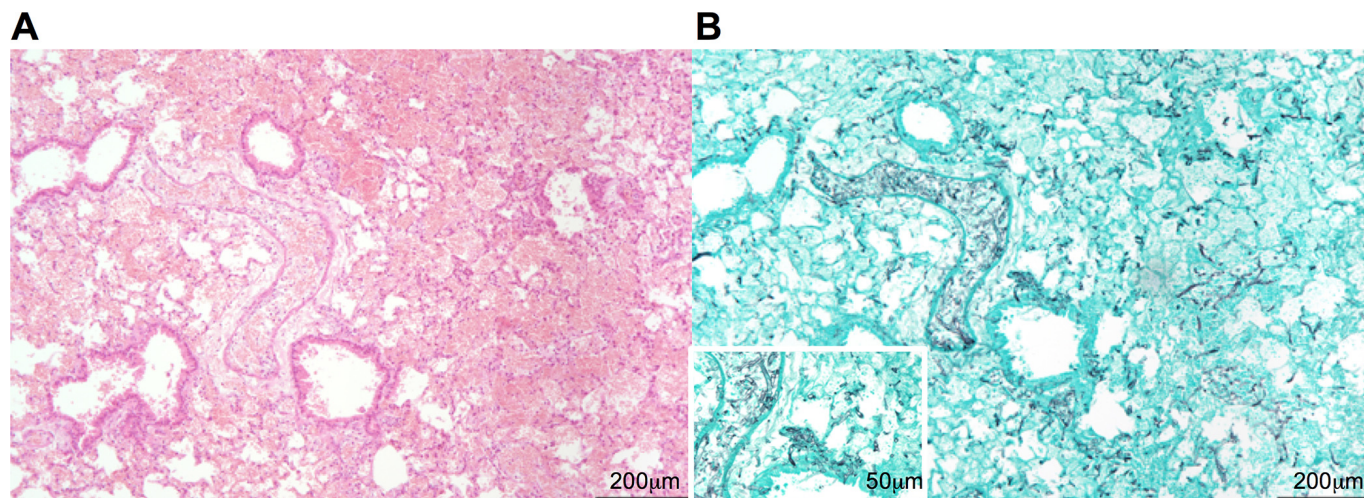


FIG 3 Histopathological examination of a mouse lung infected by *L. corymbifera* at day 9 postinoculation. Three BALB/c mice were inoculated intratracheally with 10^6 spores of *L. corymbifera*/mouse and immunosuppressed at day 3 postinoculation with 500 mg/kg cortisone acetate and 200 mg/kg cyclophosphamide. Pictures of the more damaged lungs are shown. Diffuse hemorrhages of lung parenchyma and necrosis of alveolar epithelium caused by *L. corymbifera* (A, hematoxylin-eosin staining) and fungal hyphae invading the lung parenchyma and the vessels were observed (B, Grocott's methenamine silver staining).

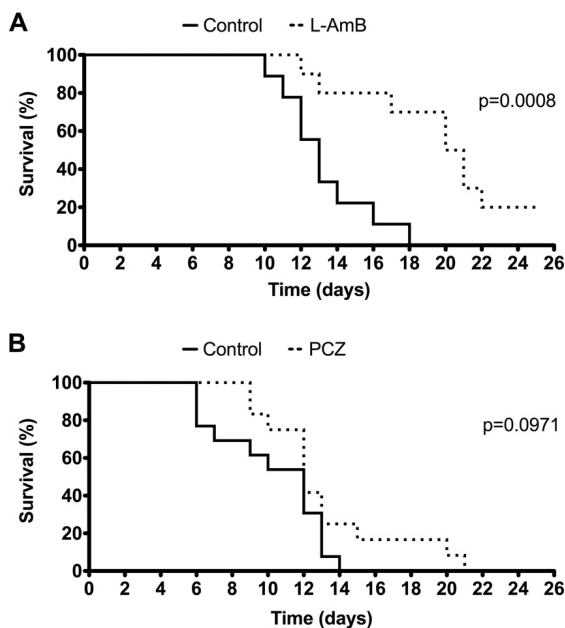


FIG 4 Survival curves of BALB/c mice colonized by *L. corymbifera* secondarily immunocompromised. All mice in this experiment were inoculated intratracheally with 10^6 spores of *L. corymbifera*/mouse and immunosuppressed at day 3 postinoculation with 500 mg/kg cortisone acetate and 200 mg/kg cyclophosphamide. (A) A total of 12 mice were treated with 15 mg/kg intraperitoneal liposomal amphotericin B (L-AmB) and 12 control mice with 5% intraperitoneal glucose serum. (B) A total of 12 mice were treated with 80 mg/kg oral posaconazole (PCZ) on the day of immunosuppression and 12 control mice with sterile water. Groups were compared using log-rank test.

pathophysiology of mucormycosis. In the literature, all other mouse models have systematically tested prophylaxis in mice that had been immunosuppressed before intratracheal (15) or intravenous inoculation (16, 17). In our model, mice were inoculated before immunosuppression. In the literature, prophylactic treatments are injected a few days before fungal inoculation at repeated doses. For example, azoles were given 2 days before and the day of inoculation in the Gebremariam et al. study (15). In another study, PCZ and deoxycholate AmB were injected 2 days before, 1 day before, and the day of inoculation (17). Caspofungin and deoxycholate AmB were given 1 day

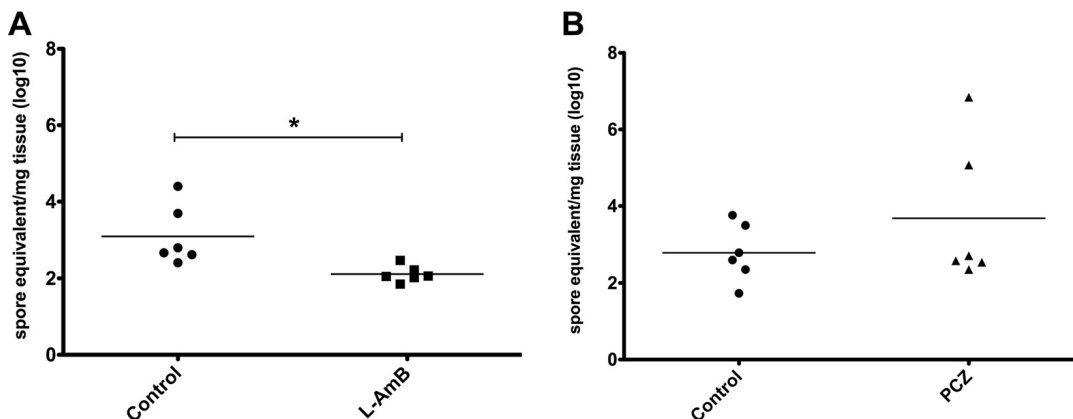


FIG 5 Comparative measurement of pulmonary fungal tissue burden at day 9 postinoculation. All BALB/c mice in the experiment were intratracheally inoculated with 10^6 spores of *L. corymbifera*/mouse, and then immunosuppressed at D3 postinoculation with 500 mg/kg cortisone acetate and 200 mg/kg cyclophosphamide. (A) Six mice were treated with 15 mg/kg intraperitoneal liposomal amphotericin B (L-AmB) and 6 control mice with 5% intraperitoneal glucose serum. (B) Six mice were treated with 80 mg/kg oral posaconazole (PCZ) on the day of immunosuppression and 6 control mice with sterile water. Results are expressed as spore equivalent (eq) of *L. corymbifera* DNA per mg of tissue relative to the organ weight. Groups were compared using Mann-Whitney U test. * $P = 0.004$.

before and the day of inoculation in the study of Ibrahim et al. (16). In our model, antifungal drugs were used as a decolonization treatment at a single and unique dose the day of immunosuppression and not as prophylaxis. Prophylaxis is used at repeated doses before infection to avoid infection, whereas decolonization is used only once after spore inoculation to eradicate spores before germination. Indeed, the duration of incubation of *Mucorales* spores in patients is unknown. Environmental investigation for the presence of spores is often negative in areas that are protected by air filtration systems (18). As *Mucorales* produce airborne spores, patients' contamination by spores may occur outside the hospital before immunosuppressive treatment. *Mucorales* spores have recently been shown to remain latent in zebrafish granuloma (19). Other molds, such as *Aspergillus* spp., could also remain latent (7, 20). Currently, there is a lack of noninvasive techniques to find *Mucorales* colonization in the lung of patients before administration of immunosuppressive regimen, although *Mucorales* reactive T cells could be a promising tool to investigate mold environmental exposure (21). Besides, even with invasive procedure and with the marked improvement in molecular tools, the diagnosis of mucormycosis remains difficult (22–24). Those molecular tools require thorough standardization, optimization, and validation before considering using them routinely in microbiology laboratories (25). As screening for *Mucorales* pulmonary colonization in patients at higher risk is not yet an option, antifungal decolonization could be useful to avoid germination of persisting spores.

Spores of *L. corymbifera* persisted in the lungs of naive mice at least 44 days after inoculation. However, pulmonary clearance may depend on the fungal species studied. Waldorf et al. have shown complete clearance of *Rhizomucor pusillus* spores after 30 days in immunocompetent Swiss albino mice inoculated intranasally with 5×10^6 spores/mouse (26). In addition, Leleu et al. reported faster elimination of another mold, *Aspergillus fumigatus*, in BALB/c mice only 10 days after inoculation with an aerosol of 3×10^8 to 5×10^8 conidia/ml (20). However, none of these models have considered seeding the lungs in their entirety to assess fungal colonization by culture. Therefore, we cannot exclude that spores were still present in the lungs. This may also explain the difference in fungal pulmonary clearance observed in our model.

The faster fungicidal activity of L-AmB compared with PCZ on *L. corymbifera* may explain the better survival in mice treated with L-AmB. AmB was more rapidly fungicidal, leading to 95% killing as early as 6 h and 99.9% killing at 24 h of *Rhizopus* spp. and *Mucor* spp. *in vitro* (27). Comparatively, PCZ showed less than 70% killing at 6 h and 99.9% killing at 48 h of the same strains (27). In addition, postantifungal effects of AmB and PCZ were studied *in vitro* with *A. fumigatus*. AmB provided a 10-fold longer postantifungal effect than that of PCZ ($7.5 \text{ h} \pm 0.70 \text{ h}$ versus $0.75 \text{ h} \pm 0.35 \text{ h}$), suggesting that L-AmB may have a longer postantifungal effect on *L. corymbifera* (28). This pharmacodynamic property of antifungals has been little studied against *Mucorales*. It has been shown that the postantifungal effect was dependent on *Mucorales* species and on AmB concentration (29).

To the best of our knowledge, only one experimental study was dedicated to prophylaxis with L-AmB treatment (30). This study used nebulized L-AmB in a mouse model of *R. oryzae* pulmonary infection. Outbred mice were immunosuppressed and then infected intratracheally with spores. This study failed to demonstrate the efficacy of nebulized L-AmB started 2 days before infection and continued for 5 days after infection in terms of survival compared with untreated mice. Two other studies have used deoxycholate AmB as prophylaxis (16, 17). These studies showed that two or three doses of deoxycholate AmB given before inoculation reduced fungal load and increased survival. They cannot be compared with ours since the fungal species, the timing of infection and immunosuppressive drugs administration, and the route and duration of treatment are different.

In conclusion, systemic administration of L-AmB offers a real potential as decolonization treatment to prevent the occurrence of mucormycosis in our mouse model of *L. corymbifera* colonization prior to immunosuppression followed by lung infection. In addition, there is no known interaction between chemotherapy and L-AmB, which

could be safely administered the same day as chemotherapy. Assessing other *Mucorales* species in this model could be of interest.

MATERIALS AND METHODS

Ethical statement. Experimental protocols have been approved by the local Comte Poitou-Charentes ethics committee and have been registered by the French Ministry of Higher Education and Research (number 2015110516595628). All investigations were performed in accordance with prevailing regulations regarding the care and use of laboratory animals from the European Commission (directive 2010/63/EU).

Mucorales strain and preparation of the inoculum. The same clinical isolate of *Lichtheimia corymbifera* from the Pasteur Institute strain collection (Centre national de référence des Mycoses invasives et antifongiques [CNRMA] 2011.1047, Paris, France) was used for all experiments (14). This strain comes from a deep pulmonary sampling in a cancer patient. MICs for AmB and PCZ were 0.5 and 0.25 mg/liter, respectively. Aliquots of *L. corymbifera* spores were stored at -80°C . After being thawed, an aliquot was cultured on potato dextrose agar (PDA) tubes (Becton, Dickinson, Le Pont de Claix, France). After 6 days of culture, a subculture was performed on 75-cm³ flasks containing 15 ml of PDA. After additional 6 days, the spores were collected by flooding the flask with 10 ml of phosphate-buffered saline (PBS; pH 7.4; Gibco, Life Technologies, Marly-le-Roi, France) supplemented with 0.05% Tween 80 (Sigma, Saint Quentin Fallavier, France) (PBS/Tween 80) to avoid spore aggregation. The suspension was filtered with a 11- μm nylon filter (Millipore, Carrigtwohill, Ireland) to remove hyphal elements, and then centrifuged at $3000 \times g$ for 3 min at 4°C . The supernatant was removed and the pellet resuspended in 3 ml of PBS/Tween 80 to obtain a spore suspension. The spores were counted using a Malassez hemocytometer. The suspension was then diluted in PBS/Tween 80 to obtain the inoculum suspension of 2.10^7 spores/ml. The inoculum suspension was kept at $+4^{\circ}\text{C}$ for a maximum of 24 h.

Mouse model development. Congenic male BALB/c mice ($n = 132$), 7 to 9 weeks old, and 18 to 20 g (Janvier Labs, Le Genest Saint Isle, France) were used for all the experiments and housed under sterile conditions throughout the experiments. Naive mice were intratracheally inoculated using a blunt-end, 24-gauge needle (Dutscher, Brumath, France) with a solution containing 10^6 spores/mouse in 50 μl of PBS/Tween 80 following a short anesthesia with isoflurane (Forene, Rungis, France), as previously described (14, 31).

The model was developed following three steps.

Step A. Lung colonization after *L. corymbifera* intratracheal inoculation in naive mice. We first checked the inoculum intratracheally delivered to the lungs of seven naive mice from three separate experiments, sacrificed 2 hours after inoculation. Then, the lower respiratory tract colonization was assessed by lung culture at different times postinoculation up to 44 days ($n = 2$ per time). Since spores were not able to germinate in naive mice, they are not damaged by tissue grinding, contrary to hyphae (16). Mice were sacrificed using pentobarbital (Vetoquinol, Magny-Vernois, France). The lungs were then removed and homogenized using a tissue grinder (Polytron PT 1600 E; Kirematica AG, Luzern, Switzerland) at 15,000 rpm for 1 min in 1 ml of sterile water. The whole homogenate was then plated onto Sabouraud chloramphenicol medium (SC) plates with 200 μl /plate. The fungal CFUs were enumerated after 24 to 72 h of incubation at 30°C .

Step B. Immunosuppression of mice. After a lag time of 3 to 4 days, mice were immunocompromised with cortisone acetate combined to cyclophosphamide. This combination was commonly used in mucormycosis animal models (15, 31–35). Corticosteroids are used to suppress pulmonary alveolar macrophage function. Cyclophosphamide is used to induce granulocytopenia (32). Groups of 6 mice were immunocompromised at D4pi and groups of 8 mice at D3pi. Experiments were performed in duplicate. Cortisone acetate (Sigma) was dissolved in PBS containing 0.01% Tween 20 (Sigma) to obtain a 50 mg/ml solution, and cyclophosphamide (Sigma) was dissolved in PBS (40 mg/ml). Both drugs were administered intraperitoneally (IP) every 5 days at 500 mg/kg and 200 mg/kg, respectively (15, 31–35). All immunosuppressive drugs were prepared at the day of use. The lag time between inoculation and immunosuppression was defined with survival curves. The endpoint was the development of infection in all immunocompromised mice within 21 days following the injection of immunosuppressive drugs. This time point was arbitrarily chosen as it allowed the development of an acute infection and not a chronic one. The mice were euthanized when they reached the limit points, i.e., weight loss of more than 20% compared with the average weight, passive position in environment, or prostration, or limb palsy, or impossibility to feed.

Step C. Assessment of lung invasive infection. A histopathological examination was performed to ensure invasive disease and presence of hyphae in the parenchyma at D9pi. Lungs of three control mice were aseptically collected and fixed in 60 ml of 10% neutral buffered formalin (VWR Chemicals, Fontenay-sous-Bois, France) for 24 h. They were then immersed in 70% ethanol and embedded in paraffin. Four-micrometer sections were cut in the middle of the paraffin block and stained with hematoxylin and eosin to describe histologic lesions and Grocott methenamine silver for the detection of fungi.

Decolonization assessment in the model. The highest doses of L-AmB and PCZ described in the literature were tested, i.e., 15 mg/kg and 80 mg/kg, respectively (14, 31). The antifungal drugs were prepared at the day of use. L-AmB (Gilead Sciences, Boulogne-Billancourt, France) was diluted in sterile water according to the manufacturer's recommendations. The final concentration of 1.5 mg/ml was obtained by adding sterile 5% glucose serum and was then administered as a single and unique IP injection (200 μl) the day of immunosuppression. Infected untreated control mice received sterile 5% glucose serum as an IP placebo. PCZ oral suspension (Merck, Lyon, France) was diluted 1:2 in sterile water

(20 mg/ml), and 100 μ l was given by oral gavage as a single and unique dose the day of immunosuppression. Infected untreated control mice received sterile water as an oral placebo.

Then, the lung infection was assessed by survival curves up to 21 days and lung fungal load measured by quantitative PCR (qPCR) at D9pi. qPCR was used to determine fungal load since tissue fungal burden determined by qPCR but not CFU correlates with disease progression (16). *L. corymbifera* fungal burden in tissue was determined in 3 mice per group by real-time qPCR on lungs. Experiments were performed in duplicate. After collection, lungs were stored at -80°C before use. After thawing, the sample was homogenized in a milling bowl containing 5 ml of sterile water (Fresenius Kabi, Sèvres, France) and 3-mm-diameter steel beads (Nextadvance, New York, USA). The bowl was placed in a Retsch MM 400 vibratory mill (Retsch, Haan, Germany) programmed for 30 movements per second for 2 min 30 seconds. Then, an external prelysis was carried out with a Roche MagNa pure bacteria lysis buffer kit (Roche Diagnostics, Meylan, France). This protocol was as follows: 200 μ l of buffer added to 200 μ l of crushed material and 40 μ l of proteinase K were placed at 65°C for 3 h and then mixed and placed at 100°C for 10 min. Finally, a chemical lysis was performed by a MagNa pure compact instrument automatic extractor (Roche) using 400 μ l of the prelysis sample. At the end of the automatic extraction process, 100 μ l of eluate was obtained. DNA amplification was performed on a StepOnePlus system (Thermo Fisher Scientific, Illkirch, France) using primers and probes of 18S ribosomal DNA (rDNA) from *L. corymbifera* (36). Oligonucleotide sequences were as follows: (i) sense amplification primer (or forward primer), 5'-CACCGCCCGTCGCTAC-3'; (ii) antisense amplification primer (or reverse primer), 5'-GCAAAGCGTCCGAAGGACA-3'; and (iii) hybridization probe, 5'-FAM-ATGGCAGCAGCAAGCATTAGGGACG-NFQ-MGB-3'. The thermal cycling conditions were as follows: denaturation at 95°C for 10 min and then 15 cycles of 15 s at 95°C and 1 min at 60°C . Each 25- μ l qPCR mix consisted of 10 μ l of DNA, 100 nM sense and antisense primers, and TaqMan universal PCR master mix (Applied Biosystems, Thermo-Fisher Scientific). The fluorophore used was 6-carboxyfluorescein (FAM), and the dark quencher used was black-hole quencher 1 (BHQ1; Eurogentec, Angers, France). The reactions were performed in 0.1-ml MicroAmp 96-well plates (Applied Biosystems). The fungal burden was reported as spore equivalent (eq) of *L. corymbifera* DNA per mg of lung tissue (32).

Statistical analysis. Statistical analysis was performed using Prism 5 software (Graph Pad, La Jolla, CA, USA). Quantitative variables were expressed as mean \pm standard deviation or median (minimum – maximum). Differences in survival rates between groups were assessed using log-rank tests. To compare lung fungal loads obtained by qPCR, Mann-Whitney U nonparametric tests were used. Statistical significance was retained if *P* values were <0.05 .

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Agnès Beby-Defaux for her kind help with qPCR. We thank Jeffrey Arsham for editing the manuscript. This work has benefited from the facilities and expertise of the PREBIOS platform (University of Poitiers).

REFERENCES

- Danion F, Aguilar C, Catherinot E, Alanio A, DeWolf S, Lortholary O, Lanternier F. 2015. Mucormycosis: new developments into a persistently devastating infection. *Semin Respir Crit Care Med* 36:692–705. <https://doi.org/10.1055/s-0035-1562896>.
- Spellberg B, Kontoyiannis DP, Fredricks D, Morris MI, Perfect JR, Chin-Hong PV, Ibrahim AS, Brass EP. 2012. Risk factors for mortality in patients with mucormycosis. *Med Mycol* 50:611–618. <https://doi.org/10.3109/13693786.2012.669502>.
- Lanternier F, Dannaoui E, Morizot G, Elie C, Garcia-Hermoso D, Huerre M, Bitar D, Dromer F, Lortholary O, French Mycosis Study Group. 2012. A global analysis of mucormycosis in France: the RetroZygo Study (2005–2007). *Clin Infect Dis* 54:S35–S43. <https://doi.org/10.1093/cid/cir880>.
- Rüping M, Heinz WJ, Kindo AJ, Rickerts V, Lass-Flörl C, Beisel C, Herbrecht R, Roth Y, Silling G, Ullmann AJ, Borchert K, Egerer G, Maertens J, Maschmeyer G, Simon A, Wattad M, Fischer G, Vehreschild JJ, Cornely OA. 2010. Forty-one recent cases of invasive zygomycosis from a global clinical registry. *J Antimicrob Chemother* 65:296–302. <https://doi.org/10.1093/jac/dkp430>.
- Neofytos D, Fishman JA, Horn D, Anaissie E, Chang C-H, Olyaei A, Pfaller M, Steinbach WJ, Webster KM, Marr KA. 2010. Epidemiology and outcome of invasive fungal infections in solid organ transplant recipients. *Transpl Infect Dis* 12:220–229. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3062.2010.00492.x>.
- Morris A, Norris KA. 2012. Colonization by *Pneumocystis jirovecii* and its role in disease. *Clin Microbiol Rev* 25:297–317. <https://doi.org/10.1128/CMR.00013-12>.
- Brunet K, Alanio A, Lortholary O, Rammaert B. 2018. Reactivation of dormant/latent fungal infection. *J Infect* 77:463–468. <https://doi.org/10.1016/j.jinf.2018.06.016>.
- Maertens JA, Girmenia C, Brüggemann RJ, Duarte RF, Kibbler CC, Ljungman P, Racil Z, Ribaud P, Slavin MA, Cornely OA, Peter Donnelly J, Cordonnier C, European Conference on Infections in Leukaemia (ECIL), a joint venture of the European Group for Blood and Marrow Transplantation (EBMT), the European Organization for Research and Treatment of Cancer (EORTC), the Immunocompromised Host Society (ICHS) and European Conference on Infections in Leukaemia (ECIL), a joint venture of the European Group for Blood and Marrow Transplantation (EBMT), the European Organization for Research and Treatment of Cancer (EORTC), the Immunocompromised Host Society (ICHS) and the European LeukemiaNet (ELN). 2018. European guidelines for primary antifungal prophylaxis in adult haematology patients: summary of the updated recommendations from the European Conference on Infections in Leukaemia. *J Antimicrob Chemother* 73:3221–3230. <https://doi.org/10.1093/jac/dky286>.
- Lerolle N, Raffoux E, Socie G, Touratier S, Sauvageon H, Porcher R, Bretagne S, Bergeron A, Azoulay E, Molina J-M, Lafaurie M. 2014. Breakthrough invasive fungal disease in patients receiving posaconazole primary prophylaxis: a 4-year study. *Clin Microbiol Infect* 20:952–959. <https://doi.org/10.1111/1469-0691.12688>.
- Kang SH, Kim HS, Bae MN, Kim J, Yoo JY, Lee KY, Lee D-G, Kim H-J. 2015. Fatal breakthrough mucormycosis in an acute myelogenous leukemia patient while on posaconazole prophylaxis. *Infect Chemother* 47:49–54. <https://doi.org/10.3947/ic.2015.47.1.49>.
- Petitcollin A, Crochette R, Tron C, Verdier M-C, Boggione-Kerrien C, Vigneau C, Bellissant E, Lemaitre F. 2016. Increased inhibition of cytochrome P450 3A4 with the tablet formulation of posaconazole. *Drug Metab Pharmacokinet* 31:389–393. <https://doi.org/10.1016/j.dmpk.2016.05.001>.
- Tissot F, Agrawal S, Pagano L, Petrikos G, Groll AH, Skiada A, Lass-Flörl C, Calandra T, Viscoli C, Herbrecht R. 2017. ECIL-6 guidelines for the

- treatment of invasive candidiasis, aspergillosis and mucormycosis in leukemia and hematopoietic stem cell transplant patients. *Haematologica* 102:433–444. <https://doi.org/10.3324/haematol.2016.152900>.
13. Capilla J, Clemons KV, Stevens DA. 2007. Animal models: an important tool in mycology. *Med Mycol* 45:657–684. <https://doi.org/10.1080/13693780701644140>.
 14. Rammaert B, Jouvion G, de Chaumont F, Garcia-Hermoso D, Szczepaniak C, Renaudat C, Olivo-Marin J-C, Chrétien F, Dromer F, Bretagne S. 2015. Absence of fungal spore internalization by bronchial epithelium in mouse models evidenced by a new bioimaging approach and transmission electronic microscopy. *Am J Pathol* 185:2421–2430. <https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2015.04.027>.
 15. Gebremariam T, Alkhazraji S, Baldin C, Kovanda L, Wiederhold NP, Ibrahim AS. 2017. Prophylaxis with isavuconazole or posaconazole protects immunosuppressed mice from pulmonary mucormycosis. *Antimicrob Agents Chemother* 61:e02589-16. <https://doi.org/10.1128/AAC.02589-16>.
 16. Ibrahim AS, Bowman JC, Avanesian V, Brown K, Spellberg B, Edwards JE, Douglas CM. 2005. Caspofungin inhibits *Rhizopus oryzae* 1,3-beta-D-glucan synthase, lowers burden in brain measured by quantitative PCR, and improves survival at a low but not a high dose during murine disseminated zygomycosis. *Antimicrob Agents Chemother* 49:721–727. <https://doi.org/10.1128/AAC.49.2.721-727.2005>.
 17. Barchiesi F, Spreghini E, Santinelli A, Fothergill AW, Pisa E, Giannini D, Rinaldi MG, Scalise G. 2007. Posaconazole prophylaxis in experimental systemic zygomycosis. *Antimicrob Agents Chemother* 51:73–77. <https://doi.org/10.1128/AAC.00969-06>.
 18. Ryan L, O'Mara N, Tansey S, Slattey T, Hanahoe B, Vellinga A, Doyle M, Cormican M. 2018. A 2-year comparative study of mold and bacterial counts in air samples from neutral and positive pressure rooms in 2 tertiary care hospitals. *Am J Infect Control* 46:590–593. <https://doi.org/10.1016/j.ajic.2017.10.019>.
 19. Inglesfield S, Jasiulewicz A, Hopwood M, Tyrrell J, Youlden G, Mazon-Moya M, Millington OR, Mostowy S, Jabbari S, Voelz K. 2018. Robust phagocyte recruitment controls the opportunistic fungal pathogen *Mucor circinelloides* in innate granulomas *in vivo*. *mBio* 9:e02010-17. <https://doi.org/10.1128/mBio.02010-17>.
 20. Leleu C, Menotti J, Meneceur P, Choukri F, Sulhian A, Garin Y-F, Derouin F. 2013. Efficacy of liposomal amphotericin B for prophylaxis of acute or reactivation models of invasive pulmonary aspergillosis. *Mycoses* 56: 241–249. <https://doi.org/10.1111/myc.12011>.
 21. Page L, Weis P, Müller T, Dittrich M, Lazariotou M, Dragan M, Waaga-Gasser AM, Helm J, Dandekar T, Einsele H, Löffler J, Ullmann AJ, Wurster S. 2018. Evaluation of *Aspergillus* and *Mucorales* specific T-cells and peripheral blood mononuclear cell cytokine signatures as biomarkers of environmental mold exposure. *Int J Med Microbiol* 308:1018–1026. <https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2018.09.002>.
 22. Bernal-Martínez L, Buitrago MJ, Castelli MV, Rodríguez-Tudela JL, Cuenca-Estrella M. 2013. Development of a single tube multiplex real-time PCR to detect the most clinically relevant *Mucormycetes* species. *Clin Microbiol Infect* 19:E1–E7. <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2012.03976.x>.
 23. Lengerova M, Racil Z, Hrnčirova K, Kocmanova I, Volfova P, Ricna D, Bejda P, Moulis M, Pavlovsky Z, Weinbergerova B, Toskova M, Mayer J. 2014. Rapid detection and identification of mucormycetes in bronchoalveolar lavage samples from immunocompromised patients with pulmonary infiltrates by use of high-resolution melt analysis. *J Clin Microbiol* 52:2824–2828. <https://doi.org/10.1128/JCM.00637-14>.
 24. Millon L, Herbrecht R, Grenouillet F, Morio F, Alanio A, Letscher-Bru V, Cassaing S, Chouaki T, Kauffmann-Lacroix C, Poirier P, Toubas D, Augereau O, Rocchi S, Garcia-Hermoso D, Bretagne S, French Mycosis Study Group. 2016. Early diagnosis and monitoring of mucormycosis by detection of circulating DNA in serum: retrospective analysis of 44 cases collected through the French Surveillance Network of Invasive Fungal Infections (RESSIF). *Clin Microbiol Infect* 22:810.e1–810.e8. <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2015.12.006>.
 25. Lamoth F, Calandra T. 2017. Early diagnosis of invasive mould infections and disease. *J Antimicrob Chemother* 72:i19–i28. <https://doi.org/10.1093/jac/dkx030>.
 26. Waldorf AR, Peter L, Polak A. 1984. Mucormycotic infection in mice following prolonged incubation of spores *in vivo* and the role of spore agglutinating antibodies on spore germination. *Sabouraudia* 22: 101–108. <https://doi.org/10.1080/00362178485380171>.
 27. Krishnan-Natesan S, Manavathu EK, Alangaden GJ, Chandrasekar PH. 2009. A comparison of the fungicidal activity of amphotericin B and posaconazole against *Zygomycetes* *in vitro*. *Diagn Microbiol Infect Dis* 63:361–364. <https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2008.12.013>.
 28. Manavathu EK, Ramesh MS, Baskaran I, Ganesan LT, Chandrasekar PH. 2004. A comparative study of the post-antifungal effect (PAFE) of amphotericin B, triazoles and echinocandins on *Aspergillus fumigatus* and *Candida albicans*. *J Antimicrob Chemother* 53:386–389. <https://doi.org/10.1093/jac/dkh066>.
 29. Vitale RG, Meis J, Mouton JW, Verweij PE. 2003. Evaluation of the post-antifungal effect (PAFE) of amphotericin B and nystatin against 30 *Zygomycetes* using two different media. *J Antimicrob Chemother* 52: 65–70. <https://doi.org/10.1093/jac/dkg285>.
 30. Mihara T, Kakeya H, Izumikawa K, Obata Y, Nishino T, Takazono T, Kosai K, Morinaga Y, Kurihara S, Nakamura S, Imamura Y, Miyazaki T, Tsukamoto M, Yamamoto Y, Yanagihara K, Tashiro T, Kohno S. 2014. Efficacy of aerosolized liposomal amphotericin B against murine invasive pulmonary mucormycosis. *J Infect Chemother* 20:104–108. <https://doi.org/10.1016/j.jiac.2013.09.002>.
 31. Luo G, Gebremariam T, Lee H, French SW, Wiederhold NP, Patterson TF, Filler SG, Ibrahim AS. 2013. Efficacy of liposomal amphotericin B and posaconazole in intratracheal models of murine mucormycosis. *Antimicrob Agents Chemother* 57:3340–3347. <https://doi.org/10.1128/AAC.00313-13>.
 32. Lewis RE, Albert ND, Liao G, Hou J, Prince RA, Kontoyiannis DP. 2010. Comparative pharmacodynamics of amphotericin B lipid complex and liposomal amphotericin B in a murine model of pulmonary mucormycosis. *Antimicrob Agents Chemother* 54:1298–1304. <https://doi.org/10.1128/AAC.01222-09>.
 33. Gebremariam T, Wiederhold NP, Alqarhi A, Uppuluri P, Azie N, Edwards JE, Ibrahim AS. 2017. Monotherapy or combination therapy of isavuconazole and micafungin for treating murine mucormycosis. *J Antimicrob Chemother* 72:462–466. <https://doi.org/10.1093/jac/dkw433>.
 34. Honda A, Kamei K, Unno H, Hiroshima K, Kuriyama T, Miyaji M. 1998. A murine model of zygomycosis by *Cunninghamella bertholletiae*. *Mycopathologia* 144:141–146. <https://doi.org/10.1023/A:1007095831301>.
 35. Bellanger A-P, Tataru AM, Shirazi F, Gebremariam T, Albert ND, Lewis RE, Ibrahim AS, Kontoyiannis DP. 2016. Statin concentrations below the minimum inhibitory concentration attenuate the virulence of *Rhizopus oryzae*. *J Infect Dis* 214:114–121. <https://doi.org/10.1093/infdis/jiw090>.
 36. Millon L, Larosa F, Lepiller Q, Legrand F, Rocchi S, Daguindau E, Scherer E, Bellanger A-P, Leroy J, Grenouillet F. 2013. Quantitative polymerase chain reaction detection of circulating DNA in serum for early diagnosis of mucormycosis in immunocompromised patients. *Clin Infect Dis* 56: e95–e101. <https://doi.org/10.1093/cid/cit094>.

IV. Potentialisation de l'effet de l'amphotéricine B

Article 3 : « Polyethylene glycol (15)-hydroxystearate enhances activity of amphotericin B against *Mucorales* »

➤ Article en cours d'écriture

Résumé en français :

Le but de cette étude était d'évaluer la capacité du polyéthylène glycol (15) -hydroxystéarate (PEG15HS), un tensioactif utilisable par voie parentérale et approuvé par la FDA, à améliorer l'activité antifongique de l'amphotéricine B (AmB) contre six espèces et douze souches cliniques de *Mucorales*. Le PEG15HS a fortement amélioré l'activité de l'AmB contre les six espèces de *Mucorales* testées avec une efficacité et une puissance élevées. L'association AmB - PEG15HS pourrait améliorer le traitement de la mucormycose.

**Polyethylene glycol (15)-hydroxystearate enhances activity of amphotericin B against *Mucorales*
*in vitro***

Abstract

The aim of this study was to evaluate ability of polyethylene glycol (15)-hydroxystearate (PEG15HS), an FDA approved parenteral surfactant, to enhance amphotericin B (AmB) antifungal activity against six species and twelve clinical strains of *Mucorales*. PEG15HS highly enhanced AmB activity against the six tested species of *Mucorales* with high efficacy and potency. AmB - PEG15HS combination could improve mucormycosis treatment.

Text

Mucormycosis are life-threatening invasive fungal diseases due to species belonging to *Mucorales* order (1). They are difficult-to-treat infections in immunocompromised patients, being resistant to most antifungal drugs (2). Treatment is based on surgery, whenever possible, control of underlying diseases, and aggressive antifungal therapy (3,4). There are only three active antifungal agents against *Mucorales*: Liposomal Amphotericin B (L-AmB), recommended for first line therapy (3), posaconazole (PSC) and isavuconazole (ISC), as alternative options (3,5). Despite treatment, mortality remains unacceptable, varying from 30 to 90% according to the disease forms (2). Increasing the efficacy of AmB by using it in combination with an adjuvant could help address this issue (6). Polyethylene glycol (15)-hydroxystearate (Polyoxyl 15 Hydroxystearate) (PEG15HS), an FDA-approved surfactant for parenteral use (7), could destabilize fungal membrane by surfactant activity, and thus, promote AmB activity which acts through pore formation at the fungal membrane (8). The aim of our study was to evaluate *in vitro* the combination of AmB and PEG15HS on six common *Mucorales* species.

Twelve clinical isolates of *Mucorales* identified by ARNr sequencing were used: *Rhizopus arrhizus* (5), *Rhizopus microsporus* (1), *Lichtheimia corymbifera* (3), *Lichtheimia ramosa* (1), *Mucor circinelloides* (1) and *Rhizomucor pusillus* (1). Isolates were subcultured from frozen stocks (-80°C) on 75 cm³ flasks containing 15 mL of Sabouraud dextrose agar (Sigma-Aldrich, Saint-Louis, USA) during 3 days at 37°C. Spores were collected by flooding the flask with 10 mL of sterile water. The suspension was filtered on 11-µm nylon filter (Millipore, Carrigtwohill, Ireland) to remove hyphal elements. Concentration of spore suspension was then adjusted in sterile water to obtain inoculum of 2 x 10⁵ spores/mL.

RPMI 1640 (with L-glutamine and a pH indicator but without bicarbonate) (Sigma-Aldrich) was supplemented with dextrose to a final concentration of 2%, buffered with MOPS (Sigma-Aldrich) at a final concentration of 0.165 mol/L, adjusted to pH 7.0 with 1M sodium hydroxide (Scharlab, Barcelona, Spain), and used as culture medium. Medium was sterilized using 0.22 µm pore-size filter.

AmB powder (Sigma-Aldrich) was diluted in dimethylsulfoxide to get stock solution at 8 192 mg/L keep at -80°C . The day of use, AmB was diluted in culture medium to 16 mg/L. A total of 846 mg of PEG15HS (Solutol[®] HS 15, BASF, Ludwigshafen, Germany) was diluted in 15.5 mL of sterile water to obtain a solution at 54 580 mg/L, that was then diluted at 22 021 mg/L in culture medium.

AmB minimum inhibitory concentrations (MIC) of each strain in presence of different concentration of PEG15HS were determined according to broth microdilution antifungal susceptibility testing methodology from EUCAST with modification for checkerboard procedure (9). Checkerboards were performed with 100 μL of two-fold dilutions of AmB (0.008 to 4 mg/L) and PEG15HS (0.04 to 2752 mg/L) in 96 well plates. 100 μL of a final concentration of 10^5 spores/mL was added in wells, and plates were incubated 24 h at 37°C . MICs were read at 24 h as the lowest concentrations of AmB that completely inhibited visible growth of the fungal strain. Each experiment was performed in duplicate or triplicate.

Modeling of the interaction between AmB and PEG15HS was performed with WinNonlin software (version 6.2, Certara, NJ, USA) according to an inhibitory Emax model with a baseline effect parameter (10). Efficacy was defined by $\text{MIC}_0/\text{MIC}_{\infty}$, with MIC_0 was AmB MIC in the absence of PEG15HS and MIC_{∞} was asymptomatic value of AmB MIC when PEG15HS concentrations trends toward infinity. Potency was defined by the PEG15HS concentration corresponding to 50% of the maximum inhibitory effect (IC_{50}) and expressed in mg/L.

All strains presented $\text{MIC} \leq 1$ mg/L for AmB and $\text{MIC} > 1024$ mg/L for PEG15HS. PEG15HS highly enhanced AmB activity at low concentration (Figure 1). Inhibitory Emax model correctly described the enhancing activity of AmB in presence of different concentrations of PEG15HS (Figure 1).

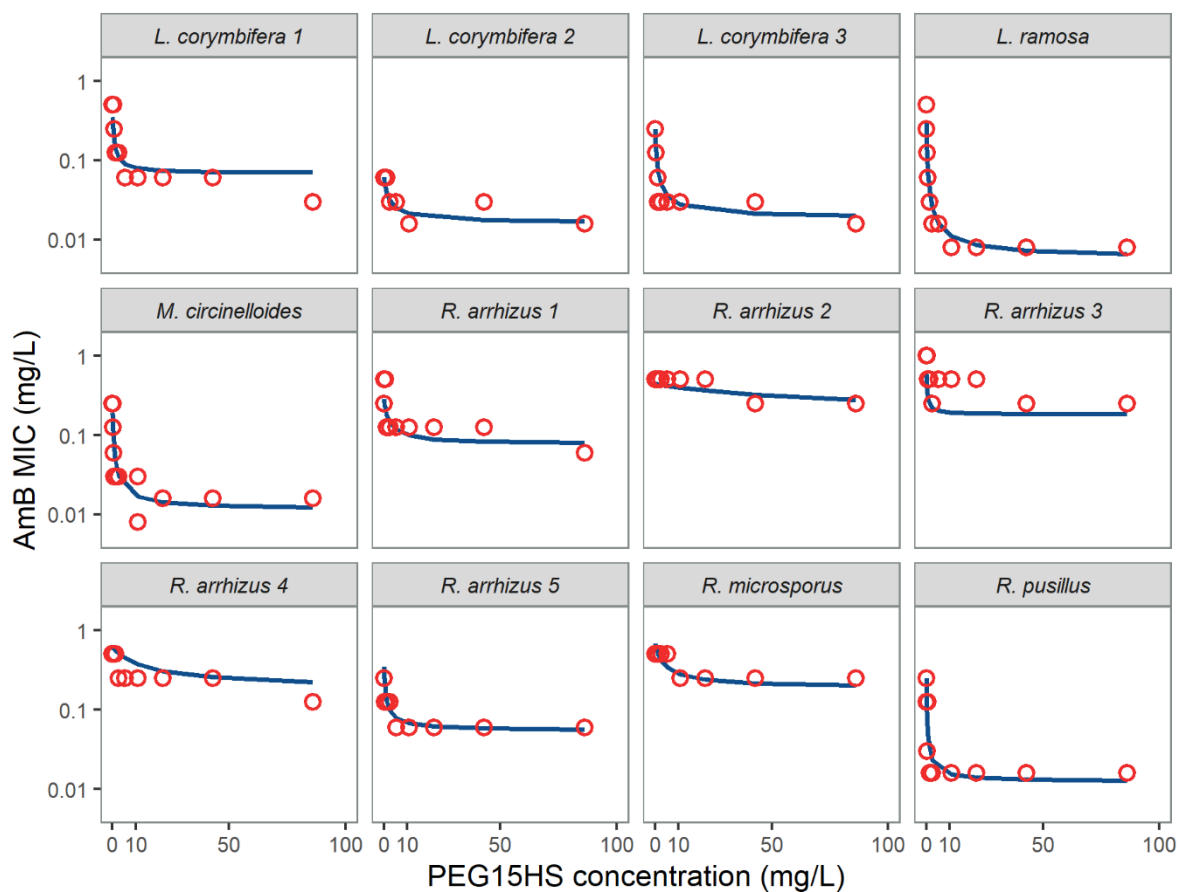


Figure 1: Amphotericin B (AmB) MICs (mg/L) versus PEG15HS concentrations (mg/L) for twelve Mucorales strains.

Circles represent the AmB MICs determined during one checkerboard experiment and the solid lines the individual AmB MICs predicted by the Emax model based on two or three checkerboard experiments.

Efficacy was variable with 2.5 to 38-fold MIC decrease depending on strain (Table 1). PEG15HS was highly potent with IC50 varied from 0.13 to 2.32 mg/L for 10 strains and was lower for two strains (8.57 and 53.45 mg/L).

Table 1: Parameter estimates of the inhibitory E_{max} model for twelve *Mucorales* strains.

Strain	MIC ₀ (mg/L)	MIC ₀ StdError (mg/L)	MIC ₀ CV (%)	IC ₅₀ (mg/L)	IC ₅₀ StdError (mg/L)	IC ₅₀ CV (%)	MIC _∞ (mg/L)	MIC _∞ StdError (mg/L)	MIC _∞ CV (%)	Efficacy MIC ₀ /MIC _∞
<i>L. corymbifera 1</i>	0.36	0.05	13.12	0.44	0.20	44.87	0.068	0.007	10.89	5.2
<i>L. corymbifera 2</i>	0.06	0.00	4.76	1.33	0.28	21.03	0.016	0.001	4.12	3.8
<i>L. corymbifera 3</i>	0.25	0.03	12.26	0.42	0.15	36.17	0.019	0.007	35.18	13.0
<i>L. ramosa</i>	0.31	0.01	3.11	0.19	0.05	26.91	0.008	0.006	101.84	38.2
<i>M. circinelloides</i>	0.19	0.02	12.69	0.32	0.13	39.91	0.012	0.007	56.44	16.5
<i>R. arrhizus 1</i>	0.28	0.03	9.93	1.34	0.60	44.70	0.077	0.007	8.56	3.7
<i>R. arrhizus 2</i>	0.44	0.02	5.56	53.45	28.44	53.21	0.177	0.023	13.08	2.5
<i>R. arrhizus 3</i>	0.59	0.13	21.59	0.28	0.27	97.14	0.183	0.024	13.38	3.2
<i>R. arrhizus 4</i>	0.61	0.06	9.11	8.57	5.08	59.23	0.186	0.024	12.84	3.3
<i>R. arrhizus 5</i>	0.35	0.03	7.94	0.47	0.12	25.25	0.055	0.004	7.88	6.4
<i>R. microsporus</i>	0.68	0.06	8.31	2.32	0.97	41.55	0.190	0.015	8.07	3.6
<i>R. pusillus</i>	0.25	0.03	10.33	0.13	0.05	37.91	0.012	0.008	65.02	19.9

MIC₀: MIC of AmB in the absence of PEG15HS. IC₅₀: PEG15HS concentration corresponding to 50% of the maximum inhibitory effect. MIC_∞: asymptomatic value of AmB MIC when PEG15HS concentrations trends toward infinity. Efficacy: MIC₀/MIC_∞. CV: coefficient of variation. StdError: standard error.

These results suggest that PEGHS15 used in combination with AmB on *Mucorales* decrease MICs at low concentrations. PEG15HS is a non-ionic surfactant used as solubilizer in oral, parenteral, and ophthalmic drugs since many decades. It has low toxicity and excellent biocompatibility due to low hemolytic properties (11–14). Being listed on the inactive ingredient of FDA database, it is approved for ophthalmic and injectable drugs (7). It thus represents a potentially interesting synergistic agent.

Combinations of antifungal agents were largely tested *in vitro* and *in vivo*, although efficacy was not confirmed in patients (15–19). Some of non-antifungal agents combined with antifungals drugs have shown interesting synergy. Calcineurin inhibitors, which have immunosuppressive effects, showed synergy with AmB or posaconazole *in vitro* and *in vivo* (20,21). Iron chelators showed high synergy with antifungal drugs *in vitro* and *in vivo*, not confirmed in patients (22–25). Other agents such as MGCD290, a Hos2 Histone Deacetylase Inhibitor not yet FDA approved, showed synergy *in vitro* with posaconazole and voriconazole (26). Although lovastatin showed synergy *in vitro* with voriconazole (27), the latter is known to enhance *Mucorales* virulence (28). Miltefosine and azoles, and rifampicine and AmB had synergistic effects on $\leq 50\%$ (29), and 56 to 83% of tested strains (30,31), respectively.

Inhibitory Emax model was shown to be a good tool to describe interaction between two compounds (10). Moreover, it can be used to describe interaction between an antimicrobial drug and a non-antimicrobial compound, while fractional inhibitory concentration index (FIC index) could not (32). Inhibitory Emax model can also be used to evaluate potency and efficacy, which cannot be reached with FIC index (10).

To conclude, PEG15HS highly enhanced AmB activity against *Mucorales* with high efficacy and potency. Due to PEG15HS low toxicity, high potency, and the need of low concentrations, AmB - PEG15HS combination could improve mucormycosis treatment. Further studies are needed to evaluate pharmacokinetics profile, *in vivo* efficacy, and toxicity of this combination.

Acknowledgments:

We thank Florent Morio and Estelle Perraud for providing clinical strains.

References

1. Farmakiotis D, Kontoyiannis DP. Mucormycoses. *Infect Dis Clin North Am*. 2016 Mar;30(1):143–63.
2. Serris A, Danion F, Lanternier F. Disease Entities in Mucormycosis. *J Fungi (Basel)*. 2019 Mar 14;5(1).
3. Cornely OA, Alastruey-Izquierdo A, Arenz D, Chen SCA, Dannaoui E, Hochhegger B, et al. Global guideline for the diagnosis and management of mucormycosis: an initiative of the European Confederation of Medical Mycology in cooperation with the Mycoses Study Group Education and Research Consortium. *Lancet Infect Dis*. 2019 Dec;19(12):e405–21.
4. Tissot F, Agrawal S, Pagano L, Petrikos G, Groll AH, Skiada A, et al. ECIL-6 guidelines for the treatment of invasive candidiasis, aspergillosis and mucormycosis in leukemia and hematopoietic stem cell transplant patients. *Haematologica*. 2017;102(3):433–44.
5. Sipsas NV, Gamaletsou MN, Anastasopoulou A, Kontoyiannis DP. Therapy of Mucormycosis. *J Fungi (Basel)*. 2018 Jul 31;4(3).
6. Dannaoui E. Antifungal resistance in *Mucorales*. *Int J Antimicrob Agents*. 2017 Nov;50(5):617–21.
7. US Food And Drug Administration. FDA Inactive ingredient database. <https://www.accessdata.fda.gov/scripts/cder/iig/index.cfm>. 2019;
8. Adler-Moore JP, Gangneux J-P, Pappas PG. Comparison between liposomal formulations of amphotericin B. *Med Mycol*. 2016 Mar;54(3):223–31.
9. EUCAST_E_Def_9_3_1_Mould_testing__definitive.pdf [Internet]. [cited 2020 Aug 24]. Available from: http://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/AFST/Files/EUCAST_E_Def_9_3_1_Mould_testing__definitive.pdf
10. Chauzy A, Buyck J, de Jonge BLM, Marchand S, Grégoire N, Couet W. Pharmacodynamic modelling of β -lactam/ β -lactamase inhibitor checkerboard data: illustration with aztreonam-avibactam. *Clin Microbiol Infect*. 2019 Apr;25(4):515.e1-515.e4.
11. Younes NF, Abdel-Halim SA, Elassy AI. Solutol HS15 based binary mixed micelles with penetration enhancers for augmented corneal delivery of sertaconazole nitrate: optimization, in vitro, ex vivo and in vivo characterization. *Drug Deliv*. 2018 Nov;25(1):1706–17.
12. Hou Y, Zhang F, Lan J, Sun F, Li J, Li M, et al. Ultra-small micelles based on polyoxyl 15 hydroxystearate for ocular delivery of myricetin: optimization, in vitro, and in vivo evaluation. *Drug Deliv*. 2019 Dec;26(1):158–67.

13. Yan H, Zhang Z, Jia X, Song J. d- α -Tocopheryl polyethylene glycol succinate/Solutol HS 15 mixed micelles for the delivery of baohuoside I against non-small-cell lung cancer: optimization and in vitro, in vivo evaluation. *Int J Nanomedicine*. 2016;11:4563–71.
14. Coon JS, Knudson W, Clodfelter K, Lu B, Weinstein RS. Solutol HS 15, nontoxic polyoxyethylene esters of 12-hydroxystearic acid, reverses multidrug resistance. *Cancer Res*. 1991 Feb 1;51(3):897–902.
15. Abidi MZ, Sohail MR, Cummins N, Wilhelm M, Wengenack N, Brumble L, et al. Stability in the cumulative incidence, severity and mortality of 101 cases of invasive mucormycosis in high-risk patients from 1995 to 2011: a comparison of eras immediately before and after the availability of voriconazole and echinocandin-amphotericin combination therapies. *Mycoses*. 2014 Nov;57(11):687–98.
16. Kyvernitakis A, Torres HA, Jiang Y, Chamilos G, Lewis RE, Kontoyiannis DP. Initial use of combination treatment does not impact survival of 106 patients with haematologic malignancies and mucormycosis: a propensity score analysis. *Clin Microbiol Infect*. 2016 Sep;22(9):811.e1-811.e8.
17. van Burik J-AH, Hare RS, Solomon HF, Corrado ML, Kontoyiannis DP. Posaconazole is effective as salvage therapy in zygomycosis: a retrospective summary of 91 cases. *Clin Infect Dis*. 2006 Apr 1;42(7):e61-65.
18. Lanternier F, Dannaoui E, Morizot G, Elie C, Garcia-Hermoso D, Huerre M, et al. A global analysis of mucormycosis in France: the RetroZygo Study (2005-2007). *Clin Infect Dis*. 2012 Feb;54 Suppl 1:S35-43.
19. Reed C, Bryant R, Ibrahim AS, Edwards J, Filler SG, Goldberg R, et al. Combination polyene-caspofungin treatment of rhino-orbital-cerebral mucormycosis. *Clin Infect Dis*. 2008 Aug 1;47(3):364–71.
20. Dannaoui E, Schwarz P, Lortholary O. In vitro interactions between antifungals and immunosuppressive drugs against zygomycetes. *Antimicrob Agents Chemother*. 2009 Aug;53(8):3549–51.
21. Lewis RE, Ben-Ami R, Best L, Albert N, Walsh TJ, Kontoyiannis DP. Tacrolimus enhances the potency of posaconazole against *Rhizopus oryzae* in vitro and in an experimental model of mucormycosis. *J Infect Dis*. 2013 Mar 1;207(5):834–41.
22. Lewis RE, Albert ND, Kontoyiannis DP. Comparative pharmacodynamics of posaconazole in neutropenic murine models of invasive pulmonary aspergillosis and mucormycosis. *Antimicrob Agents Chemother*. 2014 Nov;58(11):6767–72.
23. Ibrahim AS, Gebermariam T, Fu Y, Lin L, Hussein MI, French SW, et al. The iron chelator deferasirox protects mice from mucormycosis through iron starvation. *J Clin Invest*. 2007 Sep;117(9):2649–57.
24. Ibrahim AS, Gebremariam T, Luo G, Fu Y, French SW, Edwards JE, et al. Combination therapy of murine mucormycosis or aspergillosis with iron chelation, polyenes, and echinocandins. *Antimicrob Agents Chemother*. 2011 Apr;55(4):1768–70.

25. Spellberg B, Ibrahim AS, Chin-Hong PV, Kontoyiannis DP, Morris MI, Perfect JR, et al. The Deferasirox-AmBisome Therapy for Mucormycosis (DEFEAT Mucor) study: a randomized, double-blinded, placebo-controlled trial. *J Antimicrob Chemother.* 2012 Mar;67(3):715–22.
26. Pfaller MA, Messer SA, Georgopapadakou N, Martell LA, Besterman JM, Diekema DJ. Activity of MGCD290, a Hos2 Histone Deacetylase Inhibitor, in Combination with Azole Antifungals against Opportunistic Fungal Pathogens. *J Clin Microbiol.* 2009 Dec;47(12):3797–804.
27. Chamilos G, Lewis RE, Kontoyiannis DP. Lovastatin has significant activity against zygomycetes and interacts synergistically with voriconazole. *Antimicrob Agents Chemother.* 2006 Jan;50(1):96–103.
28. Lamarin GA, Ben-Ami R, Lewis RE, Chamilos G, Samonis G, Kontoyiannis DP. Increased virulence of Zygomycetes organisms following exposure to voriconazole: a study involving fly and murine models of zygomycosis. *J Infect Dis.* 2009 May 1;199(9):1399–406.
29. Biswas C, Sorrell TC, Djordjevic JT, Zuo X, Jolliffe KA, Chen SC-A. In vitro activity of miltefosine as a single agent and in combination with voriconazole or posaconazole against uncommon filamentous fungal pathogens. *J Antimicrob Chemother.* 2013 Dec;68(12):2842–6.
30. Dannaoui E, Afeltra J, Meis JFGM, Verweij PE, Eurofung Network. In vitro susceptibilities of zygomycetes to combinations of antimicrobial agents. *Antimicrob Agents Chemother.* 2002 Aug;46(8):2708–11.
31. Christenson JC, Shalit I, Welch DF, Guruswamy A, Marks MI. Synergistic action of amphotericin B and rifampin against *Rhizopus* species. *Antimicrob Agents Chemother.* 1987 Nov;31(11):1775–8.
32. Bidaud AL, Botterel F, Chowdhary A, Dannaoui E. *In vitro* antifungal combination of flucytosine with amphotericin B, voriconazole, or micafungin against *Candida auris* shows no antagonism. *Antimicrob Agents Chemother.* 2019 Oct 7;

Discussion

La mucormycose pulmonaire est une infection grave, dont la prise en charge reste très peu efficace, avec un taux de mortalité avoisinant les 50% malgré le traitement (19,21,138). Les travaux réalisés lors de cette thèse se sont intéressés à la prise en charge curative et préventive de la maladie. Trois modèles expérimentaux ont été mis au point pour étudier cette maladie, un modèle d'infection aiguë qui permettra de mieux appréhender la relation hôte-champignon-antifongique, un modèle *ex vivo* pour étudier l'impact des immunosuppresseurs sur la réponse immunitaire alvéolaire et un modèle original de colonisation suivie d'infection permettant d'étudier les phases précoces de l'infection. Cette thèse a également apporté de nouveaux éclairages sur cette maladie. Un impact négatif des corticoïdes sur la capacité des MA à lutter contre le champignon a été mis en évidence, la décolonisation des souris par l'AmBL a semblé apporter un bénéfice sur leur survie et un candidat potentiel, le PEG15HS, pour une association à l'AmB a été identifié.

Trois nouveaux modèles animaux originaux pour étudier la mucormycose pulmonaire

Trois nouveaux modèles expérimentaux ont été développés lors de cette thèse pour étudier la mucormycose pulmonaire. Les points forts, limites et intérêts scientifiques de ces modèles sont présentés dans le Tableau 4 et développés dans les paragraphes suivants.

La mise au point d'un modèle animal de mucormycose pulmonaire aiguë, caractérisé sur les plans immunologiques et histologiques, permet de bénéficier d'un outil précieux pour mieux appréhender la physiopathologie de cette infection. Le protocole d'immunosuppression de ce modèle ne reposant que sur les corticoïdes permettra d'étudier ce facteur de risque. Ce modèle devra cependant être complété par le développement d'un marqueur PD le rendant plus apte à l'étude de nouvelles molécules antifongiques et la caractérisation de la réponse immunologique alvéolaire devra être poursuivie.

Cette thèse a également permis de mettre au point un modèle original de colonisation suivie d'infection après immunodépression. L'intérêt scientifique paraît majeur car il s'agit du seul modèle murin retrouvé dans la littérature permettant d'étudier la colonisation à *Mucorales*. Ce modèle est précieux pour mieux appréhender les phases précoces de l'infection. Le phénomène de colonisation et de dormance suivi de réactivation au cours de l'immunodépression est un concept nouveau dont

l'étude apparait capitale pour faire diminuer l'incidence de la mucormycose pulmonaire. Ce modèle permettra d'étudier ce phénomène et de tester diverses stratégies de prévention.

Enfin, un modèle murin *ex vivo* a été développé. Il s'agit seulement du second modèle retrouvé dans la littérature permettant d'étudier l'impact de divers immunosuppresseurs sur la réponse des MA vis-à-vis des spores et le seul se focalisant sur *L. corymbifera*. Ce type de modèle permet d'étudier l'impact d'agents immunosuppresseurs de façon plus précise qu'un modèle *in vitro*. Ses avantages vis-à-vis d'un modèle *in vivo* sont de pouvoir se focaliser sur un contingent cellulaire particulier, d'être moins coûteux et d'économiser des animaux. Lorsque l'on pratique l'expérimentation animale, il est en effet crucial d'adopter une démarche éthique et de pouvoir tirer le maximum d'informations des modèles animaux tout en économisant le nombre d'animaux utilisés (41,85). Le modèle *ex vivo* développé permet de tester à partir d'un animal plusieurs conditions sur les cellules prélevées en les divisant en plusieurs échantillons, et répond donc bien à cette problématique. L'inconvénient d'un modèle *ex vivo* est cependant de s'éloigner de la réalité par rapport à un modèle *in vivo* intégrant l'ensemble des acteurs de la réponse immune. L'intérêt scientifique de ce modèle est majeur. En effet, la compréhension des facteurs de risque va devenir capitale dans la prise en charge des IFI, avec aujourd'hui, de plus en plus de thérapies immunosuppressives rendant les patients susceptibles aux infections opportunistes (139). Le développement de modèles tels que ce modèle *ex vivo* permettra de rapidement tester la susceptibilité des MA des souris traitées par ces différentes thérapies. Il sera ainsi possible de définir le risque de mucormycose pulmonaire associé à différents traitements, et donc de mieux la prévenir chez les patients traités par ces thérapies pour lesquelles il n'y a que très peu de recul. La détermination du profil immunologique de l'hôte, et de sa susceptibilité, pourrait ainsi permettre de mieux prendre en charge cette maladie (140).

La plupart des données de la littérature se rapportent à des souches de *Rhizopus sp*, dans ce cadre, il nous semblait nécessaire de développer des modèles pour étudier d'autres genres et espèces de *Mucorales* tels que *Lichtheimia sp* (6,141). Cependant, l'ensemble des données obtenues dans ces modèles devront être vérifiées sur les autres genres et espèces de *Mucorales*, les caractéristiques physiopathologiques étant variables d'une espèce à l'autre (115). Le genre *Lichtheimia sp* semble ainsi moins virulent que le genre *Rhizopus* dans les modèles d'immunodépression, ne provoque pas, ou avec un inoculum très élevée, d'infection rhino-sinusienne chez la souris et est également moins sensible que *Rhizopus sp* à la quantité de fer présente dans le sérum (100,141). De plus, ces trois modèles étudient la forme pulmonaire, il faut donc être très prudent quant à l'extrapolation des données aux autres formes de la maladie. Les différentes formes de mucormycoses présentent des physiopathologies qui semblent distinctes, ces modèles ne doivent donc être utilisés que dans l'étude de la forme pulmonaire. Enfin, il faut garder à l'esprit que les modèles animaux ne sont que des

approximations de la physiopathologie humaine et de la pharmacocinétique humaine et que les données issues de ces modèles doivent être vérifiées chez l'Homme (142).

Tableau 4 : Caractéristiques des modèles expérimentaux développés.

Modèle	Points forts	Limites	Intérêt scientifique
Modèle <i>in vivo</i> d'infection aigüe	<ul style="list-style-type: none"> - Modèle d'infection à <i>L. corymbifera</i> caractérisé sur le plan immunitaire et histologique - Permet d'étudier le FDR « corticoïdes » 	<ul style="list-style-type: none"> - Absence d'un marqueur PD pour les études PK/PD 	<ul style="list-style-type: none"> - Etudier la physiopathologie de l'infection pulmonaire aigüe à <i>L. corymbifera</i> chez les souris immunodéprimées par corticoïdes
Modèle <i>in vivo</i> de colonisation suivie d'infection	<ul style="list-style-type: none"> - Reproduit la phase de colonisation/dormance - 1^{er} modèle de ce type pour les <i>Mucorales</i> 		<ul style="list-style-type: none"> - Seul modèle permettant d'étudier et de tester des stratégies de décolonisation vis-à-vis de <i>L. corymbifera</i>
Modèle <i>ex vivo</i>	<ul style="list-style-type: none"> - Plus proche de la physiopathologie que les études <i>in vitro</i> - Permet de se focaliser sur un contingent cellulaire - Economise des animaux - Rapide et peu coûteux 	<ul style="list-style-type: none"> - Moins proche de la réalité qu'un modèle <i>in vivo</i> (absence des autres composants du SI) - Inoculum de spore arbitraire 	<ul style="list-style-type: none"> - Seul modèle permettant de tester l'effet de médicaments à des doses physiologiques sur la réponse du SI contre <i>L. corymbifera</i>
Points communs aux 3 modèles	<ul style="list-style-type: none"> - Etudier <i>L. corymbifera</i> 	<ul style="list-style-type: none"> - Extrapolation aux autres espèces de <i>Mucorales</i> à vérifier - Limité à la forme pulmonaire 	

SI : système immunitaire. FDR : facteur de risque. PD : pharmacodynamique. PK : pharmacocinétique.

Les corticoïdes, inhibiteurs des fonctions macrophagiques

Les MA sont clairement identifiés comme les cellules de première ligne dans la défense contre la mucormycose pulmonaire. Une étude récente a montré que la déplétion isolée en PNN n'est pas suffisante pour induire une mucormycose pulmonaire chez la souris, mettant en exergue le rôle fondamental des MA (114). L'action des facteurs de risque de mucormycose pulmonaire sur ce contingent cellulaire doit donc être décrite pour permettre de mieux prévenir cette maladie.

La description de l'action des corticoïdes sur les MA est une avancée importante dans la compréhension de ce facteur de risque fréquemment retrouvé (21). Une étude avait montré que les corticoïdes diminuaient la capacité des macrophages à altérer les filaments de *Mucorales* sans en explorer le mécanisme d'action (143). Une autre étude avait montré que les corticoïdes diminuaient la capacité des MA à inhiber la germination des spores de *Rhizopus*, là encore sans explorer les mécanismes en jeu (103). Cette thèse a pu montrer que les corticoïdes favorisent la croissance de *L. corymbifera* par l'inhibition de la phagocytose et du burst oxydatif des MA.

Cette description de l'effet des corticoïdes amène à s'interroger sur la prise en charge des patients traités par corticoïdes. Il serait intéressant de réussir à évaluer le niveau d'imprégnation en corticoïdes responsable d'une diminution des capacités du système immunitaire vis-à-vis des *Mucorales* de façon à pouvoir stratifier le risque des patients et mieux anticiper la survenue de cette maladie. Les dernières recommandations de l'organisation européenne pour la recherche et le traitement sur le cancer (EORTC), pour la classification des IFI, estiment que les patients à risque sont ceux ayant été exposés à 0.3 mg/kg de corticoïdes, sur 3 semaines, dans les 60 derniers jours (144). Ces données sont définies de façon empirique et n'ont pas fait l'objet d'études permettant de les justifier. La compréhension des phénomènes et des doses nécessaires à l'action néfaste des corticoïdes sur le système immunitaire permettrait de mieux classer et détecter les patients à risque.

Une autre étude, pour faire écho à ce travail, serait d'utiliser la même approche pour étudier l'effet des corticoïdes sur le deuxième contingent important de cellules immunitaires innées, les PNN. Leur rôle étant capital dans la lutte antifongique, une inhibition de leur capacité à lutter contre les champignons, induite par les corticoïdes, serait retentissante sur le plan physiopathologique. L'étude d'autres molécules immunosuppressives pourrait également être intéressante. Une étude a par exemple montré que l'ibrutinib, qui est très associé au développement d'aspergilloses invasives chez le patient d'hématologie, entraîne une altération de fonctionnement des PNN (145). Des cas de mucormycoses pulmonaires chez des patients traités par ibrutinib ayant été rapportés (146), il pourrait être pertinent d'étudier son effet sur les MA dans notre modèle.

Nos résultats sont cependant à tempérer par le caractère *ex vivo* du modèle développé. Les mécanismes immunitaires se déroulant *in vivo* sont sans aucun doute plus complexes. En effet, les MA sont à l'interface des réponses innées et acquises (31). L'étude de l'effet des corticoïdes sur la relation entre les MA et les autres composants de l'immunité serait ainsi intéressante. Il pourrait notamment être pertinent d'étudier la production de cytokines par les MA.

Il pourrait aussi être intéressant de tester d'autres souches de *L. corymbifera* dans ce modèle, la réponse phagocytaire pouvant varier selon la souche utilisée. Il a notamment été montré que les souches les plus virulentes de *L. corymbifera* sont plus phagocytées que les moins virulentes (32). Ces phénomènes de phagocytose peuvent également varier selon l'espèce en cause, alors que *Rhizopus* est maintenu dormant dans le phagosome, certaines souches de *Mucor sp* sont capable de filamenter et d'entraîner l'apoptose du macrophage (79,147–149). De plus, *Rhizopus* semble moins sensible au stress oxydatif que *Lichtheimia sp* (150).

Le phénomène de réactivation, un phénomène à prendre en compte dans la stratégie de prophylaxie

La description du phénomène de réactivation à partir de spores dormantes ou colonisantes est une avancée importante dans la compréhension de la mucormycose pulmonaire (2). Très peu de données sont disponibles aujourd'hui sur les conditions de contamination des patients dans l'environnement extérieur ou intérieur. Par exemple, le nombre de spores nécessaires pour entraîner une infection ou le délai d'incubation de celles-ci n'est pas connu. De plus, certains patients développent des infections sous prophylaxie par posaconazole alors qu'ils sont hébergés dans des chambres à air filtré (75,151,152). La description des étapes précoces de l'infection est ainsi primordiale dans la lutte contre cette maladie pour réussir à mieux la prévenir (153).

Il existe de plus en plus de preuves de la capacité des *Mucorales* à rester latentes et à se réactiver en cas d'immunodépression (2). La compréhension de ce phénomène et de ses déterminants génétiques pourrait amener à de nouvelles perspectives thérapeutiques. L'étude de ce phénomène, qui semble être retrouvé chez *Aspergillus sp* (154), a notamment mis en évidence des différences d'expressions géniques entre spores actives et spores dormantes et une modification du métabolisme (155–157). Les premières études à ce sujet avec les *Mucorales* ont montré que ce phénomène de latence pourrait se dérouler, en partie, dans le compartiment intracellulaire des macrophages (79). Après phagocytose par les macrophages, les spores de *Rhizopus* pourraient bloquer la maturation du phagolysosome par l'intermédiaire de la mélanine présente à leur surface, puis le manque de fer dans le macrophage inhiberait la germination de ces spores qui resteraient alors latentes dans le

macrophage (79). Ce blocage de la maturation du phagolysosome pourrait également se faire par l'intermédiaire de la voie de signalisation de la calcineurine chez *M. circinelloides* (147,158). Des études ont également montré que l'expression génique de *M. circinelloides* était modifiée une fois les spores phagocytés, et notamment par l'intermédiaire de la production d'ARN interférents, pour permettre une meilleure adaptation au milieu intracellulaire (159). D'autres auteurs ont montré, dans un modèle de drosophile, que *Rhizopus* serait capable de diminuer la transcription des gènes impliqués dans la défense de l'hôte, tels que ceux codant pour les peptides antimicrobiens par exemple (160). Ce phénomène de latence pourrait également être variable selon les espèces et souches. Après phagocytose, les souches les plus virulentes de *M. circinelloides* seraient capables de filamenter et d'entraîner l'apoptose du macrophage sans entrer en dormance alors que les spores les moins virulentes de *M. circinelloides* seraient capables de rester en dormance dans le macrophage (148,161). Il est capital de continuer à explorer ces phénomènes et de comprendre les voies de signalisation et les composants moléculaires impliqués. Ces mécanismes sont cependant complexes à explorer car il existe peu d'outils de modifications génétiques disponibles, la transformation génétique étant très complexe chez les *Mucorales* (161). Le développement de la technologie CRISPR-Cas 9 chez les *Mucorales* pourrait permettre d'étudier le rôle de certains gènes dans ces phénomènes de latence (162,163), tout comme le développement du séquençage de nouvelle génération, l'analyse transcriptomique ou l'utilisation d'ARN interférents (161,164).

La présence de spores latentes pose la question de l'efficacité des prophylaxies, il se pourrait ainsi que beaucoup de patients hébergent le champignon à l'état latent avant même d'être mis sous prophylaxie. Une nouvelle stratégie préventive serait donc de pouvoir éliminer ces spores latentes avant la chimiothérapie et ainsi de diminuer l'incidence des réactivations, et donc des mucormycoses. Dans notre étude, l'utilisation de l'AmBL semble offrir un réel potentiel pour décoloniser les souris avant immunosuppression (3). L'AmB pénètre dans les macrophages, comme le montre son efficacité contre la leishmaniose (165), une infection due à un parasite retrouvé dans le compartiment phagolysosomal des macrophages (166). L'AmB pourrait donc éliminer les spores colonisantes et intracellulaires. Cependant, la présence d'autres compartiments « réservoirs » de ces spores latentes ne peut pas être écartée et la capacité de l'AmB à y pénétrer reste inconnue.

Cette étude pourrait être suivie d'études cliniques permettant de confirmer ces données expérimentales. La comparaison de l'incidence de la mucormycose pulmonaire chez des patients décolonisés par AmBL, par rapport à celle de patients non décolonisés, pourrait permettre d'évaluer l'intérêt d'une stratégie de ce type. Cependant, avant cela, il faudrait déterminer la posologie la plus efficace (nombre d'administrations, dose) d'AmB permettant de décoloniser les patients.

PEG15HS – amphotéricine B, une combinaison synergique *in vitro* contre les *Mucorales*

Une partie des travaux se sont portés sur l'optimisation de l'utilisation de l'AmB par recherche d'associations potentialisant son effet. Un tensioactif, le PEG15HS, a permis de diminuer les CMI de l'AmB contre les *Mucorales*. Cet effet a semblé puissant, avec des CMI très abaissées, et effectif pour de faibles doses de PEG15HS.

Concernant le mécanisme d'action en jeu dans la synergie, le PEG15HS, par son caractère tensioactif, pourrait déstabiliser la membrane lipidique du champignon et ainsi favoriser la formation de canaux transmembranaires par l'AmB (137). Il pourrait être intéressant de tester d'autres tensioactifs, potentiellement actifs de la même manière. Cette molécule, le PEG15HS, est une molécule déjà validée par la FDA pour l'usage parentéral (167). Il ne se pose ainsi, à priori, aucune problématique majeure liée à son utilisation. Cette molécule est notamment utilisée comme surfactant dans les préparations parentérales de vitamine A, D, E et K, de propanidide, de miconazole, d'alfadolone, d'alfaxalone, de nifedipine ou de piroxicam. Le PEG15HS a notamment été utilisé chez la souris dans des préparations parentérales de chimiothérapies anticancéreuses à des concentrations supérieures à 100 mg/L sans provoquer de toxicité (168). Une question se pose cependant, si la capacité de l'AmB à former des pores dans la membrane des champignons est augmentée, il faudrait vérifier que ce n'est pas le cas dans la membrane des cellules mammifères. En effet, si le PEG15HS facilite la formation de pores dans la membrane des cellules humaines, cela se traduirait par une augmentation de toxicité limitant l'utilisation de cette association. Une étude de tolérance de cette association devra ainsi être réalisée dans notre modèle d'infection aigüe. Après avoir déterminé la pharmacocinétique du PEG15HS dans le modèle, plusieurs doses devront être associées à l'AmB pour évaluer la toxicité potentielle de cette association, par suivi de marqueurs sanguins, histologie ou survie par exemple. L'étude pharmacocinétique permettra également de s'assurer que ces deux molécules atteignent conjointement le site d'infection et de sélectionner la dose permettant d'obtenir une concentration de PEG15HS proche de la concentration potentialisant l'AmB *in vitro*. Toutefois, s'il existait un profil pharmacocinétique systémique défavorable du PEG15HS, il pourrait être envisagé une vectorisation par nanoparticules contenant à la fois l'AmB et le PEG15HS. Ce type de formulations est déjà développé avec des combinaisons d'antibiotiques (169) et notre laboratoire travail sur des formulations galéniques de ce type comprenant des associations de molécules (170). Il faudrait ensuite réaliser une étude pharmacodynamique pour évaluer l'efficacité de l'association sur la mucormycose pulmonaire.

Le modèle Emax pour caractériser les associations antifongiques : un outil précieux

Une autre composante de ce travail est la modélisation informatique des données issues des checkerboards. L'interaction pharmacodynamique entre les anti-infectieux utilisés en association, c'est-à-dire leur efficacité microbiologique, est généralement étudiée en effectuant des expériences de checkerboard qui permettent de déterminer l'indice de concentration inhibitrice fractionnée (FIC index) (171,172). Cet index est basé sur la comparaison de la CMI de chaque molécule seule (CMI_a et CMI_b pour les antibiotiques a et b, respectivement) avec les CMI de la combinaison, CMI de a en présence de b (CMI_{a/b}) et CMI de b en présence de a (CMI_{b/a}) (Figure 7). A partir de cet indice, il est possible de dire si l'association de deux molécules est synergique (FIC index ≤ 0.5), additive (> 0.5 et ≤ 4) ou antagoniste (> 4).

$$\text{FIC index} = \frac{\text{CMI}_{a/b}}{\text{CMI}_a} + \frac{\text{CMI}_{b/a}}{\text{CMI}_b}$$

Figure 7 : Méthode de calcul du FIC index.

CMI_a : concentration minimale inhibitrice de a. *CMI_b* : concentration minimale inhibitrice de b.
CMI_{a/b} : concentration minimale inhibitrice de a en présence de b. *CMI_{b/a}* : concentration minimale inhibitrice de b en présence de a.

Cet index ne peut cependant pas être calculé lorsque l'une des molécules n'a pas d'effet anti-infectieux propre car il suppose que chaque molécule possède une CMI. Le modèle Emax a lui permis de modéliser l'effet d'une molécule antifongique combinée à une molécule sans effet antifongique propre. La modélisation Emax a déjà été utilisée au sein du laboratoire dans une association bêta-lactamine – inhibiteur de bêta-lactamase (aztreonam-avibactam) (171). Notre travail a permis de montrer que cette méthode est également applicable avec les antifongiques et les *Mucorales*. Cet outil est donc très intéressant pour évaluer la puissance et l'efficacité des associations entre antifongiques et molécules non antifongiques et donc de sélectionner les plus prometteuses pour des tests PK/PD.

Lorsque l'on met en évidence une synergie entre deux composés, il n'est pas évident que l'utilisation de ces deux composés associés doit se faire aux posologies utilisées en monothérapie. Pour déterminer la posologie optimale des antifongiques on se base sur des indices PK/PD (173). Ces indices PK/PD reposent sur l'évolution des concentrations libres au site infectieux (PK) et sur la sensibilité du

micro-organisme visé (PD). On décrit en général trois catégories d'anti-infectieux dont l'efficacité est prédite par des indices différents. Les 3 catégories d'indices sont : pourcentage du temps supérieur à la CMI ($\% t > CMI$), rapport de l'aire sous la courbe sur la CMI (AUC/CMI) ou concentration maximale sur CMI (C_{max}/CMI) (Figure 8) (173). L'efficacité des triazolés est par exemple prédite par l'indice AUC/CMI, alors que celle de l'AmB est prédite par l'indice C_{max}/CMI . Selon la catégorie, la valeur cible de l'indice PK/PD à atteindre est ensuite déterminée. Ces indices sont généralement évalués dans des systèmes *in vitro* ou *in vitro* dynamiques de type hollow-fiber et dans des modèles *in vivo*, voire même chez l'Homme. Dans le cadre de la combinaison d'un antifongique et d'une molécule non antifongique, il est complexe de définir les indices et cibles PK/PD à atteindre. Les indices PK/PD usuels ne sont pas utilisables pour les molécules sans effet antifongique propre car nécessitent une valeur de CMI. L'expertise de notre laboratoire repose sur la modélisation informatique des données *in vitro* et permet de déterminer des paramètres prédictifs d'efficacité (tels que l'EC50) pour ces molécules, mais permet aussi l'optimisation des posologies pour augmenter la probabilité d'atteindre les cibles PK/PD (174). L'amélioration des posologies et des combinaisons d'antifongiques ou d'antifongiques et de molécules non antifongiques par cette approche permettrait d'optimiser leur usage. Ce type d'approche permettrait de définir les concentrations optimales de chaque composé d'une association et donc d'utiliser les posologies les plus adaptées pour obtenir l'effet le plus puissant.

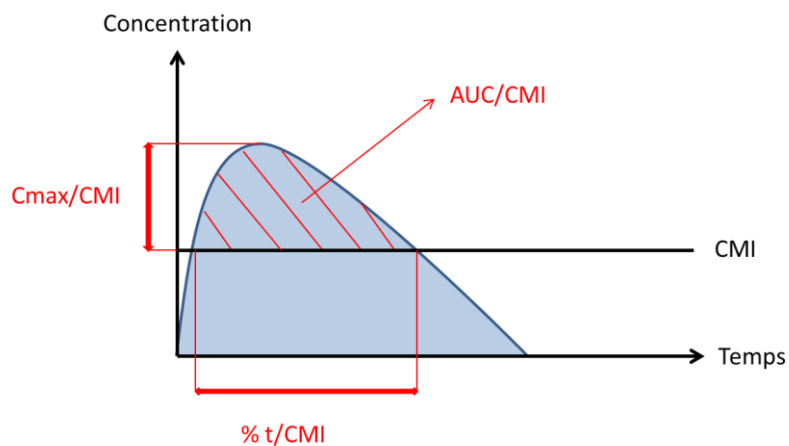


Figure 8 : Indices pharmacocinétiques/pharmacodynamiques (PK/PD).

CMI : concentration minimale inhibitrice. $\%t$: pourcentage du temps. AUC : aire sous la courbe. C_{max} : concentration maximale.

Les aérosols d'amphotéricine B : un potentiel thérapeutique intéressant ?

Au-delà de l'effet antifongique, une modulation du recrutement cellulaire broncho-alvéolaire par l'AmB a été mise en évidence dans le modèle d'infection aigüe. Il a été montré que cet effet immunomodulateur des antifongiques est variable selon les antifongiques et les formes galéniques (134). L'AmBd et l'AmBL semblent posséder des propriétés immunomodulatrices opposées. L'AmBd aurait un comportement pro-inflammatoire alors que le l'AmBL une action anti-inflammatoire (133–135). L'action pro-inflammatoire de l'AmBd passerait par une signalisation TLR-2 dans les macrophages, puis MYD88 activerait NF-kappaB (133–135). La conséquence serait un relargage de cytokines pro-inflammatoires (TNF-alpha, IL-6 et IL-1beta), de chimiokines (IL-8, MCP-1 et MIP-1b), d'oxyde nitrique, de prostaglandines, de ROS et de molécules d'adhésion intercellulaire (ICAM-1) par les cellules mononuclées et les PNN (133,134,175). Au contraire, l'action de l'AmBL diminuerait le relargage de cytokines pro-inflammatoires et augmenterait la production de cytokines anti-inflammatoires (IL-10) (133–135). De plus, les liposomes réguleraient à la baisse l'expression de CD18, une intégrine située à la surface des PNN leur permettant d'adhérer aux cellules endothéliales et impliquée dans le passage transendothélial, et donc diminuerait l'extravasation des PNN aux sites d'inflammation (134).

Cet effet immunomodulateur est cependant limité par le faible passage alvéolaire de l'AmB lorsqu'elle est administrée par voie intraveineuse ou IP. L'utilisation d'aérosols pourrait théoriquement augmenter la concentration de principe actif au niveau alvéolaire (176). Cela pourrait permettre de moduler plus efficacement la réponse inflammatoire pulmonaire locale que la voie systémique. Si l'AmB était utilisé par voie nébulisée, l'action pro-inflammatoires et la réponse Th1 induite par l'AmBd permettrait de mieux lutter contre l'infection (133), mais pourrait être délétère par une réaction immune excessive (177). Au contraire, l'AmBL pourrait empêcher une réaction inflammatoire excessive mais pourrait diminuer l'efficacité de la réaction immunitaire. Ces hypothèses nécessitent donc d'être vérifiées.

Au-delà de l'effet immunomodulateur les aérosols pourraient également augmenter l'effet antifongique de l'AmB. La forte dissémination fongique retrouvée dans cette maladie, ainsi que sa gravité, rendent la voie systémique indispensable. L'utilisation d'aérosols, en complément du traitement systémique, pourrait cependant aider à améliorer la prise en charge de cette maladie. L'utilisation d'aérosols paraît pertinente dans la forme pulmonaire car elle permet théoriquement d'augmenter la concentration de principe actif au site infectieux, tout en limitant la diffusion systémique et donc les potentiels effets indésirables (176). De plus, l'AmB nébulisée pourrait permettre de diminuer les posologies d'AmBL par voie systémique et ainsi d'épargner la fonction

rénale. Cependant, très peu de données sont disponibles dans la littérature sur ce sujet. La plupart des études animales et humaines ayant évalué les aérosols d'AmB l'ont été dans des modèles d'aspergillose pulmonaire invasive (API). Plusieurs modèles de rats ont retrouvé une efficacité pour prolonger la survie des animaux (178). Les différentes formulations d'AmB ont également été comparées dans des modèles d'API chez le rat (179–181). Toutes les formulations d'AmB ont été efficaces pour prolonger la survie des rats mais l'AmBL nébulisée était plus efficace que l'AmBd nébulisée. Chez l'Homme, vingt et une publications, principalement des cas cliniques et des séries de cas, regroupant 99 patients, ont signalé l'utilisation d'AmB nébulisée comme traitement adjuvant dans des IFI, essentiellement des API (182–202). Il est cependant très compliqué de conclure à leur efficacité en l'absence d'étude prospective et ils ne sont donc pas recommandés en première intention en l'absence de preuve suffisante. Une seule étude ayant testé l'effet des aérosols d'AmB dans la mucormycose pulmonaire chez la souris est disponible dans la littérature. Mihara et coll. ont testé l'effet de l'AmBL nébulisée dans un modèle murin de mucormycose pulmonaire à *Rhizopus oryzae* (203). Cette étude a démontré la capacité de l'AmBL nébulisée à atteindre les alvéoles et son efficacité après administration 5 jours de suite de J1 à J5. Le taux de survie était plus élevé chez les souris traitées par aérosols par rapport au groupe contrôle non traité. Cependant, le traitement par aérosols n'a pas été comparé à un traitement systémique. Quelques cas humains de mucormycoses traitées par aérosols d'AmB, majoritairement de l'AmBd, sont rapportés dans la littérature (191–194,198). La posologie d'AmBd nébulisée varie de 6 mg trois fois par jour à 30 mg deux fois par semaine, en combinaison avec un traitement systémique d'AmB et dans certains cas en association à un traitement chirurgical. Les patients de ces études ont été guéris. L'amphotéricine B sous forme de complexe lipidique a également été utilisé dans le traitement d'une infection à *Rhizomucor sp* et a permis de guérir le patient (198). Même si des données étaient obtenues sur le modèle souris, leur extrapolation à l'Homme ne serait pas aisée. Seule une étude internationale randomisée prospective pourrait montrer l'intérêt des aérosols.

Notre laboratoire possédant une expertise importante dans la nébulisation (204–206), l'évaluation de cette voie d'administration fait partie des perspectives de cette thèse.

Conclusion et perspectives

La mucormycose pulmonaire est une pathologie grave dont la mortalité reste très élevée. Sa faible incidence en fait une maladie complexe à étudier et peu rentable pour les industriels (207).

Cette thèse a permis de développer plusieurs outils pour étudier la mucormycose pulmonaire. Des modèles *in vivo* et *ex vivo* ont été mis au point pour étudier cette maladie. Le modèle *in vivo* d'infection aigüe permettra d'étudier la mucormycose pulmonaire à *Lichtheimia corymbifera*, aussi bien sur le plan physiopathologique que thérapeutique, grâce à sa caractérisation immunitaire et histologique. Le modèle *ex vivo* permettra d'évaluer l'impact de nombreuses thérapies sur les cellules immunitaires pulmonaires pour mieux évaluer le risque dû à ces nouveaux traitements. Enfin, le modèle de réactivation permettra d'étudier les phénomènes de colonisation et de réactivation fongique.

Plusieurs pistes pour améliorer la prise en charge de cette maladie ont été ouvertes. L'approche, à la fois sur les aspects préventifs et curatifs, permettra sans doute d'en optimiser les résultats. Une partie du mécanisme d'action des corticoïdes dans la physiopathologie de l'infection a été élucidée, la capacité de décolonisation de l'AmB pourrait permettre de faire diminuer l'incidence de cette maladie et un candidat à une association potentielle à l'AmB a été mis en évidence.

De toutes ces thématiques abordées découlent de nombreuses perspectives. Chacune des voies explorées doit faire l'objet d'un approfondissement. Le développement d'un marqueur PD dans le modèle d'infection aigüe, la poursuite de l'étude des mécanismes impliqués dans le développement de la maladie chez les patients sous corticoïdes, l'évaluation de la transposition des données de décolonisation à l'Homme, l'évaluation *in vivo* de l'association AmB-PEG15HS et l'étude des aérosols d'AmB sont des pistes de recherche à explorer dans le futur.

Annexes

Autorisations de reproduction des figures et des tableaux

Figure 1**ELSEVIER LICENSE TERMS AND CONDITIONS****Aug 27, 2020**

This Agreement between Dr. Kévin Brunet ("You") and Elsevier ("Elsevier") consists of your license details and the terms and conditions provided by Elsevier and Copyright Clearance Center.

License Number	4897121236504
License date	Aug 27, 2020
Licensed Content Publisher	Elsevier
Licensed Content Publication	Journal de Mycologie Medicale
Licensed Content Title	Mucormycoses post-traumatiques à Lichtheimia corymbifera : à propos de 3 cas
Licensed Content Author	D. Lambert,C. Nerot,A. Huguenin,S. Diallo,A. Mzabi,X. Ohl,V. Noel,C. Rouger,C. Strady,I. Villena,F. Bani-Sadr,D. Toubas
Licensed Content Date	Dec 1, 2014
Licensed Content Volume	24
Licensed Content Issue	4
Licensed Content Pages	6
Start Page	345
End Page	350
Type of Use	reuse in a thesis/dissertation
Portion	figures/tables/illustrations
Number of figures/tables/illustrations	1
Format	both print and electronic
Are you the author of this Elsevier article?	No
Will you be translating?	No
Title	Thèse Kévin Brunet
Institution name	Université de Poitiers
Expected presentation date	Oct 2020
Portions	Figure 2 Dr. Kévin Brunet Pole Biologie Santé
Requestor Location	Poitiers, 86000 France Attn: Dr. Kévin Brunet
Publisher Tax ID	GB 494 6272 12
Total	0.00 EUR

Molecular and Phenotypic Evaluation of *Lichtheimia corymbifera* (Formerly *Absidia corymbifera*) Complex Isolates Associated with Human Mucormycosis: Rehabilitation of *L. ramosa*

Author:

Dea Garcia-Hermoso,Damien Hoinard,Jean-Charles Gantier,Frédéric Grenouillet,Françoise Dromer,Eric Dannaoui

Publication:

Journal of Clinical Microbiology

Publisher:

American Society for Microbiology

Date:

Nov 30, 2009

Copyright © 2009, American Society for Microbiology

Permissions Request

ASM authorizes an advanced degree candidate to republish the requested material in his/her doctoral thesis or dissertation. If your thesis, or dissertation, is to be published commercially, then you must reapply for permission.

Figure 3**ELSEVIER LICENSE TERMS AND CONDITIONS****Aug 27, 2020**

This Agreement between Dr. Kévin Brunet ("You") and Elsevier ("Elsevier") consists of your license details and the terms and conditions provided by Elsevier and Copyright Clearance Center.

License Number	4897090479192
License date	Aug 27, 2020
Licensed Content Publisher	Elsevier
Licensed Content Publication	Clinical Microbiology and Infection
Licensed Content Title	The epidemiology and clinical manifestations of mucormycosis: a systematic review and meta-analysis of case reports
Licensed Content Author	W. Jeong,C. Keighley,R. Wolfe,W.L. Lee,M.A. Slavin,D.C.M. Kong,S.C.-A. Chen
Licensed Content Date	Jan 1, 2019
Licensed Content Volume	25
Licensed Content Issue	1
Licensed Content Pages	9
Start Page	26
End Page	34
Type of Use	reuse in a thesis/dissertation
Portion	figures/tables/illustrations
Number of figures/tables/illustrations	of 1
Format	both print and electronic
Are you the author of this Elsevier article?	No
Will you be translating?	No
Title	Thèse Kévin Brunet
Institution name	Université de Poitiers
Expected presentation date	Oct 2020
Portions	Figure 3
Requestor Location	Dr. Kévin Brunet Pole Biologie Poitiers, France Attn: Dr. Kévin Brunet
Publisher Tax ID	GB 494 6272 12
Total	0.00 EUR

Figure 4

ELSEVIER LICENSE TERMS AND CONDITIONS

Aug 27, 2020

This Agreement between Dr. Kévin Brunet ("You") and Elsevier ("Elsevier") consists of your license details and the terms and conditions provided by Elsevier and Copyright Clearance Center.

License Number	4897090771200		
License date	Aug 27, 2020		
Licensed Content Publisher	Elsevier		
Licensed Content Publication	The Lancet Infectious Diseases		
Licensed Content Title	The reversed halo sign and mucormycosis		
Licensed Content Author	Timothy Sullivan, Meenakshi Rana		
Licensed Content Date	Dec 1, 2019		
Licensed Content Volume	19		
Licensed Content Issue	12		
Licensed Content Pages	1		
Start Page	1379		
End Page	0		
Type of Use	reuse in a thesis/dissertation		
Portion	figures/tables/illustrations		
Number of figures/tables/illustrations	1		
Format	both print and electronic		
Are you the author of this Elsevier article?	No		
Will you be translating?	No		
Title	Thèse Kévin Brunet		
Institution name	Université de Poitiers		
Expected presentation date	Oct 2020		
Portions	Dr.	Kévin	Brunet
	Pole	Biologie	Santé
Requestor Location	Poitiers, France Attn: Dr. Kévin Brunet		86000
Publisher Tax ID	GB 494 6272 12		
Total	0.00 USD		

Figure 5

BMJ PUBLISHING GROUP LTD. LICENSE TERMS AND CONDITIONS

Aug 27, 2020

This Agreement between Dr. Kévin Brunet ("You") and BMJ Publishing Group Ltd. ("BMJ Publishing Group Ltd.") consists of your license details and the terms and conditions provided by BMJ Publishing Group Ltd. and Copyright Clearance Center.

License Number	4897111354182
License date	Aug 27, 2020
Licensed Content Publisher	BMJ Publishing Group Ltd.
Licensed Content Publication	BMJ Case Reports
Licensed Content Title	Isolated cerebral mucormycosis caused by <i>Rhizomucor pusillus</i>
Licensed Content Author	Saira Farid,Omar AbuSaleh,Rachael Liesman,Muhammad Rizwan Sohail
Licensed Content Date	Oct 4, 2017
Licensed Content Volume	2017
Type of Use	Dissertation/Thesis
Requestor type	Individual
Format	Print and electronic
Portion	Figure/table/extract
Number of figure/table/extracts	1
Description of figure/table/extracts	Figure 2
Will you be translating?	No
Circulation/distribution	1
Title	Thèse Kévin Brunet
Institution name	Université de Poitiers
Expected presentation date	Oct 2020
Portions	Figure 2
	Dr. Kévin Brunet
	Pole Biologie Santé
Requestor Location	Poitiers, France Attn: Dr. Kévin Brunet
	86000
Publisher Tax ID	GB674738491
Total	0.00 EUR

Figure 6**JOHN WILEY AND SONS LICENSE TERMS AND CONDITIONS****Aug 27, 2020**

This Agreement between Dr. Kévin Brunet ("You") and John Wiley and Sons ("John Wiley and Sons") consists of your license details and the terms and conditions provided by John Wiley and Sons and Copyright Clearance Center.

License Number	4897120237652
License date	Aug 27, 2020
Licensed Content Publisher	John Wiley and Sons
Licensed Content Publication	Mycoses
Licensed Content Title	Antifungal combinations in Mucorales: A microbiological perspective
Licensed Content Author	Eric Dannaoui, Oliver A. Cornely, Patrick Schwarz
Licensed Content Date	Jul 19, 2019
Licensed Content Volume	62
Licensed Content Issue	9
Licensed Content Pages	15
Type of use	Dissertation/Thesis
Requestor type	University/Academic
Format	Print and electronic
Portion	Figure/table
Number of figures/tables	1
Will you be translating?	No
Title	Thèse Kévin Brunet
Institution name	Université de Poitiers
Expected presentation date	Oct 2020
Portions	Figure 1
	Dr. Kévin Brunet
	Pole Biologie Santé
Requestor Location	Poitiers, France Attn: Dr. Kévin Brunet
	86000
Publisher Tax ID	EU826007151
Total	0.00 EUR

Tableau 1 :**OXFORD UNIVERSITY PRESS LICENSE TERMS AND CONDITIONS****Aug 27, 2020**

This Agreement between Dr. Kévin Brunet ("You") and Oxford University Press ("Oxford University Press") consists of your license details and the terms and conditions provided by Oxford University Press and Copyright Clearance Center.

License Number	4897130086738		
License date	Aug 27, 2020		
Licensed content publisher	Oxford University Press		
Licensed publication	content	Clinical Infectious Diseases	
Licensed content title	A Global Analysis of Mucormycosis in France: The RetroZygo Study (2005–2007)		
Licensed content author	Lanternier, F.; Dannaoui, E.		
Licensed content date	Feb 1, 2012		
Type of Use	Thesis/Dissertation		
Institution name			
Title of your work	Thèse Kévin Brunet		
Publisher of your work	Université de Poitiers		
Expected publication date	Oct 2020		
Permissions cost	0.00 EUR		
Value added tax	0.00 EUR		
Total	0.00 EUR		
Title	Thèse Kévin Brunet		
Institution name	Université de Poitiers		
Expected presentation date	Oct 2020		
Portions	Table 2		
Specific Languages	Français		
Requestor Location	Dr. Kévin Brunet	Pole Biologie	Brunet Santé
	Poitiers, France		86000
	Attn: Dr. Kévin Brunet		
Publisher Tax ID	GB125506730		
Total	0.00 EUR		

Tableau 2 :**ELSEVIER LICENSE TERMS AND CONDITIONS****Aug 27, 2020**

This Agreement between Dr. Kévin Brunet ("You") and Elsevier ("Elsevier") consists of your license details and the terms and conditions provided by Elsevier and Copyright Clearance Center.

License Number	4897130401876		
License date	Aug 27, 2020		
Licensed Content Publisher	Elsevier		
Licensed Content Publication	Clinical Microbiology and Infection		
Licensed Content Title	The epidemiology and clinical manifestations of mucormycosis: a systematic review and meta-analysis of case reports		
Licensed Content Author	W. Jeong,C. Keighley,R. Wolfe,W.L. Lee,M.A. Slavin,D.C.M. Kong,S.C.-A. Chen		
Licensed Content Date	Jan 1, 2019		
Licensed Content Volume	25		
Licensed Content Issue	1		
Licensed Content Pages	9		
Start Page	26		
End Page	34		
Type of Use	reuse in a thesis/dissertation		
Portion	figures/tables/illustrations		
Number of figures/tables/illustrations	of	1	
Format	both print and electronic		
Are you the author of this Elsevier article?	No		
Will you be translating?	Yes, without English rights		
Number of languages	1		
Title	Thèse Kévin Brunet		
Institution name	Université de Poitiers		
Expected presentation date	Oct 2020		
Portions	Table 2		
Specific Languages	Français		
	Dr. Pole	Kévin Biologie	Brunet Santé
Requestor Location	Poitiers, France Attn: Dr. Kévin Brunet		86000
Publisher Tax ID	GB 494 6272 12		
Total	0.00 EUR		

Tableau 3 :**ELSEVIER LICENSE TERMS AND CONDITIONS****Aug 27, 2020**

This Agreement between Dr. Kévin Brunet ("You") and Elsevier ("Elsevier") consists of your license details and the terms and conditions provided by Elsevier and Copyright Clearance Center.

License Number	4897130608753		
License date	Aug 27, 2020		
Licensed Content Publisher	Elsevier		
Licensed Content Publication	Clinical Microbiology and Infection		
Licensed Content Title	The epidemiology and clinical manifestations of mucormycosis: a systematic review and meta-analysis of case reports		
Licensed Content Author	W. Jeong,C. Keighley,R. Wolfe,W.L. Lee,M.A. Slavin,D.C.M. Kong,S.C.-A. Chen		
Licensed Content Date	Jan 1, 2019		
Licensed Content Volume	25		
Licensed Content Issue	1		
Licensed Content Pages	9		
Start Page	26		
End Page	34		
Type of Use	reuse in a thesis/dissertation		
Portion	figures/tables/illustrations		
Number of figures/tables/illustrations	of	1	
Format	both print and electronic		
Are you the author of this Elsevier article?	No		
Will you be translating?	Yes, without English rights		
Number of languages	1		
Title	Thèse Kévin Brunet		
Institution name	Université de Poitiers		
Expected presentation date	Oct 2020		
Portions	Table 1		
Specific Languages	Français		
Requestor Location	Dr. Kévin Brunet	Pole Biologie	Brunet Santé
	Poitiers, France		86000
	Attn: Dr. Kévin Brunet		
Publisher Tax ID	GB 494 6272 12		
Total	0.00 EUR		

Références

1. Brunet K, Rammaert B. Mucormycosis treatment: Recommendations, latest advances, and perspectives. *J Mycol Med*. 20 juin 2020;101007.
2. Brunet K, Alanio A, Lortholary O, Rammaert B. Reactivation of dormant/latent fungal infection. *J Infect*. 2018;77(6):463-8.
3. Brunet T, Brunet K, Jouvion G, Cateau E, Marchand S, Rammaert B. *Lichtheimia corymbifera* Colonization Leading to Pulmonary Infection Can Be Prevented with Liposomal Amphotericin B in a New Murine Model. *Antimicrob Agents Chemother*. août 2019;63(8).
4. Hibbett DS, Binder M, Bischoff JF, Blackwell M, Cannon PF, Eriksson OE, et al. A higher-level phylogenetic classification of the Fungi. *Mycol Res*. mai 2007;111(Pt 5):509-47.
5. Farmakiotis D, Kontoyiannis DP. Mucormycoses. *Infect Dis Clin North Am*. mars 2016;30(1):143-63.
6. Schwartze VU, Jacobsen ID. Mucormycoses caused by *Lichtheimia* species. *Mycoses*. 2014;57 Suppl 3:73-8.
7. Frater JL, Hall GS, Procop GW. Histologic features of zygomycosis: emphasis on perineural invasion and fungal morphology. *Arch Pathol Lab Med*. mars 2001;125(3):375-8.
8. Binder U, Maurer E, Lass-Flörl C. Mucormycosis—from the pathogens to the disease. *Clin Microbiol Infect*. 2014;20 Suppl 6:60-6.
9. Garcia-Hermoso D, Hoinard D, Gantier J-C, Grenouillet F, Dromer F, Dannaoui E. Molecular and Phenotypic Evaluation of *Lichtheimia corymbifera* (Formerly *Absidia corymbifera*) Complex Isolates Associated with Human Mucormycosis: Rehabilitation of *L. ramosa*. *Journal of Clinical Microbiology*. 1 déc 2009;47(12):3862-70.
10. Lambert D, Nerot C, Huguenin A, Diallo S, Mzabi A, Ohl X, et al. Mucormycoses post-traumatiques à *Lichtheimia corymbifera* : à propos de 3 cas. *Journal de Mycologie Médicale*. 1 déc 2014;24(4):345-50.
11. Lecube A, Pachón G, Petriz J, Hernández C, Simó R. Phagocytic activity is impaired in type 2 diabetes mellitus and increases after metabolic improvement. *PLoS ONE*. 2011;6(8):e23366.
12. Chinn RY, Diamond RD. Generation of chemotactic factors by *Rhizopus oryzae* in the presence and absence of serum: relationship to hyphal damage mediated by human neutrophils and effects of hyperglycemia and ketoacidosis. *Infect Immun*. déc 1982;38(3):1123-9.
13. Lelievre L, Garcia-Hermoso D, Abdoul H, Hivelin M, Chouaki T, Toubas D, et al. Posttraumatic mucormycosis: a nationwide study in France and review of the literature. *Medicine (Baltimore)*. 2014;93(24):395-404.
14. Wichmann MW, Ayala A, Chaudry IH. Severe depression of host immune functions following closed-bone fracture, soft-tissue trauma, and hemorrhagic shock. *Crit Care Med*. août 1998;26(8):1372-8.
15. Reid G, Lynch JP, Fishbein MC, Clark NM. Mucormycosis. *Semin Respir Crit Care Med*. févr 2020;41(1):99-114.

16. Kennedy KJ, Daveson K, Slavin MA, van Hal SJ, Sorrell TC, Lee A, et al. Mucormycosis in Australia: contemporary epidemiology and outcomes. *Clin Microbiol Infect.* sept 2016;22(9):775-81.
17. Kontoyiannis DP, Azie N, Franks B, Horn DL. Prospective antifungal therapy (PATH) alliance(®) : focus on mucormycosis. *Mycoses.* avr 2014;57(4):240-6.
18. Nucci M, Engelhardt M, Hamed K. Mucormycosis in South America: A review of 143 reported cases. *Mycoses.* sept 2019;62(9):730-8.
19. Lanternier F, Dannaoui E, Morizot G, Elie C, Garcia-Hermoso D, Huerre M, et al. A global analysis of mucormycosis in France: the RetroZygo Study (2005-2007). *Clin Infect Dis.* févr 2012;54 Suppl 1:S35-43.
20. Prakash H, Ghosh AK, Rudramurthy SM, Singh P, Xess I, Savio J, et al. A prospective multicenter study on mucormycosis in India: Epidemiology, diagnosis, and treatment. *Med Mycol.* 1 juin 2019;57(4):395-402.
21. Jeong W, Keighley C, Wolfe R, Lee WL, Slavin MA, Kong DCM, et al. The epidemiology and clinical manifestations of mucormycosis: a systematic review and meta-analysis of case reports. *Clin Microbiol Infect.* janv 2019;25(1):26-34.
22. Danion F, Aguilar C, Catherinot E, Alanio A, DeWolf S, Lortholary O, et al. Mucormycosis: New Developments into a Persistently Devastating Infection. *Semin Respir Crit Care Med.* oct 2015;36(5):692-705.
23. Prakash H, Chakrabarti A. Global Epidemiology of Mucormycosis. *J Fungi (Basel).* 21 mars 2019;5(1).
24. Bongomin F, Gago S, Oladele R, Denning D. Global and Multi-National Prevalence of Fungal Diseases—Estimate Precision. *Journal of Fungi.* 18 oct 2017;3(4):57.
25. Rapport d'activité 2019 CNR Mycoses Invasives et Antifongiques [Internet]. [cité 6 sept 2020]. Disponible sur: <https://www.pasteur.fr/fr/file/31034/download>
26. Bitar D, Lortholary O, Le Strat Y, Nicolau J, Coignard B, Tattevin P, et al. Population-based analysis of invasive fungal infections, France, 2001-2010. *Emerging Infect Dis.* juill 2014;20(7):1149-55.
27. Serris A, Danion F, Lanternier F. Disease Entities in Mucormycosis. *Journal of Fungi.* 14 mars 2019;5(1):23.
28. Rammaert B, Lanternier F, Poirée S, Kania R, Lortholary O. Diabetes and mucormycosis: a complex interplay. *Diabetes Metab.* 2012;38(3):193-204.
29. Walther G, Wagner L, Kurzai O. Updates on the Taxonomy of *Mucorales* with an Emphasis on Clinically Important Taxa. *J Fungi (Basel).* 14 nov 2019;5(4).
30. Ibrahim AS, Voelz K. The mucormycete-host interface. *Curr Opin Microbiol.* 2017;40:40-5.
31. Byrne AJ, Mathie SA, Gregory LG, Lloyd CM. Pulmonary macrophages: key players in the innate defence of the airways. *Thorax.* déc 2015;70(12):1189-96.

32. Kraibooj K, Park H-R, Dahse H-M, Skerka C, Voigt K, Figge MT. Virulent strain of *Lichtheimia corymbifera* shows increased phagocytosis by macrophages as revealed by automated microscopy image analysis. *Mycoses*. déc 2014;57 Suppl 3:56-66.
33. Ghuman H, Voelz K. Innate and Adaptive Immunity to *Mucorales*. *J Fungi (Basel)*. 5 sept 2017;3(3).
34. Waldorf AR, Ruderman N, Diamond RD. Specific susceptibility to mucormycosis in murine diabetes and bronchoalveolar macrophage defense against *Rhizopus*. *J Clin Invest*. juill 1984;74(1):150-60.
35. Wurster S, Thielen V, Weis P, Walther P, Elias J, Waaga-Gasser AM, et al. *Mucorales* spores induce a proinflammatory cytokine response in human mononuclear phagocytes and harbor no rodlet hydrophobins. *Virulence*. 17 2017;8(8):1708-18.
36. Chamilos G, Ganguly D, Lande R, Gregorio J, Meller S, Goldman WE, et al. Generation of IL-23 producing dendritic cells (DCs) by airborne fungi regulates fungal pathogenicity via the induction of T(H)-17 responses. *PLoS ONE*. 23 sept 2010;5(9):e12955.
37. Waldorf AR, Diamond RD. Neutrophil chemotactic responses induced by fresh and swollen *Rhizopus oryzae* spores and *Aspergillus fumigatus* conidia. *Infect Immun*. mai 1985;48(2):458-63.
38. Roilides E, Kontoyiannis DP, Walsh TJ. Host defenses against zygomycetes. *Clin Infect Dis*. févr 2012;54 Suppl 1:S61-66.
39. Park H-R, Voigt K. Interaction of Zygomycetes with innate immune cells reconsidered with respect to ecology, morphology, evolution and infection biology: a mini-review. *Mycoses*. déc 2014;57 Suppl 3:31-9.
40. Netea MG, Van der Meer JWM, Kullberg B-J. Role of the dual interaction of fungal pathogens with pattern recognition receptors in the activation and modulation of host defence. *Clin Microbiol Infect*. mai 2006;12(5):404-9.
41. Hassan MIA, Voigt K. Pathogenicity patterns of mucormycosis: epidemiology, interaction with immune cells and virulence factors. *Med Mycol*. 1 avr 2019;57(Supplement_2):S245-56.
42. Ibrahim AS, Spellberg B, Walsh TJ, Kontoyiannis DP. Pathogenesis of Mucormycosis. *Clinical Infectious Diseases*. 1 févr 2012;54(suppl_1):S16-22.
43. Ben-Ami R, Luna M, Lewis RE, Walsh TJ, Kontoyiannis DP. A clinicopathological study of pulmonary mucormycosis in cancer patients: extensive angioinvasion but limited inflammatory response. *J Infect*. 2009;59(2):134-8.
44. Gebremariam T, Liu M, Luo G, Bruno V, Phan QT, Waring AJ, et al. CotH3 mediates fungal invasion of host cells during mucormycosis. *J Clin Invest*. 2014;124(1):237-50.
45. Alqarihi A, Gebremariam T, Gu Y, Swidergall M, Alkhazraji S, Soliman SSM, et al. GRP78 and Integrins Play Different Roles in Host Cell Invasion during Mucormycosis. *mBio*. 02 2020;11(3).
46. Skiada A, Pagano L, Groll A, Zimmerli S, Dupont B, Lagrou K, et al. Zygomycosis in Europe: analysis of 230 cases accrued by the registry of the European Confederation of Medical

- Mycology (ECMM) Working Group on Zygomycosis between 2005 and 2007. *Clin Microbiol Infect.* 2011;17(12):1859-67.
47. Cornely OA, Arikan-Akdagli S, Dannaoui E, Groll AH, Lagrou K, Chakrabarti A, et al. ESCMID and ECMM joint clinical guidelines for the diagnosis and management of mucormycosis 2013. *Clin Microbiol Infect.* avr 2014;20 Suppl 3:5-26.
 48. Cornely OA, Alastruey-Izquierdo A, Arenz D, Chen SCA, Dannaoui E, Hochhegger B, et al. Global guideline for the diagnosis and management of mucormycosis: an initiative of the European Confederation of Medical Mycology in cooperation with the Mycoses Study Group Education and Research Consortium. *Lancet Infect Dis.* déc 2019;19(12):e405-21.
 49. Lin E, Moua T, Limper AH. Pulmonary mucormycosis: clinical features and outcomes. *Infection.* août 2017;45(4):443-8.
 50. Klimko N, Khostelidi S, Shadrivova O, Volkova A, Popova M, Uspenskaya O, et al. Contrasts between mucormycosis and aspergillosis in oncohematological patients. *Medical Mycology.* 1 avr 2019;57(Supplement_2):S138-44.
 51. Sullivan T, Rana M. The reversed halo sign and mucormycosis. *The Lancet Infectious Diseases.* 1 déc 2019;19(12):1379.
 52. Pyrgos V, Shoham S, Walsh TJ. Pulmonary zygomycosis. *Semin Respir Crit Care Med.* avr 2008;29(2):111-20.
 53. Millon L, Scherer E, Rocchi S, Bellanger A-P. Molecular Strategies to Diagnose Mucormycosis. *Journal of Fungi.* 20 mars 2019;5(1):24.
 54. Guegan H, Iriart X, Bougnoux M-E, Berry A, Robert-Gangneux F, Gangneux J-P. Evaluation of MucorGenius® *mucorales* PCR assay for the diagnosis of pulmonary mucormycosis. *Journal of Infection.* 1 août 2020;81(2):311-7.
 55. Farid S, AbuSaleh O, Liesman R, Sohail MR. Isolated cerebral mucormycosis caused by *Rhizomucor pusillus*. *BMJ Case Rep.* 4 oct 2017;2017.
 56. Manesh A, Rupali P, Sullivan MO, Mohanraj P, Rupa V, George B, et al. Mucormycosis-A clinicoepidemiological review of cases over 10 years. *Mycoses.* avr 2019;62(4):391-8.
 57. Saoulidis S, Simitsopoulou M, Dalakiouridou M, Walsh TJ, Wheat LJ, Papaioannidou P, et al. Antifungal activity of posaconazole and granulocyte colony-stimulating factor in the treatment of disseminated zygomycosis (mucormycosis) in a neutropaenic murine model. *Mycoses.* sept 2011;54(5):e486-492.
 58. Rodríguez MM, Calvo E, Mariné M, Pastor FJ, Fernandez-Ballart J, Guarro J. Efficacy of liposomal amphotericin B combined with gamma interferon or granulocyte-macrophage colony-stimulating factor for treatment of systemic zygomycosis in mice. *Antimicrob Agents Chemother.* août 2009;53(8):3569-71.
 59. Barratt DM, Van Meter K, Asmar P, Nolan T, Trahan C, Garcia-Covarrubias L, et al. Hyperbaric oxygen as an adjunct in zygomycosis: randomized controlled trial in a murine model. *Antimicrob Agents Chemother.* déc 2001;45(12):3601-2.

60. Ma B, Seymour JF, Januszewicz H, Slavin MA. Cure of pulmonary *Rhizomucor pusillus* infection in a patient with hairy-cell leukemia: role of liposomal amphotericin B and GM-CSF. *Leuk Lymphoma*. déc 2001;42(6):1393-9.
61. Sahin B, Paydaş S, Coşar E, Biçakçı K, Hazar B. Role of granulocyte colony-stimulating factor in the treatment of mucormycosis. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. nov 1996;15(11):866-9.
62. Garcia-Diaz JB, Palau L, Pankey GA. Resolution of rhinocerebral zygomycosis associated with adjuvant administration of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. *Clin Infect Dis*. 15 juin 2001;32(12):e145-150.
63. Abzug MJ, Walsh TJ. Interferon-gamma and colony-stimulating factors as adjuvant therapy for refractory fungal infections in children. *Pediatr Infect Dis J*. août 2004;23(8):769-73.
64. John BV, Chamilos G, Kontoyiannis DP. Hyperbaric oxygen as an adjunctive treatment for zygomycosis. *Clin Microbiol Infect*. juill 2005;11(7):515-7.
65. Tiphine M, Letscher-Bru V, Herbrecht R. Amphotericin B and its new formulations: pharmacologic characteristics, clinical efficacy, and tolerability. *Transpl Infect Dis*. déc 1999;1(4):273-83.
66. Adler-Moore JP, Gangneux J-P, Pappas PG. Comparison between liposomal formulations of amphotericin B. *Med Mycol*. mars 2016;54(3):223-31.
67. Adler-Moore J. AmBisome targeting to fungal infections. *Bone Marrow Transplant*. 1994;14 Suppl 5:S3-7.
68. Roden MM, Zaoutis TE, Buchanan WL, Knudsen TA, Sarkisova TA, Schaufele RL, et al. Epidemiology and outcome of zygomycosis: a review of 929 reported cases. *Clin Infect Dis*. 1 sept 2005;41(5):634-53.
69. Gleissner B, Schilling A, Anagnostopoulos I, Siehl I, Thiel E. Improved outcome of zygomycosis in patients with hematological diseases? *Leuk Lymphoma*. juill 2004;45(7):1351-60.
70. Adler-Moore J, Lewis RE, Brüggemann RJM, Rijnders BJA, Groll AH, Walsh TJ. Preclinical Safety, Tolerability, Pharmacokinetics, Pharmacodynamics, and Antifungal Activity of Liposomal Amphotericin B. *Clin Infect Dis*. 2 mai 2019;68(Supplement_4):S244-59.
71. Almyroudis NG, Sutton DA, Fothergill AW, Rinaldi MG, Kusne S. In vitro susceptibilities of 217 clinical isolates of zygomycetes to conventional and new antifungal agents. *Antimicrob Agents Chemother*. 2007;51(7):2587-90.
72. Alastruey-Izquierdo A, Castelli MV, Cuesta I, Monzon A, Cuenca-Estrella M, Rodriguez-Tudela JL. Activity of posaconazole and other antifungal agents against *Mucorales* strains identified by sequencing of internal transcribed spacers. *Antimicrob Agents Chemother*. avr 2009;53(4):1686-9.
73. Lamoth F, Damonti L, Alexander BD. Role of Antifungal Susceptibility Testing in Non-*Aspergillus* Invasive Mold Infections. *J Clin Microbiol*. 2016;54(6):1638-40.
74. Maertens JA, Girmenia C, Brüggemann RJ, Duarte RF, Kibbler CC, Ljungman P, et al. European guidelines for primary antifungal prophylaxis in adult haematology patients: summary of the

- updated recommendations from the European Conference on Infections in Leukaemia. *J Antimicrob Chemother.* 01 2018;73(12):3221-30.
75. Lerolle N, Raffoux E, Socie G, Touratier S, Sauvageon H, Porcher R, et al. Breakthrough invasive fungal disease in patients receiving posaconazole primary prophylaxis: a 4-year study. *Clin Microbiol Infect.* nov 2014;20(11):O952-959.
 76. Spellberg B, Ibrahim AS, Chin-Hong PV, Kontoyiannis DP, Morris MI, Perfect JR, et al. The Deferasirox-AmBisome Therapy for Mucormycosis (DEFEAT Mucor) study: a randomized, double-blinded, placebo-controlled trial. *J Antimicrob Chemother.* mars 2012;67(3):715-22.
 77. Lanternier F, Poiree S, Elie C, Garcia-Hermoso D, Bakouboula P, Sitbon K, et al. Prospective pilot study of high-dose (10 mg/kg/day) liposomal amphotericin B (L-AMB) for the initial treatment of mucormycosis. *J Antimicrob Chemother.* nov 2015;70(11):3116-23.
 78. Marty FM, Ostrosky-Zeichner L, Cornely OA, Mullane KM, Perfect JR, Thompson GR, et al. Isavuconazole treatment for mucormycosis: a single-arm open-label trial and case-control analysis. *Lancet Infect Dis.* juill 2016;16(7):828-37.
 79. Andrianaki AM, Kyrmizi I, Thanopoulou K, Baldin C, Drakos E, Soliman SSM, et al. Iron restriction inside macrophages regulates pulmonary host defense against *Rhizopus* species. *Nat Commun.* 2018;9(1):3333.
 80. Watkins TN, Gebremariam T, Swidergall M, Shetty AC, Graf KT, Alqarihi A, et al. Inhibition of EGFR Signaling Protects from Mucormycosis. *mBio.* 14 2018;9(4).
 81. Baldin C, Soliman SSM, Jeon HH, Alkhazraji S, Gebremariam T, Gu Y, et al. PCR-Based Approach Targeting *Mucorales*-Specific Gene Family for Diagnosis of Mucormycosis. *J Clin Microbiol.* 2018;56(10).
 82. Gebremariam T, Wiederhold NP, Alqarihi A, Uppuluri P, Azie N, Edwards JE, et al. Monotherapy or combination therapy of isavuconazole and micafungin for treating murine mucormycosis. *J Antimicrob Chemother.* 2017;72(2):462-6.
 83. Gebremariam T, Wiederhold NP, Fothergill AW, Garvey EP, Hoekstra WJ, Schotzinger RJ, et al. VT-1161 Protects Immunosuppressed Mice from *Rhizopus arrhizus* var. *arrhizus* Infection. *Antimicrob Agents Chemother.* déc 2015;59(12):7815-7.
 84. Lewis RE, Albert ND, Kontoyiannis DP. Comparative pharmacodynamics of posaconazole in neutropenic murine models of invasive pulmonary aspergillosis and mucormycosis. *Antimicrob Agents Chemother.* nov 2014;58(11):6767-72.
 85. Jacobsen ID. Animal Models to Study Mucormycosis. *J Fungi (Basel).* 27 mars 2019;5(2).
 86. Graybill JR. The role of murine models in the development of antifungal therapy for systemic mycoses. *Drug Resist Updat.* 2000;3(6):364-83.
 87. Capilla J, Clemons KV, Stevens DA. Animal models: an important tool in mycology. *Med Mycol.* 2007;45(8):657-84.
 88. Paulussen C, Boulet GA, Cos P, Delputte P, Maes LJ. Animal models of invasive aspergillosis for drug discovery. *Drug Discov Today.* 2014;19(9):1380-6.

89. Kamei K. Animal models of zygomycosis—*Absidia*, *Rhizopus*, *Rhizomucor*, and *Cunninghamella*. *Mycopathologia*. 2001;152(1):5-13.
90. Chamilos G, Lionakis MS, Lewis RE, Kontoyiannis DP. Role of mini-host models in the study of medically important fungi. *Lancet Infect Dis*. 2007;7(1):42-55.
91. Tobin DM, May RC, Wheeler RT. Zebrafish: a see-through host and a fluorescent toolbox to probe host-pathogen interaction. *PLoS Pathog*. 2012;8(1):e1002349.
92. Chia R, Achilli F, Festing MF, Fisher EM. The origins and uses of mouse outbred stocks. *Nat Genet*. 2005;37(11):1181-6.
93. Rammaert B, Jouvion G, de Chaumont F, Garcia-Hermoso D, Szczepaniak C, Renaudat C, et al. Absence of Fungal Spore Internalization by Bronchial Epithelium in Mouse Models Evidenced by a New Bioimaging Approach and Transmission Electronic Microscopy. *Am J Pathol*. 2015;185(9):2421-30.
94. Salas V, Pastor FJ, Calvo E, Sutton D, García-Hermoso D, Mayayo E, et al. Experimental murine model of disseminated infection by *Saksenaia vasiformis*: successful treatment with posaconazole. *Med Mycol*. 2012;50(7):710-5.
95. Gebremariam T, Alkharaji S, Baldin C, Kovanda L, Wiederhold NP, Ibrahim AS. Prophylaxis with Isavuconazole or Posaconazole Protects Immunosuppressed Mice from Pulmonary Mucormycosis. *Antimicrob Agents Chemother*. 2017;61(5).
96. Festing MF. Inbred strains should replace outbred stocks in toxicology, safety testing, and drug development. *Toxicol Pathol*. 2010;38(5):681-90.
97. Lewis RE, Leventakos K, Liao G, Kontoyiannis DP. Efficacy of caspofungin in neutropenic and corticosteroid-immunosuppressed murine models of invasive pulmonary mucormycosis. *Antimicrob Agents Chemother*. 2011;55(7):3584-7.
98. Bao W, Jin L, Fu HJ, Shen YN, Lu GX, Mei H, et al. Interleukin-22 mediates early host defense against *Rhizomucor pusilluscan* pathogens. *PLoS One*. 2013;8(6):e65065.
99. Aristizábal BH, Clemons KV, Cock AM, Restrepo A, Stevens DA. Experimental *Paracoccidioides brasiliensis* infection in mice: influence of the hormonal status of the host on tissue responses. *Med Mycol*. 2002;40(2):169-78.
100. Schulze B, Rambach G, Schwartze VU, Voigt K, Schubert K, Speth C, et al. Ketoacidosis alone does not predispose to mucormycosis by *Lichtheimia* in a murine pulmonary infection model. *Virulence*. 2017;0.
101. Lamaris GA, Ben-Ami R, Lewis RE, Chamilos G, Samonis G, Kontoyiannis DP. Increased virulence of Zygomycetes organisms following exposure to voriconazole: a study involving fly and murine models of zygomycosis. *J Infect Dis*. 1 mai 2009;199(9):1399-406.
102. Lamoth F, Kontoyiannis DP. Therapeutic Challenges of Non-*Aspergillus* Invasive Mold Infections in Immunosuppressed Patients. *Antimicrob Agents Chemother*. nov 2019;63(11).
103. Waldorf AR, Levitz SM, Diamond RD. In vivo bronchoalveolar macrophage defense against *Rhizopus oryzae* and *Aspergillus fumigatus*. *J Infect Dis*. nov 1984;150(5):752-60.

104. Lionakis MS, Kontoyiannis DP. Glucocorticoids and invasive fungal infections. *The Lancet*. nov 2003;362(9398):1828-38.
105. Lewis RE, Ben-Ami R, Best L, Albert N, Walsh TJ, Kontoyiannis DP. Tacrolimus enhances the potency of posaconazole against *Rhizopus oryzae* in vitro and in an experimental model of mucormycosis. *J Infect Dis*. 1 mars 2013;207(5):834-41.
106. Dannaoui E, Schwarz P, Lortholary O. In vitro interactions between antifungals and immunosuppressive drugs against zygomycetes. *Antimicrob Agents Chemother*. août 2009;53(8):3549-51.
107. Pfaller MA, Messer SA, Georgopapadakou N, Martell LA, Besterman JM, Diekema DJ. Activity of MGCD290, a Hos2 histone deacetylase inhibitor, in combination with azole antifungals against opportunistic fungal pathogens. *J Clin Microbiol*. déc 2009;47(12):3797-804.
108. Schwarz P, Cornely OA, Dannaoui E. Antifungal combinations in *Mucorales*: A microbiological perspective. *Mycoses*. sept 2019;62(9):746-60.
109. Lewis RE, Albert ND, Liao G, Hou J, Prince RA, Kontoyiannis DP. Comparative pharmacodynamics of amphotericin B lipid complex and liposomal amphotericin B in a murine model of pulmonary mucormycosis. *Antimicrob Agents Chemother*. 2010;54(3):1298-304.
110. Lewis RE, Liao G, Wang W, Prince RA, Kontoyiannis DP. Voriconazole pre-exposure selects for breakthrough mucormycosis in a mixed model of *Aspergillus fumigatus*-*Rhizopus oryzae* pulmonary infection. *Virulence*. 2011;2(4):348-55.
111. Millon L, Larosa F, Lepiller Q, Legrand F, Rocchi S, Daguindau E, et al. Quantitative polymerase chain reaction detection of circulating DNA in serum for early diagnosis of mucormycosis in immunocompromised patients. *Clin Infect Dis*. 2013;56(10):e95-101.
112. Becher B, Schlitzer A, Chen J, Mair F, Sumatoh HR, Teng KWW, et al. High-dimensional analysis of the murine myeloid cell system. *Nat Immunol*. déc 2014;15(12):1181-9.
113. Kitz DJ, Embree RW, Cazin J. Comparative virulence of *Absidia corymbifera* strains in mice. *Infect Immun*. 1981;33(2):395-400.
114. Rambach G, Fleischer V, Harpf V, Lackner M, Meinitzer A, Maier H, et al. Comparative immunopathogenesis in a murine model of inhalative infection with the mucormycetes *Lichtheimia corymbifera* and *Rhizopus arrhizus*. *PLoS ONE*. 2020;15(6):e0234063.
115. Luo G, Gebremariam T, Lee H, French SW, Wiederhold NP, Patterson TF, et al. Efficacy of liposomal amphotericin B and posaconazole in intratracheal models of murine mucormycosis. *Antimicrob Agents Chemother*. 2013;57(7):3340-7.
116. Ogino MH, Tadi P. Cyclophosphamide. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2020 [cité 10 août 2020]. Disponible sur: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK553087/>
117. Adrover JM, Nicolás-Ávila JA, Hidalgo A. Aging: A Temporal Dimension for Neutrophils. *Trends in Immunology*. 1 mai 2016;37(5):334-45.
118. Murphy J, Summer R, Wilson AA, Kotton DN, Fine A. The prolonged life-span of alveolar macrophages. *Am J Respir Cell Mol Biol*. avr 2008;38(4):380-5.

119. Santosuosso M, Divangahi M, Zganiacz A, Xing Z. Reduced tissue macrophage population in the lung by anticancer agent cyclophosphamide: restoration by local granulocyte macrophage-colony-stimulating factor gene transfer. *Blood*. 15 févr 2002;99(4):1246-52.
120. Rhen T, Cidlowski JA. Antiinflammatory action of glucocorticoids--new mechanisms for old drugs. *N Engl J Med*. 20 oct 2005;353(16):1711-23.
121. Youssef J, Novosad SA, Winthrop KL. Infection Risk and Safety of Corticosteroid Use. *Rheum Dis Clin North Am*. févr 2016;42(1):157-76, ix-x.
122. Sugar AM, Liu XP. Combination antifungal therapy in treatment of murine pulmonary mucormycosis: roles of quinolones and azoles. *Antimicrob Agents Chemother*. juill 2000;44(7):2004-6.
123. Zaragoza O, Alvarez M, Telzak A, Rivera J, Casadevall A. The relative susceptibility of mouse strains to pulmonary *Cryptococcus neoformans* infection is associated with pleiotropic differences in the immune response. *Infect Immun*. 2007;75(6):2729-39.
124. Mircescu MM, Lipuma L, van Rooijen N, Pamer EG, Hohl TM. Essential role for neutrophils but not alveolar macrophages at early time points following *Aspergillus fumigatus* infection. *J Infect Dis*. 15 août 2009;200(4):647-56.
125. Misharin AV, Morales-Nebreda L, Mutlu GM, Budinger GRS, Perlman H. Flow Cytometric Analysis of Macrophages and Dendritic Cell Subsets in the Mouse Lung. *Am J Respir Cell Mol Biol*. oct 2013;49(4):503-10.
126. Duong M, Ouellet N, Simard M, Bergeron Y, Olivier M, Bergeron MG. Kinetic study of host defense and inflammatory response to *Aspergillus fumigatus* in steroid-induced immunosuppressed mice. *J Infect Dis*. nov 1998;178(5):1472-82.
127. Zaynagetdinov R, Sherrill TP, Kendall PL, Segal BH, Weller KP, Tighe RM, et al. Identification of Myeloid Cell Subsets in Murine Lungs Using Flow Cytometry. *Am J Respir Cell Mol Biol*. août 2013;49(2):180-9.
128. Luo G, Gebremariam T, Lee H, Edwards JE, Kovanda L, Ibrahim AS. Isavuconazole Therapy Protects Immunosuppressed Mice from Mucormycosis. *Antimicrob Agents Chemother*. avr 2014;58(4):2450-3.
129. Abdul Rahim N, Cheah S-E, Johnson MD, Zhu Y, Yu HH, Sidjabat HE, et al. Transcriptomic responses of a New Delhi metallo- β -lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* isolate to the combination of polymyxin B and chloramphenicol. *Int J Antimicrob Agents*. 20 juin 2020;106061.
130. Brock M, Jouvion G, Droin-Bergère S, Dussurget O, Nicola M-A, Ibrahim-Granet O. Bioluminescent *Aspergillus fumigatus*, a new tool for drug efficiency testing and in vivo monitoring of invasive aspergillosis. *Appl Environ Microbiol*. nov 2008;74(22):7023-35.
131. Skory CD. Homologous recombination and double-strand break repair in the transformation of *Rhizopus oryzae*. *Mol Genet Genomics*. 2002;268(3):397-406.
132. Cornu M, Sendid B, Mery A, François N, Mikulska M, Letscher-Bru V, et al. Evaluation of Mass Spectrometry-Based Detection of Panfungal Serum Disaccharide for Diagnosis of Invasive

- Fungal Infections: Results from a Collaborative Study Involving Six European Clinical Centers. *J Clin Microbiol.* 2019;57(5).
133. Mesa-Arango AC, Scorzoni L, Zaragoza O. It only takes one to do many jobs: Amphotericin B as antifungal and immunomodulatory drug. *Front Microbiol.* 2012;3:286.
 134. Ben-Ami R, Lewis RE, Kontoyiannis DP. Immunocompromised hosts: immunopharmacology of modern antifungals. *Clin Infect Dis.* 15 juill 2008;47(2):226-35.
 135. Simitopoulou M, Roilides E, Walsh TJ. Immunomodulatory properties of antifungal agents on phagocytic cells. *Immunol Invest.* 2011;40(7-8):809-24.
 136. Simitopoulou M, Roilides E, Dotis J, Dalakiouridou M, Dudkova F, Andreadou E, et al. Differential expression of cytokines and chemokines in human monocytes induced by lipid formulations of amphotericin B. *Antimicrob Agents Chemother.* avr 2005;49(4):1397-403.
 137. Stone NRH, Bicanic T, Salim R, Hope W. Liposomal Amphotericin B (AmBisome®): A Review of the Pharmacokinetics, Pharmacodynamics, Clinical Experience and Future Directions. *Drugs.* mars 2016;76(4):485-500.
 138. Sipsas NV, Gamaletsou MN, Anastasopoulou A, Kontoyiannis DP. Therapy of Mucormycosis. *J Fungi (Basel).* 31 juill 2018;4(3).
 139. Friedman DZP, Schwartz IS. Emerging Fungal Infections: New Patients, New Patterns, and New Pathogens. *J Fungi (Basel).* 20 juill 2019;5(3).
 140. Skiada A, Lass-Floerl C, Klimko N, Ibrahim A, Roilides E, Petrikos G. Challenges in the diagnosis and treatment of mucormycosis. *Med Mycol.* avr 2018;56(Suppl 1):S93-101.
 141. Spellberg B. Mucormycosis pathogenesis: Beyond *Rhizopus*. *Virulence.* 17 2017;8(8):1481-2.
 142. Stevens VM, Mueller SW, Reynolds PM, MacLaren R, Kiser TH. Extrapolating Antifungal Animal Data to Humans - Is it reliable? *Curr Fungal Infect Rep.* mars 2020;14(1):50-62.
 143. Diamond RD. Inhibition of monocyte-mediated damage to fungal hyphae by steroid hormones. *J Infect Dis.* janv 1983;147(1):160.
 144. Donnelly JP, Chen SC, Kauffman CA, Steinbach WJ, Baddley JW, Verweij PE, et al. Revision and Update of the Consensus Definitions of Invasive Fungal Disease From the European Organization for Research and Treatment of Cancer and the Mycoses Study Group Education and Research Consortium. *Clin Infect Dis.* 5 déc 2019;
 145. Blez D, Blaize M, Soussain C, Boissonnas A, Meghraoui-Kheddar A, Menezes N, et al. Ibrutinib induces multiple functional defects in the neutrophil response against *Aspergillus fumigatus*. *Haematologica.* 2020;105(2):478-89.
 146. Anastasopoulou A, DiPippo AJ, Kontoyiannis DP. Non-*Aspergillus* invasive mould infections in patients treated with ibrutinib. *Mycoses.* août 2020;63(8):787-93.
 147. Lee SC, Li A, Calo S, Inoue M, Tonthat NK, Bain JM, et al. Calcineurin orchestrates dimorphic transitions, antifungal drug responses and host-pathogen interactions of the pathogenic mucoralean fungus *Mucor circinelloides*. *Mol Microbiol.* 2015;97(5):844-65.

148. Li CH, Cervantes M, Springer DJ, Boekhout T, Ruiz-Vazquez RM, Torres-Martinez SR, et al. Sporangiospore size dimorphism is linked to virulence of *Mucor circinelloides*. PLoS Pathog. 2011;7(6):e1002086.
149. López-Muñoz A, Nicolás FE, García-Moreno D, Pérez-Oliva AB, Navarro-Mendoza MI, Hernández-Oñate MA, et al. An Adult Zebrafish Model Reveals that Mucormycosis Induces Apoptosis of Infected Macrophages. Sci Rep. 24 2018;8(1):12802.
150. Gil-Lamaignere C, Simitopoulou M, Roilides E, Maloukou A, Winn RM, Walsh TJ. Interferon-gamma and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor augment the activity of polymorphonuclear leukocytes against medically important zygomycetes. J Infect Dis. 1 avr 2005;191(7):1180-7.
151. Kang SH, Kim HS, Bae MN, Kim J, Yoo JY, Lee KY, et al. Fatal Breakthrough Mucormycosis in an Acute Myelogenous Leukemia Patient while on Posaconazole Prophylaxis. Infect Chemother. 2015;47(1):49-54.
152. Davoudi S, Anderlini P, Fuller GN, Kontoyiannis DP. A long-term survivor of disseminated *Aspergillus* and *Mucorales* infection: an instructive case. Mycopathologia. déc 2014;178(5-6):465-70.
153. Dannaoui E, Lackner M. Special Issue: *Mucorales* and Mucormycosis. Journal of Fungi. mars 2020;6(1):6.
154. Leleu C, Menotti J, Meneceur P, Choukri F, Sulahian A, Garin YJ, et al. Efficacy of liposomal amphotericin B for prophylaxis of acute or reactivation models of invasive pulmonary aspergillosis. Mycoses. 2013;56(3):241-9.
155. Lamarre C, Sokol S, Debeaupuis JP, Henry C, Lacroix C, Glaser P, et al. Transcriptomic analysis of the exit from dormancy of *Aspergillus fumigatus* conidia. BMC Genomics. 2008;9:417.
156. Wong Sak Hoi J, Lamarre C, Beau R, Meneau I, Bepiki A, Barre A, et al. A novel family of dehydrin-like proteins is involved in stress response in the human fungal pathogen *Aspergillus fumigatus*. Mol Biol Cell. 2011;22(11):1896-906.
157. Hagiwara D, Takahashi H, Kusuya Y, Kawamoto S, Kamei K, Gono T. Comparative transcriptome analysis revealing dormant conidia and germination associated genes in *Aspergillus* species: an essential role for AtfA in conidial dormancy. BMC Genomics. 2016;17(1):358.
158. Vellanki S, Billmyre RB, Lorenzen A, Campbell M, Turner B, Huh EY, et al. A Novel Resistance Pathway for Calcineurin Inhibitors in the Human-Pathogenic *Mucorales* *Mucor circinelloides*. mBio. 28 2020;11(1).
159. Nicolás FE, Murcia L, Navarro E, Navarro-Mendoza MI, Pérez-Arques C, Garre V. *Mucorales* Species and Macrophages. J Fungi (Basel). 26 juin 2020;6(2).
160. Chamilos G, Lewis RE, Hu J, Xiao L, Zal T, Gilliet M, et al. *Drosophila melanogaster* as a model host to dissect the immunopathogenesis of zygomycosis. Proc Natl Acad Sci U S A. 2008;105(27):9367-72.
161. Lax C, Pérez-Arques C, Navarro-Mendoza MI, Cánovas-Márquez JT, Tahiri G, Pérez-Ruiz JA, et al. Genes, Pathways, and Mechanisms Involved in the Virulence of *Mucorales*. Genes (Basel). 16 2020;11(3).

162. Ibragimova S, Szebenyi C, Sinka R, Alzyoud EI, Homa M, Vágvölgyi C, et al. CRISPR-Cas9-Based Mutagenesis of the Mucormycosis-Causing Fungus *Lichtheimia corymbifera*. *Int J Mol Sci*. 25 mai 2020;21(10).
163. Morio F, Lombardi L, Butler G. The CRISPR toolbox in medical mycology: State of the art and perspectives. *PLoS Pathog*. 2020;16(1):e1008201.
164. Soare AY, Watkins TN, Bruno VM. Understanding Mucormycoses in the Age of « omics ». *Front Genet*. 2020;11:699.
165. Voak AA, Standing JF, Sepúlveda N, Harris A, Croft SL, Seifert K. Pharmacodynamics and cellular accumulation of amphotericin B and miltefosine in *Leishmania donovani*-infected primary macrophages. *J Antimicrob Chemother*. 01 2018;73(5):1314-23.
166. Podinovskaia M, Descoteaux A. Leishmania and the macrophage: a multifaceted interaction. *Future Microbiol*. 2015;10(1):111-29.
167. US Food And Drug Administration. Inactive Ingredient Search for Approved Drug Products [Internet]. [cité 21 août 2020]. Disponible sur: <https://www.accessdata.fda.gov/scripts/cder/iig/index.cfm>
168. Yan H, Zhang Z, Jia X, Song J. d- α -Tocopheryl polyethylene glycol succinate/Solutol HS 15 mixed micelles for the delivery of baohuoside I against non-small-cell lung cancer: optimization and in vitro, in vivo evaluation. *Int J Nanomedicine*. 2016;11:4563-71.
169. Yang Y, Ding Y, Fan B, Wang Y, Mao Z, Wang W, et al. Inflammation-targeting polymeric nanoparticles deliver sparfloxacin and tacrolimus for combating acute lung sepsis. *J Control Release*. 19 févr 2020;321:463-74.
170. TEWES F, VALCOURT C, COUET W. Use of acyclic terpene alcohols for enhancing the antimicrobial activity of colistin [Internet]. WO2020021052A3, 2020 [cité 13 août 2020]. Disponible sur: <https://patents.google.com/patent/WO2020021052A3/en?q=wo2020021052>
171. Chauzy A, Buyck J, de Jonge BLM, Marchand S, Grégoire N, Couet W. Pharmacodynamic modelling of β -lactam/ β -lactamase inhibitor checkerboard data: illustration with aztreonam-avibactam. *Clin Microbiol Infect*. avr 2019;25(4):515.e1-515.e4.
172. White RL, Burgess DS, Manduru M, Bosso JA. Comparison of three different in vitro methods of detecting synergy: time-kill, checkerboard, and E test. *Antimicrob Agents Chemother*. août 1996;40(8):1914-8.
173. Lepak AJ, Andes DR. Antifungal pharmacokinetics and pharmacodynamics. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 10 nov 2014;5(5):a019653.
174. Chauzy A. Evaluation pharmacocinétique/pharmacodynamique in vitro et in vivo de l'association aztréonam-avibactam [Internet] [These de doctorat]. Poitiers; 2018 [cité 2 sept 2020]. Disponible sur: <http://www.theses.fr/2018POIT1802>
175. Martin E, Stüben A, Görz A, Weller U, Bhakdi S. Novel aspect of amphotericin B action: accumulation in human monocytes potentiates killing of phagocytosed *Candida albicans*. *Antimicrob Agents Chemother*. janv 1994;38(1):13-22.

176. Takazono T, Izumikawa K, Mihara T, Kosai K, Saijo T, Imamura Y, et al. Efficacy of combination antifungal therapy with intraperitoneally administered micafungin and aerosolized liposomal amphotericin B against murine invasive pulmonary aspergillosis. *Antimicrob Agents Chemother.* août 2009;53(8):3508-10.
177. Cleary JD, Chapman SW, Nolan RL. Pharmacologic modulation of interleukin-1 expression by amphotericin B-stimulated human mononuclear cells. *Antimicrob Agents Chemother.* mai 1992;36(5):977-81.
178. Schmitt HJ, Bernard EM, Häuser M, Armstrong D. Aerosol amphotericin B is effective for prophylaxis and therapy in a rat model of pulmonary aspergillosis. *Antimicrob Agents Chemother.* nov 1988;32(11):1676-9.
179. Gavalda J, Martín M-T, López P, Gomis X, Ramírez J-L, Rodríguez D, et al. Efficacy of nebulized liposomal amphotericin B in treatment of experimental pulmonary aspergillosis. *Antimicrob Agents Chemother.* juill 2005;49(7):3028-30.
180. Ruijgrok EJ, Fens MHA, Bakker-Woudenberg IAJM, van Etten EWM, Vulto AG. Nebulization of four commercially available amphotericin B formulations in persistently granulocytopenic rats with invasive pulmonary aspergillosis: evidence for long-term biological activity. *J Pharm Pharmacol.* oct 2005;57(10):1289-95.
181. Ruijgrok EJ, Vulto AG, Van Etten EW. Efficacy of aerosolized amphotericin B desoxycholate and liposomal amphotericin B in the treatment of invasive pulmonary aspergillosis in severely immunocompromised rats. *J Antimicrob Chemother.* juill 2001;48(1):89-95.
182. Godet C, Cateau E, Rammaert B, Grosset M, Le Moal G, Béraud G, et al. Nebulized Liposomal Amphotericin B for Treatment of Pulmonary Infection Caused by *Hormoglyphiella aspergillata*: Case Report and Literature Review. *Mycopathologia.* août 2017;182(7-8):709-13.
183. Birsan T, Taghavi S, Klepetko W. Treatment of aspergillus-related ulcerative tracheobronchitis in lung transplant recipients. *J Heart Lung Transplant.* avr 1998;17(4):437-8.
184. Zhou Q-Y, Yang W-J, Zhao X-Q. Pulmonary aspergillosis treated with inhaled amphotericin B. *Int J Infect Dis.* janv 2017;54:92-4.
185. Huang H, Li Q, Huang Y, Bai C, Wu N, Wang Q, et al. Pseudomembranous necrotizing tracheobronchial aspergillosis: an analysis of 16 cases. *Chin Med J.* avr 2012;125(7):1236-41.
186. Wu N, Huang Y, Li Q, Bai C, Huang H-D, Yao X-P. Isolated invasive *Aspergillus* tracheobronchitis: a clinical study of 19 cases. *Clin Microbiol Infect.* juin 2010;16(6):689-95.
187. Dal Conte I, Riva G, Obert R, Lucchini A, Bechis G, De Rosa G, et al. Tracheobronchial aspergillosis in a patient with AIDS treated with aerosolized amphotericin B combined with itraconazole. *Mycoses.* oct 1996;39(9-10):371-4.
188. Boots RJ, Paterson DL, Allworth AM, Faoagali JL. Successful treatment of post-influenza pseudomembranous necrotising bronchial aspergillosis with liposomal amphotericin, inhaled amphotericin B, gamma interferon and GM-CSF. *Thorax.* nov 1999;54(11):1047-9.
189. Rodenhuis S, Beaumont F, Kauffman HF, Sluiter HJ. Invasive pulmonary aspergillosis in a non-immunosuppressed patient: successful management with systemic amphotericin and flucytosine and inhaled amphotericin. *Thorax.* janv 1984;39(1):78-9.

190. Boettcher H, Bewig B, Hirt SW, Möller F, Cremer J. Topical amphotericin B application in severe bronchial aspergillosis after lung transplantation: report of experiences in 3 cases. *J Heart Lung Transplant.* déc 2000;19(12):1224-7.
191. Furco A, Mouchet B, Carbonnelle M, Vallerand H. [Pulmonary mucormycosis: benefit of aerosol amphotericin B?]. *Rev Mal Respir.* juin 2001;18(3):309-13.
192. Alfageme I, Reina A, Gallego J, Reyes N, Torres A. Endobronchial instillations of amphotericin B: complementary treatment for pulmonary mucormycosis. *J Bronchology Interv Pulmonol.* juill 2009;16(3):214-5.
193. McGuire FR, Grinnan DC, Robbins M. Mucormycosis of the bronchial anastomosis: a case of successful medical treatment and historic review. *J Heart Lung Transplant.* août 2007;26(8):857-61.
194. Safdar A, O'Brien S, Kouri IF. Efficacy and feasibility of aerosolized amphotericin B lipid complex therapy in caspofungin breakthrough pulmonary zygomycosis. *Bone Marrow Transplantation.* sept 2004;34(5):467-8.
195. Castagnola E, Moresco L, Cappelli B, Cuzzubbo D, Moroni C, Lanino E, et al. Nebulized liposomal amphotericin B and combined systemic antifungal therapy for the treatment of severe pulmonary aspergillosis after allogeneic hematopoietic stem cell transplant for a fatal mitochondrial disorder. *J Chemother.* juin 2007;19(3):339-42.
196. Canetti D, Cazzadori A, Adami I, Lifrieri F, Cristino S, Concia E. Aerosolized amphotericin B lipid complex and invasive pulmonary aspergillosis: a case report. *Infez Med.* mars 2015;23(1):44-7.
197. Venanzi E, Martín-Dávila P, López J, Maiz L, de la Pedrosa EG-G, Gioia F, et al. Aerosolized Lipid Amphotericin B for Complementary Therapy and/or Secondary Prophylaxis in Patients with Invasive Pulmonary Aspergillosis: A Single-Center Experience. *Mycopathologia.* avr 2019;184(2):239-50.
198. Safdar A, Rodriguez GH. Aerosolized amphotericin B lipid complex as adjunctive treatment for fungal lung infection in patients with cancer-related immunosuppression and recipients of hematopoietic stem cell transplantation. *Pharmacotherapy.* oct 2013;33(10):1035-43.
199. Morales P, Galán G, Sanmartín E, Monte E, Tarrazona V, Santos M. Intrabronchial instillation of amphotericin B lipid complex: a case report. *Transplant Proc.* août 2009;41(6):2223-4.
200. Al Yazidi LS, Huynh J, Britton PN, Morrissey CO, Lai T, Westall GP, et al. Endobronchial fusariosis in a child following bilateral lung transplant. *Med Mycol Case Rep.* 14 janv 2019;23:77-80.
201. Peghin M, Monforte V, Martin-Gomez M-T, Ruiz-Camps I, Berastegui C, Saez B, et al. 10 years of prophylaxis with nebulized liposomal amphotericin B and the changing epidemiology of *Aspergillus* spp. infection in lung transplantation. *Transpl Int.* janv 2016;29(1):51-62.
202. Taton O, Bernier B, Etienne I, Bondue B, Lecomte S, Knoop C, et al. Necrotizing *Microascus* tracheobronchitis in a bilateral lung transplant recipient. *Transpl Infect Dis.* févr 2018;20(1).
203. Mihara T, Kakeya H, Izumikawa K, Obata Y, Nishino T, Takazono T, et al. Efficacy of aerosolized liposomal amphotericin B against murine invasive pulmonary mucormycosis. *J Infect Chemother.* févr 2014;20(2):104-8.

204. Carrez R, Brillault J, Grégoire N, Lamarche I, Laroche J, Couet W, et al. Pulmonary Pharmacokinetics of Oseltamivir Carboxylate in Rats after Nebulization or Intravenous Administration of Its Prodrug, Oseltamivir Phosphate. *Antimicrob Agents Chemother.* 2019;63(6).
205. Mehta S, Aranzana-Climent V, Rammaert B, Grégoire N, Marchand S, Couet W, et al. Preclinical Pharmacokinetic and Pharmacodynamic Data To Support Cefoxitin Nebulization for the Treatment of *Mycobacterium abscessus*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2019;63(7).
206. Marchand S, Boisson M, Mehta S, Adier C, Mimoz O, Grégoire N, et al. Biopharmaceutical Characterization of Nebulized Antimicrobial Agents in Rats: 6. Aminoglycosides. *Antimicrob Agents Chemother.* 2018;62(10).
207. Ibrahim AS, Kontoyiannis DP. Update on mucormycosis pathogenesis. *Curr Opin Infect Dis.* 2013;26(6):508-15.

Abstract

Pulmonary mucormycosis are life-threatening invasive fungal infections affecting immunocompromised patients. First-line treatment is based on liposomal amphotericin B (AmB). Despite treatment, mortality remains high. The aim of this thesis was to optimize preventive and curative treatments of pulmonary mucormycosis.

In the first part of this thesis, an acute pulmonary mucormycosis model was developed. This model will be used to explore fungal-host-antifungal relationship. The aim of the second part was to study the role of corticosteroids in infection pathophysiology. An *ex vivo* model was consequently developed. In this model, corticosteroids decreased alveolar macrophage capacity to control fungal growth through phagocytosis and oxidative burst alterations. Reactivation of mucormycosis was then studied. Fungi can remain latent after an asymptomatic primary infection. After a latency period, they may be reactivated in the event of major immune deficiency leading to symptomatic infection. A mouse model was developed to reproduce this concept and assess AmB as decolonizing treatment. Decolonization using AmB was effective to prevent the disease. Finally, *in vitro* combination between AmB and PEG15HS was evaluated. This combination was tested by checkerboard assay on several strains of *Mucorales*. PEG15HS decreased AmB minimum inhibitory concentrations.

Keywords: invasive fungal disease, mucormycosis, *Lichtheimia corymbifera*, reactivation, corticosteroids, immunomodulation, antifungal combinations, pharmacodynamics

Résumé

La mucormycose pulmonaire est une infection fongique invasive grave affectant les patients immunodéprimés. Le traitement de référence fait appel à l'amphotéricine B (AmB) liposomale mais reste peu efficace avec environ 50% de mortalité. Le but de cette thèse était d'optimiser le traitement préventif et curatif de la mucormycose pulmonaire à *Lichtheimia corymbifera*.

La première partie de cette thèse a consisté à développer un modèle murin de mucormycose pulmonaire aiguë. Bien que ce modèle présente encore quelques limites pour étudier l'effet de molécules antifongiques, il permettra d'explorer la relation champignon-hôte-antifongique. La deuxième partie avait pour but d'étudier le rôle des corticoïdes dans la physiopathologie de l'infection. Pour ce faire, un modèle murin *ex vivo* a été mis au point. Les corticoïdes ont diminué la capacité globale des macrophages alvéolaires à inhiber la filamentation du champignon par diminution de leur capacité de phagocytose et par diminution de la production de dérivés réactifs de l'oxygène. Cette thèse s'est ensuite intéressée au phénomène de réactivation des infections fongiques invasives. Son postulat est le suivant : suite à une primo-infection asymptomatique et après une période de latence, une réactivation peut avoir lieu à distance en cas d'immunodépression. Un modèle murin a été développé pour reproduire ce concept et évaluer l'intérêt de l'AmB en traitement décolonisant pour prévenir ce phénomène de réactivation. L'AmB s'est révélée efficace pour prévenir la survenue de la maladie. Enfin, ce travail a permis d'évaluer *in vitro* l'association entre l'AmB et un tensioactif, le PEG15HS. Cette association a été testée par checkerboard sur différentes souches de *Mucorales*. Le PEG15HS a permis de diminuer les concentrations minimales inhibitrices d'AmB.

Mots-clés : infection fongique invasive, mucormycose pulmonaire, *Lichtheimia corymbifera*, réactivation, corticoïdes, immunomodulation, associations antifongiques, pharmacodynamique