

Évaluation et prise en charge du risque fongique chez le patient atteint de mucoviscidose : résultats de la phase d'inclusion de l'étude Mucofong au CHU de Grenoble

Yolande Lemeille

▶ **To cite this version:**

Yolande Lemeille. Évaluation et prise en charge du risque fongique chez le patient atteint de mucoviscidose : résultats de la phase d'inclusion de l'étude Mucofong au CHU de Grenoble. Sciences pharmaceutiques. 2009. ⟨dumas-00592323⟩

HAL Id: dumas-00592323

https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-00592323v1

Submitted on 12 May 2011

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.



HAL Authorization

UNIVERSITE JOSEPH FOURIER
FACULTE DE PHARMACIE DE GRENOBLE

Année : 2009 N°

Evaluation et prise en charge du risque fongique chez le patient atteint de mucoviscidose: résultats de la phase d'inclusion de l'étude Mucofong au CHU de Grenoble

MEMOIRE DU DIPLOME D'ETUDES SPECIALISEES
DE BIOLOGIE MEDICALE

Conformément aux dispositions du décret n°90-810 du 10 septembre 1990 tient lieu de

THESE
PRESENTEE POUR L'OBTENTION DU TITRE DE DOCTEUR EN PHARMACIE

DIPLÔME D'ETAT

Yolande LEMEILLE
Née le 17 Octobre 1979 à Thonon-les-Bains

Thèse soutenue publiquement à la Faculté de Pharmacie de Grenoble
Le : 15 Juin 2009

DEVANT LE JURY COMPOSE DE
Présidente du jury : Madame le Professeur R. GRILLOT
Membres
Monsieur le Professeur H. PELLOUX
Madame le Docteur C. PINEL
Madame le Docteur I. PIN
Madame le Docteur B. COLTEY

La Faculté de Pharmacie de Grenoble n'entend donner aucune approbation ni improbation aux opinions émises dans les thèses ; ces opinions sont considérées comme propres à leurs auteurs.

UFR
DE PHARMACIE
DE GRENOBLE

UNIVERSITE
JOSEPH FOURIER
SCIENCES.TECHNOLOGIE.SANTÉ

UNIVERSITE JOSEPH FOURIER
FACULTE DE PHARMACIE DE GRENOBLE
Domaine de la Merci 38700 LA TRONCHE

Doyen de la Faculté : Mme le Professeur **Renée GRILLOT**
Vice -Doyen : Mme **Edwige NICOLLE**

Année 2008-2009
Mise à jour : le 6 octobre 2008

PROFESSEURS A L'UFR DE PHARMACIE

BAKRI	Aziz	Pharmacie Galénique et Industrielle, Formulation et Procédés Pharmaceutiques (LR)
BOUMENDJEL	Ahcène	Chimie Organique (D.P.M.)
BURMEISTER	Wilhelm	Physique (U.V.H.C.I)
CALOP	Jean	Pharmacie Clinique (CHU)
DANEL	Vincent	Toxicologie (CHU SAMU-SMUR)
DECOUT	Jean-Luc	Chimie Inorganique (D.P.M.)
DROUET	Emmanuel	Immunologie / Microbiologie (U.V.H.C.I)
FAURE	Patrice	Biochimie (DBI / CHU)
FAVIER	Alain	Professeur Emérite
GODIN-RIBUOT	Diane	Physiologie – Pharmacologie (HP2)
GRILLOT	Renée	Parasitologie - Mycologie Médicale (Directeur UFR et CHU)
MARIOTTE	Anne-Marie	Pharmacognosie (D.P.M.)
PEYRIN	Eric	Chimie Analytique (D.P.M.)
SEVE	Michel	Biotechnologie (CHU / CRI IAB)
RIBUOT	Christophe	Physiologie - Pharmacologie (HP2)
ROUSSEL	Anne-Marie	Biochimie Nutrition (L.B.F.A)
WOUESSIDJEWE	Denis	Pharmacotechnie (D.P.M.)

UFR
DE PHARMACIE
DE GRENOBLE

UNIVERSITE
JOSEPH FOURIER
SCIENCES.TECHNOLOGIE.SANTÉ.
GRENOBLE 1

PROFESSEURS ASSOCIES (PAST)

CHAMPON	Bernard	Pharmacie officine
RIEU	Isabelle	Qualitologie (CHU)
TROUILLER	Patrice	Santé Publique (CHU)

PROFESSEUR AGREGE (PRAG)

GAUCHARD	Pierre Alexis	Chimie Inorganique (D.P.M.)

CHU : Centre Hospitalier Universitaire
DPM : Département de Pharmacochimie Moléculaire
HP2 : Hypoxie Physiopathologie Respiratoire et Cardiovasculaire
LBFA : Laboratoire de Bioénergétique Fondamentale et Appliquée
LCIB : Laboratoire de Chimie Inorganique et Biologie
LR : Laboratoire des Radio pharmaceutiques
PAST : Professeur Associé à Temps Partiel
PRAG : Professeur Agrégé
UVHCI: Unit of Virus Host Cell Interactions

DOMAINE DE LA MERCI - 38706 LA TRONCHE CEDEX - FRANCE - TELEPHONE +33 (0)4 76 63 71 00 - FAX +33 (0)4 76 63 71 70

UFR
DE PHARMACIE
DE GRENOBLE

UNIVERSITE
JOSEPH FOURIER
SCIENCES.TECHNOLOGIE.SANTÉ.
GRENOBLE 1

UNIVERSITE JOSEPH FOURIER
FACULTE DE PHARMACIE DE GRENOBLE
Domaine de la Merci 38700 LA TRONCHE

Doyen de la Faculté : Mme le Professeur **Renée GRILLOT**
Vice -Doyen : Mme **Edwige NICOLLE**

Année 2008-2009

MAITRES DE CONFERENCES DE PHARMACIE

ALDEBERT	Delphine	Parasitologie - Mycologie (L.A.P.M)
ALLENET	Benoît	Pharmacie Clinique (ThEMAS TIMC-IMAG / CHU)
BATANDIER	Cécile	Nutrition et Physiologie (L.B.F.A / CHU)
BRETON	Jean	Biologie Moléculaire / Biochimie (L.C.I.B)
BRIANCON-MARJOLLET	Anne	Physiologie Pharmacologie (HP2)
BUDAYOVA SPANO	Monika	Biophysique (U.V.H.C.I)
CAVAILLES	Pierre	Biologie Cellulaire et génétique (L.A.P.M)
CHOISNARD	Luc	Pharmacotechnie (D.P.M)
DELETRAZ-DELPORTE	Martine	Droit Pharmaceutique Economie Santé
DEMEILLIERS	Christine	Biochimie (N.V.M.C)
DURMORT-MEUNIER	Claire	Biotechnologies (I.B.S.)
ESNAULT	Danielle	Chimie Analytique (D.P.M.)
GEZE	Annabelle	Pharmacotechnie (D.P.M.)
GERMI	Raphaële	Microbiologie (I.V.H.C.I. / CHU)
GILLY	Catherine	Chimie Thérapeutique (D.P.M.)
GROSSET	Catherine	Chimie Analytique (D.P.M.)
HININGER-FAVIER	Isabelle	Biochimie (L.B.F.A)
JOYEUX-FAURE	Marie	Physiologie –Pharmacologie (HP2)
KRIVOBOK	Serge	Biologie Végétale et Botanique (L.C.B.M)
MOUHAMADOU	Bello	Cryptogamie, Mycologie Générale (L.E.C.A)
MORAND	Jean-Marc	Chimie Thérapeutique (D.P.M.)
MELO DE LIMA	Christelle	Probabilités Biostatistiques (LE.C.A)
NICOLLE	Edwige	Chimie Organique (D.P.M.)
PINEL	Claudine	Parasitologie - Mycologie Médicale (CIB / CHU)
RACHIDI	Walid	Biochimie (L.C.I.B)
RAVEL	Anne	Chimie Analytique (D.P.M.)
RAVELET	Corinne	Chimie Analytique (D.P.M.)
RICHARD	Jean Michel	Service Accueil Handicap (Direction)
SOUARD	Florence	Pharmacognosie (D.P.M)
TARBOURIECH	Nicolas	Biophysique (U.V.H.C.I.)
VANHAVERBEKE	Cécile	Chimie organique (D.P.M.)
VILLET	Annick	Chimie Analytique (D.P.M.)

DOMAINE DE LA MERCI - 38706 LA TRONCHE CEDEX - FRANCE - TELEPHONE +33 (0)4 76 63 71 00 - FAX +33 (0)4 76 63 71 70

UFR
DE PHARMACIE
DE GRENOBLE

UNIVERSITE
JOSEPH FOURIER
SCIENCES.TECHNOLOGIE.SANTÉ.
GRENOBLE 1

ENSEIGNANTS ANGLAIS

COLLE Pierre Emmanuel	Maître de Conférence
FITE Andrée	Professeur Certifié
GOUBIER Laurence	Professeur Certifié

ATER

1 ATER	**RECHOUM** Yassine	Immunologie / DMBMT
1 ATER	**GLADE** Nicolas	Biophysique
½ ATER	**RUTA** Joséphine	Chimie Analytique
1 ATER	**NZENGUE** Yves	Biologie cellulaire / DMBMT
1 ATER	**ELAZZOUZI** Samira	Pharmacie Galénique
1 ATER	**VERON** Jean Baptiste	Chimie Organique
1 ATER	**HADJ SALEM** Jamila	Pharmacognosie
½ ATER	**REINICKE** Anne Teresa	Pharmacologie
1 ATER	**CHENAU** Jérôme	DMBMT
1 ATER	**NASER EDDINE** Abeer	Anglais

ATER : Attachés Temporaires d'Enseignement et de Recherches
CHU : Centre Hospitalier Universitaire
CIB : Centre d'Innovation en Biologie
DPM : Département de Pharmacochimie Moléculaire
DMBMT : Département Mécanismes Biologiques des Maladies et des Traitements
HP2 : Hypoxie Physiopathologie Respiratoire et Cardiovasculaire
IAB : Institut Albert Bonniot, Centre de Recherche « Oncogenèse et Ontogenèse »
IBS : Institut de Biologie Structurale
LAPM : Laboratoire Adaptation et Pathogenèse des Microorganismes
LBFA : Laboratoire de Bioénergétique Fondamentale et Appliquée
LCBM : Laboratoire Chimie et Biologie des Métaux
LCIB : Laboratoire de Chimie Inorganique et Biologie
LECA : Laboratoire d'Ecologie Alpine
TIMC-IMAG : Laboratoire Technique de l'Imagerie, de la Modélisation et de Cognition
UVHCI: Unit of Virus Host Cell Interactions

DOMAINE DE LA MERCI - 38706 LA TRONCHE CEDEX - FRANCE - TELEPHONE +33 (0)4 76 63 71 00 - FAX +33 (0)4 76 63 71 70

Remerciements

A la présidente du jury, Madame le Professeur Renée Grillot,

Vous me faites l'honneur de juger ce travail, soyez assurée de ma gratitude.

A Monsieur le Professeur Hervé Pelloux,

Je vous remercie de m'avoir accueillie au sein du Laboratoire de Parasitologie-Mycologie et de m'avoir permis de travailler dans les meilleures conditions.

Au directeur de thèse, Madame le Docteur Claudine Pinel,

Je vous remercie de m'avoir accordé votre confiance pour effectuer cette étude. Merci pour vos conseils dans l'élaboration et la rédaction de ce travail ainsi que pour votre gentillesse et votre bonne humeur.

A Madame le Docteur Isabelle Pin,

Je vous remercie de faire partie de mon jury et de juger mon travail à travers votre regard de clinicien. Merci de m'avoir introduite auprès des patients du CRCM pédiatrique de Grenoble et pour votre participation dans la collecte des données cliniques.

A Madame le Docteur Bérangère Coltey,

Je vous remercie de m'avoir acceptée à la consultation du CRCM adulte de Grenoble où j'ai ainsi pu rencontrer de nombreux patients. Merci pour votre aide et votre disponibilité dont j'ai pu bénéficier afin d'obtenir au mieux les données cliniques.

Je tiens également à remercier le Docteur **Claire Cracowski** ainsi que le Docteur **Cathy LLerena** pour le temps et l'attention qu'elles ont pu m'accorder.

Merci à toute l'équipe des CRCM adulte et pédiatrique de Grenoble, en particulier Catherine Segond pour sa disponibilité et pour avoir guider mes premiers pas à la consultation.

Merci à tout le personnel du Laboratoire de Parasitologie-Mycologie pour son accueil chaleureux. Merci à Catherine Zitouni pour son aide précieuse.

Merci à Paul pour ses conseils.

A mes co-internes : Marion, Marie, Charles, Raphaël, Géraldine, Stéphanie, Leïla, Ariane, Clémence, Lydvine, Perrine, Hélène …

A Mag, Flo, Bibi, Marion, David, Henri, Oliv, Kara et Laure…

A Sylvain, à Maman, et au Cavalier noir !

Sommaire

LISTE DES ABREVIATIONS 10

LISTE DES FIGURES 11

LISTE DES TABLEAUX 12

INTRODUCTION 13

RAPPELS SUR LA MUCOVISCIDOSE 14

1. Physiopathologie 14
2. Diagnostic 15
3. Traitement et suivi 16

MICRO-ORGANISMES IMPLIQUES DANS LES PATHOLOGIES RESPIRATOIRES DE LA MUCOVISCIDOSE 17

1. Mycètes 17
   1.1 Aspergillus fumigatus et autres espèces aspergillaires 18
   1.2 Scedosporium apiospermum 20
   1.3 Autres champignons filamenteux 21
   1.4 Levures 22
2. Bactéries 22
3. Evolution au sein de l'arbre respiratoire 25
4. Les exacerbations cliniques respiratoires 26

ASPERGILLOSE BRONCHO-PULMONAIRE ALLERGIQUE OU ABPA 27

1. Physiopathologie de l'ABPA 27
   1.1 Inhalation des spores d'Aspergillus fumigatus 27
   1.2 Réponse de l'organisme 28
   1.3 Rôle des interleukines 29
   1.4 Modulation de la réponse immunitaire selon les antigènes 30
   1.5 Facteurs de risque de l'ABPA 31
2. Diagnostic de l'ABPA 33
   2.1 Difficultés du diagnostic dans la mucoviscidose 34
   2.2 Place de l'imagerie médicale pour le diagnostic de l'ABPA dans la mucoviscidose 35
   2.3 Consensus diagnostique de l'ABPA 36
   2.4 Classification des stades d'ABPA 36
   2.5 Perspectives actuelles et futures dans le diagnostic de l'ABPA 38
3. Traitements de l'ABPA 41
   3.1 Corticothérapie systémique 42
   3.2 Les antifongiques 43
   3.3 Recommandations pour le traitement de l'ABPA 44
   3.4 Alternatives thérapeutiques 46

ETUDE MUCOFONG : MATERIELS ET METHODES 48

1. Les examens effectués au Laboratoire de Parasitologie-Mycologie 50
   1.1 Examen mycologique des expectorations 50
   1.2 Sérologie fongique 58
2. Dosage des Immunoglobulines E sériques spécifiques et totales 60
   2.1 Dosage des IgE sériques totales par immunoprécipitation sur immunonéphélomètre BN II Dade Behring 60
   2.2 Dosage des Immunoglobulines E spécifiques anti-Aspergillus fumigatus par immunoanalyse sur appareillage Unicap PhaDia 61
3. Dosage des polynucléaires éosinophiles 62
4. Examen cytobactériologique des expectorations 62
5. Données cliniques obtenues à la consultation 62
   5.1 Score de Shwachman et Kulczycki 62
   5.2 Fonction respiratoire 63

RESULTATS **64**

1. Inclusions à Grenoble 64
2. Epidémiologie fongique : résultat des cultures mycologiques 65
3. Comparaison des milieux de culture utilisés pour isoler les champignons filamenteux 68
4. Comparaison du milieu et de la méthodologie appliquée en routine par rapport aux résultats de l'étude Mucofong 69
5. Sensibilité *in vitro* aux antifongiques 69
6. Comparaison des cultures mycologiques et des cultures bactériologiques 71
7. Patients de l'étude susceptibles d'avoir une ABPA 72
8. Caractéristiques des patients de l'étude Mucofong selon le taux d'IgE totales 76
9. Caractéristiques des patients de l'étude Mucofong avec ou sans sensibilisation à *Aspergillus fumigatus* (IgE spécifiques) 77
10. Caractéristiques des patients de l'étude Mucofong selon l'intensité de la réponse sérologique en IgG 78
11. Comparaison des données sérologiques et mycologiques 79
12. Mutations génétiques du CFTR 80
13. Comparaison des patients selon les traitements antibiotiques 81
14. Traitements anti-fongiques et implications dans la colonisation fongique ? 82
15. Caractéristiques des patients avec ou sans corticothérapie en cours à l'inclusion 82

DISCUSSION **84**

1. Statistiques 84
2. Epidémiologie fongique de cette population 84
3. Sensibilité aux antifongiques 87
4. Comparaison des cultures mycologiques et des cultures bactériologiques 88
5. Sensibilisation à *A.fumigatus* 90
6. Cultures mycologiques et association avec ABPA ou d'autres critères 92
7. Prévalences de l'ABPA 93
8. Association de l'ABPA à divers paramètres cliniques ou biologiques 94
9. Patients de l'étude susceptibles d'avoir une ABPA 95
10. Comparaison des patients selon les traitements antibiotiques 96
11. Caractéristiques des patients avec ou sans corticothérapie en cours à l'inclusion 97
12. Risque fongique et mutation du gène CFTR 97
13. Recherche de sources de contamination 98

CONCLUSION **100**

ANNEXES **102**

1. Consentement 102
2. Liste des milieux de cultures : 105
   2.1 Milieu Sabouraud + chloramphénicol des laboratoires AES® *105*
   2.2 Milieu chromogène CAN2 de BioMérieux®, Réf 43631/43639 ..... *105*
   2.3 Milieu Sabouraud + chloramphénicol + cycloheximide *106*
   2.4 Milieu au dichloran-rose bengal additionée de Bénomyl *106*
   2.5 Milieu à l'Erythritol *107*
3. Score de Shwachman et Kulczycki : 108

BIBLIOGRAPHIE **109**

LISTE DES ABREVIATIONS

ABPA Aspergillose Broncho Pulmonaire Allergique
CFTR Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator
CHU Centre Hospitalo-Universitaire
CRCM Centre de Ressources et de Compétence pour la Mucoviscidose
CVF Capacité Ventilatoire Forcée
EFR Epreuve Fonctionnelle Respiratoire
ELISA Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay
IEP Immuno Electrophorèse
IgE Immunoglobuline de classe E
IgG Immunoglobuline de classe G
IL Interleukines
PHRC Programme Hospitalier de Recherche Clinique
PNN Polynucléaire neutrophile
PNE Polynucléaire éosinophile
VEMS Volume Expiré Maximum en une Seconde

LISTE DES FIGURES

Figure 1. Schéma d'une tête aspergillaire et formation des spores 19
Figure 2. Diagramme représentant les multiples agents pathogènes respiratoires dans la.....24
mucoviscidose et les co-infections possibles 24
Figure 3. Evolution des colonisations respiratoires bactériennes dans la mucoviscidose 24
Figure 4. Physiopathologie de l'ABPA.....29
Figure 5. Relations entre les différents stades d'ABPA.....37
Figure 6. Cahier rouge de suivi pour l 'étude Mucofong 49
Figure 7. Préparation du milieu Bénomyl 51
Figure 8. Aspect macroscopique d'*A. fumigatus* 53
Figure 9. Aspect macroscopique d'*A. fumigatus* 54
Figure 10. Aspect macroscopique de *Scedosporium apiospermum* 54
Figure 11. Aspect macroscopique de *Candida albicans* 55
Figure 12. Têtes aspergillaires sur milieu Erythritol à la loupe binoculaire.....55
Figure 13. *Aspergillus fumigatus* coloré au bleu de lactophénol 56
Figure 14. *Aspergillus terreus* coloré au bleu de lactophénol 56
Figure 15. *Scedosporium apiospermum* coloré au bleu de lactophénol 56
Figure 16. *Geotrichum sp* coloré au bleu de lactophénol.....56
Figure 17. *Penicillium sp* coloré au bleu de lactophénol 56
Figure 18. Antifongigramme d'*Aspergillus fumigatus* sur milieu RPMI 58
Figure 19. Antifongigramme de *Fusarium sp* sur milieu RPMI 58
Figure 20. Précipitines aspergillaires observées en immuno-électrphorèse 59
Figure 21. Répartition des patients inclus au CHU de Grenoble en fonction de l'âge au moment de l'inclusion.....64
Figures 22 et 23. Répartition des différentes espèces fongiques en fonction de l'âge des patients....67
Figure 24. Résultats des cultures mycologiques pour les 62 patients 67
Figure 25. Répartition des champignons filamenteux présents dans les 35 expectorations.....68
positives 68
Figure 26. Résultats des antifongigrammes des différents isolats d'*Aspergillus fumigatus* 70
Figure 27. Score de Shwachman et Kulczycki selon l'âge des patients inclus dans l'étude.....74
Mucofong.....74
Figures 28 et 29. Capacité respiratoire des patients inclus dans l'étude Mucofong selon l'âge (CVF et VEMS) 75
Figure 30. Répartition des différentes mutations du gène CFTR 80
Figure 31. Les patients atteints de mucoviscidose face au risque fongique 92
Figure 32. Répartition des spores fongiques dans l'environnement selon les saisons 98

LISTE DES TABLEAUX

Tableau I. Différents stades de la colonisation à l'infection respiratoire par *Pseudomonas aeruginosa* 23
Tableau II. Différents stades dans l'évolution de l'ABPA 37
Tableau III. Classification de l'ABPA en 3 groupes selon différents critères cliniques et biologiques 38
Tableau IV. Liste des allergènes recombinants utilisés pour le dosage des IgE spécifiques anti-*A.fumigatus* 40
Tableau V. Recommandations dans le traitement de l'ABPA.....45
Tableau VI. Synthèse des différentes conditions de culture des expectorations 52
Tableau VII. Interprétations des sensibilités aux différents antifongiques testés en fonction des CMI57
Tableau VIII. Différences sérologiques entre l'asthme aspergillaire et l'ABPA 59
Tableau IX. Seuils supérieurs de normalité des IgE totales en fonction de l'âge.....60
Tableau X. Suivi des inclusions dans les sept centres participant au PHRC « Mucofong » 65
Tableau XI. Nombre de cultures positives à *Aspergillus sp*, à *Scedosporium sp* ou à d'autres filamenteux selon les milieux de culture utilisés.....68
Tableau XII. Résultats des antifongigrammes selon les espèces de champignons filamenteux 70
Tableau XIII. Fonction respiratoire et taux d'IgE totales regroupés en fonction de la colonisation bactérienne ou fongique.....71
Tableau XIV. Données biologiques des patients ayant tous les critères d'ABPA 72
Tableau XV. Données cliniques des patients ayant tous les critères d'ABPA.....73
Tableau XVI. Données biologiques et cliniques des patients diagnostiqués avec une ABPA à l'inclusion.....73
Tableau XVII. Place des examens mycologiques dans les cas d'ABPA suspectée ou non lors des exacerbations cliniques.....74
Tableau XVIII. Différences des données biologiques et cliniques selon les deux groupes de patients en fonction du taux d'IgE totales 76
Tableau XIX. Différences des données biologiques et cliniques selon les deux groupes de patients en fonction du taux d'IgE spécifiques anti-*A.fumigatus* 77
Tableau XX. Différences des données biologiques et cliniques selon les deux groupes de patients en fonction de l'intensité de la réponse sérologique en IgG spécifiques.....78
Tableau XXI. Comparaison des données sérologiques (ELISA et IEP) et des cultures mycologiques 79
Tableau XXII. Colonisation par des filamenteux et mutation du gène CFTR 80
Tableau XXIII. Résultats des cultures bactériologiques et mycologiques des expectorations en comparaison avec les différents traitements antibiotiques et antifongiques 81
Tableau XXIV. Traitement ou antécédents de traitement par antifongique et résultats des cultures mycologiques à l'inclusion.....82
Tableau XXV. Différences des données biologiques et cliniques différents groupes de patients en fonction du traitement par corticoïdes ou non 83

INTRODUCTION

L'infection broncho-pulmonaire représente le problème majeur auquel sont confrontés les malades atteints de mucoviscidose (134). Hormis les infections bactériennes d'incidence importante, divers champignons filamenteux peuvent être à l'origine de colonisation voire d'infections respiratoires plus ou moins graves. *Aspergillus fumigatus* est l'espèce la plus fréquemment impliquée et isolée des expectorations, mais d'autres espèces aspergillaires telles que *A. flavus*, *A. terreus* peuvent aussi coloniser le tractus respiratoire. D'autres mycètes sont aussi capables de s'adapter et peuvent être isolés des expectorations ; leur rôle dans la survenue d'infection fongique est cependant moins précisé. Il s'agit le plus souvent de *Scedosporium spp* ou *Exophiala dermatitidis* (101).

L'objectif principal de l'étude Mucofong est de déterminer quelles sont les espèces de champignons filamenteux du genre *Aspergillus* ou d'autres champignons filamenteux présents dans l'appareil respiratoire des patients atteints de mucoviscidose ; responsables soit de colonisation soit d'épisodes infectieux authentiques. Leur rôle pourra être précisé dans la dégradation de la fonction pulmonaire de ces patients au cours du suivi sur une période de trois ans.

Les objectifs secondaires sur le plan mycologique sont de connaître le phénotype des isolats fongiques, notamment la sensibilité aux antifongiques existants ; et de mieux préciser la ou les niches écologiques fongiques, ce qui permettrait des mesures préventives simples conduisant à l'éviction de la source fongique. Les objectifs secondaires sur le plan clinique sont d'évaluer l'état clinique des patients, en particulier leur fonction respiratoire et de rechercher une association entre le risque fongique et la colonisation bactérienne, l'impact des thérapeutiques antibactériennes associées et/ou les mutations du gène CFTR.

La mucoviscidose altérant les fonctions respiratoires assure un micro-milieu propice à l'adhérence et au maintien des spores sur les sécrétions bronchiques puis à leur développement. La responsabilité de ces agents fongiques dans la détérioration des fonctions respiratoires est toujours un sujet de controverses. Aussi, il est important de connaître la physiopathologie de la maladie sous-jacente créant un terrain propice à la colonisation et à l'infection.

RAPPELS SUR LA MUCOVISCIDOSE

La mucoviscidose ou fibrose kystique est une maladie génétique autosomique récessive présente partout dans le monde avec des prévalences différentes selon les régions. En France, elle concerne une naissance sur 4500 ce qui représente 200 enfants malades chaque année et environ 2 millions de personnes sont « porteurs sains » du gène muté (134).

1. Physiopathologie

Cette maladie est due à la mutation du gène CFTR (Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator), découvert en 1989 (134) et présent sur le chromosome 7 en position q31. Ce gène code pour une glycoprotéine transmembranaire qui régule le flux d'ions dont le transport du chlore de part et d'autre de la membrane cellulaire. Il y a plus de 1200 mutations possibles, la délétion F508 est la plus fréquente en France (70% des patients) et entraîne une inactivité fonctionnelle quasi complète de la protéine. Celle-ci, issue des deux allèles mutés est soit absente, soit anormale. Il n'a pas été possible d'établir une corrélation entre le génotype et le phénotype observé ; le tableau clinique de mucoviscidose est pratiquement inféodé à chaque patient.

Les symptômes cliniques sont dus à l'altération des sécrétions et perturbent la fonction de divers organes notamment des poumons. Le mucus synthétisé par les cellules bronchiques est plus épais, plus visqueux et en volume plus faible (hyper absorption du sodium, manque d'absorption du chlore et déshydratation). Il est associé à une altération de la clairance muco-ciliaire et crée un milieu propice à la colonisation et à la multiplication de micro-organismes (49). Les infections poly-microbiennes multiples et l'inflammation persistante conduisent à une dégradation progressive des tissus des poumons avec apparition de bronchectasies, de fibrose, et à une insuffisance respiratoire chronique, cause principale de morbidité et de mortalité (104). Le mucus visqueux englue les spores et les bactéries ; il les protège des attaques des cellules de défense ou des molécules biocides, facilitant de nouvelles infections. La clinique se traduit par une toux, des expectorations épaisses et une dyspnée. Une hémoptysie ou un pneumothorax peuvent survenir.

La mucoviscidose entraîne également d'autres complications selon les organes touchés : troubles digestifs, insuffisance pancréatique exocrine, diabète, troubles nutritionnels par malabsorption, syndrome d'occlusion intestinale distale (SOID), troubles hépatiques, troubles ORL (sinusite chronique, polypose nasale), stérilité chez les hommes… Les symptômes sont variables et peuvent apparaître dès la naissance ou plus tardivement, voire à l'âge adulte. L'évolution de cette maladie se fait de façon progressive mais l'altération irréversible de la fonction respiratoire va conduire au décès du patient. La transplantation pulmonaire reste l'ultime possibilité thérapeutique (134).

2. Diagnostic

Depuis 2002, le dépistage néonatal de la mucoviscidose est obligatoire en France. Il permet un diagnostic précoce assurant une prise en charge thérapeutique rapide. Il consiste à doser la trypsine immuno-réactive (TIR) sur une goutte de sang séchée prélevée à 3 jours de vie. Une concentration élevée de cette enzyme reflète l'atteinte du pancréas mais n'est pas spécifique de la mucoviscidose. Une recherche des principales mutations génétiques (29 mutations) sera effectuée si le test est positif. Si les deux allèles du gène CFTR sont mutés, le diagnostic sera confirmé par un test à la sueur. Si un seul allèle est muté avec un résultat normal du test à la sueur, le nouveau-né sera porteur sain de la mucoviscidose. Ce test consiste à doser la concentration en chlore dans la sueur. Pour cela, la sueur du patient est recueillie après ionisation transcutanée et la concentration en chlore est mesurée. Un taux inférieur à 40 mmol/L est normal et un taux supérieur à 60 mmol/L confirme le diagnostic de mucoviscidose. Un taux intermédiaire fait suspecter une mucoviscidose.

Un diagnostic prénatal peut être proposé aux couples à risque d'avoir un enfant atteint de mucoviscidose. Il se fait soit à 8 semaines d'aménorrhée en recherchant les mutations du gène CFTR sur les villosités choriales, soit par amniocentèse avec un dosage de la phosphatase alcaline (134).

3. Traitement et suivi

Les patients atteints de mucoviscidose sont suivis dans les CRCM : Centre de Ressources et de Compétence pour la Mucoviscidose. L'approche thérapeutique se fait de façon pluridisciplinaire faisant intervenir différents acteurs : médecins, infirmières, kinésithérapeutes, diététiciennes et psychologues.

Les traitements concernent les multiples symptômes. Un des objectifs est de prévenir les infections pulmonaires et d'améliorer la fonction respiratoire des patients. Une kinésithérapie respiratoire quotidienne permet d'éliminer des poumons le mucus en excès. Les médicaments utilisés localement ou par voie générale sont nombreux: broncho-dilatateurs, corticoïdes, mucofluidifiants, antibiotiques, antifongiques, oxygénothérapie… Ils sont pris en continu *per os*, ou par voie intra-veineuse lors d'exacerbation clinique. L'azithromycine (Zithromax®) pris en continu à une dose subnormale chez des patients colonisés ou non par *Pseudomonas aeruginosa* permet de diminuer la fréquence de ces infections. Les macrolides ont un effet immunomodulateur, ils sont actifs sur les ribosomes et inhibent la synthèse des protéines et des toxines, limitant ainsi la virulence des germes. Ils permettent de diminuer le nombre d'exacerbations et la quantité de traitement antibiotique, même avant la colonisation par le bacille pyocyanique (30).

De nouveaux traitements sont encore au stade de recherche et d'expérimentation : vaccin anti-pyocyanique, thérapie génique (introduction d'un gène CFTR non muté dans une cellule du malade par un vecteur adénovirus (91)), thérapie protéique (baisse de la dégradation de la protéine CFTR (Miglustat®)), protéine recombinante du surfactant SP-D (29)…

Ainsi la présence quasi permanente de micro-organismes et leur développement dans le tractus respiratoire sont amplement facilités par les anomalies génétiques. Ces agents infectieux potentiels sont nombreux, mais certains plus adaptables ou opportunistes trouvent une niche écologique particulièrement favorable à leur implantation.

MICRO-ORGANISMES IMPLIQUES DANS LES PATHOLOGIES RESPIRATOIRES DE LA MUCOVISCIDOSE

Dans la mucoviscidose, le mucus présent dans l'arbre respiratoire est plus épais, plus visqueux et donc plus difficilement éliminé. Des spores ou des germes potentiellement pathogènes peuvent se retrouver piégés dans les bronches. La colonisation chronique entraîne des infections respiratoires multiples et une inflammation persistante qui conduira à terme à une insuffisance respiratoire et au décès du patient. Plusieurs agents peuvent être impliqués : bactéries (*Pseudomonas aeruginosa…),* mycètes (*Aspergillus fumigatus*…) ou virus (*VRS, ADV, influenza*…). L'acquisition de ces organismes se fait soit à partir de l'environnement, soit par transmission inter-patients (51). Elle évolue avec l'âge du patient (Figure 3). La plupart des infections pulmonaires sont dues aux bactéries, mais certains champignons filamenteux pouvant coloniser le tractus respiratoire peuvent être responsable d'épisodes infectieux pouvant conduire à une dégradation de l'état clinique. L'étude Mucofong s'intéresse à ces champignons.

1. Mycètes

Les champignons ou mycètes sont des organismes eucaryotes uni-ou pluricellulaires, incluant des espèces macroscopiques (macromycètes) et d'autres microscopiques (micromycètes), d'aspect filamenteux (pluricellulaires) ou levuriformes (unicellulaires). Ils constituent un règne distinct de celui des plantes ou des animaux. Ils sont dépourvus de chlorophylle et donc hétérotrophes au carbone ; la plupart sont saprophytes. Leur reproduction produit un très grand nombre de spores, ce qui leur assure un pouvoir de dissémination et de contamination important.

Ils sont présents partout dans la nature : sol, terre, air, plantes, surfaces…Les niches écologiques sont variées mais à prédominance rurale et chaque champignon a ses préférences (hydrophobie d'*Aspergillus sp* et hydrophilie de *Fusarium sp*). Les habitations mal ventilées et humides sont très propices à la croissance des champignons Plusieurs espèces sont très répandues dans l'environnement et peuvent être retrouvées dans les expectorations des patients atteints de mucoviscidose : *Aspergillus sp, Penicillium sp* …(101). La contamination se fait par

inhalation de spores qui se retrouvent dans les bronches et sont difficilement éliminées du fait de la viscosité des sécrétions. Celles-ci peuvent être à l'origine de différents symptômes chez tous les individus : asthme, toux, irritation respiratoire ; dans de rares cas, ils peuvent être responsables de mycoses systémiques. La prévention élémentaire consiste à identifier puis à supprimer l'exposition à la « source fongique ».

1.1 *Aspergillus fumigatus* et autres espèces aspergillaires

Les *Aspergillus* sont des champignons saprophytes cosmopolites et très répandus dans le milieu extérieur aussi bien en milieu urbain qu'en milieu rural et à l'intérieur ou l'extérieur des habitations. Ils se situent au 4ème rang des spores fongiques de l'air après *Alternaria sp*, *Cladosporium sp* et *Penicillium sp* (132). Ils appartiennent à la classe des Ascomycètes et ont des filaments cloisonnés hyalins d'où prennent naissances des conidiophores qui se terminent par une vésicule où sont disposées des phialides ou cellules conidiogènes d'où vont bourgeonner des centaines de spores unicellulaires. L'ensemble constitue la « tête aspergillaire » qui caractérise le genre *Aspergillus* (Figure 1).

Aspergillus fumigatus est l'espèce possédant le potentiel le plus pathogène du genre *Aspergillus* ; c'est aussi une espèce produisant une très grande quantité d'allergènes puissants. Elle est isolée de plus de 45% des expectorations de patients atteints de mucoviscidose (6) et est impliquée dans 80% à 90% des aspergilloses humaines. La pathogénicité d'*A. fumigatus* est multifactorielle ; la petite taille des spores (3-5μm) lui permet de pénétrer profondément dans les poumons, cette espèce est thermotolérante et adapte rapidement sa biologie à des températures dépassant 58°C, elle est capable de se développer en conditions hypoxiques (115). L'habileté d'*A. fumigatus* à s'adapter à des micro-environnements variés en fait le champignon le plus fréquemment rencontré dans les maladies opprtunistes (79). Il est capable d'adhérer à différentes molécules de l'organisme (laminine, fibrinogène, surfactant A et D …). Grâce à ses enzymes (trois catalases, protéases…) et ses toxines (la gliotoxine, la fumagilline, la ribotoxine...), il peut résister à l'agression des cellules de défense et inhiber partiellement les capacités de phagocytose ; la digestion et l'élimination des conidies par les macrophages est très lente. Au niveau pulmonaire, les toxines sont capables d'inhiber l'activité ciliaire (79). *A. fumigatus* sécrète aussi des enzymes lysant les tissus et assurant ainsi une pénétration rapide

et efficace dans tous tissus y compris le tissus osseux, c'est le cas de certaines trypsines comme la superoxide dismutase (58), les phospholipases ou l'hémolysine. Ces protéines étant immunogènes, certaines sont utilisées pour le diagnostic de l'aspergillose (catalase, chymotrypsine, ribotoxine).

Aspergillus flavus et *Aspergillus terreus* sont selon les études les 2ème ou 3ème *Aspergillus* isolés des expectorations de patients atteints de mucoviscidose (25, 26). La prévalence de ce dernier (6,2%) semble importante comparée à la faible fréquence dans l'environnement (26). Les patients présentent un génotype unique et persistant ; ce qui traduit une colonisation réelle et non un passage transitoire.

D'autres espèces aspergillaires peuvent êtres également retrouvées : *Aspergillus nidulans*, *Aspergillus niger*…

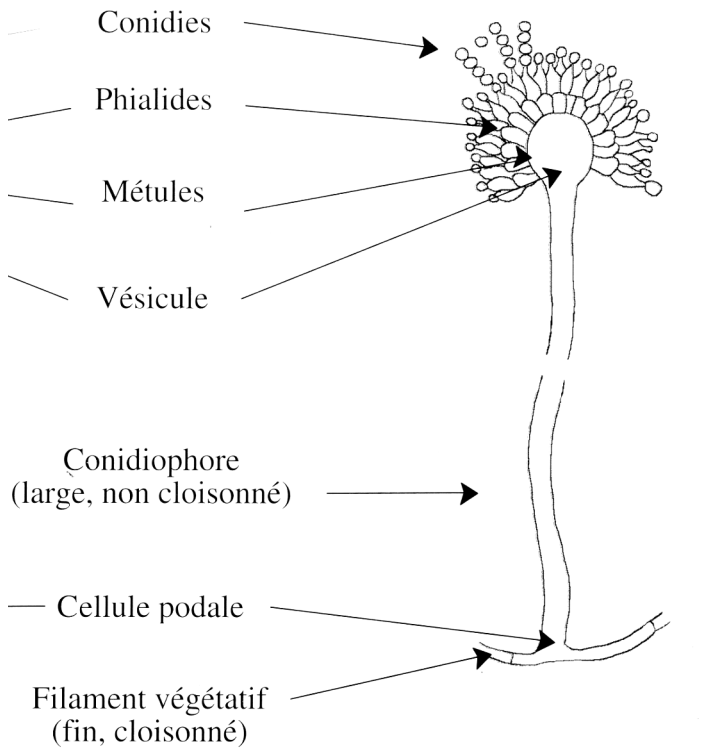


Figure 1. Schéma d'une tête aspergillaire et formation des spores (132)

Bien que les *Aspergillus* soient responsables de nombreuses formes chroniques de l'aspergillose (45) ; dans un contexte de mucoviscidose ce sont essentiellement des manifestations allergiques qui sont observées. Dans un certain nombre de cas, la sensibilisation aspergillaire peut conduire à un asthme aspergillaire. Lors d'intenses colonisations, celui-ci peut évoluer avec une stimulation de la production d'IgE et d'IgG spécifiques générant la formation de complexes immuns qui à leur tour potentialisent les réponses immunitaires. La forme allergique la plus sévère est

l'ABPA (Aspergillose Broncho-Pulmonaire Allergique). Sa prévalence dans la mucoviscidose varie entre 1 et 15% selon les études (115). Elle est le plus souvent due à *A. fumigatus*, mais les autres espèces aspergillaires sont susceptibles d'entraîner également une ABPA (120). En général, le champignon a une croissance limitée et les expectorations ne contiennent que des fragments d'hyphes. Ils envahissent rarement les poumons, cependant de rares cas d'aspergillose invasive ont néanmoins été rapportés chez des patients non greffés (13, 24).

La bronchite aspergillaire peut également être observée dans la mucoviscidose. Elle est due à la présence d'*Aspergillus* dans les bronches, mais n'a pas de composante allergique. Ce diagnostic peut être envisagé chez des patients ne remplissant pas tous les critères d'ABPA mais répondant à un traitement antifongique (111).

La sinusite fongique allergique se retrouve habituellement chez des sujets jeunes à terrain atopique et associe une sinusite persistante, une obstruction nasale, une polypose nasale et une hyperéosinophilie sanguine. Elle peut se comparer à l'ABPA car la réponse immunitaire est similaire. Les champignons filamenteux de l'environnement et en particulier les champignons du genre *Aspergillus* peuvent être à l'origine de cette pathologie (11).

Alors que les *Penicillium* très fortement présents dans l'environnement sont fréquemment isolés des expectorations, leur rôle serait négligeable dans le développement des infections respiratoires. Cependant, une autre moisissure pourrait avoir une importance non négligeable dans les infections fongiques.

1.2 *Scedosporium apiospermum*

C'est un champignon tellurique saprophyte présent dans les sols et les eaux boueuses. Il fait partie des Ascomycètes, sa forme sexuée *Pseudallescheria boydii* est rarement retrouvée en culture ; c'est essentiellement la forme végétative qui est observée. Il est de plus en plus impliqué dans des infections pouvant aller jusqu'à menacer le pronostic vital, notamment chez les immunodéprimés. Celles-ci peuvent toucher divers organes : infections ORL, infections oculaires, infections du système nerveux central, mycétomes cutanés, ostéomyélites, arthrite…(33). L'inhalation de spores peut entraîner des infections respiratoires : sinusites, mycétomes

pulmonaires, pneumonies nécrosantes et scédosporioses broncho-pulmonaires allergiques (25).

C'est le deuxième champignon filamenteux, après *A. fumigatus*, retrouvé dans les expectorations des patients, ce qui correspond à 8,6%. Sa fréquence est assez élevée comparée à sa faible prévalence dans l'environnement (25). 21,1% des patients ont une sérologie *S. apiospermum* positive. La présence d'anticorps chez certains patients non-colonisés peut s'expliquer soit par une colonisation transitoire, soit par une réaction croisée avec des anticorps anti-*A. fumigatus*. Sa prévalence est sous-estimée et il est capable de colonisation chronique et est à l'origine de réponse immunitaire et d'inflammation chronique. Or sa pathogénicité chez le patient atteint de mucoviscidose est peu étudiée et son rôle dans la survenue de lésions pulmonaires reste controversé. Il est essentiellement considéré comme un simple agent colonisateur des voies bronchiques (25). Cependant, quelques cas de scédosporiose plus ou moins graves ont été diagnostiqués chez des patients atteints de mucoviscidose : réactions de type « ABPA » (25, 90), bronchite (124), infections disséminées après transplantation pulmonaire (117) et un cas de spondylodicite (50). Ce champignon filamenteux possède un matériel enzymatique comparable à celui d'*A.fumigatus*, avec une sérine protéase et deux catalases (25). Il est capable de se développer en microaérophilie et sa thermotolérance pourrait faciliter son développement in situ.

1.3 Autres champignons filamenteux

Tous les micromycètes présents dans l'environnement peuvent potentiellement coloniser l'arbre respiratoire des patients atteints de mucoviscidose. Leur présence est en général transitoire et leur pouvoir pathogène faible chez des patients immunocompétents (néanmoins, quelques espèces pouvant être très pathogènes comme les Mucorales sont à surveiller, surtout lors de corticothérapie systémique ou après une transplantation). Les plus souvent isolés sont les *Penicillium sp*, comme *P. emersonii* (101), ou *Exophiala dermatitidis* (1,8% à 15,7% (59)), *Geotrichum sp*, *Fusarium sp*, *Acrophialophora fusispora* et *Scedosporium prolificans* (27, 101). Certains comme *Exophiala dermatitidis* peuvent être associés à des facteurs de risque comme le diabète ou la corticothérapie (6).

1.4 Levures

Les levures sont aussi isolées dans les expectorations. Leur présence endogène en particulier au niveau buccal rend l'interprétation délicate. La notion quantitative présente un grand intérêt en particulier lorsque le prélèvement s'effectue après rinçage buccal. *Candida albicans*, commensale des muqueuses, est la levure la plus fréquemment retrouvée. Elle est isolée chez près des trois quarts des patients. Sa présence dans la trachée, les bronches ou les bronchioles, peut néanmoins être associée à une candidose pulmonaire, chez des patients recevant de fortes doses d'antibiotiques ou de corticoïdes (6).

2. Bactéries

Haemophilus influenzae et *Staphylococcus aureus* sont les premières bactéries s'implantant dans le tractus pulmonaire des patients atteints de mucoviscidose, elles sont observées en général à partir de 6 ans (Figure 3). *S. aureus* est ensuite isolé périodiquement entraînant des infections chroniques. Certaines souches deviennent résistantes aux antibiotiques. Une étude aux Etats-Unis a montré que 2,7% des patients atteints de mucoviscidose hébergeaient du *S. aureus* résistant à la méticilline, ce qui correspond à 14% des souches isolées de l'ensemble de la population sur la même période (48).

Pseudomonas aeruginosa pourrait coloniser les voies respiratoires partiellement lésées. Aussi, cette bactérie est observée plus tardivement dans l'enfance et l'adolescence. Cet agent infectieux s'adapte ensuite parfaitement à cette niche écologique et sa prévalence à l'âge adulte atteint 80% (49). Les infections qu'il provoque sont souvent sévères et sa présence est associée à un mauvais pronostic (51). Il sécrète des mucopolysaccharides associés à une détérioration clinique. Le début de la colonisation peut se faire par des souches de l'environnement, puis certaines souches sont sélectionnées dans l'arbre respiratoire au cours du temps et sont associées à un changement phénotypique comme la production de biofilm ou l'acquisition de résistance aux antibiotiques (11,6% à 17,4% de *P. aeruginosa* multi-résistants) (49). L'environnement hydrique et ionique dans les bronches favorise une activation de la production d'alginate, *P. aeruginosa* devient alors muqueux et signe l'infection chronique. Il y a plusieurs stades de colonisation bactérienne (Tableau I).

La colonisation chronique par *P. aeruginosa* ou *S. aureus* est définie comme la présence du germe dans l'arbre bronchique pendant au moins 6 mois, attestée par au moins 3 cultures positives à au moins 1 mois d'intervalle, sans signe direct (manifestations cliniques) ou indirect (anticorps) d'infection. La différence entre colonisation et infection tient à l'identification de la réponse de l'hôte : réponse humorale ou manifestations cliniques. La définition de l'exacerbation est la survenue d'un épisode aigu de détérioration clinique sur un état stable (Consensus Européen sur l'infection bronchopulmonaire dans la mucoviscidose).

Primo-colonisation à PA	Présence de PA sans signe clinique
Colonisation chronique à PA	Présence de PA pendant au moins 6 mois attestée par 3 cultures positives à au moins 1 mois d'intervalle
Infection broncho-pulmonaire à PA	Primo-colonisation avec signes cliniques
Infection broncho-pulmonaire chronique à PA	Colonisation chronique avec signes cliniques

Tableau I. Différents stades de la colonisation à l'infection respiratoire par *Pseudomonas aeruginosa*

La sérologie à *P. aeruginosa* peut aider au diagnostic précoce d'infection, notamment chez les enfants et les patients expectorants peu.

Les résistances de ces germes aux antibiotiques posent des problèmes de prise en charge thérapeutique des patients.

D'autres bactéries souvent résistantes aux traitements sont également associées à un mauvais pronostic : le complexe *Burkolderia cepacia* est associé à une progression rapide de nécrose pulmonaire et de décès; *Stenotrophomonas maltophilia* et *Achromobacter xylosoxidans* plus communes et moins virulentes, sont observées chez les patients dont la pathologie est déjà très avancée (Figure 2) (49) .

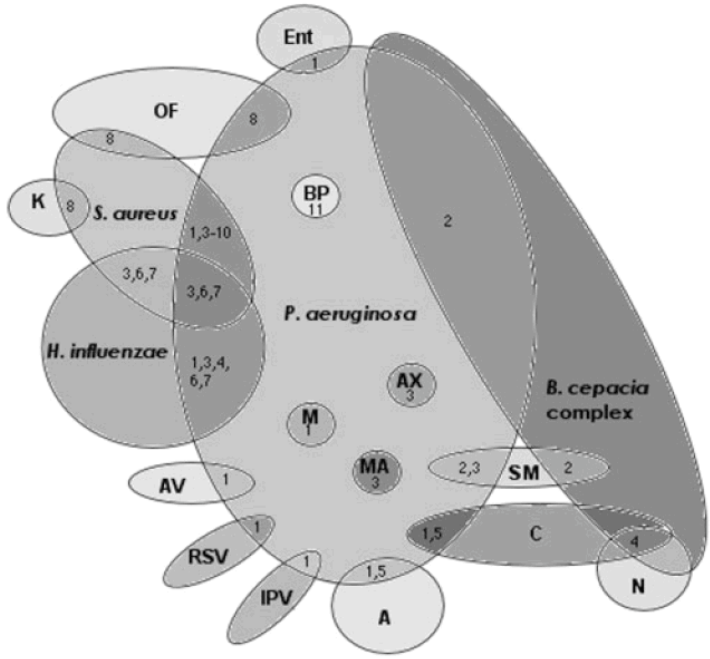


Figure 2. Diagramme représentant les multiples agents pathogènes respiratoires dans la mucoviscidose et les co-infections possibles
(NB : les co-infections n'impliquent pas forcément une intéraction directe entre les espèces.
A, Aspergillus sp ; AV, adenovirus ; AX, A. xylosoxidans ; BP, bacteriophage ; C, Candida sp ; Ent, entérobateries ; IPV, influenza et/ou parainfluenza virus ; K, Klebsiella sp ; M, mycoplasma ; MA, Mycobacterium abscessus ; N, Neisseria sp ; OF, flore orpharyngée ; RSV, virus respiratoire syncitial ; SM, S. maltophilia. Les chiffres correspondent aux références : 1, Petersen *et al.* (1981) ; 2, Lambiase *et al.* (2006) ; 3, Wahab *et al.* (2004) ; 4, Moore *et al.* (2005) ; 5, Burns *et al.* (1998) ; 6, Hoiby (1974) ; 7, Lording et al. (2006) ; 8, Santana *et al.* (2003) ; 9, Alvarez *et al.* (2004) ; 10, Anzaudo *et al.* (2005) ; 11, Ojenniyi *et al.* (1991). (51)

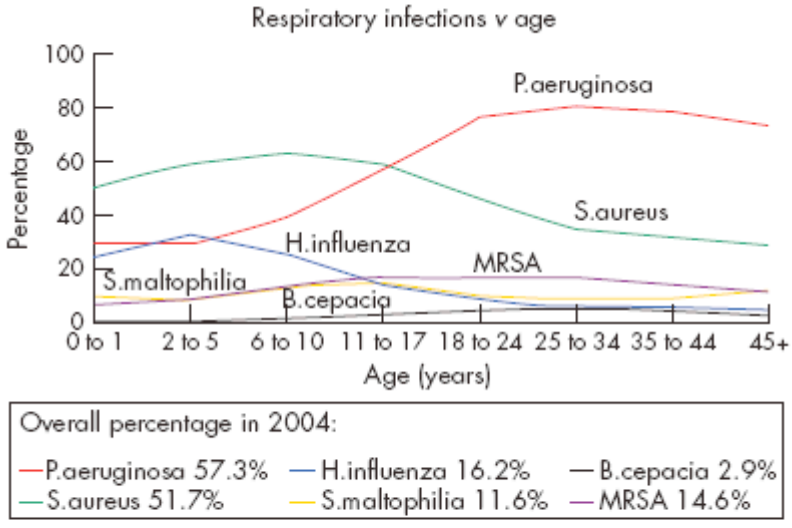


Figure 3. Evolution des colonisations respiratoires bactériennes dans la mucoviscidose
Cystic Fibrosis Foundation Patient Registry, 2004 Annual Data report to the Center Directors ; Cystic Fibrosis Foundation, 2005 (49)

3. Évolution au sein de l'arbre respiratoire

L'évolution de cette population se fait sous une pression de sélection et une augmentation des résistances. Quand un pathogène disparaît, il est remplacé par un autre. Tous ces micro-organismes interagissent de façon synergique ou antagoniste (soit par compétition sur les ressources, soit par action directe). *S. aureus* « sensibilise » les poumons à l'infection par le *P. aeruginosa* et celui-ci peut lyser les cellules de *S. aureus* et limiter le développement d'*A. fumigatus* (51). *P. aeruginosa* a un effet immunomodulateur et précède la colonisation à *S. maltophilia*, *A. xylosoxidans* et des mycobactéries non tuberculosiques (51). Les patients colonisés par une mycobactérie non-tuberculosique, bactéries pouvant être difficile à traiter, ont une prévalence plus grande de pathologie respiratoire liée à l'*Aspergillus* (74). L'ABPA et la corticothérapie systémique pourraient être des facteurs de risque à la colonisation par ces bactéries, comme *Mycobacterium abscessus* (93). Certains phages du bacille pyocyanique peuvent entraîner un changement de sérotype, rendant la bactérie polyagglutinable et associée à une plus grande mortalité (51).

Chez les patients récemment colonisés par *A. fumigatus*, une grande diversité génotypique du champignon a été décrite. Inversement, les patients colonisés de façon chronique ont un nombre restreint de génotypes avec émergence d'un génotype dominant, ou plusieurs génotypes dominants se succédant (37); associé à une réponse sérologique plus intense, avec présence d'anticorps anti-catalase. Il y a donc une sélection génotypique au cours de l'évolution de la maladie chez les patients colonisés par *A. fumigatus* (28). Il n'y a pas de relation entre le type de colonisation (un ou plusieurs génotypes) et la présence d'ABPA (37).

S. apiospermum apparaît quand il y a déjà des altérations préalables de l'arbre respiratoire et souvent après *A. fumigatus*. Les âges moyens de première colonisation sont respectivement de 14,5 ans et de 12,9 ans. Les patients peuvent êtres colonisés par les deux champignons (25). Les études chez des patients colonisés à *S. apiospermum* ont montré qu'il y avait un génotype dominant associé ou non à des souches proches, et qu'aucun génotype n'était commun entre les patients (39).

La prophylaxie antibiotique anti-pyocyanique (par voie orale, par inhalation, ou les deux) serait associée à une augmentation de la prévalence de la colonisation par *A. fumigatus* dans la mucoviscidose (8). *P. aeruginosa* synthétise des métabolites (pyocyanine et 1-hydroxyphenazine) pouvant inhiber la croissance des champignons filamenteux et des levures *in vitro* (64). Les processus existent très probablement *in vivo*.

Il est difficile d'évaluer la part d'*A.fumigatus* comme facteur indépendant dans la progression de la maladie pulmonaire puisqu'il est très souvent associé à *P.aeruginosa :* deux tiers des expectorations positives en bacille pyocyanique ont aussi des cultures aspergillaires positives (6).

4. Les exacerbations cliniques respiratoires

Ce sont des épisodes récurrents de symptômes pulmonaires fonction de la relation complexe entre pathogènes présents et défenses immunitaires. Les signes cliniques sont multiples : toux, expectorations augmentées ou modifiées, dyspnée, asthénie, anorexie, amaigrissement, baisse de la capacité respiratoire à l'EFR. Elles peuvent être causées par l'acquisition d'un nouvel organisme ou par une augmentation importante de la colonisation bactérienne ou fongique avec prolifération d'une souche déjà existante. Par exemple, plusieurs génotypes de *P. aeruginosa* sont présents chez un même patient, et l'acquisition d'un nouveau génotype peut être associé à une exacerbation (49).

Dans certaines conditions, les bactéries peuvent accélérer leur fréquence de mutation (hypermutation chez *P. aeruginosa*) et s'adapter à un environnement défavorable ; c'est le cas de développement accru de résistance aux antibiotiques dans les voies respiratoires des patients atteints de mucoviscidose (88).

Pour les atteintes fongiques, la forme clinique la plus sévère est l'aspergillose broncho-pulmonaire allergique. Il est nécessaire d'en préciser les caractéristiques cliniques et biologiques.

ASPERGILLOSE BRONCHO-PULMONAIRE ALLERGIQUE ou ABPA

Les pathologies respiratoires liées à *Aspergillus fumigatus* sont multiples. La présence du champignon dans les bronches chez des patients atteints de mucoviscidose peut soit engendrer une inflammation type bronchite aspergillaire, soit entraîner une réaction allergique type ABPA. L'aspergillose broncho-pulmonaire allergique ou ABPA est la pathologie respiratoire associée à la présence d'*A. fumigatus.* C'est la forme la plus sévère des aspergilloses allergiques. Elle nécessite la présence du champignon et une exacerbation des réponses immunitaires intégrant une réponse allergique (IgE) et médiée aussi par les IgG. Les premiers cas ont été décrits en 1952 par Hinson chez des patients asthmatiques, puis dans la mucoviscidose dans les années 60 (57, 89). C'est une pathologie inflammatoire chronique des voies respiratoires résultant d'une hypersensibilité à *A. fumigatus* (120). L'inflammation persistante entraîne le développement de bronchectasies et de fibrose pulmonaire (6, 89). Elle se caractérise au niveau clinique par divers symptômes : dyspnée, sifflement, fièvre, malaise, hémoptysie ; dus à une hyper-réactivité bronchique et à des bouchons muqueux résultant de sécrétions augmentées, d'infiltrats pulmonaires et la présence d'hyphes mycéliens. Les exacerbations peuvent êtres très graves par dégradation de la fonction respiratoire et peuvent entamer le pronostic vital (114).

1. Physiopathologie de l'ABPA

1.1 Inhalation des spores d'*Aspergillus fumigatus*

Les spores inhalées sont piégées dans le mucus visqueux de la lumière bronchique. Cette persistance est à l'origine d'une colonisation de l'arbre respiratoire. Les spores vont aller se fixer au niveau du surfactant via différentes molécules comme la laminine, la fibronectine ou le fibrinogène et à la surface de l'épithélium bronchique (79). Le développement mycélien se fait entre, et sur les cellules épithéliales grâce aux enzymes protéolytiques comme l'élastase et la collagénase, qui peuvent provoquer le détachement des cellules Ces protéines fongiques

induisent la production de cytokines chémo-attractives (IL6, IL8) par les cellules épithéliales (121), provoquant une inflammation persistante et participant au recrutement des lymphocytes Th2 CD4+ (66). Cependant, d'autres études montrent qu'elles sont également capables d'induire un hypofonctionnement des cellules épithéliales baissant la production de cytokines, freinant ainsi l'arrivée de cellules phagocytaires (63). Les autres agents fongiques peuvent produire également des enzymes protéolytiques, mais les plus efficaces sont sécrétées par *A. fumigatus* (63).

1.2 Réponse de l'organisme

La première ligne de défense est constituée par les macrophages alvéolaires qui vont phagocyter et détruire les spores. La deuxième ligne de défense, lorsque les spores ont germé, est constituée de polynucléaires neutrophiles et de cellules mononuclées qui vont sécréter des substances toxiques pour le champignon comme le péroxyde d'hydrogène. Ces cellules immunitaires sont présentes au niveau systémique ou localement dans le tissu lymphoide broncho-alvéolaire (BALT). Elles entraînent une synthèse locale d'immunoglobulines retrouvées dans le LBA (115).

Les cellules présentatrices d'antigènes comme les cellules dendritiques vont endocyter les spores et les hyphes d'*A.fumigatus* et présenter les allergènes via le système HLA-DR2 et HLA-DR5 aux lymphocytes T présents dans le tissu lymphoide broncho-alvéolaire. Cette stimulation entraîne deux types de réponse immunitaire adaptative. La réponse humorale du type Th2 permet la synthèse de cytokines pro-inflammatoires (IL4, IL5 et IL13), la production d'IgE totales et spécifiques anti-*A.fumigatus* et une augmentation des polynucléaires éosinophiles. En parallèle, la réponse cellulaire de type Th1 se caractérise par la synthèse d'IgG et d'IgA anti-*A. fumigatus* (Figure 4) (104, 115). Les cellules Th17 synthétisent de l'IL17 et de l'IL22 dont les taux sont augmentés dans les expectorations au cours des exacerbations de la mucoviscidose (104).

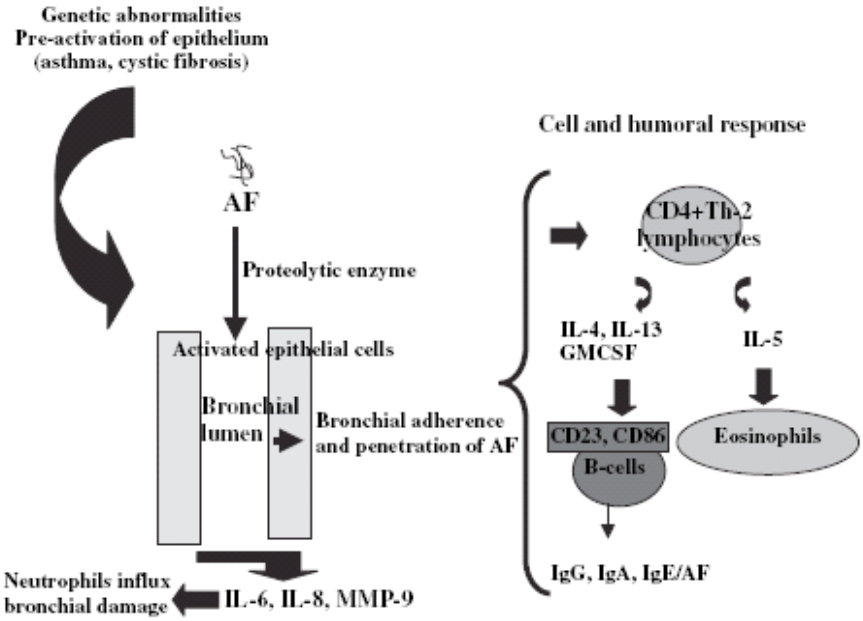


Figure 4. Physiopathologie de l'ABPA
De l'adhérence d'*Aspergillus* et de sa pénétration dans le mucus bronchique, à la réponse immunitaire par les lymphocytes B et T. (120)

La bronchite aspergillaire a une réponse inflammatoire de type Th1 et est caractérisée par une dyspnée due à la broncho-constriction, de la fièvre, une asthénie, des taux d'IgE et de PNE faibles, une augmentation des lymphocytes T et des macrophages pendant la phase chronique, et des PNN pendant la phase aiguë.

1.3 Rôle des interleukines

Les cytokines IL4 et IL5 participent au chimiotactisme des cellules du système immunitaire (120).

IL4 est à l'origine d'une augmentation de l'expression des récepteurs CD23 et CD86 sur les lymphocytes B ce qui entraîne une stimulation de la synthèse d'IgE. Les lymphocytes ont une sensibilité augmentée pour l'IL4 (52, 65). Elle permet un recrutement des lymphocytes T et des PNE en stimulant la synthèse de récepteurs VCAM-1 sur les cellules vasculaires endothéliales, les ligands se trouvant sur les lymphocytes T et les PNE (115). *In vitro*, les lymphocytes B de patients avec ABPA synthétisent spontanément en grande quantité des IgE par rapport aux lymphocytes des patients sensibilisés par *A.fumigatus* mais non ABPA (66). Les IgE vont stimuler les cellules responsables de la réaction inflammatoire allergique comme les

mastocytes et les PNE qui vont libérer différents produits (12) (histamine, leucotriène, Platelet-Activating Factor, chémoattractants pour les PNE …). Cela entraîne une broncho-constriction, une augmentation de la perméabilité vasculaire à l'origine d'une inflammation locale persistante (115).

L'IL3 et l'IL5 sécrétées par les lymphocytes B CD4 Th2+ sont des promoteurs au niveau médullaire et participent à la maturation et à l'activation des PNE (12). Une augmentation locale et systémique des PNN et PNE (46) et des IgE (120) est ainsi observée.

L'IL10 joue un rôle dans la tolérance et le contrôle de la réponse inflammatoire à *A. fumigatus* et *P. aeruginosa* (19). La réponse cellulaire des lymphocytes T aux antigènes recombinants (f3, f4, f6) est contrôlée par IL10.

L'IL17 participe au recrutement des PNN et l'IL22 est impliquée dans la régulation de la fonction de la barrière épithéliale et dans l'élaboration de défense vis à vis de certaines bactéries. L'IL17 et l'IL23 sont associées à une augmentation de la réponse pathologique à *A. fumigatus*. L'IL25 et la lymphopoïétine thymique stromale (TSLP) produit par les cellules épithéliales, ainsi que l'IL17E sont associées à une réponse immunitaire de type Th2 (104).

Les Toll Like Receptor (TLR) TR2 et TR4 jouent un rôle dans la réponse immunitaire, mais celui-ci n'est pas totalement précisé. *A. fumigatus* serait capable de moduler TR2 et TR4 pouvant ainsi induire un effet immunosuppresseur qui faciliterait son invasion (20). Certains récepteurs non-TLR peuvent se lier au galactomannanes aspergillaires. Ils sont présents sur les cellules dendritiques et les macrophages : récepteur Dectin-1 des cellules dendritiques, macrophages alvéolaires et cellules épithéliales, se lient aux β glucanes d'*A.fumigatus* et entraînent une réaction inflammatoire avec production de cytokines par les macrophages (TNFα, IL1, IL6, chémotractants, GM-CSF, IL12) (104).

1.4 Modulation de la réponse immunitaire selon les antigènes

Les lymphocytes T CD4+ stimulés par les antigènes aspergillaires f2 entraînent une réponse immunitaire Th2 avec synthèse d'IL5, ou une réponse mixte Th1 et Th2 avec synthèse d'IL4, IL5 et INFγ. La stimulation par les antigènes aspergillaires f1 entraîne une réponse Th2 avec synthèse d'IL4 mais pas de réponse Th1 (52). Chez les patients présentant une ABPA, l'IL4 et l'IL5 sont présentes en grande quantité dans le LBA alors que les taux d'IL2 et d'INFγ sont faibles (52).

1.5 Facteurs de risque de l'ABPA

Les facteurs de risque de l'ABPA sont multiples (104) et les mécanismes selon lesquels certains patients restent tolérants à *A. fumigatus* (simple colonisation) et d'autres développent une ABPA sont peu connus. Plus de 80% des enfants atteints de mucoviscidose ont des IgG anti-*Aspergillus* et très peu font une ABPA (104). La prévalence de l'ABPA est très augmentée chez les patients asthmatiques et dans la mucoviscidose. Dans ces deux maladies, l'ABPA commence suite à un dérèglement de la balance immunitaire Th1/Th2 avec une orientation vers une réponse de type Th2 pouvant générer une inflammation. La physiophathologie est mieux comprise chez les patients asthmatiques que dans la mucoviscidose qui est elle-même une maladie à réponse Th2 (52) avec une inflammation bronchique constante ; les patients pouvant également présenter ou non de l'asthme. Il existe des facteurs génétiques influant sur les sécrétions et la qualité du mucus bronchique et sur la réponse immunitaire. Ces situations sont aussi modulées par des facteurs environnementaux.

1.5.1 Environnement

L'inhalation de spores se fait à partir d'une source de contamination et la surexposition aux allergènes fongiques potentialise la réaction allergique inflammatoire. L'éviction de la source limite le risque de colonisation fongique massive.

1.5.2 Mucus bronchique pathologique

Le mucus anormalement visqueux et la mauvaise clairance mucocilaire favorisent la rétention de spores ce qui leur permet de se développer. Cela facilite également l'interaction entre les cellules dendritiques sub-épithéliales et les antigènes aspergillaires qui vont ensuite être présentés aux lymphocytes T entraînant une réponse de type Th2 (52).

1.5.3 Polymorphisme des récepteurs cellulaires

Les récepteurs HLA de classe II, permettant de présenter les antigènes, seraient impliqués dans la susceptibilité à induire une ABPA. La synthèse d'IgE par les lymphocytes T serait faite chez les patients atopiques mais pas chez les patients non atopiques (97). Les récepteurs HLA-DR2 et HLA-DR5 (voire HLA-DR4 et HLA-DR7) et notamment les allèles HLA DRB1 1501 et 1503 seraient associés à un

risque plus élevé de développer une ABPA majorant l'inflammation, la production d'IL4 et augmentant l'importance des infiltrats (22, 70, 104). Ces réponses immunes sont majorées chez des patients ABPA par rapport à des patients simplement colonisés par *A. fumigatus*. En revanche, les récepteurs HLA-DQ2 et HLA DRB1 1502 seraient associés à une protection de la pathologie et à une orientation vers une réponse non allergique de type Th1 (22, 70). Il pourrait être envisageable de faire un typage HLA des patients atteints de mucoviscidose afin de déterminer leur susceptibilité à l'ABPA.

1.5.4 Polymorphisme du gène CFTR

Le gène CFTR serait également impliqué dans l'ABPA. L'incidence de cette pathologie est plus grande dans la mucoviscidose et chez les patients asthmatiques ayant une mutation du gène CFTR (86). Le CFTR aurait un rôle dans le maintien de l'équilibre de la réponse immunitaire Th1/Th2 (3). Les études chez la souris CFTR -/- montre un biais dans la réponse immunitaire à *A. fumigatus*, passant d'une réponse IL5 prédominante à un profil d'IL4 prédominante (92) favorisant ainsi la réponse de type Th2.

1.5.5 Le surfactant

Le polymorphisme des protéines du surfactant et du collagène (109) entraînent différentes manifestations dans la pathologie. Les protéines du surfactant peuvent se lier à des antigènes glycosylés aspergillaires (104). Le polymorphisme des gènes SP-A, comme la protéine SP-A2 (52), est associé au développement et la gravité de l'ABPA.

La protéine du surfactant SP-D intéragit avec *A. fumigatus*. Il a été mis en évidence des taux élevés de cette protéine sur des modèles d'animaux allergiques à *A. fumigatus*, suggèrant un rôle important. Dans le cadre de la mucoviscidose, l'augmentation des taux de SP-D dans le sérum des patients pourrait être corrélée avec la fonction respiratoire et à la détérioration pulmonaire. Par contre, ce dosage n'a pas montré d'utilité dans le diagnostic de l'ABPA (72).

1.5.6 Les interleukines

Certaines études montrent une augmentation de la sensibilité à IL4 due à une mutation de son récepteur sur la chaîne α, ce qui amplifie la réponse Th2 et la

synthèse d'IL4 qui va aller se fixer sur les lymphocytes B CD23+ et CD86+ dont l'expression est augmentée par la réponse Th2 (68).

Le polymorphisme au niveau de la région promotrice du gène de l'IL10 augmente les taux d'IL10 et est retrouvé chez des patients avec ABPA (15).

Certains lymphocytes T CD4+ et CD25+ seraient impliqués dans la tolérance à la présence d'*Aspergillus*, n'entraînant pas de réponse immunitaire Th2 et ne favorisant pas la production d'IgE (104).

1.5.7 Les infections respiratoires

Les infections chroniques à *P. aeruginosa* seraient également promotrices d'une réponse Th2. Les patients colonisés ont des taux plus élevés d'IL4, IL13, de lymphocytes Th2 CD4+ CCR4+, TARC/CCL17 et une diminution d'INFγ (52). La sensibilisation à *A. fumigatus* chez les enfants atteints de mucoviscidose est généralement précédée par une infection à bacille pyocyanique.

1.5.8 Les différents traitements

Les antibiotiques, comme l'inhalation de tobramycine, peuvent favoriser le développement de *Candida albicans* ou d'*Aspergillus* (16). La corticothérapie inhalée ou systémique peut entraîner une diminution de l'efficacité des défenses immunitaires et faciliter l'implantation de la moisissure.

Ces études suggèrent de nouvelles cibles thérapeutiques comme IL4, le récepteur à IL4, le récepteur CD86 ; ainsi qu'un possible typage des gènes SP-A, HLA de susceptibilité à l'ABPA.

2. Diagnostic de l'ABPA

Cette forme particulière d'aspergillose réunit les réactions immunes de type Th1 et Th2 avec une réaction d'hypersensibilité immédiate due aux IgE et une réaction d'hypersensibilité retardée liée à la production massive d'IgG.

Le diagnostic d'ABPA est fondé sur un faisceau d'arguments cliniques, radiologiques, immunologiques et biologiques.

Jusqu'en 2002, le diagnostic s'appuyait sur des critères majeurs et des critères mineurs. Les critères majeurs d'ABPA étaient: asthme, infiltrats pulmonaires (actuels

ou anciens), réaction cutanée immédiate à *A. fumigatus*, IgE totale > 417UI/mL, précipitines aspergillaires, bronchectasies centrales, augmentation du taux de PNE, IgE spécifique *A. fumigatus* et/ou IgG spécifique *A. fumigatus* augmentées (critères minimums soulignés). À cela s'ajoutaient des critères mineurs : bouchons muqueux, cultures positives ou examen direct révélant la présence de fragments mycéliens septés, PNE dans les expectorations, signes radiologiques d'inflammation bronchique (115).

2.1 Difficultés du diagnostic dans la mucoviscidose

Le diagnostic d'ABPA est difficile dans la mucoviscidose car de nombreuses manifestations sont communes aux deux maladies. En particulier, l'inflammation bronchique est persistante, due aux multiples infections bactériennes ou virales.

Au niveau pulmonaire, les bronchectasies et les infiltrats pulmonaires apparaissent très tardivement dans l'ABPA mais sont souvent déjà présents à cause des infections bactériennes (81) ou de la mucoviscidose. Aussi les bronchectasies et la dilatation bronchique sont très fréquentes, mais consécutives aux infections fongiques.

Au niveau biologique, beaucoup de patients sont sensibilisés vis à vis des antigènes aspergillaires et présentent une réaction d'hypersensibilité immédiate après sensibilisation cutanée aux antigènes aspergillaires (115). Les IgE totales sont considérées comme de l'aspergillose allergique (60, 81) mais répondent bien au traitement par corticoïdes (87). Ils varient avec l'âge et plusieurs seuils peuvent être envisagés : 500 UI/mL (112) ou 1000 UI/mL (87). Cependant, certains cas d'ABPA prouvés peuvent avoir des taux d'IgE totales inférieurs à 500UI/mL (69). À l'inverse, des patients peuvent avoir des IgE totales et spécifiques élevées mais sans autres critères d'ABPA (115). *A.fumigatus* est très souvent présent, quelques fois en quantité importante dans les expectorations ; il peut ainsi entraîner une sensibilisation ou être responsable d'une bronchite aspergillaire.

Les IgE spécifiques constituent un marqueur spécifique de la sensibilisation aspergillaire (81). Les précipitines aspergillaires sont peuvent être présentes chez des patients sans ABPA et leurs taux fluctuent dans le temps (60). Les taux d'IgE varient en fonction des traitements par corticoïdes, de l'âge et du stade d'ABPA (105). Les PNE ont une utilité limitée et leur augmentation peut être due à l' infection

par *P. aeruginosa* (81). Bien qu'il y ait controverse, les cultures mycologiques constituent un critère mineur car il n'y a pas de corrélation entre la présence du champignon ou le niveau d'exposition fongique et la présence d'ABPA (120).

2.2 Place de l'imagerie médicale pour le diagnostic de l'ABPA dans la mucoviscidose

La mucoviscidose entraîne une altération des bronches avec différentes images visibles à la radiographie pulmonaire. L'épaississement des sécrétions conduit à une stase muqueuse et par conséquence à une dilatation irréversible du calibre des bronches appelée bronchectasie, ainsi qu'à un épaississement de la paroi bronchique. Des impactions mucoïdes ou bouchons de mucus anormalement épais peuvent s'accumuler dans les bronches. Les bronchectasies centrales seraient suggestives d'une ABPA ainsi que des impactations mucoïdes avec des infiltrats (opacité de quelques centimètres dans les poumons) (115). La plupart de ces anormalités sont donc non spécifiques et peuvent être dues à une ABPA ou à une autre infection dans un contexte de mucoviscidose; elles persistent après traitement dans la plupart des cas (32).

Les bronchectasies sont parfaitement détectées par tomodensitométrie. Elles sont la conséquence d'une accumulation locale de leucocytes (PNN, PNE, Lymphocytes, monocytes) ainsi que de toxines qui entraînent une inflammation. L'extension des bronchectasies est corrélée avec la quantité de PNN et PNE présents dans les expectorations mais pas avec les taux d'IgE (128).

Les infiltrats pulmonaires sont communs à l'ABPA et à la mucoviscidose. Ils disparaissent plus facilement avec les traitements par corticoïdes (115).

Les bouchons muqueux ou impactations mucoïdes et les épanchements pleuraux sont également communs aux deux pathologies, mais les bouchons muqueux plus denses à la radiographie ne seraient présents que dans l'ABPA (1, 115).

Une antibiothérapie prolongée ne permettant pas une résolution des infiltrats et bouchons muqueux, une orientation vers une étiologie fongique peut être envisagée.

2.3 Consensus diagnostique de l'ABPA

La difficulté du diagnostic de l'ABPA dans la mucoviscidose a conduit à instaurer un consensus en 2002 (115)

1/ Détérioration clinique aiguë ou sub-aiguë : toux, sibilants, intolérance à l'exercice, asthme induit à l'effort, altération de la fonction respiratoire, hypersécrétion bronchique ; signes non attribuables à d'autres étiologies.

2/ IgE totales sériques >1000 UI/mL sauf si le patient est sous corticothérapie, auquel cas, il faut refaire le dosage après l'arrêt du traitement. Le taux minimum des IgE totales est 500 UI/mL. Si une ABPA est suspectée et que le taux d'IgE totales est de 200 à 500 UI/mL, il faut recommencer le dosage un à trois mois après. Si le patient est sous stéroïdes, il faut également répéter ce dosage après arrêt du traitement.

3/ Test cutané positif immédiat aux réactions d'hypersensibilité aux allergènes aspergillaires (Prick test) qui se traduit par une inflammation cutanée de diamètre >3mm ou IgE spécifiques > 0,35 UI/mL (sans traitement antihistaminique)

4/ Présence d'IgG anti-*A.fumigatus* (>0,6 voire 1) et/ou présence de précipitines aspergillaires (au moins 3 arcs ou présence d'un arc à activité de type catalase ou chymotrypsine) OU 5/ Anomalie à la radiographie pulmonaire nouvelle ou récente (infiltrats, bouchons muqueux) ou bronchectasies au scanner, non résorbables après traitement antibiotique et standard.

Ces critères sont les critères minimums pour établir un diagnostic d'ABPA. Si un de ces critères manquent, l'ABPA n'est que probable et il faut recontrôler les doages d'IgE ou suggérer une étiologie fongique à l'exacerbation.

Un bilan aspergillaire doit se faire dès l'âge de 6 ans ou et lorsque la clinique est évocatrice. Il comprend un dépistage annuel systématique des IgE totales, des IgE spécifiques et une sérologie aspergillaire.

2.4 Classification des stades d'ABPA

Selon l'évolution de la pathologie aspergillaire 5 stades ont été différenciés concernant l'ABPA (Tableau II). Les différents stades sont fonction de données cliniques, radiologiques et biologiques. Le stade I représente l'ABPA aiguë et les signes décrits régressent sous corticothérapie. Le stade V correspond à une fibrose et une dégradation de la fonction respiratoire irréversible qu'on peut rapprocher de la symptomatologie de la mucoviscidose (99).

Stades		Caractéristiques cliniques	Caractéristiques radiologiques	Caractéristiques biologiques
I	**ABPA aiguë**	Fièvre, toux, douleurs thoraciques, hémoptysie	Infiltrats pulmonaires (lobes moyens / supérieurs)	IgE totales augmentées +++ +- taux de PNE augmentés
II	**« Rémission »**	Asthme stable/asymptomatique	Pas d'infiltrats en l'absence de traitement par corticoïdes pendant au moins 6 mois.	Taux d' IgE normal ou augmenté
III	**Exacerbation récurrente**	Asymptomatique ou ressemble au stade I	Infiltrats pulmonaires (lobes moyens / supérieurs)	IgE totales augmentées +++ +- taux de PNE augmentés
IV	**Asthme cortico-dépendant**	Astme persistant +++	Présence ou non d'infiltrats pulmonaires	Taux d' IgE normal ou augmenté
V	**Fibrose**	Dyspnée +++, cyanose	Bronchectasie étendues, fibrose	Taux d' IgE normal ou augmenté

Tableau II. Différents stades dans l'évolution de l'ABPA (99)

Les patients évoluent du stade I au stade V avec plus ou moins d'exacerbation de l'ABPA (Figure 5).

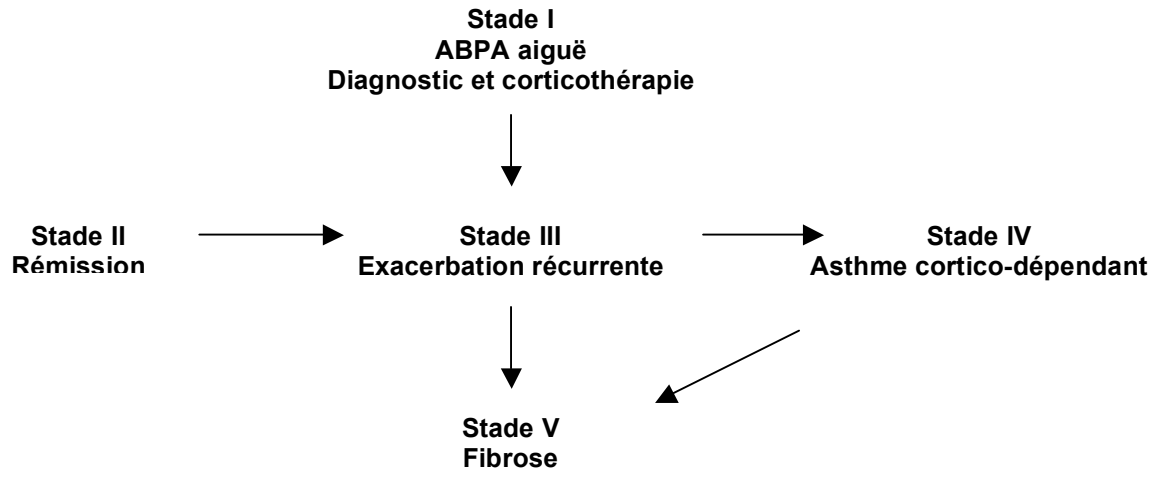


Figure 5. Relations entre les différents stades d'ABPA (99)

Une autre classification résume ces stades en 3 groupes (Tableau III) (73) :

ABPA-S : sérologie positive, stage précoce d'ABPA. L'ABPA-S correspond aux stades I à IV

ABPA-CB : présence de bronchectasies centrales

ABPA-CB-ORF : présence de bronchectasies centrales et autres images radiographiques

	ABPA-S	**ABPA-CB**	**ABPA-CB-ORF**
Anomalies pulmonaires	Moyennes	Modérées	Graves
PNE	+	+	++
IgE spécifiques	+	+	++
Symptômes	+	+	++

Tableau III. Classification de l'ABPA en 3 groupes selon différents critères cliniques et biologiques (73)

2.5 Perspectives actuelles et futures dans le diagnostic de l'ABPA

De nouveaux paramètres pouvant êtres utiles au diagnostic sont étudiés. Les données sérologiques s'avèrent très utiles pour confirmer une ABPA puisque les complications pulmonaires et cliniques sont communes avec la mucoviscidose. Le manque de standardisation dans les dosages d'IgE et d'IgG peuvent rendre difficile l'interprétation des résultats biologiques (9). Certains paramètres comme la sérologie avec antigènes aspergillaires recombinants sont étudiés depuis quelques années et d'autres comme le dosage des TARC nécessitent des investigations supplémentaires. On peut également envisager des tests génétiques sur le groupage HLA ou l'étude de la sensibilité à l'IL4 pour appréhender la susceptibilité des patients à développer une ABPA. Une étude du LBA peut également s'avérer utile pour renseigner sur l'inflammation locale.

2.5.1 Allergène recombinants

La difficulté de trouver un marqueur spécifique de l'ABPA et le problème de standardisation et de reproductibilité des techniques de dosage ont conduit ces dernièes années à doser les IgE spécifiques anti-*A.fumigatus* vis à vis d'antigènes aspergillaires recombinants.

Les problèmes de standardisation des allergènes utilisés pour le dosage des IgE limitent l'interprétation des résultats. Il est difficile de produire de façon reproductible une grande quantité d'antigènes purs à partir de cultures *in vitro*. Des dégradations et des pertes d'allergènes peuvent survenir au cours de la purification. La présence d'autres antigènes aspergillaires non allergènes peuvent conduire à des résultats erronés en captant avec plus d'affinité les anticorps spécifiques (Latgé 1999). Les résultats dépendent aussi des méthodes de détection: ELISA, RIA, IEP… (120). Plus de vingt allergènes aspergillaires peuvent être produits de façon recombinante (75). En principe, chez les patients à terrain atopique, asthmatiques et sensibilisés par *A.fumigatus*, le dosage des IgE spécifiques avec des allergènes recombinants assurerait une parfaite reproductibilité des tests de détection et de dosage, Parmi les multiples allergènes aspergillaires, certains seraient associés à une spécificité plus grande en fonction des différentes pathologies aspergillaires. Asp *f1* et Asp *f3* semblent provoquer une forte réponse IgE chez les patients sensibilisés aux allergènes aspergillaires. Les IgE dirigées contre les recombinants Asp *f4* et Asp *f6* (et Asp *f2* (80)) seraient plus spécifiques de l'ABPA (18, 54, 96). L'allergène *f6* correspond à la super oxyde dismutase associée au manganèse ; elle n'est exprimée que pendant la phase tardive de germination d'*A. fumigatus* et donc les IgE anti-Asp*f6* sont témoin d'un développement aspergillaire et ne seraient pas produits lors de simples contacts transitoires avec la moisissure. Les tests cutanés faits avec les recombinants corroborent les tests effectués dans le sérum (96). Une réactivité différente des IgE vis à vis de l'allergène Asp *f3* permettrait une discrimination des stades d'ABPA (67).

Cependant, la sensibilité de ces allergènes serait très variable selon les études publiées. Certaines montrent peu ou pas de progrès diagnostique par ces antigènes recombinants. Selon certaines observations, ils permettraient un diagnostic précoce d'une sensibilisation à *A. fumigatus* en association avec les données cliniques d'ABPA (4), alors que d'autres études n'ont pas mis en évidence une utilité sur la détection de la sensibilisation aspergillaire (36). Aucun de ces recombinants ne permettrait de différencier les patients ABPA des patients non-ABPA dans la mucoviscidose (34, 76).

A.fumigatus possède un grand nombre d'allergènes. Seuls sont commercialisés les allergènes recombinants majeurs (Tableau IV).

Asp *f1*	Ribotoxine
Asp *f2*	Ligand du fibrinogène
Asp *f3*	Protéine du péroxysome
Asp *f4*	Protéine de fonction inconnue
Asp *f5*	Métalloprotéinase
Asp *f6*	Super Oxyde Dismutase à Manganèse

Tableau IV. Liste des allergènes recombinants utilisés pour le dosage des IgE spécifiques anti-*A.fumigatus* (75)

2.5.2 Les cytokines TARC

Les thymus-and-activation-regulated-chemokine (TARC) sont des cytokines synthétisées par les cellules dendritiques après stimulation antigénique. Elles vont se fixer aux récepteurs CCR4 situés sur les lymphocytes T et auraient un rôle promoteur de la réponse immunitaire Th2. Elles constitueraient un marqueur plus sensible, plus spécifique et plus précis de l'ABPA comparé aux IgE totales et spécifiques, aux IgG et aux allergènes recombinants (80). Les TARC permettraient de différencier les patients atteints de mucoviscidose avec ABPA des patients sans ABPA ou simplement sensibilisé à *A.fumigatus* ou présentant un terrain atopique. Leur place dans le diagnostic de l'ABPA nécessite cependant d'être précisé sur de plus grande cohorte de patients et par des études multicentriques.

2.5.3 Le ligand CCL17

Les récepteurs des chémokines se trouvent sur les lymphocytes Th1 ou Th2. Les lymphocytes Th2 ont des récepteurs C-C : CCR3 (ligand CCL11), CCR4 (ligand CCL17 et CCL22) et CCR8 (ligand CCL1 et CCL17). Les lymphocytes Th1 ont des récepteurs différents : CCR5 (ligand CCR1, CCL3, CCL4) et CXCR3 (ligand CXCL10, CXCL9, CXCL11). Chez les patients ayant un asthme ou d'autres atopies, les taux de CCL17, de CCL22 et de lymphocytes T CD4+ CCR4 sont augmentés (réponse Th17). Cela suggère un rôle important du récepteur CCR4 dans l'inflammation allergique, mais les études sont encore controversées car CCR4 n'est pas le seul récepteur de CCL17 et CCL22. Il a un rôle dans la maturation des lymphocytes T et si ce récepteur était déficient, les troubles immunologiques devraient être plus importants (52, 53).

Les études chez la souris et chez l'homme soulignent le rôle important du récepteur CCR4 et de ses ligands CCL17 et CCL22 dans l'ABPA. Les taux de CCL17 permettraient de différencier les patients avec ABPA des patients

sensibilisés ou colonisés par *A. fumigatus,* ainsi que des témoins sains non colonisés. CCL17 serait un meilleur marqueur, plus sensible, plus spécifique et de haute pertinence pour le diagnostic de l'ABPA par rapport aux critères biologiques classiques (IgE totales et spécifiques) (52, 53). Le taux de CCL17 augmenterait plus précocement par rapport à la clinique (80) et diminuerait avec les traitements par corticoïdes.

Sa place comme marqueur et cible thérapeutique fait actuellement l'objet de plusieurs études. Il en est de même des analyses du polymorphisme du gène de CCL17 et des implications dans le diagnostic de l'ABPA. Cependant, la variabilité inter-essai est très importante et la méthode de dosage utilisée influe sur le résultat (53, 80).

2.5.4 Autres tests

Le cellular allergen stimulation test (CAST) permet de déterminer les sulfidoleukotriènes produits par les polynucléaires basophiles stimulés par un allergène. Ils peuvent être complémentaires du dosage des IgE totales (106).

L'augmentation du Leucotriène β4 et de l'IL6 dans les expectorations des patients atteints de mucoviscidose seraient des marqueurs potentiels de l'inflammation pulmonaire. Ils sont élevés au cours des exacerbations et augmentent lors des infections à *P. aeruginosa* ; ils diminuent lors des traitements antibiotiques (17).

L'oxyde nitrique expiré serait également un marqueur de l'inflammation asthmatique mais la corticothérapie fausse les résultats (83).

3. Traitements de l'ABPA

Le traitement de l'ABPA est complexe et répond à deux exigences: prophylaxie contre l'ABPA et traitement des exacerbations. Une prise en charge précoce permet de prévenir la progression de la maladie jusqu 'au stade V (120). Le problème est de savoir quels patients traiter, quand traiter et avec quelle thérapie. De plus, la pharmacologie des médicaments chez ces patients est à prendre en compte.

Les études cliniques montrent que la corticothérapie permet une amélioration de la fonction respiratoire avec diminution des infiltrats pulmonaires ainsi qu 'une baisse des IgE totales (105).

La mucoviscidose entraîne une modification des sécrétions digestives et les nutriments sont moins bien absorbés. La pharmacocinétique des médicaments et notamment l'absorption peut donc être modifiée. La posologie et la prise des traitements doit se faire ou non de façon concomittante avec un repas.

3.1 Corticothérapie systémique

Les corticoïdes ont un effet anti-inflammatoire et immunomodulateur. Ils agissent sur le métabolisme de l'acide arachidonique et inhibent l'action de la phospholipase A2. Ils permettent de diminuer les taux d'IgE, de PNE ; ainsi que des infiltrats pulmonaires et des bronchospasmes (115). Des études suggèrent même de traiter les patients ayant des taux d'IgE élevés mais asymptomatiques car les taux d'IgE pourraient être corrélés avec l'activité inflammatoire les exacerbations lors des réponses de type Th2 (98).

La pharmacocinétique est différente dans la mucoviscidose. Par exemple, la prednisolone est absorbée dans le jejunum à pH 6,8 alors que celui-ci est inférieur à 5 dans la mucoviscidose (130).

Les effets indésirables des corticoïdes sont nombreux : risque de diabète, prise de poids, perturbation de la croissance, ostéoporose, inconfort gastrique, cataracte, effets psychiatriques, infection par diminution de la réponse immunitaire (133). Ils sont contre-indiqués dans les cas de diabète, de retard de croissance, d'ostéopénie et d'infection, pathologies souvent présentes dans la mucoviscidose. Les traitements à dose forte et sur de longues périodes peuvent entraîner une immunosuppression favorisant les infections systémiques et des effets métaboliques (diabète, hyperlipidémie, ostéoporose…).

Les corticoïdes n'ont pas d'effet antifongique, leur effet immunosuppresseur pourrait favoriser le développement des mycètes (79). Le traitement à long terme n'est pas recommandé car il ne prévient pas l'émergence de nouveaux infiltrats ou la progression de la fibrose (120).

3.2 Les antifongiques

Les traitements antifongiques dans l'ABPA ont pour objectif d'empêcher le développement fongique et donc de diminuer la quantité d'antigènes pulmonaires et par conséquence de limiter la stimulation antigénique. Leur utilisation dans le contexte entraîne une baisse de la réponse inflammatoire, une amélioration de symptômes et un ralentissement de la progression de la maladie à long terme (115). De plus, l'environnement du patient est à prendre en compte et l'éviction de la source fongique constitue un élément important mais pas toujours réalisable de la prévention.

Les antifongiques les plus couramment utilisés ont été les nitro-imidazolés avec tout d'abord l'itraconazole, progressivement remplacé par les nouveaux azolés comme le voriconazole.

3.2.1 Itraconazole : SPORANOX® (po)

L'itraconazole inhibe le cytochrome CYP3A4 des champignons ce qui bloque la synthèse de l'ergostérol, constituant de la membrane fongique. Son action est donc fongistatique. C'est un antifongique à large spectre actif sur les levures et les champignons filamenteux. Il est indiqué dans le traitement des mycoses superficielles et systémiques dont l'aspergillome et l'aspergillose broncho-pulmonaire nécrosante mais pas dans l'ABPA. Les études de son action dans cette forme clinique ont été effectuées sur des périodes courtes d'observation avec des cohortes restreintes comportant en majorité des patients asthmatiques et peu ou pas de patients ayant la mucoviscidose (40, 127). Cependant, l'itraconazole per-os pendant 6 semaines a montré une efficacité. Il améliore la fonction respiratoire et les symptômes cliniques et limite le nombre d'exacerbations. Son action sur le micromycète s'accompagne d'une diminution du taux d'IgE totales voire des IgE spécifiques, des PNE, des précipitines, permettant de diminuer la dose de corticoïdes (108, 116, 125, 126, 127).

L'absorption d'itraconazole est optimisée dans un environnement acide et doit être accompagnée d'un repas, d'une boisson type coca ou jus d'orange, ou en solution de cyclodextrine. Il est assez bien toléré (troubles digestifs, céphalées…), cependant sa toxicité hépatique impose de surveiller la fonction hépatique ; son action sur le cytochrome P450 est à l'origine de nombreuses interactions médicamenteuses. Plusieurs études ont été faites sur la pharmacocinétique de

l'itraconazole chez des patients atteints de mucoviscidose. Les données restent homogènes pour un même patient, mais la variabilité individuelle est élevée (31). Les concentrations optimales sont difficiles à atteindre et une administration bi-quotidienne est préférable (55). L'itraconazole en solution buvable serait mieux adapté dans le cadre de la mucoviscidose car les taux de concentration plasmatique sont plus élevés et l'absorption plus rapide par rapport à la forme capsule (111).

3.2.2 Voriconazole : VFEND® (po ou iv)

Il est indiqué dans les infections systémiques à *Candida*, les aspergilloses invasives et les infections fongiques à *Scedosporium sp* ou *Fusarium sp*. Cet antifongique est plus onéreux, mais a moins d'effets indésirables, son absorption est supérieure à celle de l'itraconazole. Il peut entraîner notamment des troubles de la vision, des troubles digestifs et des céphalées, en général réversibles à l'arrêt du traitement. Sa toxicité hépatique sensiblement pareille à celle de l'itraconazole nécessite les mêmes précautions : il faut surveiller la fonction hépatique et les intéractions médicamenteuses sont nombreuses. Il a montré son efficacité dans diverses aspergilloses respiratoires ainsi que dans le traitement de l'ABPA où il est associé selon les études, à une amélioration de la clinique, de la fonction respiratoire et des valeurs sérologiques (baisse des IgE) et permet une diminution des doses de corticoïdes (43, 47 , 56). Il peut être utilisé en monothérapie ou associé à une corticothérapie.

3.3 Recommandations pour le traitement de l'ABPA (115)

Il faut savoir quand et comment traiter les patients avec ABPA et mucoviscidose. Les exacerbations pulmonaires peuvent avoir des origines différentes (ABPA, infections bactériennes, asthme), soit de manière isolée, soit combinée.

Dans le traitement des exacerbations, la posologie initiale des corticoïdes est de 0,5 à 2 mg/kg/j de prédnisone (avec un maximum de 60 mg/j) pendant une à deux semaines, puis la dose est diminuée à 0,5 ou 1 mg/kg/j pendant une à deux semaines (115). Une amélioration clinique conforte le rôle de l'ABPA comme cause de l'exacerbation. En l'absence de réponse clinique, il faut soit chercher une autre étiologie, ou augmenter les doses de corticoïdes, ou ajouter un traitement antifongique. La corticothérapie chronique est quelques fois nécessaire pour certains

patients. L'itraconazole est ajouté si la réponse aux corticoïdes seuls est insuffisante, s'il y a trop d'effets indésirables par les corticoïdes ou si l'ABPA est devenue cortico-dépendante. Il doit être prescrit à la posologie de 200-400 mg/j pendant 3 à 6 mois (115) (Tableau V).

Au CRCM de Grenoble, le traitement et le suivi d'une ABPA se déroulent ainsi : Prédnisone per-os 2mg/kg/j pendant 7 jours, puis 1mg/kg/j pendant 1 mois, puis diminution de la dose sur 3 mois. Un bilan est fait à 1 mois : bilan clinique, taux des IgE totales et spécifiques, EFR. Un nouveau bilan est fait à 3 mois : bilan clinique, sérologie, EFR. S'il y a cortico-dépendance ou récidive, un traitement par itraconazole est mis en place à 10mg/kg/j, soit 400mg/j chez les adultes (posologie à adapter en fonction du dosage à 15 jours).

Chez les patients ayant une détérioration respiratoire ne régressant pas sous antibiotiques mais ne présentant pas tous les critères d'ABPA, un traitement antifongique devrait être envisagé (111).

Type d'ABPA	**Clinique/radiographie/biologie**	**Conduite à tenir et traitements**
Exacerbation ABPA	Symptômes cliniques Dégradation fonction respiratoire Nouveaux infiltrats pulmonaires IgE >1000UI/mL IgG positives	Traitement de l'ABPA : Corticoïdes Antifongique(s) Attention aux autres causes d'exacerbation
ABPA-S asymptomatique	Tableau clinique stable Radiographie stable IgE >1000UI/mL IgG positives	Surveillance (risque de développer une ABPA +++)
ABPA-S avec modification radiologique	Tableau clinique stable Nouveaux infiltrats pulmonaires IgE >1000UI/mL IgG positives	Traitement des infections bactériennes associées et traitement de l'ABPA si pas d'amélioration
ABPA-S avec signes respiratoires	Symptômes cliniques Dégradation fonction respiratoire Radiographie stable IgE >1000UI/mL IgG positives	Traitement des infections bactériennes associées et traitement de l'ABPA en fonction des IgE et /ou de l'asthme
Antécédent d'ABPA avec signes respiratoires	Symptômes cliniques Dégradation fonction respiratoire Radiographie stable IgE stables IgG stables	Traitement des infections bactériennes associées et traitement de l'ABPA et de l'asthme si pas d'amélioration
Exacerbations avec ABPA probable	Symptômes cliniques Dégradation fonction respiratoire Nouveaux infiltrats pulmonaires IgE 500-1000UI/mL IgG positives	Traitement de l'ABPA : Corticoïdes Antifongiques Et traitement des infections bactériennes associées

Tableau V. Recommandations dans le traitement de l'ABPA (115)

3.4 Alternatives thérapeutiques

3.4.1 Corticoïdes inhalés

Le traitement par corticoïdes inhalés permettrait d'en diminuer les effets indésirables, donc améliorer l'observance. En revanche, ils n'auraient pas ou peu d'effet dans l'ABPA (123), sur le VEMS ou sur la colonisation par *Pseudomonas aeruginosa* (7). Il n'y a pas assez de données pour recommander le traitement par corticoïdes inhalés ou par bronchodilatateurs dans l'ABPA mais ils peuvent avoir une action sur la composante asthmatique de l'ABPA (115).

3.4.2 Corticothérapie inta-veineuse pulsée

L'administration de méthylprednisolone par voie IV pulsée serait une alternative thérapeutique à l'ABPA résistante au traitement classique et diminuerait les effets indésirables des corticoïdes à haute dose (119).

3.4.3 Amphotéricine B par voie inhalée avec nébuliseur

Les effets indésirables sont diminués et des résultats satisfaisants ont été rapportés (77).

3.4.4 Anidulafungine : Ecalta® (IV)

Les échinocandines sont une classe d'antifongiques systémiques apparue au début des années 2000 avec la caspofungine. Leur mode d'action est différent de celui des azolés. Ces molécules interfèrent avec la synthèse de la paroi fongique par inhibition d'une β glucane synthétase, système enzymatique présent chez la plupart des champignons pathogènes mais absent des cellules de notre organisme. Leur spectre d'action est étendu et elles possèdent une bonne activité sur *Candida sp* et *A. fumigatus,* elles sont notamment indiquées dans le traitement des candidoses invasives. Ces molécules sont bien tolérées, elles ont peu d'interférences médicamenteuses, et la spécificité de leur site d'action permettent des associations synergiques avec les autres antifongiques comme les azolés (100, 133).

L'anidulafungine est indiqué dans le traitement des candidoses invasives chez l'adulte non neutropénique. C'est une échinocandine semi-synthétique fabriquée à partir d'un produit de fermentation d'*Aspergillus nidulans*. Cet antifongique est administré par voie intraveineuse. Il est particulièrement bien toléré et pourrait constituer une alternative au traitement par imidazolés dans l'ABPA.

3.4.5 Omalizumab : Xolair® (IV)

C'est un anticorps monoclonal recombinant anti-IgE, administré par voie sous-cutanée. Il est indiqué dans le traitement de l'asthme allergique persistant sévère. Les anticorps vont se fixer aux IgE humaines et empêchent leur fixation sur les récepteurs des polynucléaires, stoppant ainsi la chaîne de réaction allergique. Très peu d'étude ont été faites sur son efficacité dans l'ABPA, mais il semble lié à une amélioration clinique de patients. Ces données confirment le rôle important des IgE dans le processus inflammatoire et cet anticorps pourrait être envisagé comme thérapeutique possible dans l'ABPA (62, 82, 122, 131).

Malgré la conférence de consensus de 2003 sur le diagnostic de l'ABPA dans la mucoviscidose, la prévalence de cette pathologie et des champignon filamenteux au sein de cette population est difficile à déterminer. Son association à divers traitement ou à la colonisation bactérienne ainsi que son impact sur la fonction respiratoire doit être étudiée.

ÉTUDE MUCOFONG : MATERIELS ET METHODES

La place et l'impact des champignons filamenteux dans les processus inflammatoires chez les sujets atteints de mucoviscidose ne sont pas bien précisés et ils restent le plus souvent un sujet de controverses. De plus, les très nombreuses surinfections virales ou bactériennes rendent extrêmement complexes les interprétations des données mycologiques. L'association des expériences de cliniciens et de biologistes de différents CHU devrait permettre de définir de façon indépendante et sur un nombre conséquent de patients l'intérêt du suivi mycologique et sérologique chez les patients atteints de mucoviscidose. C'est donc dans ce contexte qu'a été proposé un projet de recherche clinique « Mucofong » dont la première phase d'inclusion fait l'objet de ce travail. L'étude Mucofong est un programme hospitalier de recherche clinique (PHRC) multicentrique et prospectif, centré sur le suivi mycologique des patients atteints de mucoviscidose impliquant 7 centres investigateurs : Lille (investigateur principal), Dunkerques, Angers, Bordeaux, Dijon, Rouen et Grenoble.

Les critères d'Inclusion des patients sont les suivants:

- Patient dont le diagnostic de mucoviscidose est validé sur les critères actuellement en vigueur.
- Patient habituellement suivi dans l'un des 7 CRCM impliqués dans le projet.
- Patient âgé d'au moins 6 ans sans limite supérieure d'âge.
- Patient bénéficiant d'un bilan mycologique réalisé soit dans le cadre de la surveillance microbiologique habituelle (bonnes pratiques cliniques), soit devant un épisode clinique d'aggravation nécessitant une exploration biologique.
- Sujet ayant signé un consentement éclairé au moment de l'inclusion. Consentement en 3 exemplaires dont 1 pour le patient.
- Assuré social

Les critères de Non-inclusion sont :

- Patient greffé pulmonaire (les patients inscrits sur liste de greffe peuvent être inclus).
- Patient ou leurs parents (si le patient est mineur) refusant toute participation à l'étude.
- Sujet incapable majeur, sous tutelle ou sous mesure de protection de justice.
- Refus ou incapacité de donner un consentement éclairé.

L'étude consiste en un suivi clinique et biologique des patients sur une durée de 2 ans après l'inclusion. Elle prend en compte 3 visites pour chaque patient, ce qui correspond à 3 bilans annuels, avec un maximum de 5 visites incluant les éventuelles exacerbations. Les prélèvements à analyser sont obtenus à partir de prélèvements effectués lors du suivi des patients, une fois par an au minimum: bilan mycologique et bactériologique des expectorations, bilan biologique sanguin pour le dosage des IgE et des IgG aspergillaires. Parallèlement les données cliniques et radiologiques recueillies complètent le suivi.

Un cahier de suivi de l'étude pour chaque patient doit être minutieusement rempli (Figure 6). Il permet de collecter toutes les données cliniques (antécédents médicaux, traitements en cours et dans l'année écoulée, examens cliniques (notamment respiratoires), radiologiques, biologiques y compris les différents épisodes infectieux quelque en soit l'origine. Les cahiers ont été complétés en s'appuyant sur le dossier médical et avec l'aide du médecin correspondant.

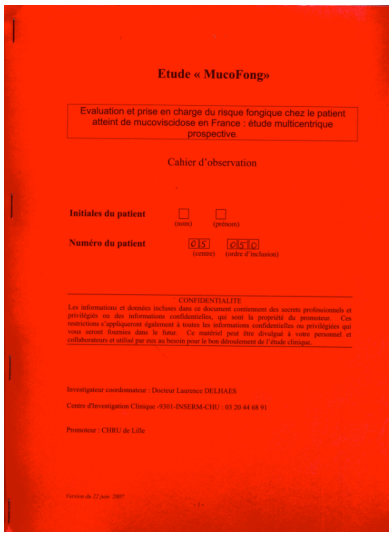


Figure 6. Cahier rouge de suivi pour l 'étude Mucofong

1. Les examens effectués au Laboratoire de Parasitologie-Mycologie

1.1 Examen mycologique des expectorations

1.1.1 Examen direct par coloration de Musto

La coloration de Musto ou Gomori Grocott modifiée permet une coloration des parois des mycètes par imprégnation argentique. Certains composants présents dans la paroi réagissent avec le « nitrate d'argent + ammonium », ce qui permet la fixation l'argent dans les parois en les colorant en noir.

1.1.2 Culture pour identification et dénombrement des micromycètes

Les ensemencements sont qualibrés de façon à comparer les résultats entre eux et rendre l'aspect quantitatif pertinent. Les expectorations sont ensemencées à l'oëse avec un volume défini de 10μL sur 5 milieux gélosés différents coulés en boîte de Pétri et sélectionés pour ces cultures. Les températures d'incubation sont de 37°C et/ou 27°C. La lecture des boîtes ensemencées s'effectue tous les jours sur une durée maximale de 15 jours. 5 milieux sont utilisés dans l'étude Mucofong (Tableau VI). L'interprétation de ces différents milieux a pour but d'améliorer l'isolement de micromycètes plus rares et de culture délicate. Leurs caractéristiques sont les suivantes :

- Milieu chromogène CAN2 incubé à 37°C : c'est un milieu chromogène utilisé en routine hospitalière. Il permet une identification directe de *Candida albicans* et une quantification des levures. Il assure aussi la pousse des champignons filamenteux.
- Milieu Sabouraud + chloramphénicol + cycloheximide incubé à 37°C et 27°C : il permet d'inhiber la croissance de champignons filamenteux contaminants et de favoriser le développement de champignons à croissance plus lente comme *Scedosporium apiospermum.*
- Milieu au dichloran-rose bengal additionée de Bénomyl incubé à 37°C : le Bénomyl est un inhibiteur des microtubules favorisant l'isolement de plusieurs espèces concomitantes. Ce milieu serait plus performant pour la mise en

évidence et la croissance de *Scedosporium apiospermum* (102). Ce milieu non commercialisé est préparé au laboratoire (Figure 7).

- Milieu à l'érythritol incubé à 37°C et 27°C : l'érythritol est un sucre et représente une source de carbone sélective pour *Exophiala dermatitidis*. Ce milieu non commercialisé est préparé au laboratoire.
- Milieu Sabouraud + chloramphénicol à 27°C : ce milieu constitue la culture de base pour tous les mycètes et inhibe la croissance de la plupart des bactéries.

L'identification des levures se fait soit directement sur le milieu chromogène CAN2 (colonies bleues de *Candida albicans*), soit par reprise de colonies isolées, identifiées selon leurs caractères métaboliques sur galerie Api32C (galerie de 32 tests d'assimilation de différents sucres)



Figure 7. Préparation du milieu Bénomyl

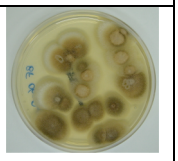
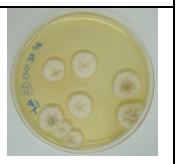
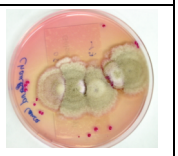
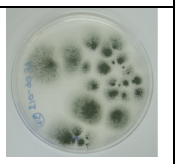
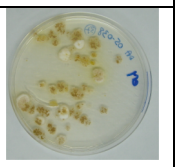
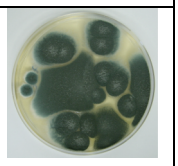
Milieux	T (°C)	Objectifs	Exemples de culture	
CAN 2	37	Milieu chromogène pour l'identification des levures	*A. fumigatus*	
Actidione®	37	Inhibition de certains filamenteux par le cycloheximide	*A. fumigatus*	
Bénomyl	37	Inhibition des microtubules et sélection de Scedosporium	*S. apiospermum*	
Erythritol	37	Sucre sélectif d'*Exophiala dermatitidis*	*A. fumigatus*	
Actidione®	27	Inhibition de certains filamenteux par le cycloheximide	*S. apiospermum*	
Erythritol	27	Sucre sélectif d'*Exophiala dermatitidis*	*A. terreus*	
Sabouraud-chloramphénicol	27	Milieu de base des mycètes : Nutriments + ATB	*A. fumigatus*	

Tableau VI. Synthèse des différentes conditions de culture des expectorations

L'identification des espèces de champignons filamenteux repose sur des critères macroscopiques (aspect général des colonies : relief, consistance, taille, couleur…) (Figures 8 à 11), et microscopiques (étude des filaments végétatifs, des organes de fructification et des spores) (Figures 12 à 17). Certaines données (température, vitesse de pousse, sensibilité au cycloheximide) peuvent être des compléments utiles à l'identification.

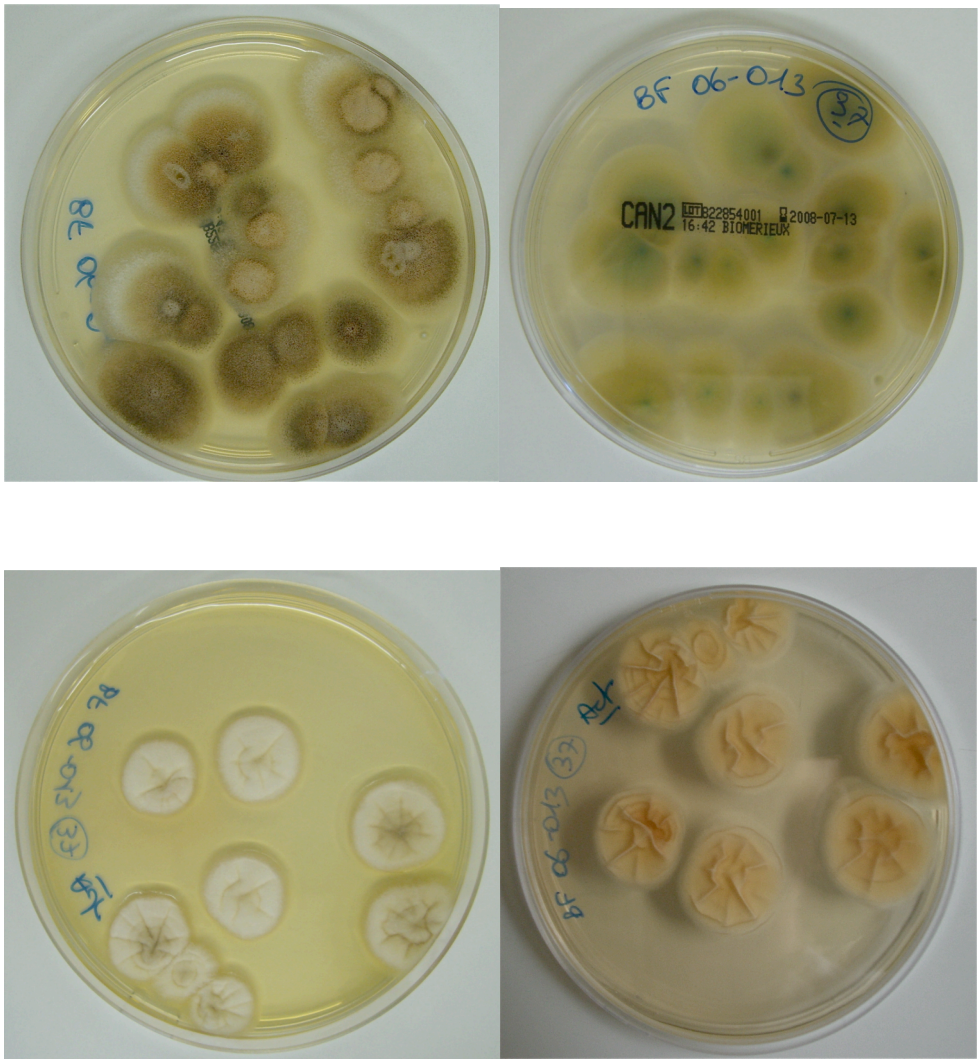


Figure 8. Aspect macroscopique d'*A. fumigatus*
Sur milieu CAN2 (A) et milieu à l'Actidione® (B); culture des colonies (peu nombreuses) sur la boïte (gauche) et au revers (droite)

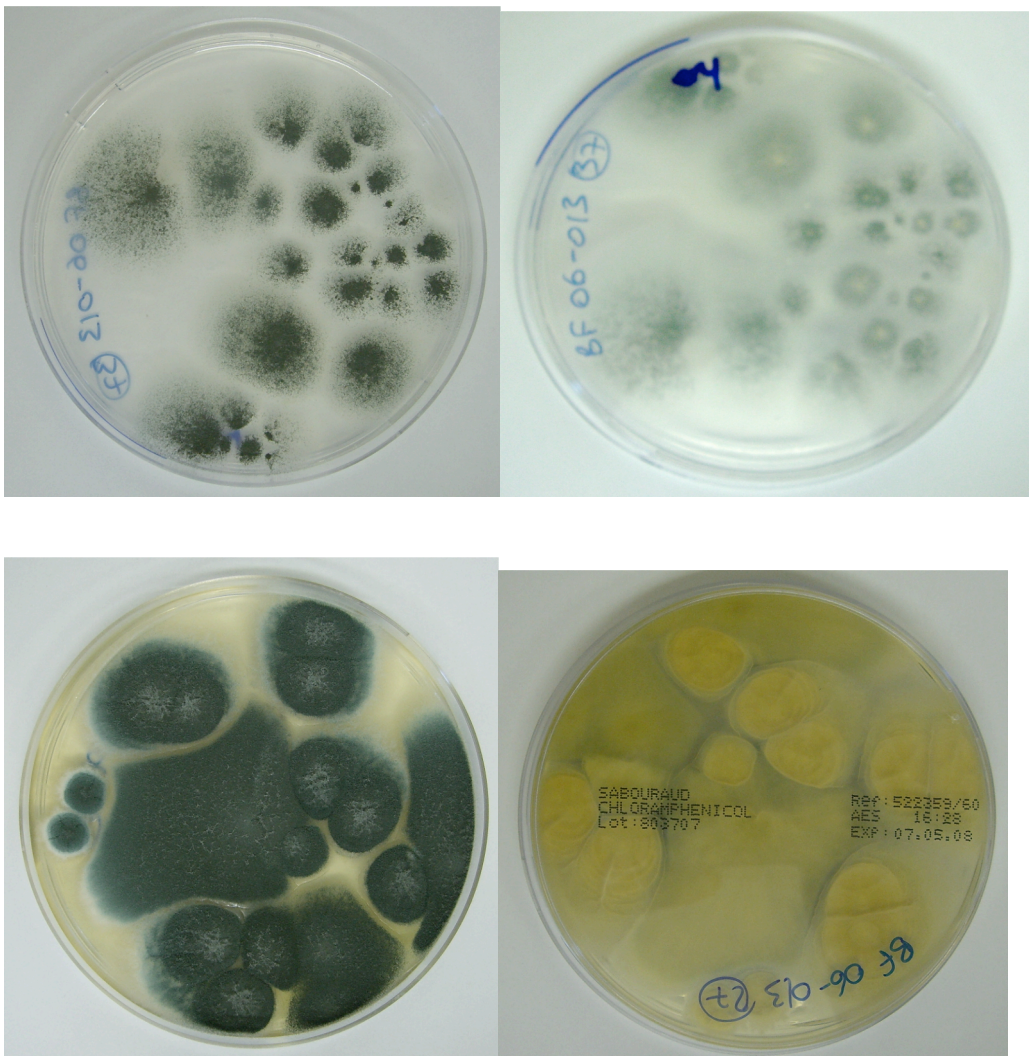


Figure 9. Aspect macroscopique d'*A. fumigatus*
Sur milieu à l'érythritol (A) et milieu Sabouraud-chloramphénicol (B); culture des colonies (peu nombreuses) sur la boîte (gauche) et au revers (droite)

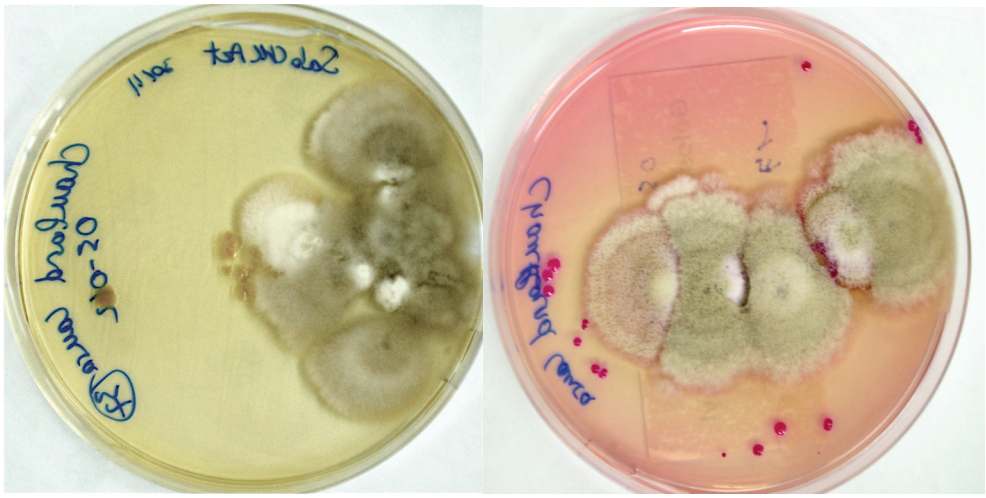


Figure 10. Aspect macroscopique de *Scedosporium apiospermum*
Sur milieu à l'Actidione® à droite et milieu au Bénomyl à gauche (peu nombreuses colonies)

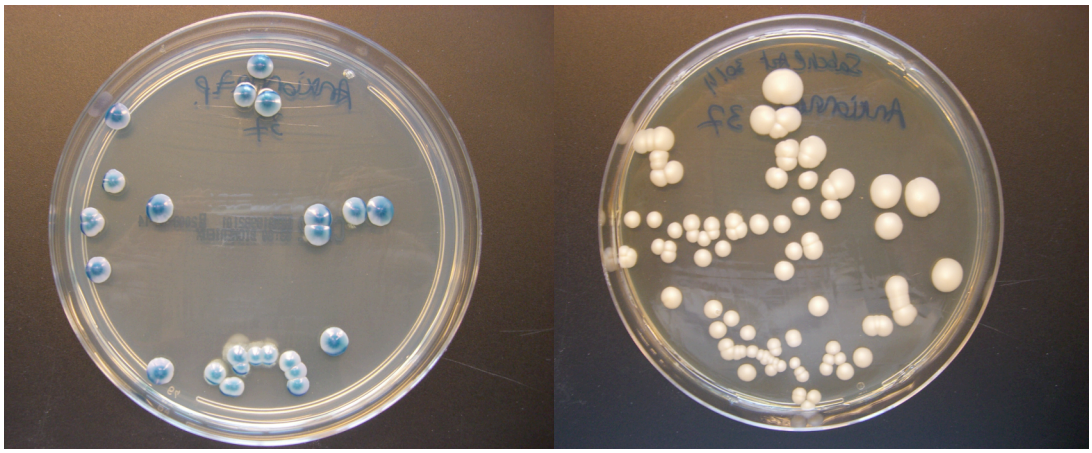


Figure 11. Aspect macroscopique de *Candida albicans*
Sur milieu à chromogène CAN2 à droite (peu nombreuses colonies) et milieu à l'Actidione® à gauche (assez nombreuses colonies)

1.1.3 Examen microscopique des colonies fongiques

L'observation à la loupe binoculaire permet de visualiser rapidement les fructifications et permet d'orienter vers le genre de micromycètes.

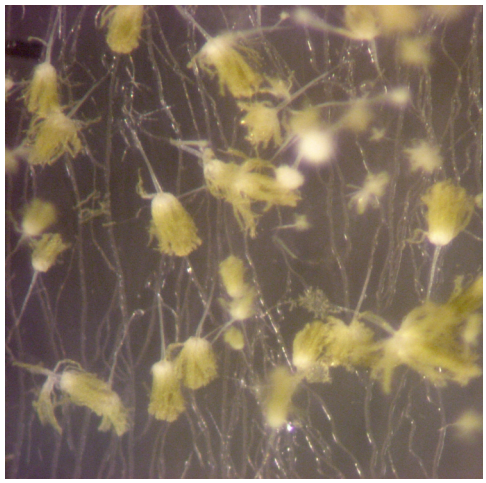


Figure 12. Têtes aspergillaires sur milieu Erythritol à la loupe binoculaire

L'identification se fait ensuite au microscope : un petit morceau de scotch® est appliqué par sa face collante sur la colonie à l'aide d'une pince, puis déposé sur une lame avec une goutte de bleu au lactophénol ; le tout est recouvert d'une lamelle et observé au microscope.

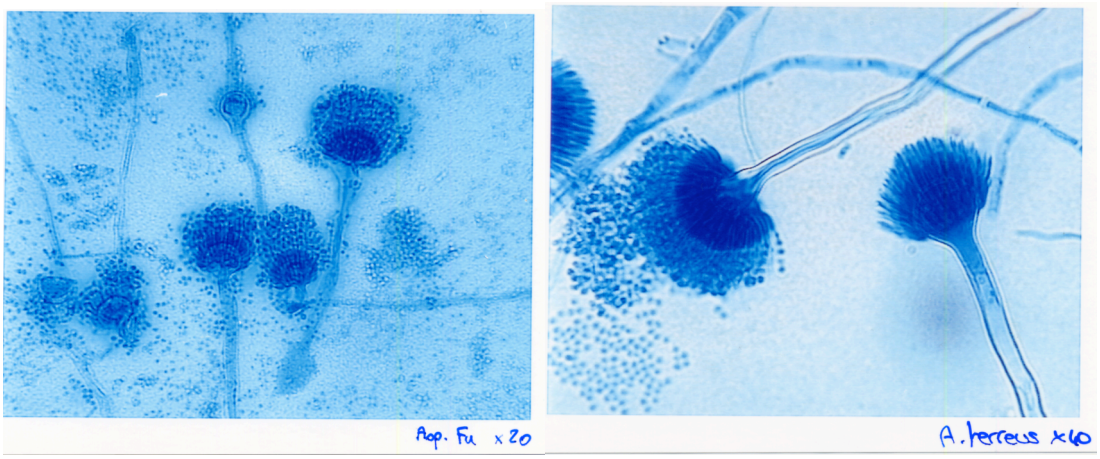


Figure 13 (à gauche) : *Aspergillus fumigatus* coloré au bleu de lactophénol
(objectif x20)

Figure 14 (à droite) : *Aspergillus terreus* coloré au bleu de lactophénol
(objectif x40)

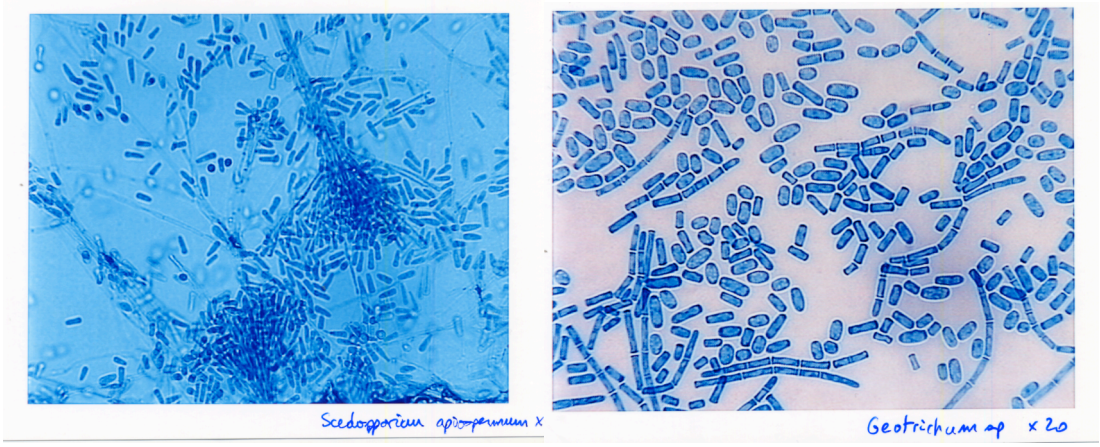


Figure 15 (à gauche) : *Scedosporium apiospermum* coloré au bleu de lactophénol
(objectifX40)
Figure 16 (à droite) : *Geotrichum sp* coloré au bleu de lactophénol
(objectif x20)

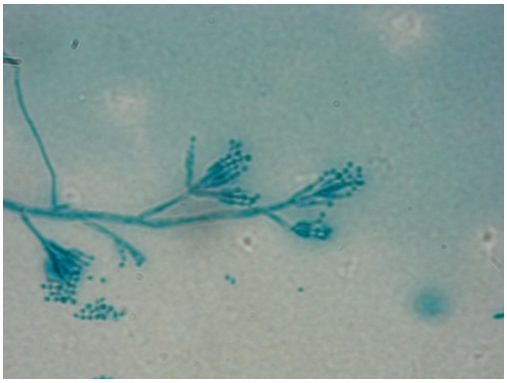


Figure 17. *Penicillium sp* coloré au bleu de lactophénol
(objectif x20)

1.1.4 Détermination de la sensibilité aux antifongiques

Elle se fait par la méthode E-Test sur les colonies isolées d'*Aspergillus sp*, de *S. apiospermum* et sur certaines espèces plus rarement isolées (Mucorales et *Fusarium*) mais n'est pas déterminée sur les filamenteux « contaminants » comme les *Penicillium sp*. L'ensemencement se fait sur milieu RPMI® avec une solution saline 0,9% NaCl contenant 0,5 McFarland (soit environ 10^5 spores par mL) de spores fongiques. Lorsqu'une bandelette E-test est appliquée sur la surface de la gélose ensemencée, le gradient de l'antifongique est immédiatement transféré dans la matrice de l'agar. Après une période d'incubation de 48h, une ellipse d'inhibition symétrique centrée le long de la bandelette est formée. La CMI est lue directement à partir de l'échelle de graduation (Figures 18 et 19). Elle est exprimée en µg/mL au point ou l'ellipse croise la bandelette. La sensibilité à six antifongiques est déterminée: amphotéricine B, itraconazole, voriconazole, posaconazole, caspofungine et anidulafungine.

La lecture de la CMI se fait à 100% d'inhibition pour l'amphotéricine B. Pour les azolés et les échinocandines qui sont fongistatiques, il ne faut pas tenir compte des microcolonies poussant sur tout le milieu ; c'est le changement de morphologie des colonies qui donnent la valeur de la CMI et la lecture se fait à 80% d'inhibition (Tableau VII).

Antifongiques	Action antifongique	**CMI (µg/mL)**		
		Sensible	Sensible Dose Dépendant	Résistant
Amphotéricine B	fongicide	< 1	≥ 1 et ≤ 2	< 2
Itraconazole	fongistatique	≤ 0,125	> 0,125 et < 1	≥ 1
Voriconazole	fongistatique	< 1	≥ 1 et < 4	≥ 4
Posaconazole	fongistatique	?	?	?
		CMI basse		CMI haute
Casponfungine	fongistatique	< 0,25		> 1
Anidulafungine	fongistatique	?		?

Tableau VII. Interprétations des sensibilités aux différents antifongiques testés en fonction des CMI

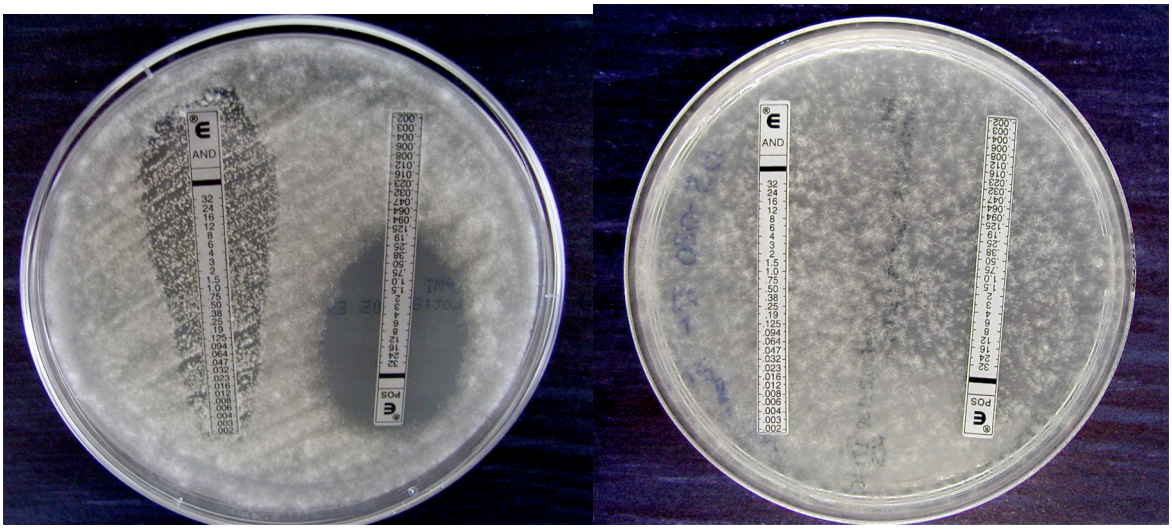


Figure 18 (à gauche) Antifongigramme d'*Aspergillus fumigatus* sur milieu RPMI
L'anidulafungine est sensible avec une trace de microcolonies puisqu'il s'agit d'un fongistatique. Le posaconazole est fongistatique cependant le phénomène de pousse n'est pas observé et la CMI est bien délimitée.

Figure 19 (à droite) Antifongigramme de *Fusarium sp* sur milieu RPMI
L'anidulafungine et le posaconazole ont des CMI >32 mg/L et n'ont pas d'action inhibitrice *in vitro* sur ce filamenteux.

1.2 Sérologie fongique

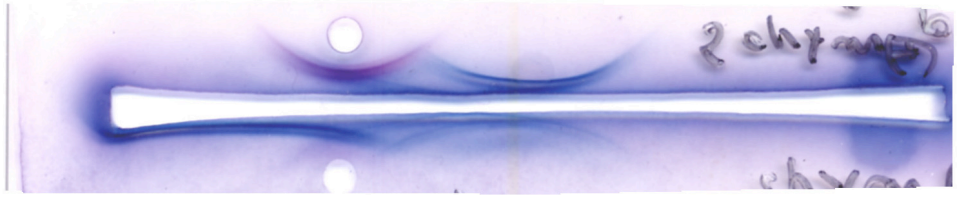
1.2.1 ELISA

La recherche d'immunogloblines IgG anti-*Aspergillus fumigatus* se fait par méthode ELISA (Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay). Le laboratoire utilise une technique non commercialisée mise au point depuis de nombreuses années en parallèle à la préparation des antigènes aspergillaires. Le seuil de positivité est à 0,45 et le seuil de spécificité est à 0,6 pour *A. fumigatus*. Cependant, la positivité dans le contexte de mucoviscidose où les contacts avec les micromycètes sont fréquents, un seuil de spécificité de 1 est plus indiqué.

1.2.2 IEP

Il s'agit de la mise en évidence de complexes immuns précipitants par immuno-électrophorèse (IEP), la plupart étant lié aux IgG. Les antigènes natifs permettent la recherche sur ces complexes immuns des activités catalasiques et chymotrypsiques. Les détections de précipitines se font vis-à-vis de 5 espèces *d'Aspergillus* : *A. fumigatus, A. flavus, A. nidulans, A. terreus, A. niger*. Seuls les antigènes d'*A.fumigatus* sont préparés au laboratoire pour assurer une meilleure

standardisation et contrôle de leur qualité diagnostique. Les autres antigènes sont obtenus à partir de fractions lyophilisées et commercialisées par le Laboratoire Biorad®. Les catalases sont des enzymes fongiques soit pariétale (une catalase) soit cytoplasmiques (deux catalases) et sécrétées dans le milieu de culture. Elles constituent un système de défense contre les substances oxydantes. La chymotrypsine est une protéase sécrétée par le champignon pour lyser les tissus permettant une plus grande dissémination, elle traduit la présence de mycélium et constitue aussi un marqueur d'infectiosité. La présence ou l'absence d'anticorps dirigés contre ces enzymes est bien corrélée avec une aggravation ou une amélioration clinique (28) (Tableau VIII). La lecture des lames notera la présence ou l'absence d'arc de précipitation ainsi que la présence d'une activité enzymatique (Figure 20). Les antigènes chymotrypsiques ont aussi une très forte spécificité d'espèce.



A

B

Figure 20. Précipitines aspergillaires observées en immuno-électrphorèse
Sur la partie supérieure (A) on observe 4 arcs de précipitation détectant des précipitines anti-*Aspergillus fumigatus*. Sur la partie inférieure (B), on détecte 5 arcs de précipitation anti-*Aspergillus flavus.* L'arc coloré en rose met en évidence une activité chymotrypsique sur les complexes immuns d'*Aspergillus fumigatus* et *flavus*.

	ELISA (IgG)	IFI, HAI	IEP	IgE (totales et spécifiques)	Ag (mannanes, glucanes)	ADN circulant
Asthme aspergillaire	+	-	-/+	+++	-	-
ABPA	+++	+	++	+++	-	-

Tableau VIII. Différences sérologiques entre l'asthme aspergillaire et l'ABPA
Les IgE sont présentes dans les deux pathologies, mais les IgG sont mis en évidence à taux très élevés dans l'ABPA, en particulier en ELISA.

Tous les champignons filamenteux obtenus après cultures sont conservés sur tube de Sabouraud-chloramphénicol constituant ainsi une mycothèque. Tous les sérums sont conservés à -20°C. Les expectorations dans le cadre de ce PHRC sont aussi, après utilisation technique, conservées à -20°C.

2. Dosage des Immunoglobulines E sériques spécifiques et totales

2.1 Dosage des IgE sériques totales par immunoprécipitation sur immunonéphélomètre BN II Dade Behring

Ces analyses sont effectuées au département de Biologie Intégrée (DBI).

2.1.1 Principe du dosage

Dans une réaction immunochimique, les anticorps IgE dans le sérum forment avec des anticorps spécifiques fixés sur des billes de latex des complexes immuns précipitants. Le signal de mesure est obtenu par néphélométrie : la déviation de la lumière par ces complexes est proportionnelle à la concentration des IgE et est comparée par rapport à un standard dont la concentration en IgE est connue.

2.1.2 Domaine de référence et sensibilité analytique du test

La concentration d'IgE dans le sérum de sujets cliniquement sains, couvre un large domaine de répartition et ne suit aucune répartition normale. La concentration d'IgE dans le sérum des enfants est fortement corrélée à l'âge et atteint les valeurs adultes entre 7 et 10 ans environ. Entre 10 et 15 ans, les valeurs sont plus élevées. On peut considérer qu'une concentration sérique d'environ 100 kUI /L correspond à la limite supérieure du domaine de référence chez l'adulte (Tableau IX).

La sensibilité est déterminée par la limite inférieure de la gamme d'étalonnage. Elle se situe aux environs de 0,05 kUI/L.

Age	Seuil d'IgE totales (kUI/L)
Cordon	0,9
1-6 mois	15
6-12 mois	20
1-2 ans	30
2-4 ans	45
4-6 ans	60
6-8 ans	100
8-12 ans	100
Adultes	100

Tableau IX. Seuils supérieurs de normalité des IgE totales en fonction de l'âge

2.2 Dosage des Immunoglobulines E spécifiques anti-*Aspergillus fumigatus* par immunoanalyse sur appareillage Unicap PhaDia

2.2.1 Principe du dosage

Il s'agit d'une technique immunoenzymatique. L'allergène à doser est couplé par covalence au support solide immunocap et réagit avec les IgE spécifiques présents dans le sérum du patient. Ce complexe est révélé par un conjugué anticorps anti-IgE couplé à une enzyme. Un substrat est ajouté et est transformé en composé fluorescent. Après arrêt de la réaction, la fluorescence de l'éluat est mesurée. Le signal est directement proportionnel à la quantité d'IgE spécifique dans le sérum à doser. Pour standardiser les résultats du test, les réponses obtenues sont converties en concentration arbitraire grâce à une courbe de calibration étalon obtenue avec des échantillons de référence de composition connue en IgE spécifiques testé dans les mêmes conditions. Les différents sérums étalons sont fournis par le constructeur.

2.2.2 Performance analytique

La réactivité croisée avec d'autres immunoglobulines humaines est inexistante aux conditions physiologiques d'IgG, IgA, IgM et IgD.
La sensibilité analytique du test est de 0,35 kUI/L et les valeurs chez des sujets sains sont <0,35 kUI/L.

2.2.3 Interprétation des taux d'IgE spécifiques

Jusqu'en 2006, les résultats du dosage d'IgE spécifiques (en kUI/L) pouvaient être interprétés à l'aide d'un classement selon l'intensité de l'allergie. Les classes allaient de 0 à 6 :

- Classe 0 : taux d'IgE spécifiques indétectable <0,35 kUI/L
- Classe 1 : taux d'IgE spécifiques faible 0,35-0,7 kUI/L
- Classe 2 : taux d'IgE spécifiques modéré 0,7-3 ,5 kUI/L
- Classe 3 : taux d'IgE spécifiques élevé 3,5-17,5 kUI/L
- Classe 4 : taux d'IgE spécifiques très élevé 17,5-50 kUI/L
- Classe 5 : taux d'IgE spécifiques très élevé 50-100 kUI/L
- Classe 6 : taux d'IgE spécifiques très élevé >100 kUI/L

Pour des problèmes de standardisation internationale des antigènes utilisés par cette technique, le résultat ne peut plus être rendu en classe mais en valeur précise (kUI/L).

Il existe une autre technique de dosage des IgE anti-aspergillaires par la technique RAST : Radio Allergo Sorbent Test. C'est un dosage des IgE spécifiques dirigés contre un allergène utilisant un marqueur radioactif pour la détection du complexe formé. Cette technique n'est plus utilisée au CHU de Grenoble.

3. Dosage des polynucléaires éosinophiles

Le dosage des polynucléaires éosinophiles (PNE) se fait au Laboratoire d'Hématologie du CHU de Grenoble sur l'automate Coulter LH750 Analyzer. Cet automate permet un comptage après une analyse morphologique des différentes cellules sanguines : érythrocytes, leucocytes et plaquettes.

4. Examen cytobactériologique des expectorations

L'étude bactériologique des expectorations est indispensable au suivi des patients dans la mucoviscidose et s'effectue au Laboratoire de Bactériologie-Virologie du CHU de Grenoble.

5. Données cliniques obtenues à la consultation

5.1 Score de Shwachman et Kulczycki

Ce score utilisé dans l'étude Mucofong permet de déterminer l'état clinique des patients en fonction de données cliniques, nutritionnelles, radiologiques et de l'activité des patients (Annexe 2).

5.2 Fonction respiratoire

5.2.1 Épreuve fonctionnelle respiratoire

La fonction pulmonaire doit être régulièrement surveillée à l'aide des explorations fonctionnelles respiratoires (EFR). Cela permet d'évaluer la gravité de l'atteinte respiratoire et de suivre son évolution au cours du temps. Elles permettent de mesurer notamment la capacité vitale forcée (CVF) et le volume expiratoire maximum seconde (VEMS). Les résultats sont exprimés en pourcentage de la valeur attendue pour l'âge (fonction de la taille et du poids de l'enfant).

5.2.2 Échelle de dyspnée de Sadoul

Elle est utilisée pour typer la dyspnée de chaque patient :

- Stade 0 : dyspnée pour les efforts soutenus (montée de 2 étages).
- Stade 1 : dyspnée lors de la marche rapide ou en pente.
- Stade 2 : dyspnée à la marche sur terrain plat en suivant quelqu'un de son âge ou obligeant à s'arrêter pour reprendre son souffle.
- Stade 3 : dyspnée obligeant à s'arrêter pour reprendre son souffle après quelques minutes ou une centaine de mètres sur terrain plat.
- Stade 4 : dyspnée au moindre effort de la vie courante (habillage, déshabillage). Trop essoufflé pour quitter le domicile.

RESULTATS

Les inclusions entre les différents centres étaient coordonnées et suivies par le CHU de Lille. Les centres participants étaient régulièrement informés par « newsletter » du nombre de patients inclus pour chaque centre. Les calculs statistiques ont été réalisés à l'aide du test de Fisher et du test de Student pour la comparaison des moyennes, et du test du Chi^2 pour la comparaison des fréquences.

1. Inclusions à Grenoble

62 patients ont été inclus au CHU de Grenoble : 49 au CRCM adulte et 13 au CRCM pédiatrique. Les inclusions se sont déroulées du 2 Novembre 2007 au 27 Mai 2008. Le sexe ratio est de 1. La plupart des patients sont de jeunes adultes, la moyenne d'âge est de 23 ans. Le plus jeune a 6 ans et le plus âgé 56 ans (Figure 21).

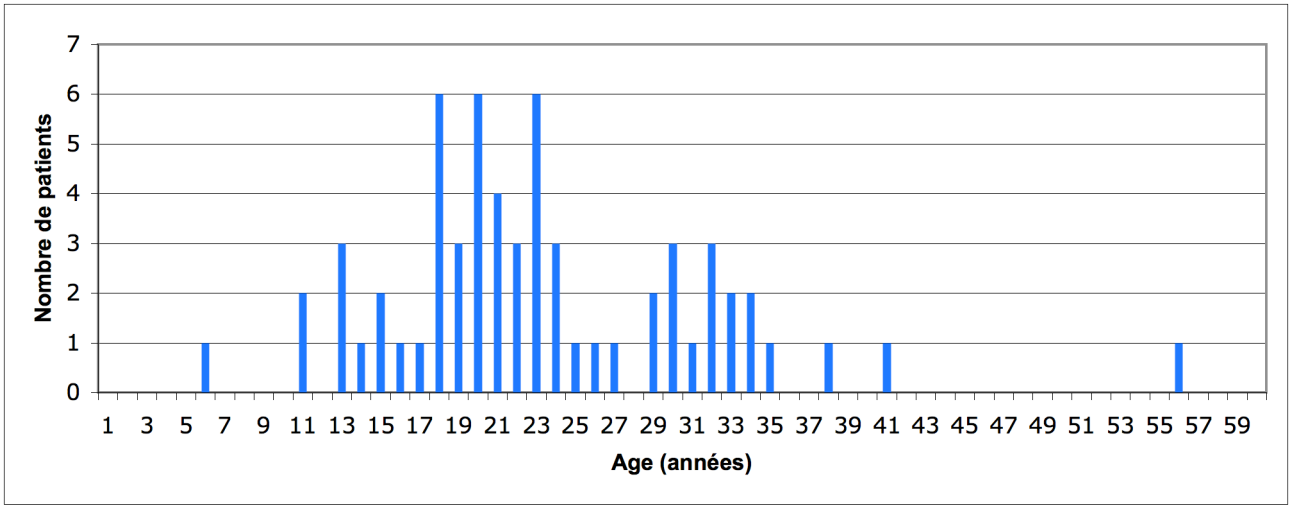


Figure 21. Répartition des patients inclus au CHU de Grenoble en fonction de l'âge au moment de l'inclusion

Les inclusions sur les autres centres sont représentées dans le Tableau X. 290 patients ont été inclus au total dans l'étude Mucofong.

N° de centre	Ville	Nombre d'inclus (04/08)	Nombre d'inclus (05/08)	Nombre d'inclus (06/08)	Nombre d'inclus (07/08)	Nombre d'inclus (09/08)	Nombre d'inclus (10/08)
01	Lille	41	47	48	54	58	58
02	Lille	5	7	7	8	10	10
03	Dunkerque	12	13	13	14	14	14
04	Dunkerque	15	16	17	19	20	20
05	Grenoble	44	49	49	49	49	49
06	Grenoble	8	8	12	13	13	13
07	Bordeaux	17	18	20	22	23	23
08	Bordeaux	4	6	6	7	7	7
09	Angers	8	9	9	10	10	10
10	Angers	11	11	11	11	11	11
11	Dijon	13	13	15	16	17	17
12	Dijon	12	13	13	14	18	18
13	Rouen	10	16	20	26	27	32
14	Rouen	5	5	7	8	8	8
	TOTAL	204	229	245	271	285	290

Tableau X. Suivi des inclusions dans les sept centres participant au PHRC « Mucofong »
Centres avec des numéros pairs : CRCM enfants
Centres avec des numéros impairs : CRCM adultes

2. Épidémiologie fongique : résultat des cultures mycologiques

Sur les 62 patients inclus, 56 expectorations ont pu être obtenues. Certains patients n'ayant pas eu de bilan au moment de l'inclusion, une visite supplémentaire a été utilisée pour avoir au moins un bilan mycologique complet. D'autres patients sont non expectorants.

Les cultures ont permis de mettre en évidence des champignons filamenteux dans 62,5% des expectorations (35 sur 56). Pour les 37,5% des expectorations sans filamenteux, les cultures sur les différents milieux ont été entièrement négatives au plan mycologique pour 79% d'entre elles et *Candida albicans* a été isolé sur 21% de ces expectorations. (Figures 22 à 25). Les expectorations étant faites sans lavage préalable des voies aériennes supérieures, la présence de ces levures peut correspondre à une contamination oro-pharyngée.

Le genre *Aspergillus* est retrouvé dans 42,8% des cultures (23 sur 56). Parmi les cultures positives en filamenteux, le genre *Aspergillus* est présent dans 65,7% (23 sur 35) et l'espèce dominante est *A. fumigatus* (91,8% du genre). Ce micromycète peut être seul à coloniser le tractus pulmonaire (16,1%) ou être associé avec d'autres espèces aspergillaires (*A. flavus* 8,9%, *A. terreus* 1,8%) ou avec d'autres filamenteux (*Penicillium sp* 8,9%, *Scedosporium apiospermum* 3,6%).

Chez 3 patients *S. apiospermum* a été mis en évidence dans les expectorations soit 5,4% des prélèvements, et cette espèce était associée à *A. fumigatus* chez deux patients.

Les champignons filamenteux peu ou non pathogènes (*Penicillium sp*) ou présents en très faible quantité (*Fusarium sp*, *Mucor sp*) sont présents dans 17,9% des expectorations. Ces mycètes sont abondants dans l'environnement et des spores peuvent être retrouvées dans les voies aériennes supérieures. Ces champignons seront considérés comme « contaminants ».

Sur les 35 expectorations contenant des champignons filamenteux seulement 6 retrouvaient des filaments mycéliens à l'examen direct. Cet examen est assez rapide, mais ce résultat montre la sensibilité médiocre de ce dernier par rapport à la culture.

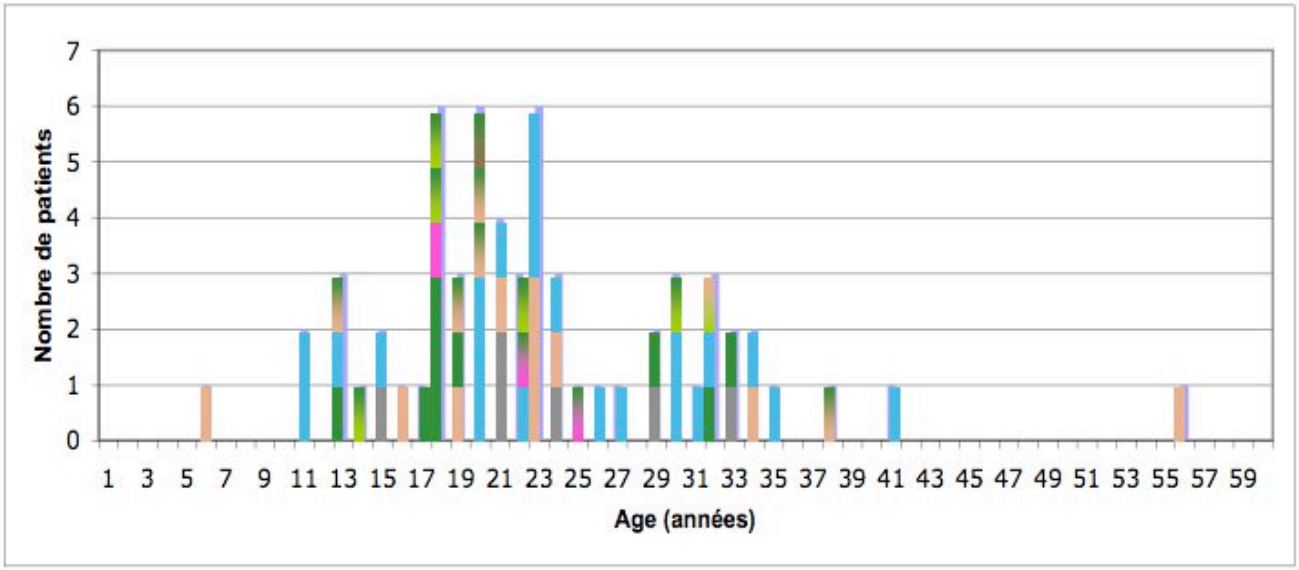


Figure 22 . Répartition des différentes espèces fongiques en fonction de l'âge des patients

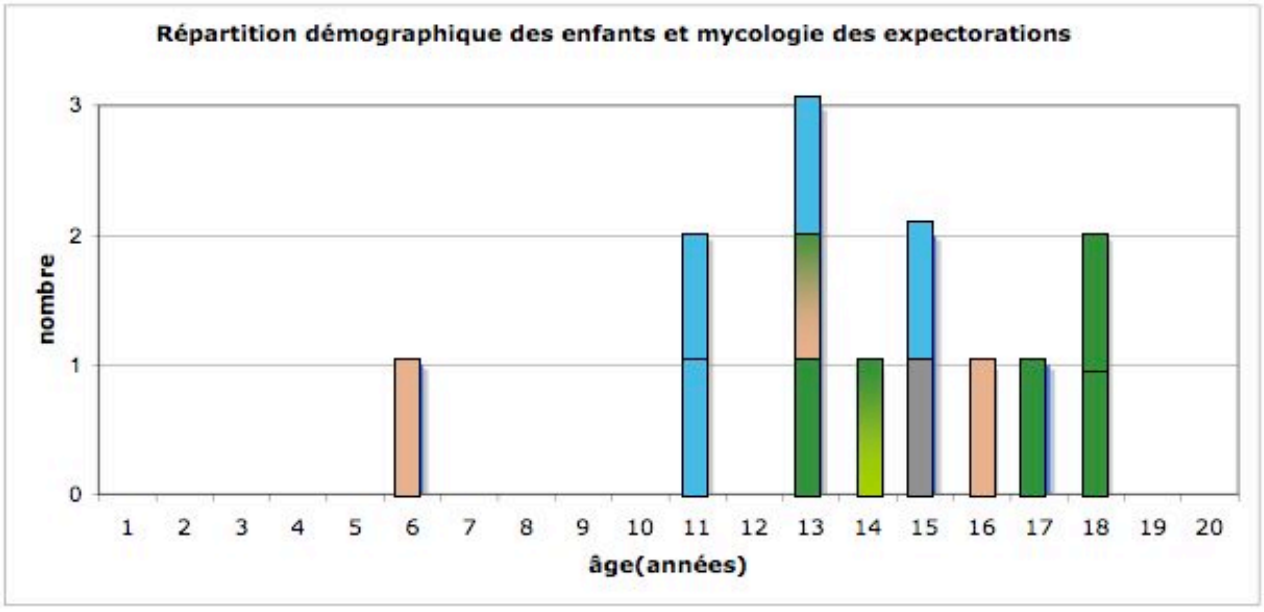


Figure 23. Répartition des différentes espèces fongiques en fonction de l'âge des patients chez les enfants

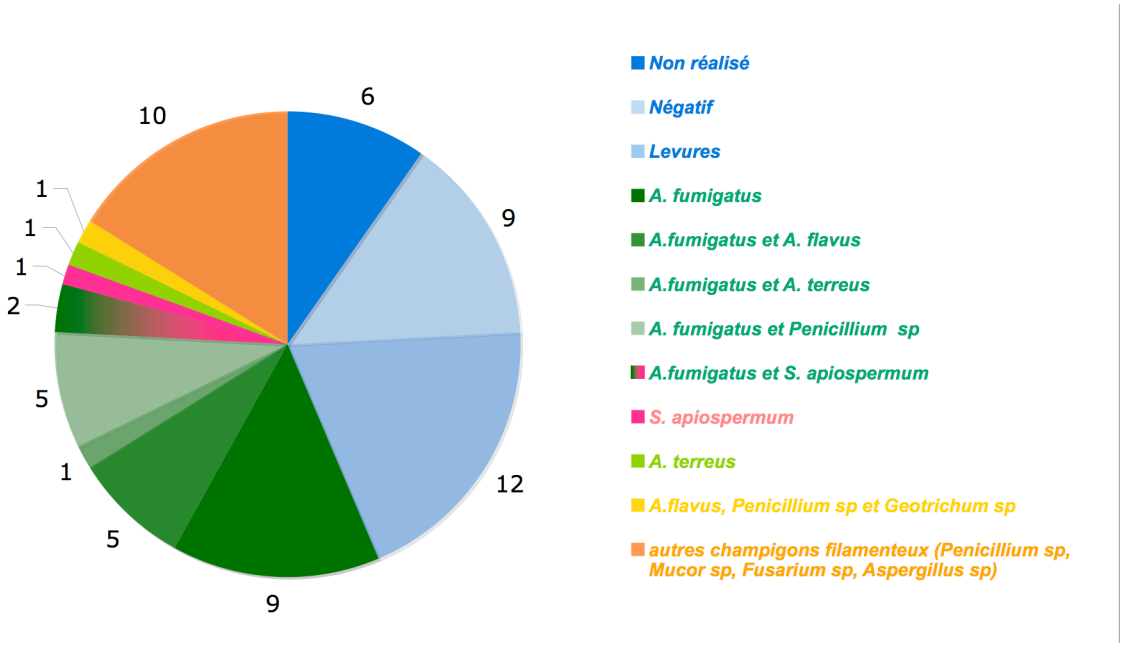


Figure 24. Résultats des cultures mycologiques pour les 62 patients

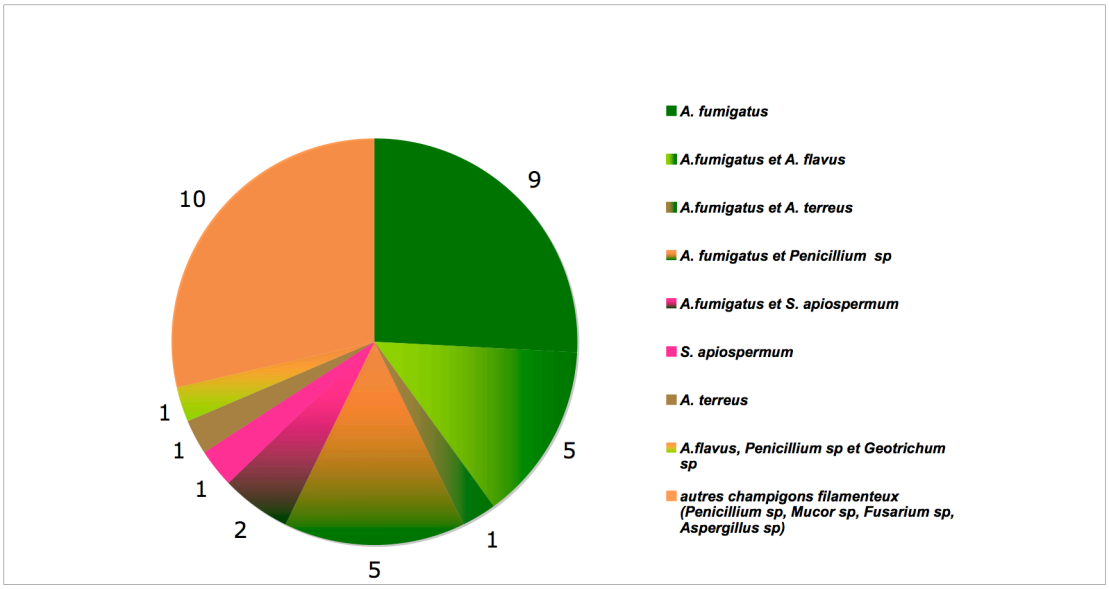


Figure 25. Répartition des champignons filamenteux présents dans les 35 expectorations positives

3. Comparaison des milieux de culture utilisés pour isoler les champignons filamenteux

Aucune espèce aspergillaire ne pousse sur milieu Bénomyl. La détection de *S. apiospermum* est possible sur le milieu Actidione® et sur le milieu Bénomyl.

La température d'incubation à 27°C met en évidence plus de champignons filamenteux, mais ceux-ci sont plus souvent des « contaminants» (Tableau XI). Le milieu à l'érythritol met en évidence un plus grand nombre d'*Aspergillus*, mais ceux-ci ont une culture plus lente et altérée. La reconnaissance microscopique nécessaire à l'identification s'avère beaucoup plus difficile. Les colonies fructifient en 6 jours pour tous les champignons isolés, excepté pour un *Penicillium*.

35 cultures de filamenteux	CAN2 37°C	Actidione® 37°C	Bénomyl 37°C	Erythritol 37°C	Actidione® 27°C	Erythritol 27°C	Sabouraud 27°C
Détection *Aspergillus*	10	12	0	14	10	18	12
Détection *Scedosporium*	2	3	2	1	3	2	2
Détection « contaminants »	2	0	1	2	1	2	6

Tableau XI. Nombre de cultures positives à *Aspergillus sp*, à *Scedosporium sp* ou à d'autres filamenteux selon les milieux de culture utilisés

4. Comparaison du milieu et de la méthodologie appliquée en routine par rapport aux résultats de l'étude Mucofong

Le Laboratoire de Mycologie du CHU de Grenoble utilise deux milieux pour la culture des expectorations : une boîte CAN2 à 37°C et un tube Sabouraud-chloramphénicol à 27°C.

Sur les 62 patients inclus, 14 prélèvements n'ont pas été techniqués (pas d'expectoration effectuée ou pas de demande de mycologie en routine). Sur les 48 échantillons restants, 59% ne montrent pas de différence, une espèce a été détectée uniquement en routine (1 colonie d'*A. nidulans* non retrouvé sur les milieux Mucofong) et 39% des expectorations ne sont positives qu'après ensemencement sur l'ensemble des milieux « Mucofong « (14% de colonies aspergillaires dont 6 *A. fumigatus*, 1 *A. flavus* et 1 *A. terreus*), 1 *S. apiospermum*, 23% de « contaminants » (8 *Penicillium sp*, 1 *Fusarium sp*, 1 *Mucor sp*, 1 *Aspergillus sp* de l'environnement).

Cependant, il est nécessaire de souligner que l'ensemencement pour culture fongique en routine hospitalière n'est pas fait avec une quantité définie de prélèvement. Les procédures sont plus rigoureuses lors de cette étude en ensemençant sur tous les milieux 10µL d'échantillon homogénéisé, ce qui permet une meilleure comparaison entre les différents milieux utilisés, entre les périodes de prélèvements au cours du suivi mycologique et entre les divers centres participant à cette étude épidémiologique.

5. Sensibilité *in vitro* aux antifongiques

Les antifongiques de la famille des azolés montrent une bonne activité sur toutes les espèces aspergillaires isolées dans l'étude. La sensibilité à l'itraconazole est en général « sensible dose dépendante» ; le voriconazole ainsi que le posaconazole ont une bonne activité. 4 isolats d'*A. fumigatus* ont des CMI intermédiaires à l'amphotéricine B. *A. terreus* et *A. flavus* sont résistants *in vitro* à cette molécule. Les échinocandines en particulier la nouvelle molécule, l'anidulafungine, montrent une excellente efficacité *in vitro* sur tous les isolats d'*Aspergillus* (Tableau XII et Figure 26).

S. apiospermum a un profil de sensibilité différent d'*A. fumigatus*. Il est naturellement résistant à l'amphotéricine B et peut présenter des profils de

résistance extrêmement variables aux autres antifongiques selon les isolats. Les trois souches de *S. apiospermum* isolées sont résistantes à l'amphotéricine B et à l'anidulafungine. En revanche, la sensibilité *in vitro* à la caspofungine et aux azolés est plus hétérogène et amplement dépendante des isolats testés.

Fusarium sp et *Mucor sp* ont une résistance élevée à l'ensemble des antifongiques actuellement utilisés en thérapeutique. Une attention particulière sera nécessaire au cours du suivi pour distinguer une présence transitoire ou permanente de ces espèces particulièrement redoutables en cas d'immunodépression.

espèces	nombre	Itraconazole	AmphoB	Caspofungine	Voriconazole	Posaconazole	Anidulafungine
Aspergillus fumigatus	22	15SDD 5S, 2NR	4I 18S	22CMIb	22S	21CMIb 1NR	21CMIb 1NR
Aspergillus flavus	6	4SDD 2S	1R 5I	6CMIb	6S	5CMIb 1NR	5CMIb (dont 1 avec colonies R), 1NR
Aspergillus terreus	2	1SDD 1S	2R	2S	1CMIi et 1S	2CMIb	2CMIb
Scedosporium apiospermum	3	1R 2SDD	3R	3S	2R 1S	1CMIh 2CMIb	3R
Fusarium	1	R	R	R	R	R	R
Mucor sp	1	R	S	R	S	R	R

Tableau XII. Résultats des antifongigrammes selon les espèces de champignons filamenteux (S=sensible, SDD =sensible dose dépendant, I=intermédiaire, R=résistant ; NR= non rendu par croissance difficile du champignon).

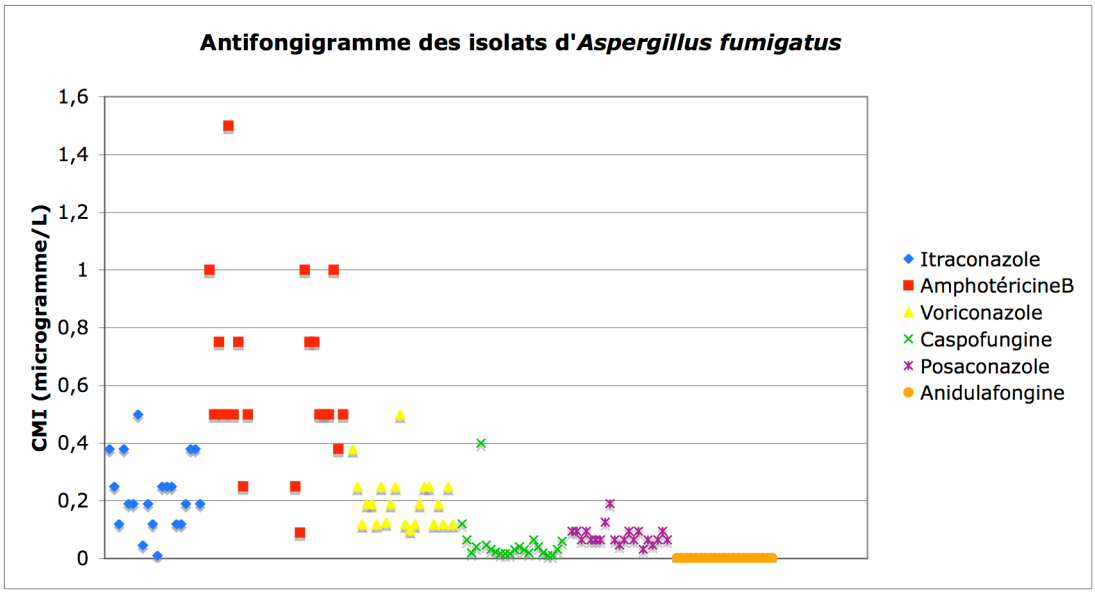


Figure 26. Résultats des antifongigrammes des différents isolats d'*Aspergillus fumigatus*

6. Comparaison des cultures mycologiques et des cultures bactériologiques

Sur les 62 patients inclus dans l'étude Muconfong, 56 ont eu en parallèle un examen cytobactériologique des expectorations.

Selon les résultats des cultures, quatre groupes de patients on été définis (Tableau XIII) : ceux qui sont colonisés par des espèces aspergillaires uniquement, ceux qui sont colonisés par *P. aeruginosa* uniquement, ceux étant colonisés par les deux micro-organismes et ceux ayant des cultures négatives pour ces deux micro-organismes. Pour chaque groupe, la capacité respiratoire et l'état clinique des patients ont été comparés tout en tenant compte des différents antécédents de traitements antibiotiques et antifongiques.

Cependant, certains critères des différents groupes ont des écart-types trop grands pour être comparés d'après le test de Fischer. Les espèces isolées en culture des 56 expectorations au cours de cette phase d'inclusion comprennent *A. fumigatus*, *A. flavus* et *A. terreus.* Les capacités respiratoires (CVF et VEMS) ont été comparées dans les quatre groupes. 12 patients ne sont colonisés que par *A.fumigatus* et ils présentent un score de Shwachman plus élevé ($p<0,05$). Les 28 patients colonisés par *P. aeruginosa* ont un score de Shwachman plus faible mais aucune différence significative ne peut être démontrée sur l'altération de la fonction respiratoire par la présence concomittante d' *Aspergillus sp* et de *P. aeruginosa* ($p=0,3$).

	Aspergillus sp	***P. aeruginosa***	***Aspergillus sp* et *P. aeruginosa***	**Cultures négatives pour *Aspergillus* et *P. aeruginosa***	**p**
Nombre	12	16	12	16	/
CVF (%)	87,17 ± 19,13	64,56 ± 29,56	69,58 ± 13,57	76,25 ± 25,82	/
VEMS (%)	74,83 ± 20,58	48,13 ± 25,28	50,92 ± 16,01	63,38 ± 31,83	/
Shwachman	70,17 ± 15,25	59,00 ± 17,12	61,58 ± 17,02	67,94 ± 20,08	<0,05

Tableau XIII. Fonction respiratoire et taux d'IgE totales regroupés en fonction de la colonisation bactérienne ou fongique

7. Patients de l'étude susceptibles d'avoir une ABPA

Une exacerbation due à l'ABPA a été diagnostiquée chez deux patients à l'inclusion. En revanche, plus de la moitié des patients inclus ont eu des antécédents d'ABPA ou une suspicion d'ABPA au cours des dernières années. Les critères biologiques ne sont pas forcément présents au même moment, ainsi sur les deux patients pour lesquels le diagnostic d'ABPA a été posé, l'un d'entre eux avait tous les critères diagnostiques et l'autre avait tous les critères sauf un taux d'IgE totales de 153 UI/mL mais ce patient était sous corticothérapie per os (Tableau XVI).

Trois patients étaient traités par antifongiques pour une ABPA possible à l'inclusion mais le diagnostic formel n'a été retenu que pour un patient car les deux autres patients ne présentaient pas de critères cliniques et biologiques de l'ABPA.

Sept patients (5 adultes et 2 enfants) rassemblent tous les critères diagnostiques de l'ABPA avec des paramètres biologiques très positifs (dont un diagnostic posé à l'inclusion): présence d'IgG spécifiques et de précipitines aspergillaires, taux d'IgE spécifiques >0,35 UI/mL et d'IgE totales > 1000 UI/mL associés à une dégradation clinique (Tableaux XIV et XV). Trois d'entre eux étaient colonisés par *A. fumigatus*. Deux n'ont pas eu de culture mycologique des expectorations et deux n'étaient pas colonisés. La présence de la moisissure est un élément indispensable à la sensibilisation allergique, mais celle-ci peut être antérieure à la consultation et les cultures ne sont pas systématiquement positives dans ce contexte en lien avec le développement d'une forte réponse immunologique. Six d'entre eux avaient des antécédents d'ABPA antérieurement à l'inclusion.

Age des patients	IgG ELISA (UI/mL)	IEP (arcs)	IgE spécifiques (UI/mL)	IgE totales (UI/mL)	Mycologie des expectorations	Critères cliniques : Sibilants, toux d'effort, expectorations…
27	1,07	2 et catalase +	>100	4930	0	+
18	4	5	30,6	1520	*A. fumigatus*	+
19	3,05	7	38,4	1580	*A. fumigatus* et *A.flavus*	+
33	0,91	2	63,4	2020	Non effectuée	+
21	1,88	7	25,6	1930	Non effectuée	+
11	1,26	2	41,9	4780	0	+
14	4	10	7,46	1510	*A. fumigatus* et *A.flavus*	+

Tableau XIV. Données biologiques des patients ayant tous les critères d'ABPA

Age des patients	ABPA ?	Exacerbation ?	Dyspnée (Sadoul)	Score de Shwachmann	CVF (%)	VEMS (%)	Présence de *P. aeruginosa* ?
27	ATCD	Non	0	80	99	89	Oui
18	ATCD	ABPA	I	55	74	46	Oui
19	ATCD	Non	I	84	73	61	Non
33	Non	Non	I	95	104	117	Non
21	ATCD	Non	I	85	100	77	Non
11	ATCD	Non	0	95	111	103	Non
14	ATCD	Non	I	55	74	65	Non

Tableau XV. Données cliniques des patients ayant tous les critères d'ABPA

Age des patients	IgG ELISA (UI/mL)	IEP (arcs)	IgE spécifiques (UI/mL)	IgE totales (UI/mL)	Mycologie des expectorations	Critères cliniques : Sibilants, toux d'effort, expectorations augmentées…
18	4	5	30,6	1520	*A. fumigatus*	+
13	3,17	5	7,25	153	*A. fumigatus*	+

ABPA ?	Exacer-bation ?	Dyspnée (Sadoul)	Score de Shwachman	CVF (%)	VEMS (%)	Présence de *P. aeruginosa* ?
ATCD	ABPA	I	55	74	46	Oui
ATCD	ABPA et autre	I	55	52	41	Non

Tableau XVI. Données biologiques et cliniques des patients diagnostiqués avec une ABPA à l'inclusion

Quatre patients présentaient des IgG spécifiques élevées mais des IgE spécifiques et totales inférieures aux seuils de spécificité. Trois d'entre eux étaient colonisés par *A. fumigatus.* Une bronchite aspergillaire pourrait être évoquée plutôt qu'une ABPA.

La première visite à l'inclusion regroupait des patients venant de la consultation au CRCM mais aussi des patients hospitalisés, la plupart du temps pour une cure d'antibiotiques par voie intra-veineuse. Les exacerbations sont le plus souvent

d'origine bactérienne même chez les patients colonisés par *Aspergillus* (Tableau XVII).

Mycologie des expectorations	ABPA ?	Excacerbation clinique ?
A. fumigatus, A. flavus, A. terreus, Scedosporium	16 ATCD ABPA ou évoquée 9 non évoquée	2 ABPA 16 sans exacerbation 7 exacerbations autres
Contaminants, levures, négatives	18 ATCD ABPA ou évoquée 13 non évoquée	Pas d'ABPA 20 sans exacerbation 11 exacerbations autres
Pas de culture	1 ATCD ABPA ou évoquée 5 non évoquée	6 sans exacerbation

Tableau XVII. Place des examens mycologiques dans les cas d'ABPA suspectée ou non ou lors des exacerbation cliniques
ATCD ABPA: antécédent de diagnostic d'ABPA dans l'historique médical du patient sans limitatio dans le temps.

La fonction respiratoire et le score de Shwachman de tous les patients inclus dans l'étude montrent une très grande hétérogénéité des valeurs pour une même tranche d'âge (Figures 27 à 29).

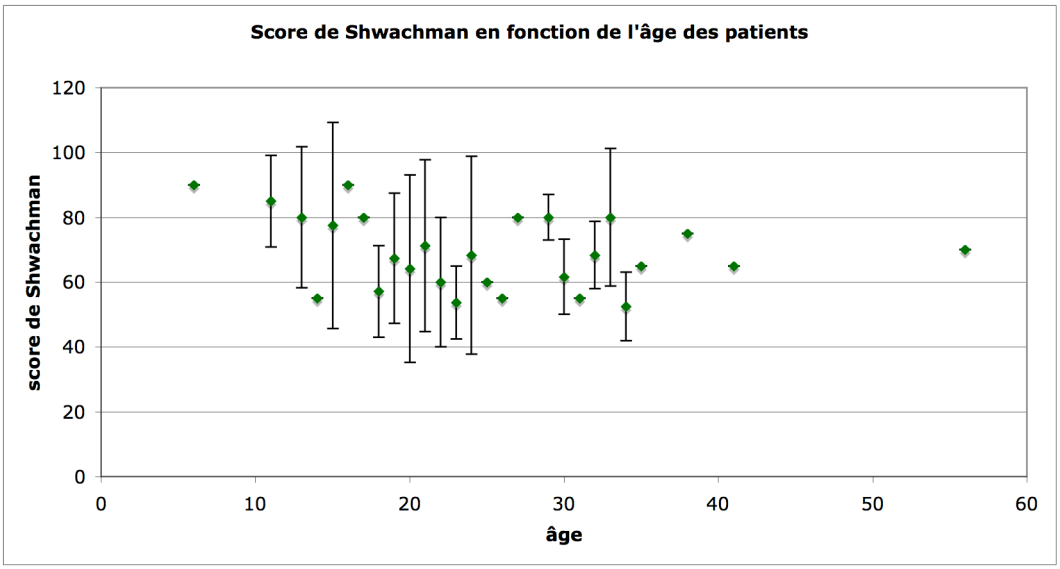
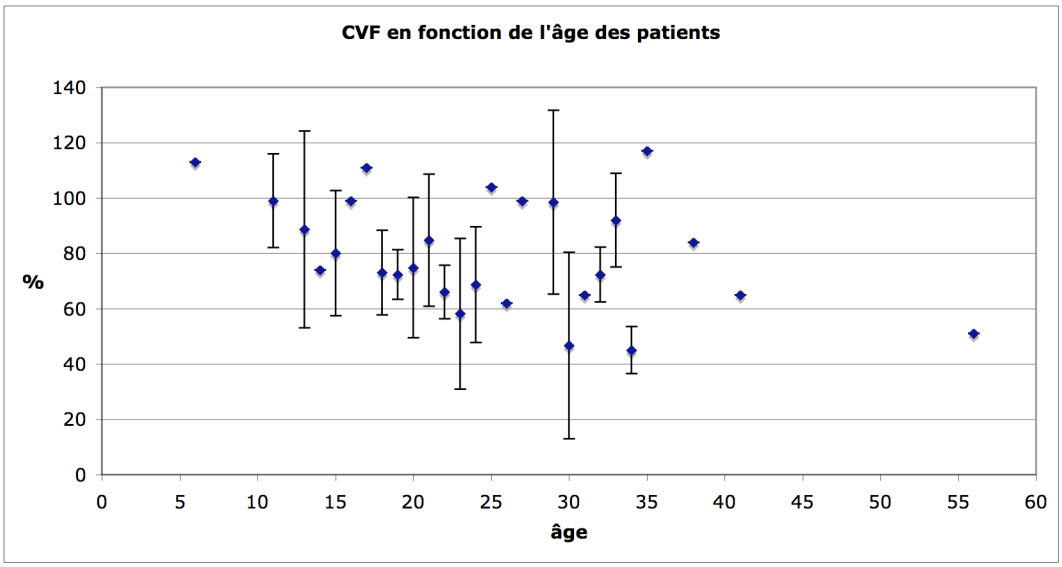
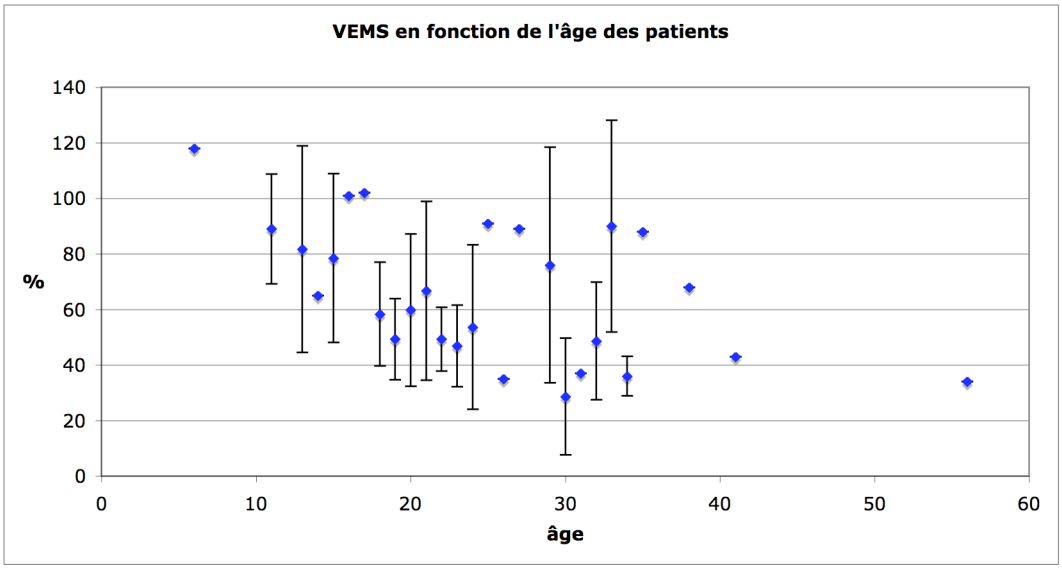


Figure 27. Score de Shwachman et Kulczycki selon l'âge des patients inclus dans l'étude Mucofong





Figures 28 et 29. Capacité respiratoire des patients inclus dans l'étude Mucofong selon l'âge (CVF et VEMS)

8. Caractéristiques des patients de l'étude Mucofong selon le taux d'IgE totales

Les IgE totales reflètent une composante allergique et une sensibilisation possible à *Aspergillus* ou à d'autres allergènes. Un taux supérieur à 500 UI/mL fait partie d'un des critères majeurs en faveur du diagnostic de l'ABPA. Il est intéressant de comparer l'impact des taux d'IgE totales (supérieur ou inférieur à 500 UI/mL) sur les caractéristiques cliniques et/ou biologiques des patients de l'étude Mucofong (Tableau XVIII). Les critères cliniques reflètent l'état général du patient exprimé selon les cas par des scores (score de Shwachman, exacerbation clinique) et la mesure de la fonction respiratoire (CVF, VEMS). Les critères biologiques sont ceux qui sont utilisés dans le diagnostic de l'ABPA (IgE spécifiques, précipitines aspergillaires, cultures mycologiques des expectorations). Les écarts types des IgE totales et spécifiques sont trop importants pour permettre une comparaison des valeurs d'après le test de Fisher. Il n'y a pas de différence significative mis en évidence sur l'état clinique des patients, leur fonction respiratoire ou la présence d'*A. fumigatus* dans leurs expectorations.

Caractéristiques des patients	**IgE totales > 500 UI/mL**	**IgE totales < 500 UI/mL**	**p**
Nombre	10	52	/
Age (années)	20 ± 6,20	23,96 ± 8,56	0,2
Sexe ratio (H/F)	7/3	24/28	0,15
Score de Shwachman	69,7 ± 23,46	66,25 ± 17,74	0,5
CVF (%)	80,2 ± 24,40	74,81 ±24,40	0,5
VEMS (%)	67,2 ± 29,62	60,17 ± 26,98	0,4
IgE totales (UI/mL)	2222,00 ± 1418,94	88,37 ± 75,74	/
IgE spécifiques (UI/mL)	36,13 ± 28,79	2,32 ± 3,54	/
PNE (/mm^3)	370 ± 262,68	242,31 ± 194,38	0,1
A.fumigatus dans les expectorations	4 (40%)	20 (38,5%)	> 0,9

Tableau XVIII. Différences des données biologiques et cliniques selon les deux groupes de patients en fonction du taux d'IgE totales
Il n'y a pas de p calculé quand les paramètres des deux populations ont des écarts types trop importants

9. Caractéristiques des patients de l'étude Mucofong avec ou sans sensibilisation à *Aspergillus fumigatus* (IgE spécifiques)

Les IgE spécifiques d'*A. fumigatus* reflètent une allergie respiratoire vis à vis des allergènes aspergillaires et font partie des critères majeurs de diagnostic de l'ABPA. Les patients de l'étude ont été comparés sur les mêmes critères cliniques et biologiques que précédemment, en fonction de la sensibilisation ou non à *A. fumigatus* (IgE spécifiques supérieures ou inférieures à 0,35 UI/mL). 59% des patients sont sensibilisés aux allergènes aspergillaires. Les écarts types sur les IgE totales et spécifiques sont aussi trop importants pour permettre une comparaison des valeurs d'après le test de Fisher. Aucune différence significative en fonction de l'âge, du score de Shwachman et de la capacité respiratoire n'a été observée entre les deux groupes (Tableau XIX). Il n'y a pas de corrélation entre la sensibilisation et la présence d'*A. fumigatus* dans les expectorations.

Caractéristiques des patients	**Patients sensibilisés à *A. fumigatus* (IgE spécifiques ≥0,35 UI/mL)**	**Patients non sensibilisés à *A. fumigatus* (IgE spécifiques <0,35 UI/mL)**	**p**
Nombre	37	25	/
Age (années)	23,24 ±7,59	23,44 ± 9,45	p > 0,9
Sexe ratio (H/F)	17/20	14/11	0,6
Score de Shwachman	64,54 ± 19,52	70,16 ± 16,98	0,25
CVF (%)	75,16 ± 23,41	76,44 ± 25,99	0,6
VEMS (%)	59,24 ± 26,19	64,36 ± 29,11	0,6
IgE totales (UI/mL)	700,28 ± 1178,24	36,20 ± 39,58	/
IgE spécifiques (UI/mL)	10,47 ± 19,08	0,14 ± 0 ,067	/
PNE (/mm^3)	289,19 ± 194,06	224,00 ± 229,64	0,25
A.fumigatus dans les expectorations	14 (37,8%)	8 (32%)	> 0,9

Tableau XIX. Différences des données biologiques et cliniques selon les deux groupes de patients en fonction du taux d'IgE spécifiques anti-*A.fumigatus*
Il n'y a pas de p calculé quand les paramètres des deux populations ont des écarts types trop importants

10. Caractéristiques des patients de l'étude Mucofong selon l'intensité de la réponse sérologique en IgG

Le dosage des IgE spécifiques est réalisé en parallèle au dosage des IgG spécifiques anti-*Aspergillus* pour mieux apprécier la sensibilisation ou la simple colonisation aspergillaire. 60 patients de l'étude Mucofong ont eu un bilan sérologique avec un dosage des IgG spécifiques anti- *A. fumigatus* et la détection des précipitines vis-à-vis des 5 espèces aspergillaires les plus fréquemment en cause dans les mécanismes de colonisation et de pathogénicité (*A. fumigatus, A. flavus, A*. *terreus, A. nidulans, A. niger*). Les patients ont été répartis en deux groupes selon leur sérologie en IgG et précipitines (un groupe avec des valeurs fortement positives et un groupe avec des valeurs négatives ou faiblement positives) ; puis selon ces deux groupes, les critères cliniques et biologiques ont été comparés (Tableau XX). Des taux d'ELISA IgG supérieurs à 2 et/ou une IEP mettant en évidence plus de 4 arcs ou avec une catalase positive étaient considérés comme sérologie anti-*Aspergillus* fortement positive. Les écarts types sur les IgE totales et spécifiques sont trop importants pour permettre une comparaison des valeurs d'après le test de Fisher. Il n'a pas été retrouvé de différence significative entre les deux groupes de patients au niveau du score de Shwachman, de l'âge et de la capacité respiratoire.

Caractéristiques des patients	**Patients avec sérologie IgG très forte (ELISA >2 et/ou IEP > 4 arcs ou cat +)**	**Autres patients**	**p**
Nombre	20	40	/
Age	20,35 ± 6,40	24,85 ± 9,01	0,25
Score de Shwachman	67,05 ± 16,73	67,15 ± 19,61	0,6
CVF (%)	81,90 ± 20,47	73,10 ± 26,09	0,4
VEMS (%)	66,45 ± 24,01	59,53 ± 28,89	0,5
IgE tot (UI/mL)	698,01 ± 1194,28	316,94 ± 836,68	/
IgE spécifiques (UI/mL)	12,56 ± 23,43	5,74 ± 12,94	/

Tableau XX. Différences des données biologiques et cliniques selon les deux groupes de patients en fonction de l'intensité de la réponse sérologique en IgG spécifiques (ELISA et IEP)

Il n'y a pas de p calculé quand les paramètres des deux populations ont des écarts types trop importants et ne sont donc pas comparables.

11. Comparaison des données sérologiques et mycologiques

Sur 62 patients, 56 expectorations ont été mises en culture. Un de ces patients n'a pas eu d'examen sérologique. Sur les 55 patients permettant une comparaison, 25 patients étaient colonisés par une espèce aspergillaire dont un avec un *Aspergillus sp* non identifiable (Tableau XXI).

Les deux techniques sérologiques, ELISA (quantification des IgG anti-aspergillaires) et IEP (quantification des précipitines) sont bien corrélées entre elles, seules 7 discordances entre les deux techniques ont été notées. La lecture de l'IEP est manuelle semi-quantitative et il peut être parfois difficile de voir les arcs si les taux d'anticorps ne sont pas très élevés. De plus, ces deux méthodes ne se positivent pas au même moment lors des séroconversions. De même les diminutions des taux sont fonction de l'immunogénicité des antigènes et de la sensibilité des méthodes sérologiques.

La sérologie IgG n'est pas corrélée à la mycologie des expectorations. 8 patients n'ont pas d'anticorps alors qu'ils sont colonisés par *A. fumigatus* à l'inclusion et que cette colonisation est chronique (notée dans leurs antécédents). À l'inverse, 5 patients ont un test ELISA positif (DO >1) avec une absence de colonisation aspergillaire. Celle-ci ne se traduit pas toujours par une réaction immunologique avec production d'IgG et inversement.

Aucun des 3 patients colonisés par *S. apiospermum* n'avait de sérologie spécifique positive vis-à-vis des antigènes de cette moisissure.

Mycologie des expectorations	**ELISA positif : DO > 1**	**IEP positif : > 2arcs ou présence de catalase ou de chymotrypsine**	**Résultat ELISA par rapport à l'IEP**
25 cultures avec *Aspergillus*	17 positifs	13 positifs et 3 négatifs	4 discordants 24 ATCD *Aspergillus*
	8 négatifs	1 positif et 7 négatifs	
30 cultures sans *Aspergillus*	5 positifs	2 positifs et 3 négatifs	2 discordants aucun ATCD *Aspergillus*
	25 négatifs	25 négatifs	4 ATCD *Aspergillus*

Tableau XXI. Comparaison des données sérologiques (ELISA et IEP) et des cultures mycologiques

12. Mutations génétiques du CFTR

87% des patients possèdent un gène CFTR avec un allèle muté DF508 et 44% sont homozygotes pour cette mutation (Figure 30).

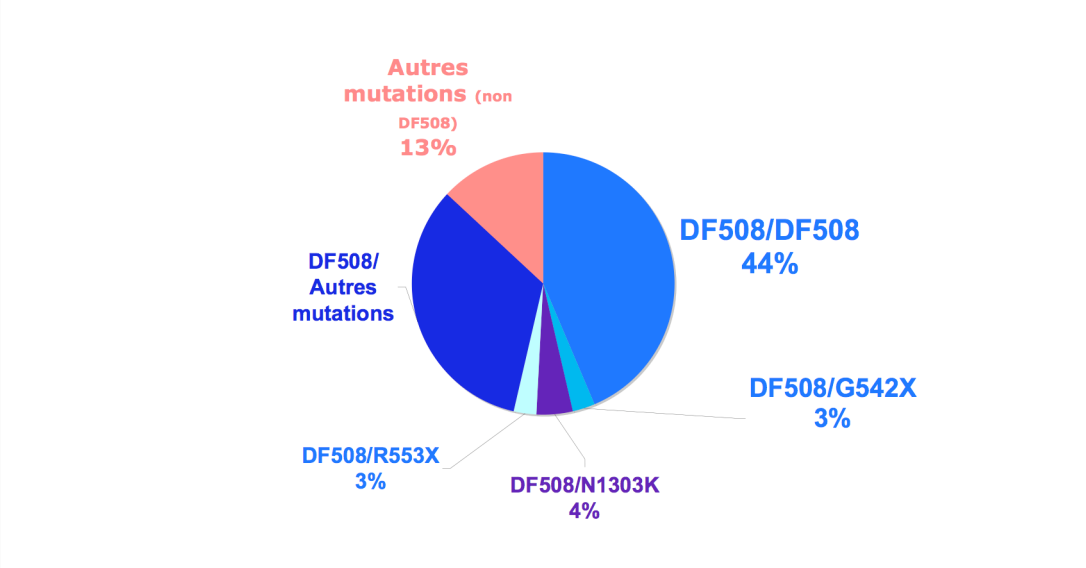


Figure 30. Répartition des différentes mutations du gène CFTR

Les deux patients diagnostiqués ABPA ont la mutation DF508 soit à l'état homozygote, soit hétérozygote. Sur les 7 patients présentant tous les critères biologiques d'ABPA, 3 sont homozygotes pour la mutation DF508 et 4 sont hétérozygotes. Il ne semble pas y avoir de corrélation entre la mutation du gène CFTR et le développement d'une ABPA ; de même, la colonisation aspergillaire ne semble pas être influencée par les caractéristiques génétiques de la mutation (Tableau XXII).

Mutations du CFTR	Nombre de patients	Cultures mycologiques des expectorations
DF508/DF508	30	12 *Aspergillus*/*Scedosporium* (40%) 15 négatives/levures/contaminants 3 non effectuées
DF508/autres	23	9 *Aspergillus*/*Scedosporium* (39%) 12 négatives/levures/contaminants 2 non effectuées
Autres/autres	9	4 *Aspergillus*/*Scedosporium* (44%) 4 négatives/levures/contaminants 1 non effectuée

Tableau XXII. Colonisation par des filamenteux et mutation du gène CFTR

13. Comparaison des patients selon les traitements antibiotiques

96% des patients de l'étude Mucofong ont un traitement antibiotique au long cours, souvent par azithromycine. Les aminosides, comme la colimycine ou la tobramycine, peuvent être utilisés par inhalation. Ils sont actifs sur le bacille pyocyanique et l'administration directe dans les bronches permet d'éviter la toxicité par voie générale de cette famille d'antibiotiques. 79% des 56 patients ont eu au moins une cure d'antibiotiques dans les six mois précédant l'inclusion (Tableau XXIII). Ces cures étaient effectuées soit dans le cadre d'une exacerbation pulmonaire soit pour tout autre infection. 73% des 56 patients ont eu une cure antibiotique par voie intraveineuse, nécessitant donc dans la plupart des cas une hospitalisation d'environ 14 jours. À l'inverse, seulement 13% des 56 patients ont bénéficié d'un traitement antifongique pour des pathologies diverses dont l'ABPA. Cette différence entre les prescriptions d'antibiotiques et d'antifongiques souligne l'importance des infections bactériennes dans la dégradation de la fonction respiratoire et l'attention portée aux colonisations bactériennes face à celles qui sont dues aux champignons filamenteux. Les patients pour lesquels aucune colonisation bactérienne *à P. aeruginosa* n'a été observée ont effectivement moins de traitements par antibiotiques.

	Aspergillus sp	***Pseudomonas aeruginosa***	***Aspergillus sp* et *Pseudomonas aeruginosa***	**Cultures négatives pour *Aspergillus* et *Pseudomonas***
Nombre de patients	**12**	**16**	**12**	**16**
ATB inhalés (ATCD ou en cours à l'inclusion)	8 (67%)	9 (56%)	10 (83%)	7 (44%)
Azithromycine et/ou autre ATB au long cours	12 (100%)	16 (100%)	12 (100%)	14 (88%)
ATB en cure per os (ATCD ou en cours à l'inclusion)	11 (92%)	12 (75%)	8 (67%)	13 (81%)
ATB en cure IV (ATCD ou en cours à l'inclusion)	9 (75%)	14 (88%)	11 (92%)	7 (44%)
ATF (ATCD ou en cours à l'inclusion)	2 (16%)	1 (6%)	0	4 (25%)

Tableau XXIII. Résultats des cultures bactériologiques et mycologiques des expectorations en comparaison avec les différents traitements antibiotiques et antifongiques
(soit en cours à l'inclusion, soit comme antcédent de traitement dans l'année précédente)

14. Traitements anti-fongiques et implications dans la colonisation fongique ?

Au moment de l'inclusion, 3 patients étaient sous traitement antifongique pour traiter une ABPA. 4 patients avaient des antécédents de traitement durant les six derniers mois pour divers motifs, soit liés à une infection aspergillaire, soit à une colonisation digestive (Tableau XXIV). 57 patients avaient un traitement antibiotique dont 49 traités par azithromycine au long cours, 1 avec une antibiothérapie par inhalation et 4 patients n'avaient aucun traitement.

	Nombre de patients	**Traitement**	**Motif**	**Mycologie des expectorations**
Antifongique en cours	**3**	2 itraconazole 1 voriconazole	ABPA	1 *A. fumigatus*
Antécédent de traitement par antifongique	**4**	divers	2 infections digestives, ABPA, bronchite aspergillaire, inconnu	1 *A. fumigatus*

Tableau XXIV. Traitement ou antécédents de traitement par antifongique et résultats des cultures mycologiques à l'inclusion

15. Caractéristiques des patients avec ou sans corticothérapie en cours à l'inclusion

La majorité des patients inclus dans l'étude, soit 42 patients, bénéficient d'un traitement par les corticoïdes par voie inhalée et 8 sont sous corticothérapie *per os*. Il n'y a pas de différence significative sur le score de Shwachman et la capacité respiratoire entre les patients traités ou non par corticoïdes (Tableau XXV). Une seule différence a été mise en évidence : les patients traités par corticoïdes *per os* ont un VEMS plus faible par rapport à ceux n'ayant pas de traitement ($p<0,05$). Les patients bénéficient d'une corticothérapie systémique lors d'exacerbation respiratoire ou d'une pathologie respiratoire importante, leur VEMS est donc plus faible.

Caractéristiques des patients	**Corticoïdes *per-os* (± inhalés)**	**Corticoïdes inhalés**	**Pas de corticothérapie**	**p**
Nombre	8 (13%)	42 (68%)	12 (19%)	/
Score de Shwachman	61,8 ± 20,2	65,6 ± 16,5	74,3 ± 23,7	0,5
CVF (%)	68,5 ± 18,7	73,5 ± 24,5	88,1 ± 23,9	0,3
VEMS (%)	50,6 ± 20,3	59,0 ± 26,8	76,3 ± 28,9	0,2
IgE tot (UI/mL)	694 ± 806	346 ± 845	557,9 ± 1404,7	/
IgE spécifiques (UI/mL)	10,7 ± 11,4	6,5 ± 13,8	3,6 ± 4,3	/
Aspergillus fumigatus	3	17	2	/

Tableau XXV. Différences des données biologiques et cliniques différents groupes de patients en fonction du traitement par corticoïdes ou non
Il n'y a pas de p calculé quand les paramètres des deux populations ont des écarts types trop importants et ne sont donc pas comparables.

DISCUSSION

1. Statistiques

La population totale étant seulement de 62 patients (49 adultes et 13 enfants), la puissance des observations statistiques reste limitée et quelques fois impossible à effectuer. Les comparaisons faites en incluant l'ensemble des patients des sept centres permettront très certainement d'augmenter la pertinence des données obtenues.

2. Epidémiologie fongique de cette population

Les pourcentages de cultures positives à *A. fumigatus* chez les patients atteints de mucoviscidose varient considérablement selon les études, de 1,3% à 63% (115). L'étude Mucofong incluant des patients de plus de 6 ans montre une prévalence de 39%. Elle augmente avec l'âge (84, 89). La population d'enfants inclus est cependant trop faible dans cette première phase pour déterminer l'influence de l'âge sur l'importance et les chronologies des colonisations aspergillaires. L'observation au cours du temps peut également faire varier les résultats. En Australie une même population de patients avait 7,4% de cultures positives en 1998 et 18,8% en 2002 (113). Les différences selon les études sont également fonction de l'environnement climatique et des saisons, même si *A. fumigatus* est ubiquitaire. La pression fongique n'est probablement pas homogène. Une étude des différents génotypes d'*A. fumigatus* retrouvé dans les expectorations serait intéressante. Il permettrait de voir si les patients sont colonisés avec un seul génotype, un génotype prédominant, ou si différents génotypes se succèdent (38). Toutes les souches aspergillaires (trois isolats au maximum pour chaque expectoration positive) de l'étude Mucofong provenant des expectorations pendant trois ans seront gardées pour génotypage afin de répondre à cette question.

A. flavus est retrouvé dans 10,7% des expectorations toujours en association avec *A. fumigatus* sauf dans un cas. Cette prévalence peut sembler élevée puisque certaines études ont des taux de colonisation à cette espèce inférieurs à 2% (6, 28). Le taux retrouvé pour *A. terreus* est de 1,8% et peut sembler bas par rapport aux données de la littérature (6,2%) (26).

S. apiospermum a été retrouvé chez trois patients inclus dans l'étude Mucofong (5,4%) ce qui est sensiblement comparable à d'autres études (8,6%) (25). Plusieurs travaux ont montré l'intérêt du milieu au Bénomyl qui permettrait une meilleure détection de ce champignon (102). Seulement deux souches ont poussé sur ce milieu inhibant totalement la croissance des *Aspergillus* ou des espèces fongiques à croissance rapide gênant le développement de cette espèce à croissance souvent un peu plus lente. En fonction des résultats obtenus, il est très probable que la colonisation par cette espèce reste rare dans la population de patients atteints de mucoviscidose. L'addition de ce milieu pourrait se discuter. Cependant, le milieu Actidione® a permis d'isoler *S. apiospermum* dans les trois expectorations des patients colonisés. Bien que moins inhibiteur, ses performances pour isoler ce champignon nous semblent satisfaisantes. Les espèces aspergillaires sont capables de pousser sur ce milieu mais avec beaucoup de difficulté. L'étude de l'intérêt de son utilisation dans la détection de ce filamenteux doit être poursuivie afin de voir si une éventuelle association avec le milieu chromogène CAN2 serait plus pertinente dans une analyse plus exhaustive de l'épidémiologie fongique. Selon certains auteurs, une partie non négligeable des patients serait colonisée par *S. apiospermum*, mais leur détection serait masquée par la croissance aspergillaire plus rapide, ce qui n'est pas le cas de nos observations dans cette phase d'inclusion, *S. apiospermum* ne colonise qu'un nombre très limité de patients.

Les taux de colonisation par *Candida albicans* dans la littérature sont élevés (75,5% (6), 87,9% (85)). Dans l'étude Mucofong, il est de 21% pour les cultures uniquement positives à levures et de 34% pour les cultures associées à des filamenteux. Leur présence en faible quantité reflète la colonisation normale de la partie supérieure du tractus digestif. Il a été montré par une seule étude une possible inhibition de la croissance d'*A. fumigatus in vitro* par *C. albicans*, ce qui peut interférer dans la détection des isolats aspergillaires lorsque la colonisation par ces filamenteux est faible ou quand la colonisation par les levures est importante, mais cela ne semble pas être le cas dans l'étude Mucofong (103). Cependant, pour limiter toute inhibition, les expectorations obtenues pour la recherche de filamenteux pourraient être faites après lavage buccal afin d'éliminer les levures.

Il est important d'utiliser des milieux spécifiques au développement des champignons avec des inhibiteurs de croissance bactérienne, notamment dans le cadre de la mucoviscidose où les patients sont fortement colonisés par des bactéries. Le milieu idéal doit être capable d'inhiber la croissance bactérienne tout en ayant une excellente sensibilité dans la détection des champignons. La plupart des bactéries sont inhibées par les antibiotiques ajoutés, en particulier le chloramphénicol, mais certaines souches de *P. aeruginosa* et de *Burkholderia cepacia* très résistantes sont capables de pousser sur ces milieux (95). Dans l'étude Mucofong, certains patients avaient des cultures contaminées par du bacille pyocyanique muqueux, qui pouvait interférer en limitant le développement des colonies aspergillaires et gênait l'examen mycologique des boîtes par envahissement rapide des colonies muqueuses. Ces bactéries possèdent des équipements enzymatiques et des toxines leur permettant d'assurer leur survie et leur développement dans cette niche écologique au détriment d'autres opportunistes (64). Les alternatives pour une connaissance de la flore fongique reste limitée et les techniques d'identification moléculaire se multiplient.

Les techniques de biologie moléculaire constituent un outil et une alternative possibles aux méthodes de mycologie classiques. Leurs sensibilités et leurs spécificités très élevées assureraient ainsi une meilleure détection et identification des levures et des champignons filamenteux dans les expectorations ou à partir des cultures (14). Un des intérêts est de pouvoir détecter des champignons à croissance lente et difficile, comme *Exophiala dermatitidis* dont la prévalence probablement très faible (1,1%) (6) et l'épidémiologie sont encore mal connues (94). L'utilisation d'un milieu à l'érythritol n'a pas permis d'isoler ce champignon dans la population étudiée. Cependant, ce milieu est aussi extrêmement favorable au développement d'autres filamenteux en particulier ceux du genre *Aspergillus*. Aussi, son manque de spécificité pourrait limiter la détection d'*E. dermatitidis* ainsi que la préconisation de son utilisation ultérieure.

Ces techniques seraient également utiles pour différencier les espèces *Aspergillus fumigatus* du groupe d'espèces *Aspergillus fumigati*. Ce dernier contient des espèces comme *A. lentulus* et leurs morphologies peuvent être confondues avec *A. fumigatus* ; hors, certains de ces mycètes peuvent présenter des profils de résistance plus importants aux azolés ou à l'amphotéricine B (2). C'est un des prolongements de cette étude qui sera axée sur l'analyse de séquences de gènes

spécifiques des espèces du groupe fumigati sur tous les isolats d'*A. fumigatus* présentant une résistance aux antifongiques systémiques.

L'examen direct des expectorations mettait en évidence 6 prélèvements avec des filaments mycéliens sur les 35 expectorations contenant des champignons filamenteux. La quantité de filaments retrouvés au direct était faible (très rare à rare) ; au contraire, les cultures pour ces patients retrouvaient de très nombreuses colonies avec une ou deux espèces fongiques (*A. fumigatus, A. flavus, S. apiospermum*). Ce résultat montre la sensibilité médiocre de ce dernier par rapport à la culture. Un examen direct positif suggère néanmoins des cultures mycologiques très positives.

Un temps d'incubation des milieux de culture de 6 jours est suffisant pour détecter la totalité des champignons filamenteux (excepté pour une colonie de *Penicillium sp*). Une prolongation à 15 jours rend la lecture difficile car les colonies déjà présentes s'étendent sur tout le milieu.

3. Sensibilité aux antifongiques

Les études sur la sensibilité des *Aspergillus* aux antifongiques se heurtent à des problèmes de standardisation des techniques: milieu utilisé, inoculum fongique, température et temps d'incubation. La lecture des échinocandines peut s'avérer difficile à cause du phénomène de traîne de la pousse. La résistance aux molécules peut être soit naturelle soit acquise. Par exemple *A. terreus* est souvent résistant à l'amphotéricine B et sensible à l'itraconazole. La résistance d'*A. fumigatus* à l'amphotéricine B est très rare, et celle à l'itraconazole est faible (3%) mais elle peut conduire ensuite à des résistances croisée avec les autres azolés (21). Dans l'étude Mucofong, l'itraconazole et le voriconazole ont une bonne activité sur les isolats d' *Aspergillus* et peuvent être susceptibles d'être utilisés et d'être efficace *in vivo* lors des traitements. La nouvelle échinochandine, l'anidulafungine, montre une excellente efficacité sur tous les isolats d'*Aspergillus.*

S. apiospermum est considéré comme sensible au voriconazole et au posaconazole. Il présente une sensibilité variable à l'itraconazole et une résistance à l'amphotéricine B (35). Son profil de résistance doit bien être pris en compte car ce champignon peut présenter des résistances naturelles importantes. C'est ce qui a

été observé dans cette phase d'inclusion. Les trois isolats étaient résistants à l'amphotéricine B et à l'anidulafungine, sensibles à la caspofungine et présentaient des résistances variables à l'itraconazole, le posaconazole et le voriconazole.

En général, les azolés et l'amphotéricine B ont une bonne activité *in vitro* sur les *Aspergillus* colonisant les patients atteints de mucoviscidose (42). Certains patients avec ABPA ou bronchite aspergillaire sont susceptibles d'être traités par antifongiques au long cours. L'existence naturelle de résistance ou l'émergence de souches résistantes doivent être surveillées. L'impact des traitements antifongiques sur l'évolution des souches colonisant les voies pulmonaires chez ces patients serait à étudier (5). C'est ce que permettra l'étude Mucofong grâce au suivi de l'épidémiologie fongique sur trois ans pour les patients inclus.

4. Comparaison des cultures mycologiques, des cultures bactériologiques

Selon différentes études, plus des trois quarts des patients ont des cultures positives à *P. aeruginosa* (6, 44). Sur les 62 patients inclus dans l'étude Muconfong, 56 ont aussi eu un examen cytobactériologique de leurs expectorations, parallèlement à un examen mycologique. Hormis le fait qu'il est difficile de faire des observations statistiques sur de petites populations, les résultats sur les différences entre l'état clinique des patients et les colonisations bactériennes seront à nuancer ; cependant, l'aggravation des fonctions pulmonaires lors des exacerbations est le plus souvent liée à une étiologie bactérienne. Les données microbiologiques sont celles observées au moment de l'inclusion. En revanche, les données sur les traitements antibiotiques et antifongiques ont été colligées à l'inclusion et sur une antériorité de 6 mois à 1 an. Ainsi, 28 patients ont une colonisation à *P. aeruginosa* dans leurs expectorations au moment de l'inclusion, mais 40 patients ont au moins un antécédent de colonisation par cette bactérie dans l'année précédant l'inclusion. Il faut également noter le faible échantillonage bien que le centre de Grenoble soit le second centre ayant inclus le plus de patients après le centre promotteur du CHU de Lille. Ces données sont aussi délicates à interpréter par l'hétérogénéité de l'âge de la population et en conséquence sur les micro-organismes présents dans les bronches.

L'infection chronique à *P. aeruginosa* favoriserait l'implantation ultérieure d'*A. fumigatus* et pourrait aussi indirectement induire une sensibilisation aspergillaire plus importante (107). D'autres études ne mettent pas en évidence de corrélation entre la colonisation aspergillaire et les infections à *P. aeruginosa* (115). *P. aeruginosa* peut altérer la croissance et le phénotype d'*A. fumigatus* et donc augmenter le relargage d'allergènes fongiques pouvant entraîner une augmentation de la sensibilisation et aggraver l'ABPA (44, 107).

L'ABPA peut être associée à des taux plus élevés de colonisation microbienne (120) et la prévalence de *P. aeruginosa* serait plus élevée chez des patients avec ABPA (44) ainsi que chez les patients sensibilisés par *A. fumigatus* (107). L'ABPA entraînerait un déclin plus rapide de la fonction respiratoire, mais l'infection chronique à *P. aeruginosa* doit être prise en compte (71). Selon les données de la littérature, les patients avec ABPA sont plus souvent colonisés par *P. aeruginosa*, *Burkholderia cepacia* et *Stenotrophomonas maltophilia*, mais il n'y aurait pas de différence sur la dégradation du VEMS (87, 107).

La colonisation chronique à *S. aureus* a une prévalence de 19,1% dans la mucoviscidose (6). Dans l'étude Mucofong, le taux de colonisation par *S. aureus* est de 32% à l'inclusion et 46% des patients ont des antécédents de culture positive l'année précédente. Ces données sembleraient donc plus importantes que celles relevées dans la littérature mais seul le suivi des patients et l'ensemble des analyse épidémiologiques sur les 290 patients inclus permettront de les affiner. L'infection chronique à S. aureus est selon les études soit associée à l'ABPA (110), soit les taux de colonisation ne sont pas différents entre les patients ABPA et non-ABPA (87). Sur les sept patients réunissant tous les critères d'ABPA, un seul est aussi colonisé par *S. aureus* (soit 14%).

Dans la littérature, *Haemophilus influenzae* est le plus souvent présent chez des patients non ABPA, mais ces observations sont liées à la plus grande prévalence de cette bactérie chez les jeunes enfants alors que les altérations dues aux colonisations aspergillaires ou fongiques apparaissent plus tard dans cette population après que les tissus soient en partie lésés par les colonisation bactériennes chroniques (87).

5. Sensibilisation à *A.fumigatus*

Les taux de sensibilisation à *A. fumigatus* selon les études sont très variables, en partie dus au fait que le critère de choix est la réaction cutanée immédiate, le taux d'IgE ou d'IgG spécifiques ou la présence de précipitines aspergillaires dans le cas d'hypersensibilité de type III. Une des difficultés d'interprétation est que ces taux peuvent varier dans le temps selon la pression fongique ou selon les traitements (115). C'est une évolution dynamique liée aux stimulations antigéniques du patient, elle est aussi inhérente aux caractéristiques immunologiques individuelles. Aussi, les paramètres marqueurs de la sensibilisation peuvent donner des résultats très différents selon les études entreprises. Ainsi, elle peut être assez basse 12% (107) si l'on prend un critère (IgE spécifiques et/ou rAspf1 augmentées avec rAspf4 et rAspf6 normaux, chez des patients ne réunissant pas tous les critères d'ABPA) ou élevée 66% (10) si l'on prend en compte divers critères (Test de réaction cutanée ou IgE spécifiques ou IgG spécifiques ou précipitines aspergillaire ; ces différents marqueurs étant tous témoins d'une sensibilisation à *A. fumigatus* mais n'étant pas forcément concomitants).

La sensibilisation est souvent diagnostiquée par un test de réaction cutanée immédiate aux allergènes aspergillaires, mais cette technique n'est pas faite en routine et dépend de la composition de la préparation antigénique (107). Le dosage des IgE spécifiques est exprimé en unité arbitraire avec des mélanges d'allergènes aspergillaires et il n'est pas parfaitement standardisé. Les IgE dirigés contre des antigènes recombinants rAspf1 et rAspf3 seraient un marqueur en faveur de la sensibilisation, et les antigènes rAspf4 et rAspf6 seraient plus spécifiques de l'ABPA (71). Dans certains cas, il est impossible d'établir une corrélation entre la sensibilisation et le tableau clinique, indispensable au diagnostic de l'ABPA (85). Selon d'autres études, la sensibilité vis-à-vis d'*A.fumigatus* (26%) est associée à une baisse du VEMS et à un déclin plus rapide de la fonction pulmonaire (61, 120, 129). Les patients sensibilisés ont également plus de traitements antifongiques (61), soit ils sont plus traités car ils sont plus colonisés par *Aspergillus* ; soit les traitements antifongiques entraînent la libération d'allergènes qui augmentent la sensibilisation des individus.

La sensibilisation est un préalable au développement de l'ABPA, mais seule une minorité de patients aura cette maladie. Les études longitudinales publiées sont encore peu nombreuses et il n'y a pas de données sur le passage de l'ABPA à la

sensibilisation et inversement (107). Une étude signale une seule évolution vers l'ABPA dans une cohorte de patients sensibilisés aux allergènes aspergillaires (10). Le taux de sensibilisation augmente avec l'âge des patients et s'explique par une plus longue exposition aux spores fongiques (44).

Les précipitines augmenteraient dans l'ABPA signant une majoration de la réponse immune vis à vis des antigènes aspergillaires au niveau pulmonaire. Certains marqueurs sérologiques sont liés au développement fongique *in vivo* (catalase intra-cytoplasmique, chymotrypsine) (41).

Il y a plus de corticothérapie inhalée chez les patients sensibilisés par *A. fumigatus* (107), ce qui pose problème car la majorité des patients sont sous corticoïdes inhalés. La relation sensibilisation à *A. fumigatus,* ABPA et fonction pulmonaire ainsi que le rôle des corticoïdes sur l'interaction entre *A. fumigatus* et le système immunitaire sont encore mal compris. Il n'y a pas de recommandation pour le traitement de la sensibilisation par *A. fumigatus*.

La sensibilisation à *A. fumigatus* peut être la première étape vers l'ABPA (1). Les différentes études sur ces dernières décennies dans la mucoviscidose montrent une moyenne de 34% de patients sensibilisés à *A. fumigatus* et de 7,8% d'ABPA (1). Ces résultats sont issus d'études différentes et les critères de diagnostic de l'ABPA étaient très variables, ainsi que les techniques utilisées pour les résultats biologiques.

Dans l'étude Mucofong, 59% des patients sont sensibilisés à *A. fumigatus* à l'inclusion (IgE spécifiques > 0,35UI/mL). Cette différence par rapport aux études est peut-être due à une plus grande sensibilité des tests de détection des IgE aujourd'hui. Il sera intéressant de comparer cette valeur avec les autres centres, la prévalence d'*A. fumigatus* étant peut-être plus importante dans notre région par rapport à d'autres localisations géographiques.

6. Cultures mycologiques et association avec ABPA ou d'autres critères

Une étude faite aux Etats-Unis entre 1993 et 1996 sur 14 210 patients atteints de mucoviscidose montrait que les patients avec ABPA prouvée étaient aussi plus souvent colonisés par *A. fumigatus* que les patients sans ABPA, avec une prévalence respective de 34% versus 8% (44). Une autre étude en Europe entre 1994 et 1997 comprenant 12 447 patients atteints de mucoviscidose observait aussi une augmentation du taux de patients colonisés dans les ABPA avec une prévalence de 45% versus 16% pour les patients sans ABPA. Lorsque les patients sont colonisés, l'ABPA a été diagnostiquée chez 19,6% d'entre eux (87). Ces données relatives à un nombre important de patients soulignent le rôle mineur de l'examen mycologique dans le diagnostic d'ABPA car les patients exposés au risque fongique ne développeront que très rarement cette forme allergique de l'aspergillose (Figure 31).

Aucune corrélation n'a jamais été montrée dans les différentes études publiées entre la présence d'*A.fumigatus* et les IgE spécifiques (84, 85, 89), ou la présence d'*A.fumigatus* et le risque de dégradation de la fonction respiratoire (84), ou la présence d'*A.fumigatus* et l'ABPA (23).

Dans l'étude Mucofong, l'ABPA a été diagnostiquée chez 2 patients à l'inclusion et *A. fumigatus* était présent dans les 2 cas. Sur les 7 patients réunissant les critères biologiques d'ABPA, 3 étaient colonisés par *Aspergillus*. Cependant, l'exposition au risque fongique est un processus dynamique et transitoire. Il faut un contact et un développement de la moisissure pour exacerber les défenses immunitaires. Selon les susceptibilités des patients, cette réponse sera plus ou moins forte. Les séquelles sérologiques peuvent aussi se manifester à distance de la colonisation.

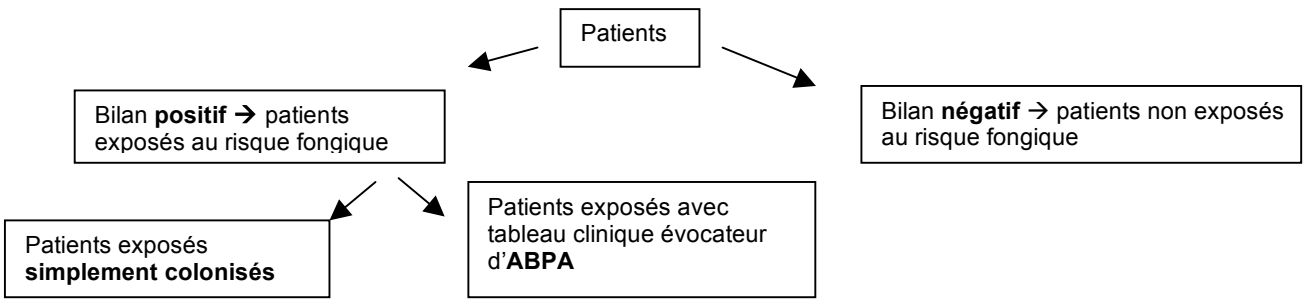


Figure 31. Les patients atteints de mucoviscidose face au risque fongique

7. Prévalences de l'ABPA

Elles sont variables selon les études. Elles sont dues à l'hétérogénéité des critères diagnostiques pris en compte (104), des cohortes de patients et de leur environnement fongique, des différentes pressions antifongiques et des interprétations cliniques (87). Les prévalences s'échelonnent de 1 à 15% (115) : 7,8% en Europe (2% en Suède, 7,4% en France et 13,6% en Belgique (87)), 2% aux Etats-Unis (0,9% à 4% selon les régions (44)), 6% en Italie (118). La prévalence moyenne des principales études effectuées ces dernières années se situe à 7,8% (1). La Conférence de consensus de 2003 sur le diagnostic de l'ABPA (115) permet une harmonisation des critères pris en compte et l'étude Mucofong faite à partir de 2007 sera plus uniforme que la plupart des études citées qui ont été faites avant 2003.

La prévalence de l'ABPA est très basse chez les enfants de moins de 6 ans (87) aussi ils n'ont pas été inclus dans l'étude Mucofong.

Les critères d'ABPA ne sont pas toujours tous observés pour faire le diagnostic qui reste toujours particulièrement difficile chez ces patients. Il existe une gradation dans le diagnostic entre ABPA probable et ABPA prouvée. Il faut différencier les patients avec antécédents d'ABPA de ceux avec ABPA au moment de l'inclusion. L'évolution de cette pathologie oscille entre crises aiguës et périodes de rémission d'où l'intérêt du suivi par l'étude Mucofong sur au moins 3 visites qui permettra ainsi un meilleur dépistage des patients et une interprétation plus homogène des données (prise en compte des antériorités cliniques et thérapeutiques et harmonisation des données recueillies).

La présence de taux élevés en anticorps (IgE et IgG) sans manifestation clinique s'apparenterait à un stade très précoce d'ABPA. Certains patients n'ayant pas tous les critères d'ABPA et traités par antifongiques pour des exacerbations ne régressant pas sous antibiothérapie ont été améliorés sur le plan clinique et une diminution des taux d'IgE a aussi été notée (111). Or, actuellement, les recommandations du stade précoce d'ABPA conseillent une simple surveillance clinico-biologique.

8. Association de l'ABPA à divers paramètres cliniques ou biologiques

L'ABPA est suspectée de causer un déclin plus rapide de la fonction pulmonaire puisque l'inflammation causerait progressivement une fibrose des tissus pulmonaires (107). La contribution de cette pathologie à la dégradation de la fonction respiratoire est encore difficilement attribuable à une étiologie dans ces contextes de surinfections complexes et chroniques.

L'étude faite aux Etats-Unis retrouvait chez les patients avec ABPA un plus grand nombre d'adolescentes, une fonction pulmonaire plus altérée, des sibilants et un asthme plus prononcés (44). Les patients avec un VEMS <70% avaient deux fois plus de risque d'avoir une ABPA. Mais cette étude n'a pas pris en compte les traitements pour évaluer la fonction respiratoire, or la fonction pulmonaire peut être améliorée par la corticothérapie ou les antifongiques. La présence de sibilants ou d'asthme augmentait par 1,5 le risque d'ABPA, mais la composante asthmatique ne doit pas être prise en compte dans le diagnostic d'ABPA notamment dans le cadre de la mucoviscidose (70% des patients avec ABPA n'auraient pas d'asthme).

L'étude en Europe ne mettait pas en évidence de différence selon le sexe des patients avec ABPA. La fonction pulmonaire était diminuée, mais l'évolution de la fonction respiratoire pendant la période d'étude ne montrait pas de différence entre les patients. Le VEMS était inférieur de 10% par rapport aux patients sans ABPA, et les patients avec un VEMS >70% étaient moins fréquents chez les patients ABPA. Le statut nutritionnel des patients avec ABPA était plus faible, les épisodes d'hémoptysie et de pneumothorax plus nombreux montrant la gravité de la pathologie. La sérologie IgG aspergillaire était plus élevée par rapport aux autres patients (87).

D'autres études mettent en évidence une augmentation du déclin de la fonction pulmonaire chez les patients avec ABPA (71). Il peut y avoir une détérioration respiratoire à court terme et qui se normalise après traitement. La prévalence chez les enfants de moins de 6 ans est toujours faible et cette aspergillose allergique se développerait surtout chez des patients adultes jeunes présentant une fonction respiratoire plus altérée et un statut nutritionnel plus bas par rapport aux patients non ABPA (120). Un diagnostic précoce et donc une prise en charge rapide permettraient de freiner la dégradation du tissu pulmonaire.

L'impact de l'ABPA sur la fonction respiratoire reste encore un sujet de controverses du aux multiples facteurs pouvant influer sur celle-ci. La dégradation respiratoire peut également être due au bacille pyocyanique ou à l'asthme. La gravité de l'obstruction bronchique dépend du stade de l'ABPA et du patient (115).

La fonction respiratoire et le score de Shwachmann des patients inclus dans l'étude montrent une très grande hétérogénéité des valeurs pour une même tranche d'âge chez des patients pour la majorité sans ABPA et il est impossible d'établir une corrélation entre cette pathologie et la dégradation de la fonction respiratoire dans la phase d'inclusion de l'étude. Certains montrent que celle-ci peut être normale chez des patients avec ABPA avec 10% de patients ayant un VEMS supérieur à 100% et 19% une CVF supérieure à 100% (44).

9. Patients de l'étude susceptibles d'avoir une ABPA

Les critères diagnostic de l'ABPA rassemblent des arguments cliniques, radiologiques et biologiques. Tous les patients présentent une détérioration clinique de la fonction respiratoire (toux, sibilants, dyspnée d'effort, hypersécrétion bronchique), mais différentes étiologies peuvent être à l'origine de ces signes : mucoviscidose, infection bactérienne, infection virale, infection fongique. Les images radiologiques peuvent être dues à différentes causes chez les patients atteints de mucoviscidose, en effet, la majorité d'entre eux (89% des patients inclus dans l'étude) présentent des bronchectasies localisées ou déjà étendues. Le diagnostic de l'ABPA est donc très difficile à poser dans ces conditions. Les critères biologiques doivent être pris en compte avec les critères cliniques et si l'exacerbation ne s'améliore pas sous antibiotiques, l'ABPA doit être envisagée.

La difficulté réside également dans le fait que les patients ne réunissent pas forcément tous les critères biologiques au même moment. Sur les deux patients avec ABPA, l'un d'entre eux avait tous les critères diagnostiques et l'autre avait tous les critères sauf des IgE totales à 153 UI/mL (taux sub-normal) mais avait une corticothérapie *per os*. Dans ce cas, il est conseillé de refaire un dosage après arrêt de la corticothérapie.

Sept patients rassemblent tous les critères diagnostiques de l'ABPA (dont un diagnostic posé à l'inclusion) avec des paramètres biologiques fortement positifs expté un nombre de précipitines limités à 2 arcs. Il est fréquent de n'avoir pas beaucoup d'immunocomplexes précipitants dans l'ABPA mais l'ELISA IgG sera très

élevée. La prévalence de l'ABPA prouvée ou probable est de 11,3% dans la phase d'inclusion Mucofong, ce taux est très proche des taux trouvés en moyenne ces dernières décennies (7,8%) (1).

Les traitements antifongiques et la corticothérapie influent sur les taux d'IgE et potentiellement sur les IgG. Le diagnostic d'ABPA doit donc s'appuyer sur des critères cliniques en prenant compte des antécédents de traitements. À l'inverse 10% des patients non ABPA ont des taux d 'IgE >1000 UI/mL (60) mais certains présentent des réactions allergiques vis-à-vis d'autres allergènes que les allergènes aspergillaires. La pertinence des IgE totales comme élément majeur du diagnostic de cette forme d'aspergillose doit certainement être nuancée en fonction des corticothérapies et traitements antifongiques des patients dont l'impact sur ce critère biologique est encore mal cerné.

L'étude Mucofong se déroulant sur 3 ans permettra un meilleur screening des patients afin de déterminer la prévalence la plus exacte de cette pathologie.

10. Comparaison des patients selon les traitements antibiotiques

La prise d'azithromycine a montré une bonne efficacité dans la prévention de la colonisation et des exacerbations dues à *P. aeruginosa* (30) et 96% des patients de l'étude Mucofong ont un traitement antibiotique au long cours. La différence entre le nombre de cures antibiotiques et de cures antifongiques souligne l'importance des infections bactériennes par rapport aux infections fongiques. Il est particulièrement difficile de répondre à la question : les traitements par antibiotiques sont-ils susceptibles d'exacerber les colonisations fongiques ? *P. aeruginosa* et *A. fumigatus* sont en compétition au sein des bronches. Dans nos observations, quasiment tous les patients sont sous antibiothérapie au long cours à laquelle peuvent s'ajouter des cures ponctuelles. Il n'y a donc pas de groupe « témoin négatif» pour assurer une comparaison. Cependant, il est signalé l'importance des traitements large spectre dans la survenue d'ABPA (87).

75% des patients colonisés par *A. fumigatus* mais pas par *P. aeruginosa* ont eu au moins une cure d'antibiothérapie intraveineuse dans l'année précédant l'inclusion qui peut s'expliquer par la présence d'autres bactéries à fort potentiel pathogène telles que *Burkholderia cepacia, Staphylococcus aureus, Stenotrophomonas maltophilia* présentes dans les expectorations de certains patients.

11. Caractéristiques des patients avec ou sans corticothérapie en cours à l'inclusion

Les glucorticoïdes sont de puissants immunosuppresseurs. Ils inhibent le fonctionnement normal des cellules phagocytaires, première ligne de défense contre les spores et filaments fongiques. Les macrophages tissulaires ne phagocyteront plus ou mal les spores fongiques. Dans ce milieu favorable, les spores germeront en développant leur mycélium, ces croissances dans les bronches assureront la libération de milliers de protéines et glycoprotéines fongiques fortement allergéniques (107). La corticothérapie *per-os* est utilisée dans le contrôle des exacerbations aiguës et prévient les dommages tissulaires, en étant pris soit quelques jours à une posologie 2mg/kg/j pendant 7 jours, soit sur une période plus longue avec diminution progressive de la posologie (87). Dans l'étude européenne, 56% des patients avec ABPA ont eu des corticoïdes par voie orale et 75% par inhalation contre 39% chez les patients non ABPA. Les corticoïdes sont plus utilisés chez les patients avec ABPA (44). Dans l'étude Mucofong, ils sont utilisés par voie inhalée dans la majorité des cas (68%)

Les corticoïdes ont un rôle immuno-modulateur, leur prise régulière sur de longue période pourrait faciliter l'implantation de micro-organismes comme *A. fumigatus* en diminuant les défenses de l'organisme localement au niveau bronchique. Le problème reste le même que pour les antibiotiques. La majorité des patients sont sous corticoïdes inhalés et il n'y a pas de « témoins négatifs » pour répondre à cette question.

12. Risque fongique et mutation du gène CFTR

Certaines études ne montrent pas d'association entre la présence d'ABPA et le génotype de la mutation du gène CFTR (107) mais pour d'autres, l'ABPA serait associée à une majorité de génotype DF508/DF508 (120). L'étude européenne a montré 8% d'ABPA chez les patients avec un génotype DF508 à l'état homozygote et 6% avec un génotype DF508 à l'état hétérozygote (87).

Dans l'étude Mucofong, il n'y a pas de différence significative entre les différents groupes de patients selon les mutations du gène CFTR et le taux de colonisation par *Aspergillus* ou *Scedosporium*. Il ne semble donc pas y avoir de corrélation entre la mutation du gène CFTR et le développement d'une ABPA ; de même, la colonisation

aspergillaire ne semble pas être influencée par les caractéristiques génétiques de la mutation.

Il serait intéressant d'étudier le typage des récepteurs HLA de classe II des patients car cela pourrait constituer un des facteurs de risque de l'ABPA. Les allèles HLA DRB1 1501 et 1503 seraient associés à un risque plus élevé de développer une ABPA et HLA DRB1 1502 serait associé à une protection vis-à-vis de la pathologie (22, 70).

13. Recherche de sources de contamination

Les champignons filamenteux retrouvés dans les expectorations des patients inclus dans l'étude Mucofong sont tous présents dans l'environnement des patients. La recherche et l'identification de sources potentielles de contamination peuvent amener à des mesures simples de prévention. Il a été demandé à chacun des renseignements sur son cadre de vie : lieu d'habitation, jardin, activité professionnelle, plante en pot chez eux, animal de compagnie, loisirs. Les patients suivis aux CRCM de Grenoble proviennent d'une région vaste et 37 d'entre eux habitent à la campagne dont 29 dans une maison avec un jardin. La moitié de ces patients étaient colonisés par *A. fumigatus*. Sur les 25 patients qui habitent en ville, 9 d'entre eux avaient des cultures positives à *A. fumigatus*. Cette moisissure est très dispersée dans l'environnement et la recherche de niches écologiques a donc peu d'intérêt. Les spores seraient en quantité plus élevée l'automne et l'hiver (Figure 32). Dans le cas des patients colonisés avec *S. apiospermum* ou certains champignons filamenteux rares et présents de façon répétée au cours du suivi, une enquête au domicile pourrait être effectuée afin de rechercher les causes de ces expositions anormales et de procéder ainsi à leur élimination.

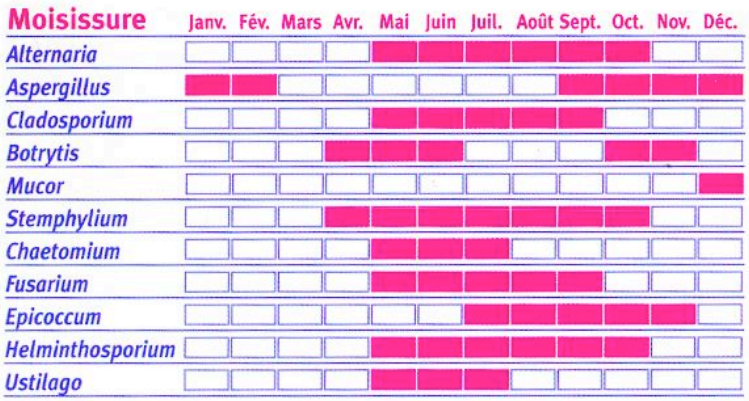


Figure 32. Répartition des spores fongiques dans l'environnement selon les saisons (135)

14. Conclusion

Cette phase d'inclusion a permis au projet PHRC Mucofong d'être initialisé sur des bases très honorables de participations volontaires des patients. Elle confirme la prévalence aspergillaire dans les expectorations et particulièrement celle d'*A. fumigatus* où 39% des patients sont colonisés à l'inclusion. Elle met aussi en évidence le rôle facilitateur de la corticothérapie dans cette colonisation fongique. Le suivi des patients sur l'ensemble de l'étude permettra sans doute de standardiser et de proposer des méthodes de cultures mycologiques adaptées à l'épidémiologie des champignons filamenteux et de parfaitement définir la prévalence de l'ABPA dans cette population ainsi que l'impact sur la fonction pulmonaire des manifestations allergiques sévères vis à vis des allergènes fongiques.

CONCLUSION

Thèse soutenue par : Yolande LEMEILLE

Titre : « Evaluation et prise en charge du risque fongique chez le patient atteint de mucoviscidose: résultats de la phase d'inclusion de l'étude Mucofong au CHU de Grenoble»

L'infection broncho-pulmonaire représente le problème majeur auquel sont confrontés les malades atteints de mucoviscidose. La responsabilité des agents fongiques dans la détérioration de la fonction respiratoire est toujours un sujet de controverses. Le programme hospitalier de recherche clinique (PHRC) Mucofong a pour objectif de déterminer la prévalence des champignons filamenteux au niveau respiratoire, leur association à divers paramètres, et d'évaluer s'ils sont responsables soit de colonisation soit d'épisodes infectieux authentiques.

62 patients ont été inclus entre Novembre 2007 et Mai 2008 aux centres de ressources et de compétence pour la mucoviscidose adulte et pédiatrique du CHU de Grenoble. L'étude mycologique des expectorations a été potentialisée par l'utilisation de différents milieux permettant d'être plus exhaustif. Le genre *Aspergillus* est retrouvé dans 42,8% des cultures. 39,3% des patients sont colonisés par *A. fumigatus*, 10,7% par *A. flavus* et 3,5% par *A. terreus*. La colonisation peut être hétérogène. D'autres espèces peuvent être mises en cause lors des infections respiratoires comme *Scedosporium apiospermum* dont l'incidence est de 5,4%. Les champignons filamenteux peu ou non pathogènes comme *Penicillium sp* sont présents dans 17,9% des expectorations. Les cultures sur milieu Actidione® et sur milieu chromogène CAN2 associées à une durée d'incubation de 6 jours à 37°C suffirait pour identifier les principaux mycètes. Il ne semble pas y avoir de corrélation entre la mutation du gène CFTR et la mycologie des expectorations. Les IgG et les IgE spécifiques anti-aspergillaires ne sont pas simultanément corrélées à la mycologie des expectorations.

Aucun des isolats d'*A. fumigatus* n'est résistant aux antifongiques amphotéricine B, itraconazole, voriconazole et anidulafungine. En revanche, *S. apiospermum* est naturellement résistant à l'amphotéricine B et selon les isolats, résistants aux imidazolés.

L'aspergillose bronchopulmonaire allergique (ABPA) a été diagnostiquée chez deux patients lors de l'inclusion, celle-ci étant la cause de l'exacerbation. La présence de *Pseudomonas aeruginosa* se traduit généralement par une morbidité plus importante que lors de la simple colonisation aspergillaire. 96% des patients ont un traitement antibiotique en continu soit par la prise d'azithromycine per-os, soit par colimycine ou tobramycine inhalée. À l'inverse, seulement 13% ont bénéficié d'un traitement antifongique. Les corticoïdes sont utilisés par voie inhalée chez 68% des patients de l'étude et il n'y a pas de différence significative sur le score de Shwachman et la capacité respiratoire entre les patients traités ou non.

L'étude Mucofong est une étude prospective avec un suivi sur trois ans permettant une meilleure interprétation des critères cliniques et biologiques. Certains paramètres évoluent au cours du temps, en particulier les colonisations bactériennes ou fongiques grandement influencées par les traitements et le milieu environnemental. La prise en compte de l'ensemble des données cliniques, biologiques, mycologiques et thérapeutiques sur les 7 centres participant à l'étude permettra de mieux appréhender les critères diagnostiques de l'ABPA et l'impact réel des champignons filamenteux sur la dégradation de la fonction respiratoire.

VU et PERMIS D'IMPRIMER
Grenoble, le 14 Mai 2009

LE DOYEN
Professeur Renée GRILLOT

UNIVERSITE JOSEPH FOURIER
U.F.R. DE PHARMACIE
GRENOBLE 1

Pr. Renée GRILLOT
Directeur U.F.R Pharmacie
Université Joseph Fourier Grenoble I

LE PRESIDENT DE LA THESE
Professeur Renée GRILLOT

ANNEXES

1. Consentement

Lettre d'information

NOTE D'INFORMATION DESTINEE AU PATIENT MAJEUR PARTICIPANT A L'ETUDE

EVALUATION ET PRISE EN CHARGE DU RISQUE FONGIQUE CHEZ LE PATIENT ATTEINT DE MUCOVISCIDOSE EN FRANCE : ETUDE MULTICENTRIQUE PROSPECTIVE
« MucoFong »

Madame, Mademoiselle, Monsieur,

Nous vous sollicitons pour participer à l'étude intitulée :
" Evaluation et prise en charge du risque fongique chez le patient atteint de mucoviscidose en France : étude multicentrique prospective".
Dans le cadre de la mucoviscidose, l'atteinte respiratoire représente un problème auquel vous êtes ou pouvez être confronté, et qui a ou peut avoir des retentissements sur votre qualité de vie et votre maladie.

Le but de cette étude est de mieux définir le rôle des champignons dans les infections pulmonaires.

Nous vous présentons ci-dessous pour information, la recherche pour laquelle nous souhaitons votre participation volontaire. Nous sommes prêt à répondre à toute question que vous souhaiteriez nous poser.

➢ **Objectifs de la recherche :**
- Déterminer quelles sont les espèces de champignons filamenteux du genre *Aspergillus* et/ou autres qu'*Aspergillus* présentes dans l'appareil respiratoire des patients enfants ou adultes ayant une mucoviscidose qui sont responsables ou non d'infection.
- Mieux évaluer leur rôle dans la variation de la fonction pulmonaire.

➢ **Méthodologie :**
Cette étude est réalisée dans plusieurs centres en France. ***Les prélèvements à analyser dans le cadre de cette étude seront obtenus à partir de prélèvements effectués dans votre suivi habituel.*** Simplement, une analyse plus complète du bilan mycologique (Analyse mycologique de l'expectoration et séro-immunlogie correspondante) sera réalisée.
Ce bilan sera intégré à votre prise en charge habituelle, dans votre Centre de Ressources et de Compétences de la Mucoviscidose (CRCM). Le rythme du suivi sera celui des bilans annuels ou des exacerbations. Le suivi global durera 2 ans +/- 3 mois.

Si votre bilan mycologique retrouve des champignons, nous vous proposerons de rechercher l'origine de la contamination en effectuant des prélèvements dans votre environnement immédiat (tel que votre habitat).

➢ **Bénéfices attendus :**
Au cours de cette étude, nous espérons mieux définir les agents infectieux fongiques (c'est à dire les champignons) éventuellement responsables de complications respiratoires. Ceci pourrait nous permettre d'améliorer votre prise en charge.

➢ **Contraintes, restrictions imposées, inconfort :**
Etant donné l'absence de prélèvements supplémentaires, aucun inconvénient n'est lié à cette étude. Pour rappel, la réalisation au minimum de 3 bilans mycologiques (soit au minimum 1 bilan / an) est prévue. Pour ce faire, nous vous demanderons une expectoration et un prélèvement sanguin. Ceci sera effectué lors des bilans systématiques ou lors des exacerbations respiratoires. Enfin, un temps de participation de 2 ans vous sera proposé.

Initiales de la personne se prêtant à la recherche :

➢ **Modalités de recrutement des participants :**

Tous les patients seront suivis dans leur Centre de Ressources et de Référence pour la Mucoviscidose habituel (CRCM).

➢ **Garanties qui vous sont offertes :**

- Vous aurez à tout moment la possibilité de suspendre votre participation à cette étude.
- Les informations recueillies lors de cette étude seront transmises à votre connaissance.
- Les résultats seront intégrés en temps réel à votre prise en charge par l'équipe soignante de votre CRCM.
- L'existence d'un contrat d'assurance souscrit par le promoteur de l'étude : le CHRU de Lille.
- L'avis favorable du Comité Protection des Personnes Nord Ouest IV a été obtenu.
- L'autorisation de l'Autorité Compétente (Direction Générale de la Santé) a été obtenue.
- Les dispositions pour préserver le caractère confidentiel des données ont été prises : les cahiers de recueil des données sont rendus anonymes conformément au cadre légal.
- Les résultats de cette étude seront publiés et vous seront communiqués par votre médecin habituel du CRCM, ou par courrier, ou à l'occasion d'une réunion d'information.
-Vous pourrez exercer à tout moment un droit d'accès ou de rectification sur vos données informatiques ; il vous suffira d'en faire la demande auprès de votre médecin référent de l'étude.

➢ **Analyse des prélèvements :**

Les prélèvements effectués au cours de votre suivi habituel seront analysés.
Une analyse mycologique approfondie sera réalisée sur vos expectorations : une recherche puis une identification des espèces fongiques sera réalisée en culture puis par une analyse génétique des champignons.
Un bilan sérologique sera également réalisé de la même manière que lors de votre suivi habituel, complété par une analyse protéique.

Une collection des prélèvements de l'ensemble des participants de l'étude sera faite (mycothèque, sérothèque et DNAthèque fongique). Cette collection est faite dans le but de pouvoir réaliser des analyses complémentaires à la suite de l'étude, dans l'objectif de mieux connaître et maîtriser votre maladie.
Si vos prélèvements devaient servir à des analyses qui n'entrent pas dans le cadre de ce protocole ; votre consentement écrit préalable serait nécessaire.
Une relecture de votre génotype pourra être envisagée en fonction des résultats obtenus, si une corrélation génotype/type d'infection fongique pourrait être envisagée.

Vous n'êtes pas obligé d'accepter de participer à cette étude et votre refus n'aura aucune incidence sur votre suivi. Si vous acceptez de participer, vous pourrez à tout moment mettre fin à votre participation et sans avoir à justifier votre démarche.

Le Dr DELHAES coordonnateur de l'étude reste à votre disposition pour répondre à toutes vos questions. Vous pouvez le joindre au 03 20 44 55 77.

Le(s) Dr ----------
investigateur(s) dans votre CRCM (adresse)----------
Vous pouvez le(s) joindre----------

Initiales de la personne se prêtant à la recherche :

Formulaire de consentement éclairé

TITRE DE l'ÉTUDE : MUCOFONG

EVALUATION ET PRISE EN CHARGE DU RISQUE FONGIQUE CHEZ LE PATIENT ATTEINT DE MUCOVISCIDOSE EN FRANCE : ETUDE MULTICENTRIQUE PROSPECTIVE
« MucoFong »

Je soussigné(e)_____(Nom, Prénom) demeurant à _____déclare avoir été informé(e) du déroulement, des objectifs et de la durée de cette étude.

Je confirme que ma participation est volontaire et que j'ai le droit de me retirer à tout moment de cette étude sans encourir de conséquence.

Je sais que :

- Ma participation sera de 3 ans environ.
- Pour toute information complémentaire, je pourrai contacter le Dr. ....., investigateur de cette étude.
- Toutes les données me concernant resteront confidentielles. Ces données pourront éventuellement être auditées ou inspectées par des personnes soumises au secret professionnel.

J'accepte que ces données enregistrées à l'occasion de cette recherche puissent faire l'objet d'un traitement informatisé. J'ai bien noté que le droit d'accès et de rectification prévu par la loi "informatique et libertés" (article 40) s'exerce à tout moment auprès du médecin référent.

- Le CHRU de Lille, promoteur de cette étude, a contracté une police d'assurance couvrant les personnes qui participent à cette étude.

J'ai pu poser toutes les questions que je désirais au cours de l'entretien médical.
Je confirme avoir reçu ce document ainsi que la lettre d'information.

Fait à .....en triple exemplaire

Date: _____
Nom et signature de l'investigateur ou de son représentant:

Date:_____
Signature du patient :

2. Liste des milieux de cultures :

2.1 Milieu Sabouraud + chloramphénicol des laboratoires AES®

Intérêt : ce milieu sert à l'isolement des moisissures et des levures. Le chloramphénicol est un antibiotique de la famille des phénicolés et inhibe la croissance des bactéries.

Composition :
Yeast extract……..……..…...……5g
Peptone……..……..……..……10g
Glucose……..……..……...…….20g
Agar……..……..……20g
Chloramphénicol….……..……...….0,5g
Eau distillée ...…...…….……..QSP 1000mL

Prix :
1,15 euros la boîte

2.2 Milieu chromogène CAN2 de BioMérieux®, Réf 43631/43639

Intérêt : l'hydrolyse spécifique d'un substrat chromogène d'hexosaminidase en présence d'un inducteur de l'enzyme entraîne la coloration bleue des colonies de *Candida albicans.* Le mélange inhibiteur permet d'inhiber la croissance de la plupart des bactéries.

Composition :
Extrait de levure……...……..6g
Extrait de malt……..……..…4,5g
Substrats et régulateurs enzymatiques…..…1,71g
Agar…….……..……....14g
Mélange d'antibiotiques……..……..0,082g
Eau purifiée ……...……..……..…..QSP 1000mL

Prix :
1,30 euros la boîte

2.3 Milieu Sabouraud + chloramphénicol + cycloheximide

Intérêt : le cycloheximide inhibe la croissance de beaucoup de contaminants en particulier celle de *Scedosporium prolificans* mais pas celle de *Scedosporium apiospermum.*

Composition :
Yeast extract……...……5g
Peptone…….…….……10g
Glucose…….……..…….20g
Agar……...…….……20g
Chloramphénicol……....….0,5g
Eau distillée ...…...……..……..QSP 1000mL
Cycloheximide ou Actidione®…….……0,5g

Modalité de préparation :
Le cycloheximide est un produit thermostable donc il peut être ajouté avant autoclavage (110°C-15min). On peut également réaliser les boîtes à partir de tubes (ce qui est réalisé au Laboratoire) ou de bouteilles puisque ce milieu est commercialisé de référence REF 42 094-IVD.

Prix :
Yeast extract (Grosseron, par 500g)……...…..……24,8€
Par litre : 0,248€
Peptone bactériologique (VWR, 26 208 297, par 1kg)……152,75€
Par litre 1,5275€
Agar bactériologique (Grosseron, Réf :9101001, par 500g)...….56,60€
Par litre 2,26€
Chloramphénicol (Cooper, Réf : 1154760 , par 250g….……..…75,45€
Par litre 0,15€
Cycloheximide (Sigma, Réf : C7698, par 5g)…….……..115,50€
Par litre 11,55€

Total : 15,75€ par litre, soit 0,31€ par gélose (+ glucose)

2.4 Milieu au dichloran-rose bengal additionée de Bénomyl

Intérêt : le Bénomyl est un inhibiteur des microtubules favorisant l'isolement de plusieurs espèces concomitantes. Ce milieu serait le meilleur pour la mise en évidence et croissance de *Scedosporium apiospermum* d'après Sybren De Hoog.

Composition :
DRBC Agar base……..31,5g
Chloramphénicol……0,1g
Bénomyl (mettre en fin de cuisson)……....0,008g
Eau distillée ……..……..QSP 1000mL

Modalité de préparation :
Ajouter le Bénomyl en sortie d'autoclavage (110°C-15min) en ayant pris soin de découper les paillettes en morceau au scalpel stérile pour une meilleure dissolution

(si quelques petits morceaux restent dans les boîtes cela ne semble pas gêner la croissance fongique…)

Prix :
DRBC agar base (Oxoid, Réf :CM0727B, par 500G)…..……..110,20€
Par litre 6,95€
Chloramphénicol (Cooper, Réf : 1154760 , par 250g……..75,45€
Par litre 0,15€
Bénomyl (Sigma, Réf :38,158-6, par 25g)…….…..174,10€
Par litre 0,05€

Total : 7,15€ le litre, soit la boîte 0,143€

2.5 Milieu à l'Erythritol

Intérêt : l'Erythritol représente une source de carbone sélective pour *Exophiala dermatitidis*.

Composition :
Yeast nitrogen base……..…..…6,7g
Méso-érythritol…….……10g
Chloramphénicol……..……...….0,5g
Agar…….……..25g
Eau distillée ……...……..……..QSP 1000mL

Modalité de préparation :
Conservation de l'érythritol (température de fusion 121°C) à -20°C ; peser et mettre le produit avant l'autoclavage (110°C-15min ; plus chaud l'érythritol changera de couleur)

Prix :
Yeast nitrogen base (Difco, Réf : 239210, par 100g) …….……..88€
Par litre : 5,9€
Erythritol (Sigma, réf : E-7500, par 100g)…….....…….130,50€
Par litre 13,05€
Chloramphénicol (Cooper, Réf : 1154760 , par 250g……..…75,45€
Par litre 0,15€
Agar bactériologique (Grosseron, Réf :9101001, par 500g)..…56,60€
Par litre 2,83€

Total : 21,93€ par litre, soit 0,45€ la gélose

3. Score de Shwachman et Kulczycki :

État	Nombre de points	Activité	Examen clinique	Croissance nutrition	Radio pulmonaire
Excellent (85 à 100 points	25 points par case	• Activité normale • Tolérance à l'effort normale • Fréquentation scolaire régulière • Joie de vivre	• Ne tousse pas • Pouls et respiration normaux • Pas de dilatation thoracique • Pas d'hippocratisme	• Poids et taille au-dessus de -0,6 DS • Bon appétit • Selles d'aspect normales	• Pas d'emphysème • Pas d'exagération des opacités bronchiques parahilaires • Pas d'infiltration, pas d'atélectasie
Bon (71 à 85 points)	20 points par case	• Légère limitation de l'effort • Parfois passif ou irritable • Bonne fréquentation scolaire	• Petite toux sèche de temps en temps • Pous et respiration normaux au repos • Légère dilatation thoracique • Hippocratisme débutant	• Poids et taille au-dessus de -1,2 DS • Appétit normal • Selles fréquentes et anormalement molles	• Emphysème minime • Légère accentuation des axes broncho-vasculaires • Pas d'infiltration, pas d'atélectasie
Moyen (56 à 70 points)	15 points par case	• Se repose souvent • Passif ou irritable • Assez bonne fréquentation scolaire	• Toux chronique le matin, après l'effort ; pas de toux nocturne • Pouls et respiration de fréquence un peu trop élevée • Augmentation du diamètre thoracique, dépression du diaphragme • Parfois râles ronflants ou sibilants • Hippocratisme +	• Poids et taille au-dessus de -2 DS • Maigreur modérée • Appétit normal • Selles volumineuses et fétides	• Emphysème modéré • Hyperclarté pulmonaire • Exagération des opacités broncho-vascuaires • Quelques atélectasies localisées • Parfois infiltrats transitoires
Mauvais (41 à 55 points)	10 points par case	• Activité physique diminuée • Dyspnée d'effort • Susceptible, irritable • Mauvaise assiduité scolaire	• Toux chronique, producive • Fréquence du pouls et de la respiration augmentée • Dilatation thoracique avec déformation • Hippocratisme ++ • Cyanose fréquente	• Poids et taille au-dessous de -2 DS • Amyotrophie, maigreur • Appétit diminué • Selles malformées, volumineuses, graisseuses, très fétides	• Emphysème thoracique prononcé • Silhouette cardiaque étroite • Parfois atélectasie segmentaire ou lobaire • Opacités persistantes • Bulles d'empysème • Franche accentuation des axes broncho-vasculaires
Grave (40 et au-dessous)	5 points par case	• Limitation sévère de l'activité physique • Dyspnée d'effort et orthopnée • Inactif • Impossibilité de fréquenter l'école	• Accès de toux fréquents, souvent avec vomissements • Tachypnée, tachycardie • Thorax dilaté en barillet • Râles disséminés • Hippocratisme +++ • Cyanose	• Petit, dénutri • Arrêt de la croissance • Selles fréquentes et volumineuses • Prolapsus rectal fréquent	• Lésions étendues • Emphysème marqué avec nombreux aspects kystiques • Infiltrats et atélectasies, lobaires ou étendues • Bronchectasies et abcès

BIBLIOGRAPHIE

1. AGARWAL R. Allergic Bronchopulmonary Aspergillosis. *Chest,* 2009, **135** : 805-826.
2. ALCAZAR-FUOLI L., MELLADO E., ALASTRUEY-IZQUIERDO A., CUENCA-ESTRELLA M., RODRIGUEZ-TUDELA J.L. Aspergillus section Fumigati: Antifungal susceptibility patterns and sequence-based identification. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 2008, **52** : 1244-1251
3. ALLARD J.B., POYNTER M.E., MARR K.A., COHN L., RINCON M. and WHITTAKER L.A. Aspergillus fumigatus Generates an Enhanced Th2-Biased Immune Response in Mice with Defective Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator. *J. Immunol.,* 2006, **177** : 5186-5194.
4. ALMEIDA M., BUSSAMRA M. and RODRIGUES J. ABPA diagnosis in cystic fibrosis patients: the clinical utility of IgE specific to recombinant Aspergillus fumigatus allergens. *J Pediatr (Rio J),* 2006, **82** : 215-220.
5. ARENDRUP M.C., PERKHOFER S., HOWARD S.J., GARCIA-EFFRON G., VISHUKUMAR A., PERLIN D. and LASS-FLORL C. Establishing In Vitro-In Vivo Correlations for Aspergillus fumigatus: the Challenge of Azoles versus Echinocandins. *Antimicrob. Agents Chemother.,* 2008, **52** : 3504-3511.
6. BAKARE N., RICKERTS V., BARGON J. and JUST-NUBLING G. Prevalence of Aspergillus fumigatus and other fungal species in the sputum of adult patients with cystic fibrosis. *Mycoses,* 2003, **46** : 19-23.
7. BALFOUR-LYNN I.M., LEES B., HALL P. *et al*. Multicenter Randomized Controlled Trial of Withdrawal of Inhaled Corticosteroids in Cystic Fibrosis. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.,* 2006, **173** : 1356-1362.
8. BARGON J., DAULETBAEV N., KOHLER B., WOLF M., POSSELT H. and WAGNER T. Prophylactic antibiotic therapy is associated with an increased prevalence of Aspergillus colonization in adult cystic fibrosis patients. *Respir Med,* 1999, **93** : 835-838.
9. BARTON R., HOBSON R., DENTON M. *et al*. Serologic diagnosis of allergic bronchopulmonary aspergillosis in patients with cystic fibrosis through the detection of immunoglobulin G to Aspergillus fumigatus. *Diagn Microbiol Infect Dis,* 2008, **62** : 287-291.
10. BECKER J.W., BURKE W., MCDONALD G. *et al*.. Prevalence of Allergic Bronchopulmonary Aspergillosis and Atopy in Adult Patients With Cystic Fibrosis. *Chest,* 1996, **109** : 1536-1540.
11. BENT J. and KUHN F. Allergic fungal sinusitis/polyposis. *Allergy Asthma Proc,* 1996, **17** : 259-268.
12. BOCHNER B. Systemic activation of basophils and eosinophils: markers and consequences. *J Allergy Clin Immunol,* 2000, **106,** Suppl. 5 : 292-302.
13. BONNEL A., QUINQUE K., LE ROUX P. and LE LUYER B. Semi-invasive necrotic aspergillosis in a child with cystic fibrosis. *Rev Mal Respir,* 2006, **23** : 343-347.
14. BOUCHARA J., HSIEH H.Y., CROQUEFER S. *et al*. Development of an Oligonucleotide Array for Direct Detection of Fungi in Sputum Samples from Patients with Cystic Fibrosis. *J. Clin. Microbiol,* 2009, **47** : 142-152.
15. BROUARD J., KNAUER N., BOELLE P. *et al*. Influence of interleukin-10 on Aspergillus fumigatus infection in patients with cystic fibrosis. *J Infect Dis,* 2005, **191** : 1988-1991.
16. BURNS J., VAN DALFSEN J., SHAWAR R. *et al*. Effect of chronic intermittent administration of inhaled tobramycin on respiratory microbial flora in patients with cystic fibrosis. *J Infect Dis,* 1999, **179** : 1190-1196.
17. CARPAGNANO G.E., BARNES P.J., GEDDES D.M., HODSON M.E. and KHARITONOV S.A. Increased Leukotriene B4 and Interleukin-6 in Exhaled Breath Condensate in Cystic Fibrosis. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.,* 2003, **167** : 1109-1112.
18. CASAULTA C., FLUCKIGER S., CRAMERI R., BLASER K. and SCHOENI M. Time course of antibody response to recombinant Aspergillus fumigatus antigens in cystic fibrosis with and without ABPA. *Pediatr Allergy Immunol,* 2005, **16** : 217-225.
19. CASAULTA C., SCHONI M., WEICHEL M. *et al*. IL-10 controls Aspergillus fumigatus- and Pseudomonas aeruginosa-specific T-cell response in cystic fibrosis. *Pediatr Res,* 2003, **53** : 313-319.
20. CHAI L.Y.A., KULLBERG B.J., VONK A.G., *et al*. Modulation of Toll-Like Receptor 2 (TLR2) and TLR4 Responses by Aspergillus fumigatus. *Infect. Immun.,* 2009, **77** : 2184-2192.
21. CHANDRASEKAR P. Antifungal resistance in Aspergillus. *Med Mycol,* 2005, **43,** Suppl 1 : 295-298.

22. CHAUHAN B., SANTIAGO L., KIRSCHMANN D. *et al*. The association of HLA-DR alleles and T cell activation with allergic bronchopulmonary aspergillosis. *J. Immunol.,* 1997 **159** : 4072-4076.
23. CHOTIRMALL S., BRANAGAN P., GUNARATNAM C. and MCELVANEY N. Aspergillus/allergic bronchopulmonary aspergillosis in an Irish cystic fibrosis population: a diagnostically challenging entity. *Respir Care,* 2008, **53** : 1035-1041.
24. CHUNG Y., KRAUT J., STONE A. and VALAITIS J. Disseminated aspergillosis in a patient with cystic fibrosis and allergic bronchopulmonary aspergillosis. *Pediatr Pulmonol,* 1994, **17** : 131-134.
25. CIMON B., CARRERE J., VINATIER J., CHAZALETTE J., CHABASSE D. and BOUCHARA J. Clinical significance of Scedosporium apiospermum in patients with cystic fibrosis. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis,* 2000, **19** : 53-56.
26. CIMON B., ZOUHAIR R., SYMOENS F., CARRERE J., CHABASSE D. and BOUCHARA J. Aspergillus terreus in a cystic fibrosis clinic: environmental distribution and patient colonization pattern. *J Hosp Infect,* 2003, **53** : 81-82.
27. CIMON B., CHALLIER S., BEGUIN H., CARRERE J., CHABASSE D. and BOUCHARA J. Airway Colonization by Acrophialophora fusispora in Patients with Cystic Fibrosis. *J. Clin. Microbiol,* 2005, **43** : 1484-1487.
28. CIMON B., SYMOENS F., ZOUHAIR R. *et al*. Molecular epidemiology of airway colonisation by Aspergillus fumigatus in cystic fibrosis patients. *J. Med. Microbiol.,* 2001, **50** : 367-374.
29. CLARK H. and REID K. The potential of recombinant surfactant protein D therapy to reduce inflammation in neonatal chronic lung disease, cystic fibrosis, and emphysema. *Arch. Dis. Child.,* 2003, **88** : 981-984.
30. CLEMENT A., TAMALET A., LEROUX E., RAVILLY S., FAUROUX B. and JAIS J. Long term effects of azithromycin in patients with cystic fibrosis: a double blind, placebo controlled trial. *Thorax,* 2006, **61** : 895-902.
31. CONWAY S.P., ETHERINGTON C., PECKHAM D.G., BROWNLEE K.G., WHITEHEAD A. and CUNLIFFE H. Pharmacokinetics and safety of itraconazole in patients with cystic fibrosis. *J. Antimicrob. Chemother.,* 2004, **53** : 841-847.
32. CORTESE G., MALFITANA V., PLACIDO R. *et al*. Role of chest radiography in the diagnosis of allergic bronchopulmonary aspergillosis in adult patients with cystic fibrosis. *Radiol Med,* 2007, **112** : 626-636.
33. CORTEZ K.J., ROILIDES E., QUIROZ-TELLES F. *et al*. Infections Caused by Scedosporium spp. *Clin. Microbial. Rev.,* 2008, **21** : 157-197.
34. CRAMERI R. and KRAEMER R. Specific IgE against Recombinant Allergens in Allergic Bronchopulmonary Aspergillosis. *Am. J. Resp. Crit. Care Med.,* 2007, **175** : 967b-968.
35. CUENCA-ESTRELLA M., ALASTRUEY-IZQUIERDO A., ALCAZAR-FUOLI L. *et al*. In Vitro Activities of 35 Double Combinations of Antifungal Agents against Scedosporium apiospermum and Scedosporium prolificans. *Antimicrob. Agents Chemother.,* 2008, **52** : 1136-1139.
36. DE OLIVEIRA E., GIAVINA-BIANCHI P., FONSECA L., FRANCA A. and KALIL J. Allergic bronchopulmonary aspergillosis' diagnosis remains a challenge. *Respir Med,* 2007, **101** : 2352-2357.
37. DE VALK H., KLAASSEN C. and MEIS J. Molecular typing of Aspergillus species. *Mycoses,* 2008, **51** : 463-476.
38. DE VALK H., KLAASSEN C., YNTEMA J. *et al*. Molecular typing and colonization patterns of Aspergillus fumigatus in patients with cystic fibrosis. *J Cyst Fibros,* 2009, **8** : 110-114.
39. DEFONTAINE A., ZOUHAIR R., CIMON B. *et al*. Genotyping Study of Scedosporium apiospermum Isolates from Patients with Cystic Fibrosis. *J. Clin. Microbiol.,* 2002, **40** : 2108-2114.
40. DENNING D.W., O'DRISCOLL B.R., POWELL G. *et al*. Randomized Controlled Trial of Oral Antifungal Treatment for Severe Asthma with Fungal Sensitization: The Fungal Asthma Sensitization Trial (FAST) Study. *Am. J. Resp. Crit. Care Med.,* 2009, **179** : 11-18.
41. DESSAINT J., BOUT D., FRUIT J. and CAPRON A. Serum concentration of specific IgE antibody against Aspergillus fumigatus and identification of the fungal allergen. *Clin Immunol Immunopathol,* 1976, **5** : 314-319.
42. DRAGO M., SCALTRITO M., CARIANI L. and MORACE G. In vitro testing of Aspergillus fumigatus clinical isolates for susceptibility to voriconazole, amphotericin B and itraconazole: comparison of sensititre versus NCCLS M38-A using two different inocula. *J Chemother,* 2004, **16** : 474-478.
43. FREYMOND N., LE LOCH J., DEVOUASSOUX G., HARF R., RAKOTOMALALA A. and PACHECO Y. Aspergillus bronchitis and aspergilloma treated successfully with voriconazole. *Rev Mal Respir,* 2005, **22** : 811-814.

44. GELLER D.E., KAPLOWITZ H., LIGHT M.J. and COLIN A.A. Allergic Bronchopulmonary Aspergillosis in Cystic Fibrosis: Reported Prevalence, Regional Distribution, and Patient Characteristics. *Chest,* 1999, **116** : 639-646.
45. GERMAUD P., RENAUDIN K., DANNER I., MORIN O. and DE LAJARTRE A. [Bronchopulmonary aspergillosis: new developments]. *Rev Mal Respir,* 2001, **18** : 257-266.
46. GIBSON P.G., WARK P.A.B., SIMPSON J.L. *et al*. Induced sputum IL-8 gene expression, neutrophil influx and MMP-9 in allergic bronchopulmonary aspergillosis. *Eur. Respir. J.,* 2003, **21** : 582-588.
47. GLACKIN L., LEEN G., ELNAZIR B. and GREALLY P. Voriconazole in the treatment of allergic bronchopulmonary aspergillosis in cystic fibrosis. *Ir Med J,* 2009, **102** : 29-29.
48. GOODRICH J.S., SUTTON-SHIELDS T.N., KERR A., WEDD J.P., MILLER M.B. and GILLIGAN P.H. Prevalence of Community-Associated Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus in Patients with Cystic Fibrosis. *J. Clin. Microbiol.,* 2009, **47** : 1231-1233.
49. GOSS C.H. and BURNS J.L. Exacerbations in cystic fibrosis {middle dot} 1: Epidemiology and pathogenesis. *Thorax,* 2007, **62** : 360-367.
50. GUIGNARD, S., HUBERT, D., DUPONT B. *et al*. Multifocal Scedosporium apiospermum spondylitis in a cystic fibrosis patient. *J Cyst Fibros,* 2008, **7** : 89-91.
51. HARRISON F. Microbial ecology of the cystic fibrosis lung. *Microbiology,* 2007, **153** : 917-923.
52. HARTL D. Immunological mechanisms behind the cystic fibrosis-ABPA link. *Med Mycol,* 2008, 1-9.
53. HARTL D., LATZIN P., ZISSEL G., KRANE M., KRAUSS-ETSCHMANN S. and GRIESE M. Chemokines Indicate Allergic Bronchopulmonary Aspergillosis in Patients with Cystic Fibrosis. *Am. J. Resp. Crit. Care Med.,* 2006, **173** : 1370-1376.
54. HEMMANN S., NIKOLAIZIK W., SCHONI M., BLASER K. and CRAMERI R. Differential IgE recognition of recombinant Aspergillus fumigatus allergens by cystic fibrosis patients with allergic bronchopulmonary aspergillosis or Aspergillus allergy. *Eur J Immunol,* 1998, **28** : 1155-1160.
55. HENNIG S., WATERHOUSE T., BELL S., FRANCE M., WAINWRIGHT C., MILLER H., CHARLES B. and DUFFULL S. A d-optimal designed population pharmacokinetic study of oral itraconazole in adult cystic fibrosis patients. *Br J Clin Pharmacol,* 2007, **63** : 438-450.
56. HILLIARD T., EDWARDS S., BUCHDAHL R. *et al*. Voriconazole therapy in children with cystic fibrosis. *J Cyst Fibros,* 2005, **4** : 215-220.
57. HINSON K.F.W., MOON A.J. and PLUMMER N.S. Broncho-pulmonary Aspergillosis : A Review and a Report of Eight New Cases. *Thorax,* 1952, **7** : 317-333.
58. HOLDOM M., HAY R. and HAMILTON A. The Cu,Zn superoxide dismutases of Aspergillus flavus, Aspergillus niger, Aspergillus nidulans, and Aspergillus terreus: purification and biochemical comparison with the Aspergillus fumigatus Cu,Zn superoxide dismutase. *Infect. Immun.,* 1996, **64** : 3326-3332.
59. HORRE, R., SCHAAL, K., SIEKMEIER, R., STERZIK, B., DE HOOG, G. and SCHNITZLER, N. Isolation of fungi, especially Exophiala dermatitidis, in patients suffering from cystic fibrosis. A prospective study. *Respiration,* 2004, **71** : 360-366.
60. HUTCHESON P.S., SLAVIN R.G., KNUTSEN A.P. and REJENT A.J. A 12-Year Longitudinal Study of Aspergillus Sensitivity in Patients With Cystic Fibrosis. *Chest,* 1996, **110** : 363-366.
61. KANTHAN S., BUSH A., KEMP M. and BUCHDAHL R. Factors effecting impact of Aspergillus fumigatus sensitization in cystic fibrosis. *Pediatr Pulmonol,* 2007, **42** : 785-793.
62. KANU A. and PATEL K. Treatment of allergic bronchopulmonary aspergillosis (ABPA) in CF with anti-IgE antibody (omalizumab). *Pediatr Pulmonol,* 2008, **43** : 1249-1251.
63. KAUFFMAN H., TOMEE J., VAN DE RIET M., TIMMERMAN A. and BORGER P. Protease-dependent activation of epithelial cells by fungal allergens leads to morphologic changes and cytokine production. *J Allergy Clin Immunol,* 2000, **105** : 1185-1193.
64. KERR J., TAYLOR G., RUTMAN A., HOIBY N., COLE P. and WILSON R. Pseudomonas aeruginosa pyocyanin and 1-hydroxyphenazine inhibit fungal growth. *J. Clin. Pathol.,* 1999, **52** : 385-387.
65. KHAN S., MCCLELLAN J. and KNUTSEN A. Increased sensitivity to IL-4 in patients with allergic bronchopulmonary aspergillosis. *Int Arch Allergy Immunol,* 2000, **123** : 319-326.
66. KNUTSEN A. Lymphocytes in allergic bronchopulmonary aspergillosis. *Front Biosci,* 2003, **8** : 589-602.
67. KNUTSEN A., HUTCHESON P., SLAVIN R. and KURUP V. IgE antibody to Aspergillus fumigatus recombinant allergens in cystic fibrosis patients with allergic bronchopulmonary aspergillosis. *Allergy,* 2004; **59** : 198-203.

68. KNUTSEN A., HUTCHINSON P., ALBERS G., CONSOLINO J., SMICK J. and KURUP V. Increased sensitivity to IL-4 in cystic fibrosis patients with allergic bronchopulmonary aspergillosis. *Allergy,* 2004, **59** : 81-87.
69. KNUTSEN A., NOYES B., WARRIER M. and CONSOLINO J. Allergic bronchopulmonary aspergillosis in a patient with cystic fibrosis: diagnostic criteria when the IgE level is less than 500 IU/mL. *Ann Allergy Asthma Immunol,* 2005, **95** : 488-493.
70. KOEHM S., SLAVIN R., HUTCHESON P., TREJO T., DAVID C. and BELLONE C. HLA-DRB1 alleles control allergic bronchopulmonary aspergillosis-like pulmonary responses in humanized transgenic mice. *J Allergy Clin Immunol,* 2007, **120** : 570-577.
71. KRAEMER R., DELOSEA N., BALLINARI P., GALLATI S. and CRAMERI R. Effect of Allergic Bronchopulmonary Aspergillosis on Lung Function in Children with Cystic Fibrosis. *Am. J. Resp. Crit. Care Med,* 2006, **174** : 1211-1220.
72. KRANE M. and GRIESE M. Surfactant protein D in serum from patients with allergic bronchopulmonary aspergillosis. *Eur. Respir. J.,* 2003, **22** : 592-595.
73. KUMAR R. Mild, Moderate, and Severe Forms of Allergic Bronchopulmonary Aspergillosis: A Clinical and Serologic Evaluation. *Chest,* 2003, **124** : 890-892.
74. KUNST H., WICKREMASINGHE M., WELLS A. and WILSON R. Nontuberculous mycobacterial disease and Aspergillus-related lung disease in bronchiectasis. *Eur. Respir. J.,* 2006, **28** : 352-357.
75. KURUP V. Aspergillus antigens: which are important? *Med Mycol,* 2005, **43,** Suppl 1 : 189-196.
76. KURUP V., KNUTSEN A., MOSS R. and BANSAL N. Specific antibodies to recombinant allergens of Aspergillus fumigatus in cystic fibrosis patients with ABPA. *Clin Mol Allergy,* 2006, **4** : 11-11.
77. LAOUDI Y., PAOLINI J., GRIMFED A. and JUST J. Nebulised corticosteroid and amphotericin B: an alternative treatment for ABPA? *Eur. Resp. J.,* 2008, **31** : 908-909.
78. LATGE J. Aspergillus fumigatus and Aspergillosis. *Clin. Microbial. Rev.,* 1999, **12** : 310-350.
79. LATGE J. The pathobiology of Aspergillus fumigatus. *Trends Microbiol,* 2001, **9** : 382-389.
80. LATZIN P., HARTL D., REGAMEY N., FREY U., SCHOENI M.H. and CASAULTA C. Comparison of serum markers for allergic bronchopulmonary aspergillosis in cystic fibrosis. *Eur. Respir. J.,* 2008, **31** : 36-42.
81. LAUFER, P., FINK, J., BRUNS W. *et al*. Allergic bronchopulmonary aspergillosis in cystic fibrosis. *J Allergy Clin Immunol,* 1984, **73** : 44-48.
82. LEBECQUE P., LEONARD A., ARGAZ M., GODDING V. and PILETTE C. Omalizumab for exacerbations of allergic bronchopulmonary aspergillosis in patients with cystic fibrosis. *BMJ Case Reports,* 2009, bcr0720080379.
83. LIM A., CHAMBERS D., AYRES J., STABLEFORTH D. and HONEYBOURNE D. Exhaled nitric oxide in cystic fibrosis patients with allergic bronchopulmonary aspergillosis. *Respir Med,* 2003, **97** : 331-336.
84. MAIZ L., CUEVAS M., LAMAS A., SOUSA A., QUIRCE S. and SUAREZ L. Aspergillus fumigatus and Candida albicans in cystic fibrosis: clinical significance and specific immune response involving serum immunoglobulins G, A, and M. *Arch Bronconeumol,* 2008, **44** : 146-151.
85. MAIZ L., CUEVAS M., QUIRCE S. *et al*. Serologic IgE Immune Responses Against Aspergillus fumigatus and Candida albicans in Patients With Cystic Fibrosis. *Chest,* 2002, **121** : 782-788.
86. MARCHAND E., VERELLEN-DUMOULIN C., MAIRESSE M. *et al*. Frequency of Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator Gene Mutations and 5T Allele in Patients With Allergic Bronchopulmonary Aspergillosis. *Chest,* 2001, **119** : 762-767.
87. MASTELLA G., RAINISIO M., HARMS H. *et al*. Allergic bronchopulmonary aspergillosis in cystic fibrosis. A European epidemiological study. Epidemiologic Registry of Cystic Fibrosis. *Eur. Respir. J.,* 2000, **16** : 464-471.
88. MENA A., SMITH E.E., BURNS J.L. *et al*. Genetic Adaptation of Pseudomonas aeruginosa to the Airways of Cystic Fibrosis Patients Is Catalyzed by Hypermutation. *J. Bacteriol.,* 2008, **190** : 7910-7917.
89. MILLA C., WIELINSKI C. and REGELMANN W. Clinical significance of the recovery of Aspergillus species from the respiratory secretions of cystic fibrosis patients. *Pediatr Pulmonol,* 1996, **21** : 6-10.
90. MILLER M., GREENBERGER P., AMERIAN R. *et al*. Allergic bronchopulmonary mycosis caused by Pseudallescheria boydii. *Am Rev Respir Dis,* 1993, **148** : 810-812.
91. MUELLER C., TORREZ D., BRAAG S. *et al*. Partial correction of the CFTR-dependent ABPA mouse model with recombinant adeno-associated virus gene transfer of truncated CFTR gene. *J Gene Med,* 2008, **10** : 51-60.

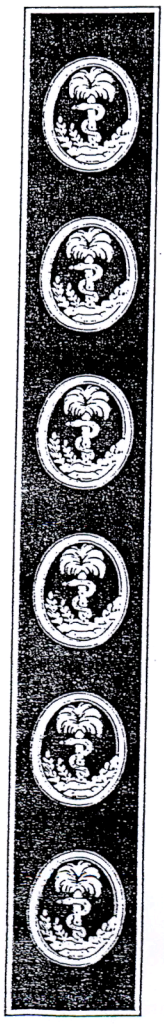
92. MULLER C., BRAAG S., HERLIHY J. *et al*. Enhanced IgE allergic response to Aspergillus fumigatus in CFTR-/- mice. *Lab Invest,* 2006, **86** : 130-40.
93. MUSSAFFI H., RIVLIN J., SHALIT I., EPHROS M. and BLAU H. Nontuberculous mycobacteria in cystic fibrosis associated with allergic bronchopulmonary aspergillosis and steroid therapy. *Eur. Respir. J.,* 2005, **25** : 324-328.
94. NAGANO Y., ELBORN J., MILLAR B., GOLDSMITH C., RENDALL J. and MOORE J. Development of a novel PCR assay for the identification of the black yeast, Exophiala (Wangiella) dermatitidis from adult patients with cystic fibrosis (CF). *J Cyst Fibros,* 2008, **7** : 576-580.
95. NAGANO Y., MILLAR B., GOLDSMITH C. *et al*. Development of selective media for the isolation of yeasts and filamentous fungi from the sputum of adult patients with cystic fibrosis (CF). *J Cyst Fibros,* 2008, **7** : 566-572.
96. NIKOLAIZIK W.H., WEICHEL M., BLASER K. and CRAMERI R. Intracutaneous Tests with Recombinant Allergens in Cystic Fibrosis Patients with Allergic Bronchopulmonary Aspergillosis and Aspergillus Allergy. *Am. J. Resp. Crit. Care Med.,* 2002, **165** : 916-921.
97. O'HEHIR R., BAL V., QUINT D., MOQBEL R., KAY A., ZANDERS E. and LAMB J. An in vitro model of allergen-dependent IgE synthesis by human B lymphocytes: comparison of the response of an atopic and a non-atopic individual to Dermatophagoides spp. (house dust mite). *Immunology,* 1989, **66** : 499-504.
98. PATTERSON R., GREENBERGER P.A., HALWIG J.M., LIOTTA J.L. and ROBERTS M. Allergic Bronchopulmonary Aspergillosis: Natural History and Classification of Early Disease by Serologic and Roentgenographic Studies. *Archives of Internal Medicine,* 1986, **146** : 916-918.
99. PATTERSON R., GREENBERGER P.A., RADIN R.C. and ROBERTS M. Allergic Bronchopulmonary Aspergillosis: Staging as an Aid to Management. *Ann Intern Med,* 1982, **96** : 286-291.
100. PERKHOFER S., JOST D., DIERICH M.P. and LASS-FLORL C. Susceptibility Testing of Anidulafungin and Voriconazole Alone and in Combination against Conidia and Hyphae of Aspergillus spp. under Hypoxic Conditions. *Antimicrob. Agents Chemother.,* 2008, **52** : 1873-1875.
101. PIHET M., CARRERE J., CIMON B. *et al*. Occurrence and relevance of filamentous fungi in respiratory secretions of patients with cystic fibrosis--a review. *Med Mycol,* 2009, **47** : 387-397.
102. RAINER J., KALTSEIS J., DE HOOG S. and SUMMERBELL R. Efficacy of a selective isolation procedure for members of the Pseudallescheria boydii complex. *Antonie van Leeuwenhoek,* 2008, **93** : 315-322.
103. RANDHAWA H., CHOWDHARY A., PREETI SINHA K., KOWSHIK T. and VIJAYAN V. Evaluation of peptone glucose fluconazole agar as a selective medium for rapid and enhanced isolation of Aspergillus fumigatus from the respiratory tract of bronchopulmonary aspergillosis patients colonized by Candida albicans. *Med Mycol,* 2006, **44** : 343-348.
104. RAPAKA R. and KOLLS J. Pathogenesis of allergic bronchopulmonary aspergillosis in cystic fibrosis: current understanding and future directions. *Med Mycol,* 2008, 1-7.
105. RICKETTI, A., GREENBERGER, P. and PATTERSON, R. Serum IgE as an important aid in management of allergic bronchopulmonary aspergillosis. *J Allergy Clin Immunol,* 1984, **74** : 68-71.
106. RINGER, S., HIPLER, U., ELSNER, P., ZINTL, F. and MAINZ, J. Potential role of the cellular allergen stimulation test (CAST) in diagnosis of allergic bronchopulmonary aspergillosis (ABPA) in cystic fibrosis. *Pediatr Pulmonol,* 2007, **42** : 314-318.
107. RITZ N., AMMANN R., CASAULTA AEBISCHE C., SCHOENI-AFFOLTER F. and SCHOENI M. Risk factors for allergic bronchopulmonary aspergillosis and sensitisation to Aspergillus fumigatus in patients with cystic fibrosis. *Eur J Pediatr,* 2005, **164** : 577-582.
108. SALEZ F., BRICHET A., DESURMONT S., GROSBOIS J., WALLAERT B. and TONNEL A. Effects of Itraconazole Therapy in Allergic Bronchopulmonary Aspergillosis. *Chest,* 1999, **116** : 1665-1668.
109. SAXENA S., MADAN T., SHAH A., MURALIDHAR K. and SARMA P. Association of polymorphisms in the collagen region of SP-A2 with increased levels of total IgE antibodies and eosinophilia in patients with allergic bronchopulmonary aspergillosis. *J Allergy Clin Immunol,* 2003, **111** : 1001-1007.
110. SHAH P., MAWDSLEY S., NASH K., CULLINAN P., COLE P. and WILSON R. Determinants of chronic infection with Staphylococcus aureus in patients with bronchiectasis. *Eur. Resp. J.,* 1999, **14** : 1340-1344.
111. SHOSEYOV D., BROWNLEE K.G., CONWAY S.P. and KEREM E. Aspergillus Bronchitis in Cystic Fibrosis. *Chest,* 2006, **130** : 222-226.

112. SKOV M., KOCH C., REIMERT C. and POULSEN L. Diagnosis of allergic bronchopulmonary aspergillosis (ABPA) in cystic fibrosis. *Allergy,* 2000, **55** : 50-58.
113. SKOV M., MCKAY K., KOCH C. and COOPER P. Prevalence of allergic bronchopulmonary aspergillosis in cystic fibrosis in an area with a high frequency of atopy. *Respir Med,* 2005, **99** : 887-893.
114. SKOWRONSKI E. and FITZGERALD D. Life-threatening allergic bronchopulmonary aspergillosis in a well child with cystic fibrosis. *Med J Aust,* 2005, **182** : 482-483.
115. STEVENS D., MOSS R., KURUP V. *et al*. Allergic bronchopulmonary aspergillosis in cystic fibrosis--state of the art: Cystic Fibrosis Foundation Consensus Conference. *Clin Infect Dis,* 2003, **37,** Suppl 3 : 225-264.
116. STEVENS D.A., SCHWARTZ H.J., LEE J.Y. *et al*. A Randomized Trial of Itraconazole in Allergic Bronchopulmonary Aspergillosis. *N. Engl. J. Med.,* 2000, **342** : 756-762.
117. SYMOENS F., KNOOP C., SCHROOYEN M. *et al*. Disseminated Scedosporium apiospermum infection in a cystic fibrosis patient after double-lung transplantation. *J Heart Lung Transplant,* 2006, **25** : 603-607.
118. TACCETTI G., PROCOPIO E., MARIANELLI L. *et al*. Allergic bronchopulmonary aspergillosis in Italian cystic fibrosis patients: prevalence and percentage of positive tests in the employed diagnostic criteria. *Eur J Epidemiol,* 2000, **16** : 837-842.
119. THOMSON J., WESLEY A., BYRNES C. and NIXON G. Pulse intravenous methylprednisolone for resistant allergic bronchopulmonary aspergillosis in cystic fibrosis. *Pediatr Pulmonol,* 2006, **41** : 164-170.
120. TILLIE-LEBLOND I. and TONNEL A. Allergic bronchopulmonary aspergillosis. *Allergy,* 2005, **60** : 1004-1013.
121. TOMEE J., WIERENGA A., HIEMSTRA P. and KAUFFMAN H. Proteases from Aspergillus fumigatus induce release of proinflammatory cytokines and cell detachment in airway epithelial cell lines. *J Infect Dis,* 1997, **176** : 300-303.
122. VAN DER ENT C.K., HOEKSTRA H. and RIJKERS G.T. Successful treatment of allergic bronchopulmonary aspergillosis with recombinant anti-IgE antibody. *Thorax,* 2007, **62** : 276-277.
123. VAN HAREN E., LAMMERS J., FESTEN J., HEIJERMAN H., GROOT C. and VAN HERWAARDEN C. The effects of the inhaled corticosteroid budesonide on lung function and bronchial hyperresponsiveness in adult patients with cystic fibrosis. *Respir Med,* 1995, **89** : 209-214.
124. VAZQUEZ-TSUJI O., CAMPOS RIVERA T., RONDAN ZARATE A. and MIRABAL GARCIA M. Endobronchitis by Scedosporium apiospermum in a child with cystic fibrosis. *Rev Iberoam Micol,* 2006, **23** : 245-248.
125. WARK P. Pathogenesis of allergic bronchopulmonary aspergillosis and an evidence-based review of azoles in treatment. *Respir Med,* 2004, **98** : 915-923.
126. WARK P., WILSON A. and GIBSON P. Azoles for allergic bronchopulmonary aspergillosis associated with asthma. *Cochrane Database Syst Rev,* 2001, **4** : CD001108-CD001108.
127. WARK P., HENSLEY M., SALTOS N. *et al*. Anti-inflammatory effect of itraconazole in stable allergic bronchopulmonary aspergillosis: a randomized controlled trial. *J Allergy Clin Immunol,* 2003, **111** : 952-957.
128. WARK P., SALTOS N., SIMPSON J., SLATER S., HENSLEY M. and GIBSON P. Induced sputum eosinophils and neutrophils and bronchiectasis severity in allergic bronchopulmonary aspergillosis. *Eur. Resp. J.,* 2000, **16** : 1095-1101.
129. WOJNAROWSKI C., EICHLER I., GARTNER C. *et al*. Sensitization to Aspergillus fumigatus and lung function in children with cystic fibrosis. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.,* 1997, **155** : 1902-1907.
130. ZENTLER-MUNRO P.L., FITZPATRICK W.J., BATTEN J.C. and NORTHFIELD T.C. Effect of intrajejunal acidity on aqueous phase bile acid and lipid concentrations in pancreatic steatorrhoea due to cystic fibrosis. *Gut,* 1984, **25** : 500-507.
131. ZIRBES J. and MILLA C. Steroid-sparing effect of omalizumab for allergic bronchopulmonary aspergillosis and cystic fibrosis. *Pediatr Pulmonol,* 2008, **43** : 607-610.
132. CHABASSE D. *Les moisissures d'ntérêt médical*, cahier Bioforma, 2002.
133. *Dictionnaire Vidal*, 2008
134. http://www.orphanet.fr
135. http://www.stallergenes.fr

Faculté de Pharmacie de Grenoble



Serment des Apothicaires



Je jure, en présence des maîtres de la faculté, des conseillers de l'ordre des pharmaciens et de mes condisciples :

D'honorer ceux qui m'ont instruit dans les préceptes de mon art et de leur témoigner ma reconnaissance en restant fidèle à leur enseignement.

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

De ne jamais oublier ma responsabilité et mes devoirs envers le malade et sa dignité humaine ; en aucun cas je ne consentirai à utiliser mes connaissances et mon état pour corrompre les moeurs et favoriser des actes criminels.

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