



HAL
open science

Évaluation et prise en charge du risque fongique chez le patient atteint de mucoviscidose : résultats de la première visite de l'étude Mucofong au CHU de Grenoble, un an après l'inclusion

Clémence Cruyppenninck

► To cite this version:

Clémence Cruyppenninck. Évaluation et prise en charge du risque fongique chez le patient atteint de mucoviscidose : résultats de la première visite de l'étude Mucofong au CHU de Grenoble, un an après l'inclusion. Sciences pharmaceutiques. 2010. dumas-01059556

HAL Id: dumas-01059556

<https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-01059556>

Submitted on 2 Sep 2014

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.

AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il n'a pas été réévalué depuis la date de soutenance.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact au SICD1 de Grenoble : **thesebum@ujf-grenoble.fr**

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10

http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php

<http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm>

Ex. 2



UNIVERSITE JOSEPH FOURIER
FACULTE DE PHARMACIE DE GRENOBLE

Année : 2010

N° 7014

**EVALUATION ET PRISE EN CHARGE DU RISQUE FONGIQUE CHEZ LE
PATIENT ATTEINT DE MUCOVISCIDOSE : RESULTATS DE LA
PREMIERE VISITE DE L'ETUDE MUCOFONG AU CHU DE GRENOBLE,
UN AN APRES L'INCLUSION**

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
DIPLOME D'ETAT

Clémence CRUYENNINCK

Née le 6 Avril 1983 à Sainte Colombe (69)

THESE SOUTENUE PUBLIQUEMENT A LA FACULTE DE GRENOBLE

Le 30 Avril 2010

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 C. LLERENA

Madame le Docteur C. CRACOWSKI

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.



UNIVERSITE JOSEPH FOURIER
FACULTE DE PHARMACIE DE GRENOBLE

Année : 2010

N°

**EVALUATION ET PRISE EN CHARGE DU RISQUE FONGIQUE CHEZ LE
PATIENT ATTEINT DE MUCOVISCIDOSE : RESULTATS DE LA
PREMIERE VISITE DE L'ETUDE MUCOFONG AU CHU DE GRENOBLE,
UN AN APRES L'INCLUSION**

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
DIPLOME D'ETAT

Clémence CRUYPENINCK

Née le 6 Avril 1983 à Sainte Colombe (69)

THESE SOUTENUE PUBLIQUEMENT A LA FACULTE DE GRENOBLE

Le 30 Avril 2010

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 C. LLERENA

Madame le Docteur C. CRACOWSKI

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.



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-Doyenne : Mme **Edwige NICOLLE**

Année 2009 – 2010

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 (PU-PH)
DANEL	Vincent	Toxicologie (SMUR SAMU / PU-PH)
DECOUT	Jean-Luc	Chimie Inorganique (D.P.M)
DROUET	Christian	Immunologie médicale (GREPI – TIMC)
DROUET	Emmanuel	Microbiologie (U.V.H.C.I)
FAURE	Patrice	Biochimie (HP2 / PU-PH)
GODIN-RIBUOT	Diane	Physiologie – Pharmacologie (HP2)
GRILLOT	Renée	Parasitologie – Mycologie Médicale (Directeur UFR / LAPM, PU-PH)
LENORMAND	Jean Luc	Ingénierie Cellulaire, Biothérapies (Therex, TIMC)
PEYRIN	Eric	Chimie Analytique (D.P.M)
SEVE	Michel	Biochimie – Biotechnologie (IAB, PU-PH)
RIBUOT	Christophe	Physiologie - Pharmacologie (HP2)
ROUSSEL	Anne-Marie	Biochimie Nutrition (L.B.F.A)
WOUESSIDJEW	Denis	Pharmacotechnie (D.P.M)

PROFESSEUR EMERITE

FAVIER Alain

PROFESSEURS ASSOCIES (PAST)

RIEU Isabelle Qualitologie (Praticien Attaché – CHU)

TROILLER Patrice Santé Publique (Praticien Attaché – CHU)

PROFESSEUR AGREGE (PRAG)

GAUCHARD Pierre Alexis Chimie (D.P.M)

CHU : Centre Hospitalier Universitaire

DPM : Département de Pharmacochimie Moléculaire

HP2 : Hypoxie Physiopathologie Respiratoire et Cardiovasculaire

IAB : Institut Albert Bonniot

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

MAITRES DE CONFERENCES DE PHARMACIE

ALDEBERT	Delphine	Parasitologie – Mycologie (L.A.P.M)
ALLENET	Benoît	Pharmacie Clinique (THEMAS TIMC-IMAG / MCU-PH)
BATANDIER	Cécile	Nutrition et Physiologie (L.B.F.A)
BRETON	Jean	Biologie Moléculaire/Biochimie (L.C.I.B - L.A.N)
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
DEMEILLIERS	Christine	Biochimie (L.B.F.A)
DURMORT-MEUNIER	Claire	Biotechnologies (I.B.S.)
GEZE	Annabelle	Pharmacotechnie (D.P.M.)
GERMI	Raphaële	Microbiologie (U.V.H.C.I / MCU-PH)
GILLY	Catherine	Chimie Thérapeutique (D.P.M)
GROSSET	Catherine	Chimie Analytique (D.P.M)
GUIEU	Valérie	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 (L.E.C.A)
NICOLLE	Edwige	Chimie Organique (D.P.M)
PEUCHMAUR	Marine	Chimie Organique (D.P.M)
PINEL	Claudine	Parasitologie-Mycologie (GIN/MCU-PH)
RACHIDI	Walid	Biochimie (L.C.I.B)
RAVEL	Anne	Chimie Analytique (D.P.M)
RAVELET	Corinne	Chimie Analytique (D.P.M)
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 (VP Form Adjoint UFR, D.P.M)

ENSEIGNANTS ANGLAIS

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

POSTES D'ATER

ATER	ELAZZOUI	Samia	Pharmacologie Galénique
ATER	SHEIKH HASSAN	Amhed	Pharmacie Galénique
ATER	MAS	Marie	Anglais Master ISM
ATER	ROSSI	Caroline	Anglais Master ISM
ATER	SAPIN	Emilie	Physiologie Pharmacologie

ATER : Attachés Temporaires d'Enseignement et de Recherches

CHU : Centre Hospitalier Universitaire

CIB : Centre d'Innovation en Biologie

DPM : Département de Pharmacochimie Moléculaire

GIN : Grenoble Institut de Neurosciences

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

REMERCIEMENTS

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

Je suis très sensible à l'honneur que vous me faites en acceptant de juger ce travail, en tant que présidente du jury. Je tiens à vous témoigner tous mes remerciements, ainsi que mon profond respect.

A Monsieur le Professeur Hervé Pelloux,

Je vous remercie de m'avoir accueillie au sein du laboratoire de Parasitologie-Mycoologie et de m'avoir fourni le cadre favorable au bon déroulement de cette thèse. Merci pour votre confiance. Je tiens à vous exprimer toute ma reconnaissance.

A mon directeur de thèse, Madame le Docteur Claudine Pinel,

Je vous remercie pour votre soutien, votre confiance, pour l'opportunité que vous m'avez offerte afin de réaliser ce travail. Merci pour votre sympathie et votre bonne humeur, ainsi que pour tous vos conseils qui ont pu améliorer la qualité de cet écrit, dernier mémoire d'interne que vous dirigez. Avec toute mon amitié.

A Madame le Docteur Catherine Llerena,

Je vous remercie de juger ce travail en tant que clinicien. Merci pour votre gentillesse et votre aide dans le recueil des données cliniques des patients du CRCM pédiatrique, et merci d'avoir accepté de participer à ce jury.

A Madame le Docteur Claire Cracowski,

Je suis très sensible à votre présence dans ce jury. Je vous remercie de m'avoir accueillie au sein du CRCM adulte. Merci pour votre aide, votre disponibilité, et pour le temps que vous m'accordez en faisant partie de ce jury.

Je tiens également à remercier le Docteur **Bérangère Coltey** ainsi que le Docteur **Isabelle Pin** pour leur attention et tout le temps qu'elles ont pu m'accorder. Merci également à toute l'équipe des CRCM adulte et pédiatrique de Grenoble, en particulier Catherine Segond.

Un grand merci à tous les biologistes et techniciens du Laboratoire de Parasitologie-Mycologie pour leur accueil si chaleureux. Cette ambiance de travail a été très agréable, en particulier grâce à Mimi, merci pour ton dynamisme et ton soutien que je n'oublierai pas.

Un immense merci à mes parents pour leur soutien indispensable, leur confiance, leur patience, et pour tout ce qu'ils m'apportent. Je serai toujours là pour vous.

A mes canadiens préférés Matthieu, Elodie et au futur bout de chou, si loin mais tellement proches dans le cœur...merci pour vos nombreuses pensées. A Marion, Harold et ma filleule Camille, je sais que je peux compter sur vous, merci pour votre aide.

A tous mes amis de Pharma, merci pour toutes ces belles années... A Lili, avec qui j'ai formé un duo gagnant dans la préparation du concours de l'internat, à Marion pour notre amitié depuis ta gentillesse au concours P1, à Camille pour ton soutien depuis le Canada, à Anne-Laure pour les moments de distraction pendant la rédaction, à Khaled notre prez de corpo, à Eugénie, à Audrey...

A Ju, merci pour tes précieux conseils, et courage à toi maintenant pour la rédaction de ta thèse! Une pensée à Violaine à qui j'ai beaucoup pensé en parlant de cette maladie...

A tous mes co-internes qui ont rendus les stages plus amusants, à Perrine pour ses conseils, à Cécile pour sa gentillesse, à Caroline, Bérangère, Laetitia, Yolande, Julie, David, Hélène, et les autres...

A mes grands-parents, dont je suis très fière, à Anne-Marie et Pierre-Marie, merci pour votre soutien, à toute ma famille...

TABLE DES MATIERES

<i>Table des Figures</i>	11
<i>Table des Tableaux</i>	13
<i>Liste des Abréviations</i>	14
INTRODUCTION	16
MUCOVISCIDOSE ET INFECTIONS RESPIRATOIRES	18
1. La Mucoviscidose	18
1.1. Définition	18
1.2. Protéine CFTR	18
1.2.1. Structure	18
1.2.2. Fonctions	19
1.3. Physiopathologie	19
1.4. Génétique	20
1.4.1. Mutation DF508	20
1.4.2. Classification des mutations	20
1.4.3. Relations entre génotype et phénotype.....	22
1.5. Diagnostic	22
1.5.1. Dépistage néonatal	23
1.5.2. Test à la sueur.....	23
1.5.3. Biologie moléculaire	23
1.6. Clinique	24
1.7. Ecologie bactérienne du tractus respiratoire	25
1.7.1. <i>Haemophilus influenzae</i>	26
1.7.2. <i>Staphylococcus aureus</i>	26
1.7.3. <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	27
1.7.4. <i>Burkholderia cepacia</i> complexe.....	28
1.7.5. <i>Nocardia sp</i>	28
1.7.6. Pathogènes bactériens émergents	28
1.8. Prise en charge	29
2. Infections fongiques	30
2.1. Aspergillus sp	30
2.2. Scedosporium apiospermum	31
2.3. Fusarium sp	32
2.4. Autres champignons filamenteux	32
3. Pouvoir pathogène induit par les moisissures	33
3.1. Colonisation bronchique	34
3.2. Sensibilisation aspergillaire	35
3.3. Asthme aspergillaire	35
3.4. Bronchite aspergillaire	36
3.5. ABPA	36
3.5.1. Introduction	36
3.5.2. Pathogénie	37
3.5.3. Facteurs favorisants.....	38

3.5.4. Diagnostic.....	39
3.5.5. Traitement	45
3.5.6. Suivi et pronostic.....	50
3.6. Aspergillose invasive et aspergillome	51
3.6.1. Aspergillose invasive	51
3.6.2. Aspergillome	52
PATIENTS ET METHODES.....	53
1. <i>Type d'étude</i>	53
2. <i>Population</i>	53
2.1. <i>Services concernés</i>	53
2.2. <i>Critères d'inclusion</i>	54
2.3. <i>Critères de non inclusion</i>	54
3. <i>Recueil de données</i>	54
4. <i>Données cliniques</i>	55
4.1. <i>Fonctions respiratoires</i>	55
4.1.1. <i>Explorations fonctionnelles respiratoires</i>	55
4.1.2. <i>Echelle de dyspnée de Sadoul</i>	55
4.2. <i>Score de Shwachman et Kulczycki</i>	55
5. <i>Outils du diagnostic mycologique</i>	56
5.1. <i>Examen direct par coloration de Musto ou Gomori Grocott</i>	56
5.2. <i>Les cultures</i>	56
5.2.1. <i>Mise en culture</i>	56
5.2.2. <i>Résultats des cultures</i>	57
5.3. <i>L'antifongigramme</i>	61
5.4. <i>Sérologies fongiques</i>	62
5.4.1. <i>Technique ELISA quantitative</i>	62
5.4.2. <i>Immunoélectrophorèse</i>	62
6. <i>Dosage des IgE totales et IgE spécifiques anti-Aspergillus fumigatus</i>	63
7. <i>La numération des polynucléaires éosinophiles</i>	64
RESULTATS	65
1. <i>Caractéristiques de la population étudiée</i>	65
2. <i>Données cliniques et bactériologiques</i>	66
2.1. <i>Mutations du gène CFTR</i>	66
2.2. <i>Données cliniques</i>	66
2.3. <i>Résultats bactériologiques</i>	67
3. <i>Résultats mycologiques</i>	68
3.1. <i>Colonisation fongique</i>	68
3.1.1. <i>Levures</i>	68
3.1.2. <i>Champignons filamenteux</i>	69
3.2. <i>Comparaison des milieux</i>	72
3.3. <i>Comparaison avec les résultats obtenus en routine hospitalière</i>	73
4. <i>Cultures bactériologiques et mycologiques</i>	74
4.1. <i>Relation entre les isollements de P. aeruginosa et Aspergillus sp</i>	74
4.2. <i>Etude de la clinique</i>	75
5. <i>Caractéristiques des patients selon leur taux d'IgE totales</i>	75
6. <i>Dosages des IgG anti-A. fumigatus</i>	76

7.	<i>Sensibilisation aspergillaire</i>	77
8.	<i>Bronchite aspergillaire</i>	78
9.	<i>ABPA</i>	79
10.	<i>Traitement antifongique</i>	81
10.1.	<i>Résultat mycologique</i>	81
10.2.	<i>Sensibilité in vitro aux antifongiques</i>	81
11.	<i>Influence des traitements sur la présence de filamenteux</i>	83
11.1.	<i>Antibiotiques</i>	83
11.2.	<i>Antifongiques</i>	83
11.3.	<i>Corticoïdes</i>	84
12.	<i>Mutations du gene CFTR et risque fongique</i>	85
12.1.	<i>Impact sur la clinique et la mycologie</i>	85
12.2.	<i>Impact sur l'ABPA</i>	85
 DISCUSSION		86
1.	<i>Epidemiologie fongique</i>	86
2.	<i>Choix des milieux de culture fongique</i>	88
3.	<i>Impact des champignons sur les voies respiratoires</i>	89
4.	<i>Infections fongiques aspergillaires</i>	91
4.1.	<i>Colonisation</i>	91
4.2.	<i>Sensibilisation aspergillaire</i>	92
4.3.	<i>Bronchite aspergillaire</i>	93
5.	<i>Prévalence de l'ABPA</i>	94
6.	<i>Association de l'ABPA avec la clinique</i>	94
7.	<i>ABPA et marqueurs biologiques</i>	95
8.	<i>Difficultés du diagnostic</i>	98
9.	<i>ABPA et traitement</i>	99
10.	<i>Mutation du gene CFTR et risque fongique</i>	100
11.	<i>Rôle des bactéries</i>	100
11.1.	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	100
11.2.	<i>Staphylococcus aureus</i>	101
11.3.	<i>Haemophilus influenzae</i>	102
11.4.	<i>Pathogènes émergents</i>	102
11.5.	<i>Impact de l'antibiothérapie au long cours</i>	102
12.	<i>Sensibilité in vitro aux antifongiques</i>	103
13.	<i>Niches écologiques fongiques</i>	105
 CONCLUSION		107
<i>Annexes</i>		122
<i>Bibliographie</i>		109

TABLE DES FIGURES

Figure 1 : Structure de la protéine CFTR.....	18
Figure 2 : CFTR, une protéine multifonctionnelle.....	19
Figure 3 : Classification des mutations du gène <i>CFTR</i>	20
Figure 4 : Classification des allèles <i>CFTR</i>	21
Figure 5 : Arbre décisionnel du dépistage néonatal de la mucoviscidose.....	24
Figure 6 : Prévalence des bactéries dans l'appareil respiratoire en fonction de l'âge.....	26
Figure 7 : Schéma général de l'organisation des <i>Aspergillus</i>	30
Figure 8 : Fréquence et pouvoir pathogène des principales espèces fongiques retrouvées dans les voies respiratoires des patients non greffés atteints de mucoviscidose.	33
Figure 9 : Les différents types d'aspergilloses respiratoires.....	34
Figure 10 : Mécanismes impliqués dans l'immunopathogénie de l'ABPA.....	38
Figure 11 : Mise en évidence d'éléments fongiques par la coloration de Musto.....	56
Figure 12 : Aspect macroscopique de <i>Candida albicans</i> sur milieu CAN2.....	57
Figure 13 : Aspects macroscopiques d' <i>A. fumigatus</i> sur les différents milieux de l'étude.....	58
Figure 14 : Aspects microscopiques d' <i>A. fumigatus</i> et <i>A. flavus</i> : coloration au bleu de lactophénol et aspect des têtes aspergillaires à la loupe binoculaire.....	59
Figure 15 : Aspect macroscopique d'une expectoration.....	59
Figure 16 : Aspects macroscopiques sur différents milieux et aspect microscopique de <i>Scedosporium apiospermum</i>	60
Figure 17 : Aspects macroscopiques et microscopiques de <i>Fusarium sp</i> et <i>Mucor sp</i>	60
Figure 18 : Antifongigramme sur milieu RPMI.....	62
Figure 19 : Technique d'immunoélectrophorèse.....	62
Figure 20 : Répartition de la population des patients du CHU de Grenoble ayant réalisé leur première visite.....	65
Figure 21 : Répartition des mutations du gène <i>CFTR</i> des patients de l'étude.....	66
Figure 22 : Capacité Vitale Forcée des patients en fonction de l'âge.....	66
Figure 23 : Volume Expiratoire Maximal par Seconde en fonction de l'âge.....	67
Figure 24 : Score de Schwachman en fonction de l'âge.....	67
Figure 25 : Répartition des bactéries dans les expectorations.....	68
Figure 26 : Isolement des levures dans les expectorations.....	69
Figure 27 : Résultat des cultures mycologiques.....	69
Figure 28 : Isolement des champignons filamenteux dans les expectorations positives.....	70
Figure 29 : Répartition des <i>Aspergillus sp</i> dans les expectorations à l'inclusion et à la visite.....	71
Figure 30 : Résultats des cultures fongiques des expectorations en fonction de l'âge des patients.....	71
Figure 31 : Répartition par tranche d'âge des patients chez qui <i>A. fumigatus</i> a été isolé lors de la première visite après l'inclusion.....	72
Figure 32 : Isolement des champignons filamenteux à l'inclusion et à la visite sur tous les milieux solides semi-sélectifs.....	72

Figure 33 : Evolution des IgE, des IgG et des fonctions respiratoires depuis l'inclusion chez une patiente présentant une bronchite aspergillaire.	79
Figure 34 : Résultats des antifongogrammes des souches isolées d' <i>Aspergillus fumigatus</i>	82
Figure 35 : Hypothèse des pathogénies de la colonisation, de la sensibilisation aspergillaire et de l'ABPA.....	91

TABLE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Stades évolutifs de l'ABPA.....	41
Tableau 2 : Classification des stades d'ABPA selon les caractéristiques cliniques, biologiques et radiologiques.	42
Tableau 3 : Répartition des patients inclus dans l'étude Mucofong multicentrique.	53
Tableau 4 : Interprétation de la sensibilité des antifongiques en fonction des CMI	61
Tableau 5 : Isolement des champignons filamenteux à l'inclusion et à la visite sur tous les milieux semi-sélectifs.....	73
Tableau 6 : Isolements de <i>P. aeruginosa</i> et <i>Aspergillus sp</i> dans les expectorations.....	74
Tableau 7 : Relations entre les isolements de <i>P. aeruginosa</i> et <i>Aspergillus sp</i> et la clinique..	75
Tableau 8 : Caractéristiques cliniques et biologiques des patients en fonction de leur taux d'IgE totales	76
Tableau 9 : Comparaison des résultats IEP et Elisa IgG.....	77
Tableau 10 : Données cliniques et biologiques des patients en fonction de leur sensibilisation à <i>A. fumigatus</i>	78
Tableau 11 : Données biologiques des patients ayant les critères d'ABPA	80
Tableau 12 : Données cliniques et caractéristiques de la mutation CFTR des patients ayant les critères d'ABPA	80
Tableau 13 : Caractéristiques des patients traités depuis l'inclusion par antifongiques	81
Tableau 14 : Résultats des antifongigrammes des différentes espèces de champignons filamenteux isolées.....	82
Tableau 15 : Résultats des cultures fongiques en fonction de l'antibiothérapie au long cours	83
Tableau 16 : Colonisation fongique en fonction de la prise d'antifongiques.....	84
Tableau 17 : Données cliniques des différents patients en fonction de la présence ou l'absence de corticothérapie	84
Tableau 18 : Impact de la mutation CFTR sur la clinique des patients.....	85
Tableau 19 : Impact de la mutation CFTR sur la présence d'une ABPA	85

LISTE DES ABREVIATIONS

ABPA : Aspergillose Broncho-Pulmonaire Allergique

AMPc : Adénosine monophosphate cyclique

ATB : Antibiotiques

ATP : Adénosine triphosphate

ARC : Assistant de Recherche Clinique

A. fumigatus : *Aspergillus fumigatus*

A. flavus : *Aspergillus flavus*

A. nidulans : *Aspergillus nidulans*

A. terreus : *Aspergillus terreus*

B. cepacia : *Burkholderia cepacia*

B. cenocepacia : *Burkholderia cenocepacia*

B. multivorans : *Burkholderia multivorans*

C. albicans : *Candida albicans*

CAST : Cellular Allergen Stimulation Test

CFTR : Cystic Fibrosis Transmembrane conductor Regulator

CHU : Centre Hospitalo-Universitaire

CMI : Concentration Minimale Inhibitrice

CRCM : Centre de Ressources et de Compétences pour la Mucoviscidose

CVF : Capacité vitale forcée

DBI : Département de Biologie Intégrée

EFR : Explorations Fonctionnelles Respiratoires

ELISA : Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay

EUCAST : European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing

E. dermatitidis : *Exophiala dermatitidis*

F. solani : *Fusarium solani*

H. influenzae : *Haemophilus influenzae*

IEP : Immunoélectrophorèse

IgA : Immunoglobuline A

IgE : Immunoglobuline E

IgG : Immunoglobuline G

IL : Interleukine

IMC : Indice de Masse Corporelle

LBA : Liquide de lavage broncho-alvéolaire

Lymphocyte Th2 : Lymphocyte T-helper de type 2

NBF : Nucleotide Binding Folds

PHRC : Programme Hospitalier de Recherche Clinique

PNE : Polynucléaire éosinophile

P. aeruginosa : *Pseudomonas aeruginosa*

RAST : Radio-allergosorbent test

RAsp f : Recombinant *A.fumigatus* allergens

S. apiospermum : *Scedosporium apiospermum*

S. aureus : *Staphylococcus aureus*

SARM : *Staphylococcus aureus* résistant à la méticilline

S. maltophilia : *Stenotrophomonas maltophilia*

TARC : Thymus – and Activation – Regulated Chemokines

VEMS : Volume Expiratoire Maximal par seconde

VPN : Valeur Prédictive Négative

VPP : Valeur Prédictive Positive

INTRODUCTION

Les champignons microscopiques sont très répandus dans la nature. Ils se comportent le plus souvent comme des opportunistes, profitant d'une défaillance des défenses de leur hôte pour coloniser puis proliférer dans l'organisme hôte et exprimer leur virulence. Certains d'entre eux sont fréquemment isolés de l'arbre respiratoire des patients atteints de mucoviscidose. Les plus adaptables appartiennent au genre *Aspergillus*, et parmi les 250 espèces de ce genre, *Aspergillus fumigatus* est sans conteste, l'espèce la plus souvent isolée du tractus respiratoire. La colonisation peut entraîner une sensibilisation et une inflammation localisée. En fonction du terrain, des pathologies aspergillaires plus sévères comme l'aspergillose broncho-pulmonaire allergique (ABPA) peuvent se développer et progressivement altérer les capacités respiratoires.

La mucoviscidose justifie une prise en charge précoce des patients, au sein des Centres de Ressources et de Compétences de la Mucoviscidose (CRCM). Le suivi est réalisé par une évaluation régulière des paramètres cliniques, radiologiques et biologiques. L'amélioration de la prise en charge de ces patients s'est, entre autres, traduite par l'augmentation de l'isolement des champignons microscopiques, moisissures et levures, au laboratoire, preuve d'une colonisation chronique chez certains patients. L'impact de cette dernière sur l'évolution de l'aspergillose, ainsi que les conséquences sur l'altération des capacités respiratoires ne sont pas parfaitement connus et restent sujets de controverses.

Cette étude devrait permettre de déterminer plus précisément le rôle et l'implication des champignons pathogènes émergents dans la dégradation de la fonction pulmonaire, et d'améliorer la prévention et la prise en charge du risque fongique chez ces patients, en fournissant les bases cognitives d'une stratégie de prévention la plus rationnelle et efficace possible pour ralentir la progression de la maladie pulmonaire.

Ce projet repose sur une étude nationale prospective, le Programme Hospitalier de Recherche Clinique (PHRC) n°1902 « Mucofong » réalisée dans sept centres hospitaliers en France (Lille, Dunkerque, Rouen, Angers, Bordeaux, Dijon et Grenoble), assurant un suivi mycologique sur une période de trois ans.

Un an après l'inclusion, les résultats obtenus ont été colligés et comparés à ceux observés à l'inclusion. Le but de ce travail a été dans un premier temps de déterminer les

espèces de champignons filamenteux présentes dans l'appareil respiratoire des patients atteints de mucoviscidose et inclus dans l'étude Mucofong par Yolande LEMEILLE au CHU de Grenoble entre novembre 2007 et mai 2008, et responsables, soit de colonisation, soit d'épisodes infectieux authentiques.

Ensuite, sur un plan mycologique, nous avons homogénéisé nos pratiques en définissant parfaitement les conditions d'ensemencement des milieux de culture afin d'assurer une connaissance bien définie de l'épidémiologie fongique et calibrer les conditions d'analyse de la sensibilité aux antifongiques systémiques existants.

Enfin, sur le plan clinique, nous avons en particulier évalué la fonction pulmonaire, pour appréhender le rôle pathogène des champignons dans la dégradation de la fonction respiratoire de ces patients, dégradation qui domine le plus souvent l'évolution de la maladie génétique. Nous avons également recherché une association entre le risque fongique et la colonisation bactérienne du patient, les stratégies thérapeutiques associées et/ou les mutations du gène *CFTR*.

Ainsi, ce travail est la synthèse de ces 7 mois de suivi, un an après l'inclusion. Après un rappel des connaissances sur la mucoviscidose et des risques infectieux liés à cette maladie génétique nous présenterons les résultats des analyses cliniques, mycologiques et biologiques que nous discuterons.

MUCOVISCIDOSE ET INFECTIONS

RESPIRATOIRES

1. LA MUCOVISCIDOSE

1.1. DEFINITION

La mucoviscidose est une des maladies génétiques les plus fréquentes, de transmission autosomique récessive, et son incidence actuelle en France est d'environ 1/3500 [55] à 1/4700 naissance [54]. Elle résulte d'une mutation au niveau d'un gène qui code pour la protéine CFTR.

1.2. PROTEINE CFTR

1.2.1. STRUCTURE

Le gène *CFTR* est localisé sur le bras long du chromosome 7, en position 7q31. Celui-ci code pour la protéine transmembranaire CFTR. Celle-ci comprend deux domaines transmembranaires, deux domaines NBF (Nucleotide Binding Folds) qui sont des domaines de liaison à l'adénosine triphosphate (ATP), et un domaine régulateur qui contrôle l'activité du canal chlore.

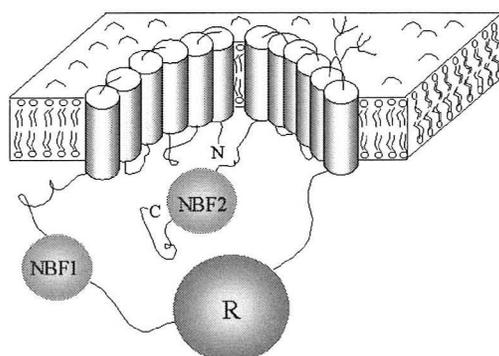


Figure 1 : Structure de la protéine CFTR. D'après [178]

La protéine CFTR est principalement localisée au pôle apical de l'ensemble des cellules épithéliales de l'organisme (voie aérienne, épithélium intestinal, pancréas exocrine, voies biliaires, tractus génital, glandes sudorales) [32, 86].

1.2.2. FONCTIONS

La protéine CFTR est un canal chlore établissant un équilibre hydroélectrolytique de part et d'autre de la membrane des cellules, régulé par l'adénosine monophosphate cyclique (AMPC). Elle joue un rôle complexe dans la sécrétion épithéliale transmembranaire, modulant ainsi la composition ionique et l'osmolarité du liquide de surface bronchique [22].

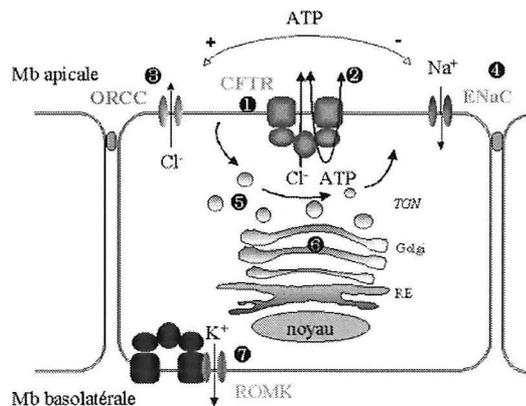


Figure 2 : CFTR, une protéine multifonctionnelle. D'après [178]

1.3. PHYSIOPATHOLOGIE

Dans la mucoviscidose, la mutation au niveau du gène *CFTR* entraîne une altération des transports ioniques épithéliaux, en particulier au niveau des voies aériennes. Il en résulte d'une part des modifications des propriétés biophysiques du liquide de surface bronchique, entraînant une altération de la clairance mucociliaire, conduisant à une obstruction des voies aériennes, et d'autre part des modifications de la composition ionique de ce liquide. Cette hyperviscosité du mucus est responsable d'une diminution des défenses naturelles antimicrobiennes de la muqueuse des voies aériennes, et d'une réponse inflammatoire excessive contre les pathogènes [32, 44, 131].

Au niveau du tube digestif, les sécrétions altérées interfèrent avec l'absorption des aliments, engendrant des troubles nutritionnels. Ceci est dû principalement à l'obstruction des

conduits du pancréas par le mucus épaissi. Les enzymes produites par le pancréas et essentielles à la digestion des aliments ne peuvent pas être libérées dans l'intestin [177].

Cependant, un grand nombre de facteurs supplémentaires peuvent exercer une influence sur l'expression de la mutation CFTR, comme la pollution, le tabac, les infections bactériennes, le statut nutritionnel, certains agents thérapeutiques [22, 45, 91].

1.4. GENETIQUE

1.4.1. MUTATIONS DU GENE *CFTR*

Plus de 1600 mutations du gène *CFTR* sont décrites, ayant pour conséquence différents phénotypes de la maladie, associés à différents grades de sévérité [176]. En France, 70% des allèles mutés sont représentés par la mutation DF508 (délétion du codon phénylalanine à la position 508) [22, 44, 136].

1.4.2. CLASSIFICATION DES MUTATIONS

Les anomalies moléculaires ont des conséquences variables sur la protéine CFTR et sa fonction. Une classification de ces anomalies par rapport à la fonction canal chlore a été proposée :

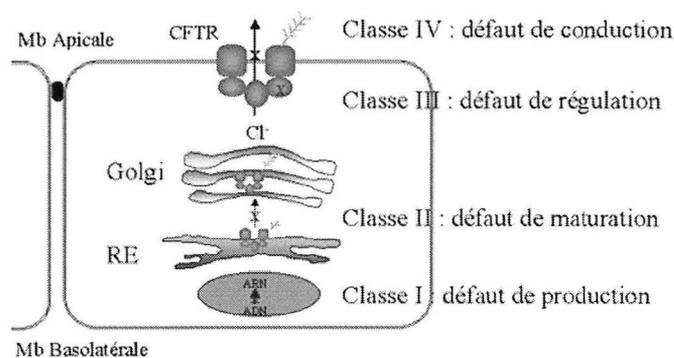


Figure 3 : Classification des mutations du gène *CFTR*. D'après [179]

Class	Functional effect of mutation	Allele
I	Defective protein production	G542X, R553X, W1282X, R1162X, 621-1G→T, 1717-1G→A, 1078ΔT, 3659ΔC
II	Defective protein processing	ΔF508, ΔI507, N1303K, S549N
III	Defective protein regulation	G551D, R560T
IV	Defective protein conductance	R117H, R334W, G85E, R347P
V	Reduced amounts of functioning CFTR protein	3849+10KbC→T, 2789+5G→A, A455E
Unknown		711+1G→T, 2184DA, 1898+1G→A

Figure 4 : Classification des allèles *CFTR*. D'après [13]

La classe I comprend les mutations qui entraînent un défaut de biosynthèse, générant une protéine altérée (tronquée ou aberrante) : insertions, délétions, mutations non-sens. Cette classe comprend 7% des patients atteints de mucoviscidose.

Les mutations de classe II sont associées à un défaut de maturation cellulaire de la protéine au niveau du réticulum endoplasmique, l'exposant à une protéolyse lysosomale. Cette mutation est la plus répandue et affecte environ 85% de ces patients (mutation DF508).

La classe III regroupe les mutations qui se traduisent par une altération du canal chlore, essentiellement celles localisées dans les régions codant pour les domaines de liaison à l'ATP (3% des patients atteints de mucoviscidose).

La classe IV correspond aux mutations provoquant une anomalie de conduction transmembranaire du canal chlore. Ce sont essentiellement des mutations faux-sens.

La classe V représente les mutations qui contribuent à une insuffisance quantitative de l'expression membranaire de la protéine [22, 85, 91, 131].

Certaines mutations plus rares ne sont pas encore associées à l'une de ces cinq classes.

1.4.3. RELATIONS ENTRE GENOTYPE ET PHENOTYPE

Il existe une grande variabilité dans l'expression clinique de la maladie. Une étude de McKone publiée en 2006 incluant 15651 patients montre des différences significatives des taux de survie en fonction du génotype CFTR [109]. Les patients sont classés en deux groupes : ceux dont le génotype est à haut risque de décès précoce (correspondant aux mutations des classes I à III), et ceux à faible risque (mutations des classes IV et V). L'âge médian du décès est de 24,2 ans pour les patients avec un génotype CFTR à haut risque contre 37,6 ans pour l'autre classe. Ces mutations du génotype CFTR expliquent donc en partie les répercussions sur la fonction pulmonaire, le statut nutritionnel, l'insuffisance pancréatique et sur la colonisation à *Pseudomonas aeruginosa*, d'où l'hétérogénéité phénotypique.

Les résultats de l'étude de McKone publiée en 2003 montrent une hausse significative de la mortalité chez les patients de classe II, comparé aux classes IV et V [108]. Les patients DF508 homozygotes ont généralement une insuffisance pancréatique, ainsi que des aggravations du statut nutritionnel et de la fonction pulmonaire plus précoces que les patients possédant un autre génotype [85, 108]. De plus, les patients DF508 hétérozygotes ont une mortalité et des caractéristiques phénotypiques principalement déterminées par l'effet de l'allèle non-DF508 [108].

Les patients homozygotes pour la mutation DF508 sont atteints d'une forme plus sévère que les patients hétérozygotes ou sans mutation DF508. En effet, dans une étude incluant 293 patients, 99% des patients homozygotes ont une insuffisance pancréatique, alors que 28% des patients hétérozygotes composites DF508/non DF508 et 64% des patients non DF508/non DF508 sont suffisants pancréatiques [85].

1.5. DIAGNOSTIC

Le dépistage néonatal de la mucoviscidose a été généralisé en France en 2002. Après un dépistage positif, une confirmation par un test à la sueur est indispensable. Une fois le diagnostic clinique établi, une recherche en biologie moléculaire doit être réalisée afin de caractériser les mutations responsables.

1.5.1. DEPISTAGE NEONATAL

Le diagnostic en période néonatale a recours depuis 2002 au dosage de la trypsine immunoréactive dans le sang par le test de Guthrie, au 3^{ème} jour de vie. Cette enzyme est libérée par le pancréas, et son taux est très élevé (> 900 µg/L) chez les enfants atteints. Un diagnostic précoce de la mucoviscidose chez les nouveaux-nés semble de meilleur pronostic comparé à un diagnostic après symptomatologie clinique [39].

1.5.2. TEST A LA SUEUR

Le test à la sueur repose sur la technique standardisée de Gibson et Cooke, qui est basée sur le dosage des ions chlorures dans la sueur recueillie après iontophorèse à la pilocarpine. Un taux de chlorure au-dessous de 40 mmol/L est considéré comme normal. Un taux supérieur à 60 mmol/L établit le diagnostic de mucoviscidose [44, 55, 99]. Deux dosages sont nécessaires pour affirmer le diagnostic [99].

1.5.3. BIOLOGIE MOLECULAIRE

L'étude génétique est une étape importante pour compléter le diagnostic, également en vue d'un conseil génétique ultérieur. Puisqu'il existe plus de 1600 mutations du gène *CFTR*, ce test n'est pas réalisable pour toutes les mutations, mais seulement possible pour la recherche des mutations les plus connues. Cependant, une analyse génétique négative n'exclue pas forcément une mucoviscidose. Les résultats ont besoin d'être interprétés en fonction du contexte clinique.

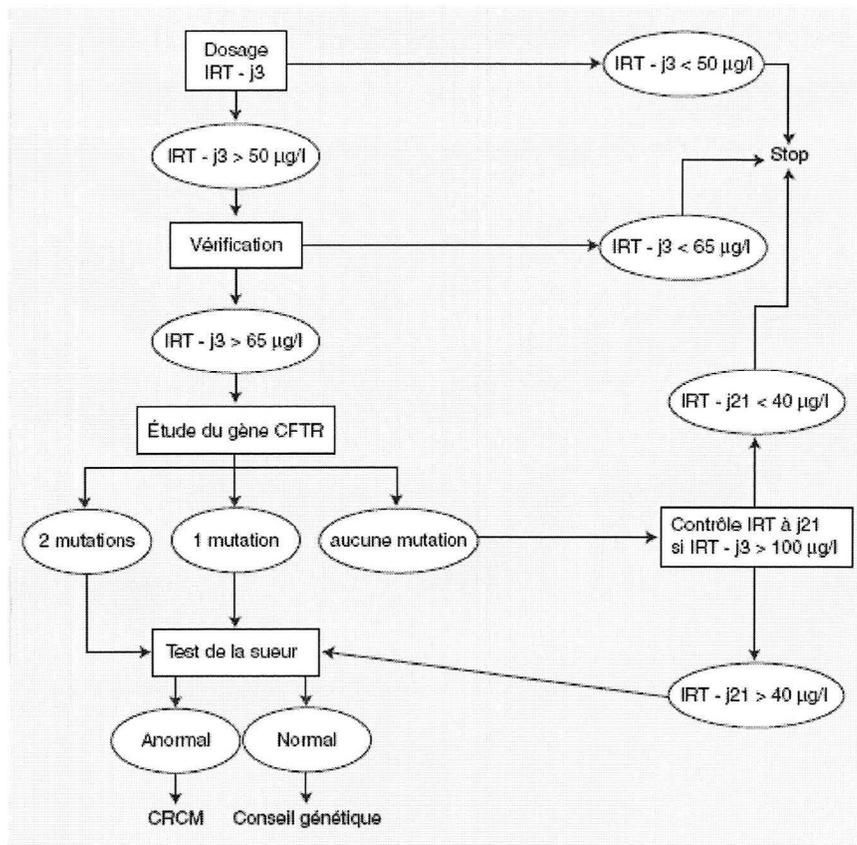


Figure 5 : Arbre décisionnel du dépistage néonatal de la mucoviscidose. D'après [8]
 IRT : Trypsine immunoréactive, J : jour

1.6. CLINIQUE

Cette pathologie touche l'ensemble des glandes exocrines de l'organisme. Cependant, favorisées par l'excès de sécrétions visqueuses et les altérations mucociliaires intrinsèques à cette maladie, les infections respiratoires sont au premier plan et conditionnent la qualité de vie et le pronostic vital des patients.

L'évolution à long terme se fait par poussées conditionnées habituellement par des surinfections virales, mycosiques ou bactériennes, qui conduisent progressivement à une insuffisance respiratoire chronique. Au cours de ces exacerbations, les signes respiratoires se modifient : l'expectoration devient purulente et abondante, la toux plus fréquente, la dyspnée plus marquée. L'analyse de la bronchorrhée est un critère important de suivi (volume, purulence, viscosité, aspect hémoptoïque) [129]. Les autres signes associés, que sont la fatigue, l'anorexie et la perte de poids, participent à l'altération de l'état général. On considère que ces périodes d'exacerbation contribuent de façon majeure à la destruction pulmonaire, du

fait de l'intensité de la réaction inflammatoire. Entre ces épisodes aigus, le sujet présente une toux chronique avec bronchorrhée. Ces signes se majorent au fil de l'évolution et s'associent alors avec une dyspnée et une oxygénodépendance d'abord à l'effort, puis au repos [7].

1.7. ECOLOGIE BACTERIENNE DU TRACTUS RESPIRATOIRE

Les anomalies de l'hydratation du film bronchique de surface dues au dysfonctionnement de la protéine CFTR limitent la clairance mucociliaire et favorise la stagnation des germes et la surinfection broncho-pulmonaire [7]. L'examen cytobactériologique des crachats permet la détection et la surveillance de cette infection. Il doit être recueilli au cours d'une expectoration profonde et réalisé au mieux tous les trois mois, ainsi qu'au moment des exacerbations aiguës avant toute antibiothérapie. Cette infection est caractérisée par la prépondérance de certains germes : *Haemophilus influenzae*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* et *Burkholderia cepacia*. La prévalence de ces espèces varie selon l'âge, comme on peut le voir sur la figure 6.

L'administration précoce d'antibiotiques ou l'antibio-prophylaxie peut retarder et prévenir la colonisation chronique par *P. aeruginosa* et *S. aureus* [69]. Cependant, la pression sélective des antibiotiques sur les espèces bactériennes et l'allongement de la durée de vie s'associent à l'émergence de nouveaux pathogènes et aux résistances aux antibiotiques [25, 114, 151].

En moyenne, sont isolées 2,9 pathogènes par échantillon pulmonaire de patient atteint de mucoviscidose [25].

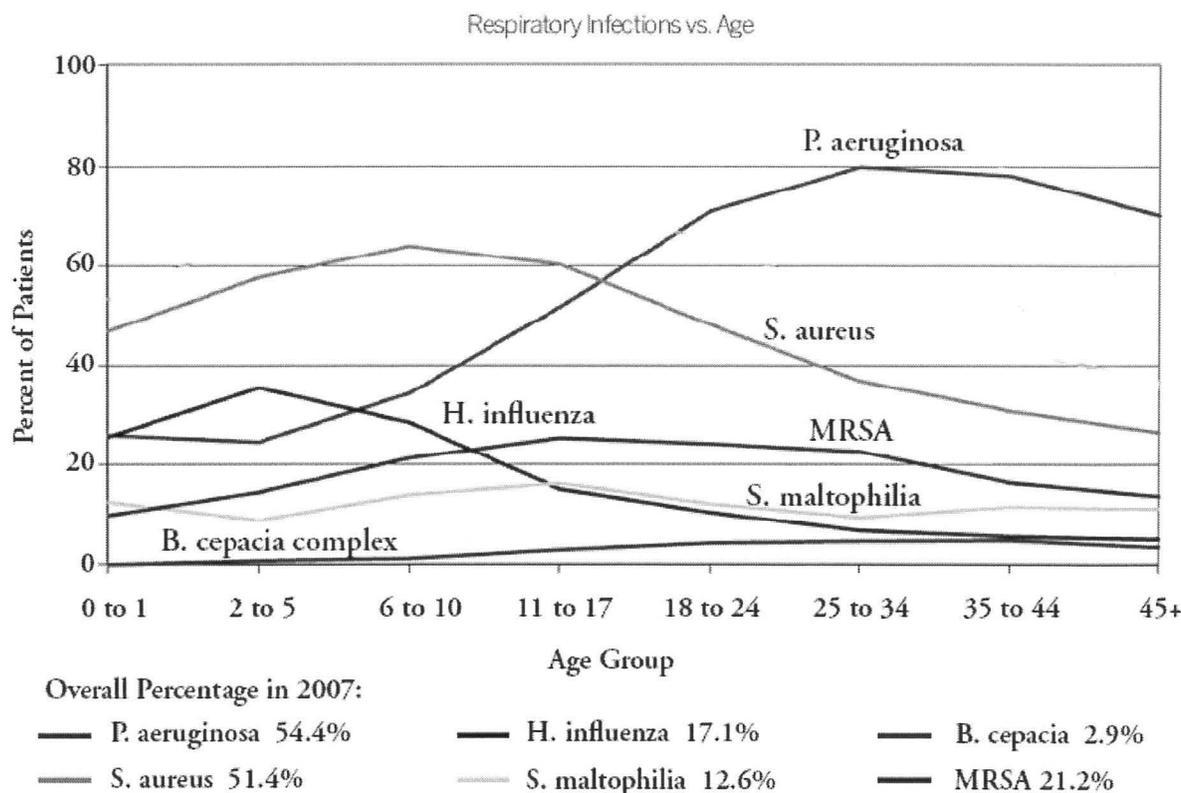


Figure 6 : Prévalence des bactéries dans l'appareil respiratoire en fonction de l'âge. D'après [175]

1.7.1. *HAEMOPHILUS INFLUENZAE*

Haemophilus influenzae constitue l'un des agents pathogènes les plus fréquents chez les jeunes enfants [166]. Son effet délétère semble moindre, comparé à celui des autres germes. Il est rarement responsable de colonisation chronique [7, 104].

1.7.2. *STAPHYLOCOCCUS AUREUS*

La virulence de *Staphylococcus aureus* est liée à sa capacité d'adhérer à l'épithélium respiratoire et d'échapper aux défenses de l'organisme. Il peut réaliser une infection chronique, l'adhérence du germe étant facilitée par certains constituants de sa paroi (acide teichoïque, « slime »). Les différents composants libérés (leucocidine, hémolysine, catalase...) participent à la dégradation tissulaire [7]. Habituellement, la colonisation à *S. aureus* précède celle de *P.aeruginosa* [104, 166].

1.7.3. *PSEUDOMONAS AERUGINOSA*

Les infections antérieures, virales ou bactériennes, favorisent la colonisation à *P. aeruginosa* car les membranes basales dénudées à la suite des processus lésionnels locaux présentent des sites d'adhérence. Une altération des mécanismes locaux de défense permet la persistance des germes et le passage à l'infection chronique [7]. La primo-infection à *Pseudomonas aeruginosa* intervient en moyenne entre 8 et 10 ans. Cette colonisation est pratiquement inéluctable en cours d'évolution, puisque plus de 95% des patients adultes en phase terminale sont colonisés par cette bactérie [104].

La présence de trois examens cyto bactériologiques des crachats successifs à au moins un mois d'intervalle permettant l'isolement de *P. aeruginosa* sans signe direct (manifestations cliniques) ou indirect (anticorps) d'infection, définit une colonisation chronique à cette bactérie [104]. L'infection chronique à cette bactérie dans la mucoviscidose contribue à la morbidité de cette maladie, par un déclin des fonctions respiratoires [4, 69].

Ce passage à la chronicité est dû à une adaptation phénotypique du germe à l'environnement bronchique : émergence de souches muqueuses productrices d'alginates, exopolysaccharides qui entourent des microcolonies de *P. aeruginosa*. Ces souches apparaissent dans un délai relativement long, en moyenne 10,9 années [129]. Ce phénomène contribue à la viscosité des sécrétions bronchiques, favorisant l'adhérence de *P. aeruginosa* et surtout réalisant un véritable écran à la phagocytose, à la réponse immunitaire et à la pénétration des antibiotiques [7, 100]. Cette transition vers ce variant muqueux est corrélée à une réponse accrue d'anticorps spécifiques et à une dégradation des capacités respiratoires [130]. L'incidence des souches muqueuses augmente avec l'âge et l'évolutivité de la maladie respiratoire [104].

Un facteur de risque important et précoce de développer une infection chronique à *P. aeruginosa* est une élévation importante des taux des anticorps anti-*P. aeruginosa*, décelée trois ans auparavant [100, 130]. Ces taux doivent être mesurés régulièrement, au moins une fois par an chez tous les patients atteints de mucoviscidose et plus fréquemment chez les patients où ces bactéries sont isolées de façon intermittente [130].

L'éradication du *P.aeruginosa* non muqueux peut être accessible par un traitement agressif contre cette bactérie, mais semble impossible pour les souches muqueuses. Ce traitement, mis en place au moment de la colonisation initiale, peut retarder le risque de

colonisation chronique à *P. aeruginosa*, et également maintenir ou améliorer les fonctions pulmonaires [58]. Cependant, l'utilisation de ces antibiotiques semble être corrélée au développement de résistances [100].

1.7.4. *BURKHOLDERIA CEPACIA* COMPLEXE

Toutes les bactéries du complexe *Burkholderia cepacia* ont été décrites comme agents infectieux dans la mucoviscidose, mais la majorité des infections est causée par *B. cenocepacia* et *B. multivorans* [4, 152]. Leurs niches écologiques sont le sol, l'eau, la rhizosphère et les plantes [110]. La prévalence des infections au complexe *B. cepacia* chez les patients atteints de mucoviscidose varie de 0 à 40% [150].

La virulence particulière et le haut niveau de transmissibilité de certaines espèces ou génomovars pourraient expliquer la variabilité clinique de l'infection [7]. La sévérité de ces infections est aussi variable selon la réponse immunitaire des patients et selon les souches, allant du simple portage chronique à l'infection grave [104, 150, 151]. Elles sont parfois associées à une détérioration pulmonaire rapide et à une morbidité accrue, plus importante que chez les patients infectés par *P. aeruginosa* [150]. Une antibiothérapie intraveineuse diminue la charge bactérienne et les symptômes associés aux exacerbations [152].

1.7.5. *NOCARDIA SP*

L'isolement de *Nocardia sp* dans les expectorations donne lieu principalement à une colonisation, sans pouvoir pathogène. Une étude rétrospective montre une prévalence de 14% chez les patients atteints de mucoviscidose. Les patients sont généralement traités par cotrimoxazole, cependant le traitement ne semble pas être associé à une amélioration des fonctions respiratoires [162].

1.7.6. PATHOGENES BACTERIENS EMERGENTS

Certains pathogènes inhabituels, parfois hautement résistants aux antibiotiques, jouent un rôle infectieux croissant depuis quelques années du fait de l'allongement de la durée de vie et de la pression antibiotique [7, 158]. Il s'agit surtout de *Stenotrophomonas maltophilia* et *Alkaligenes xylosoxidans* [114, 151].

Bien que de multiples résistances soient associées à *S. maltophilia*, plusieurs études reportent un effet modéré sur la fonction pulmonaire [4, 7, 49, 64, 158]. Cependant, la colonisation chronique à *S. maltophilia* ou à *A. xylosoxidans* semble parfois associée à une dégradation pulmonaire accélérée, similaire à celle observée en cas d'infection chronique à *P. aeruginosa* [7].

L'exposition à *S. maltophilia* est transitoire dans 80% des cas, et chronique ou persistante chez 20% des patients [49]. L'augmentation rapide de sa prévalence pourrait être corrélée à l'utilisation d'une thérapie anti-*Pseudomonas* agressive [64].

Les mycobactéries atypiques sont également retrouvées de façon croissante. Elles présentent également une résistance à de nombreux antibiotiques [7]. Les traitements antibiotiques et corticoïdes favorisent cette infection. Leur rôle dans la pathologie pulmonaire est difficile à évaluer, du fait de la présence habituelle et concomitante de *P. aeruginosa* et *S. aureus* dans les voies respiratoires, mais il pourrait être important [80].

1.8. PRISE EN CHARGE

Cette pathologie justifie une prise en charge précoce des patients, au sein des Centres de Ressources et de Compétences de la Mucoviscidose (CRCM), organisation de soins structurée depuis 2001. Le suivi est réalisé par une évaluation régulière des paramètres cliniques et biologiques et des explorations fonctionnelles respiratoires (EFR). Le CRCM s'appuie sur une équipe soignante multidisciplinaire et fonctionne en réseaux [6].

2. INFECTIONS FONGIQUES

Un accroissement de la fréquence et de la sévérité des infections pulmonaires bactériennes chez les patients atteints de mucoviscidose conduit généralement à une hausse de l'utilisation d'antibiotiques, qui semble favoriser les infections fongiques [16, 154]. En matière de risque fongique, les principales complications chez les patients atteints de mucoviscidose sont dues essentiellement à des champignons filamenteux, les levures n'exerçant, dans ce contexte, qu'un rôle très secondaire. Bien connaître les différentes pathologies respiratoires aspergillaires est important afin de les évoquer précocement et d'en améliorer la prise en charge.

2.1. *ASPERGILLUS SP*

Le genre *Aspergillus* compte 250 espèces dont une trentaine sont pathogènes pour l'homme [27]. Les espèces aspergillaires se différencient surtout par la couleur des colonies, l'organisation des têtes conidiennes, la forme et l'ornementation des conidies, ainsi que la présence éventuelle d'une reproduction sexuée.

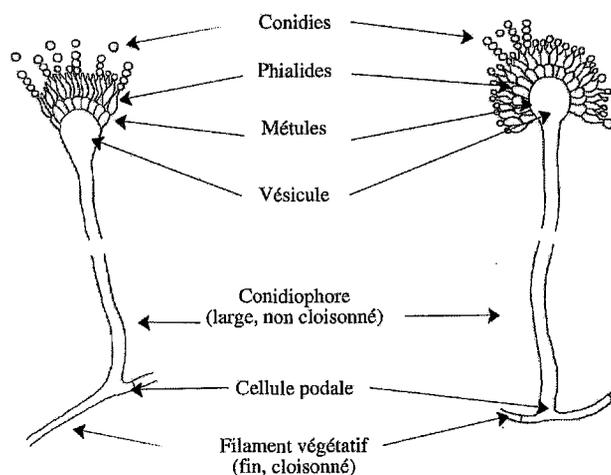


Figure 7 : Schéma général de l'organisation des *Aspergillus*. D'après [2]

Les *Aspergillus* sont des moisissures saprophytes de l'environnement. Ce sont des champignons ubiquistes, retrouvés aussi bien en milieu rural (foin, silos à grain...) qu'en milieu urbain, et aussi bien à l'intérieur qu'à l'extérieur des maisons (poussière, plantes en pots...), particulièrement quand ces environnements contiennent de l'humidité. Le faible

diamètre de leurs spores, de 2 à 3 μm , et leur thermotolérance permettent, après inhalation, leur acheminement jusqu'à l'alvéole. C'est la présence de dommages au niveau du tissu épithélial broncho-pulmonaire, causés par les protéases des bactéries et l'élastase leucocytaire libérée lors de la réaction inflammatoire, qui entraînent l'adhérence des spores fongiques chez l'hôte [128]. Les facteurs environnementaux (abondance des spores aspergillaires dans l'air inhalé) ou liés au champignon (taille des spores aspergillaires, thermotolérance, facteurs de virulence) et une prédisposition génétique de l'hôte contribuent à la fréquence de la pathologie aspergillaire [9, 65, 143].

Plusieurs mécanismes de défense locale contribuent à la lutte contre ce micro-organisme ubiquitaire : le tapis mucociliaire, les macrophages alvéolaires, les polynucléaires neutrophiles, les monocytes. Toute circonstance altérant ce processus contribue à favoriser l'émergence d'une pathologie aspergillaire.

L'*Aspergillus* est à l'origine, chez l'humain, d'un large éventail de maladies : allergies, infections superficielles liées à un traumatisme et infections profondes. L'atteinte pulmonaire est le premier site de cette affection, avec *A. fumigatus*, espèce la plus pathogène, en cause dans 80 à 90 % des formes cliniques de l'aspergillose. *Aspergillus flavus* est la seconde espèce la plus fréquemment isolée, elle est responsable de 15 à 20% des pathologies fongiques [90]. La plus faible incidence de ces infections, comparée à *A. fumigatus*, pourrait être due à une distribution différente dans l'environnement, à une plus grande difficulté d'adaptation aux environnements hostiles, et à une plus grande sensibilité aux réponses de l'hôte. Ce champignon filamenteux peut causer des manifestations pulmonaires, comme l'aspergillome ou l'aspergillose pulmonaire invasive, mais aucune forme allergique d'aspergillose n'a été décrite dans la littérature [90]. *Aspergillus terreus* est la troisième espèce la plus fréquente chez les patients atteints de mucoviscidose [37]. Elle peut être parfois responsable d'une colonisation chronique des voies respiratoires chez ces patients, voire des pathologies fongiques comme l'ABPA ou l'aspergillose invasive [128].

2.2. *SCEDOSPORIUM APIOSPERMUM*

Il s'agit d'un champignon tellurique rencontré dans les eaux polluées, les boues et les sols fortement contaminés [29]. Il est retrouvé également très fréquemment dans les plantes en pot chez les personnes colonisées par ce champignon [128]. Des altérations préalables du tractus respiratoire sont requises pour retrouver *S. apiospermum* dans les voies respiratoires

des patients [29]. Ce champignon est habituellement isolé chez des patients déjà colonisés par *A. fumigatus* [34, 40]. La fréquence d'isolement de *S. apiospermum* dans les expectorations apparaît élevée comparé à la prévalence de ce champignon dans l'environnement. En effet, les spores de *S. apiospermum* sont rarement retrouvées dans les environnements extérieur et intérieur. Sa pathogénicité est difficile à établir. Il peut être retrouvé de manière transitoire dans les voies respiratoires des patients, ou parfois être à l'origine de pathologies respiratoires [34, 56, 128].

2.3. *FUSARIUM SP*

Le genre *Fusarium* est largement distribué dans le sol, les plantes, et autres substances organiques [56]. Douze espèces sont responsables d'infections, *F. solani* étant la plus fréquente (environ 50% des cas). Ces espèces causent un large spectre d'infections humaines, incluant les infections superficielles, localement invasives, et disséminées. La forme clinique de la fusariose dépend largement du statut immunitaire de l'hôte, et de la porte d'entrée de l'infection. La voie aérienne est la principale source d'infection, par la présence de conidies dans l'environnement extérieur. Chez les hôtes immunocompétents, *Fusarium sp* est responsable de sinusites allergiques ou chroniques, et rarement de pneumonies. Chez les patients immunodéprimés, ces sinusites sont toujours invasives et les pneumopathies sont fréquentes. Les patients à risque de fusarioses disséminées sont les immunodéprimés présentant une leucémie aiguë, une neutropénie prolongée et profonde, et les sujets greffés [56, 123]. Les fusarioses disséminées présentent une mortalité importante et sont associées à un faible pronostic, malgré une thérapie antifongique agressive [56].

2.4. AUTRES CHAMPIGNONS FILAMENTEUX

Exophiala dermatitidis se trouve presque exclusivement dans les environnements humides. Son isolement dans les expectorations de patients atteints de mucoviscidose varie de 1,8 à 15,7% selon les études [75]. Dans le contexte de mucoviscidose, *E. dermatitidis* est le plus souvent responsable de colonisations transitoires ou chroniques, sans signe clinique. Cependant, il peut engendrer de réelles infections respiratoires, ou invasives [67, 75, 94].

Les Mucorales sont des champignons cosmopolites très répandus, saprophytes du sol. Leur rôle pathogène s'exprime en cas de greffe pulmonaire, pouvant être responsables de mucormycoses disséminées [14, 116].

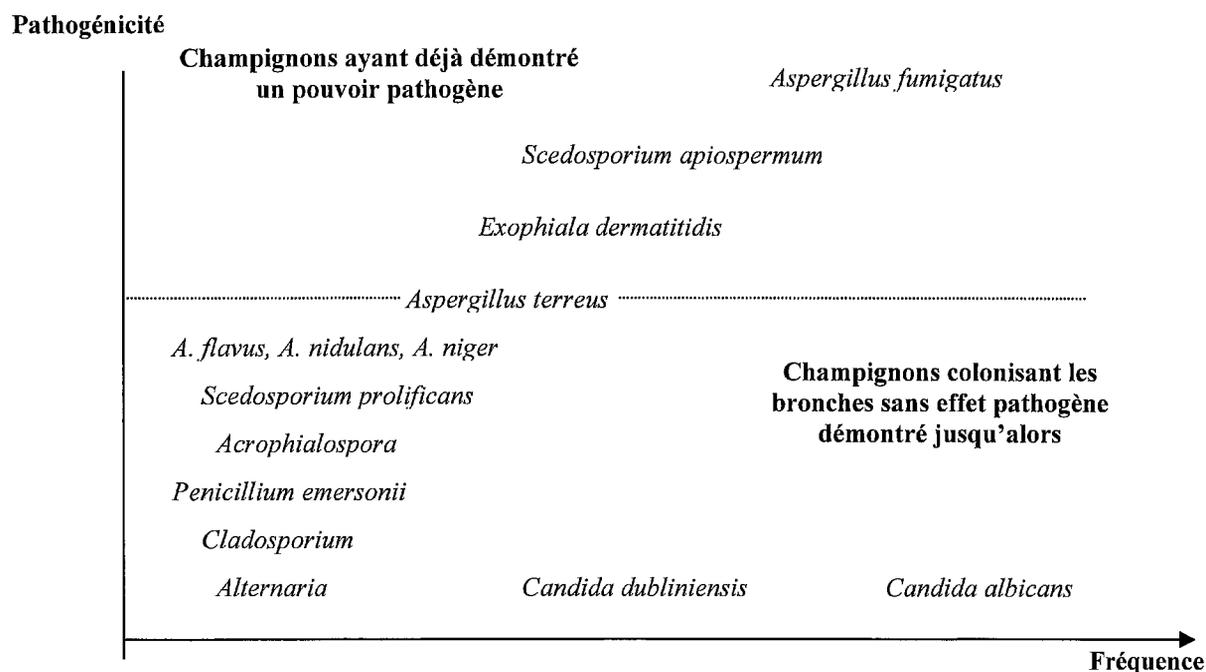


Figure 8 : Fréquence et pouvoir pathogène des principales espèces fongiques retrouvées dans les voies respiratoires des patients non greffés atteints de mucoviscidose. D'après [35]

3. POUVOIR PATHOGENE INDUIT PAR LES MOISSURES

L'expression clinique dépend de l'exposition fongique (abondance, thermotolérance, virulence des spores dans l'air inhalé), des facteurs locaux (intégrité des défenses anti-infectieuses de l'arbre trachéobronchique), et de la réponse immunitaire de l'hôte qui joue un rôle essentiel dans la pathogénie [23, 143]. Les atteintes aspergillaires broncho-pulmonaires peuvent être divisées en plusieurs catégories [23]:

- Atteinte caractérisée par l'absence d'invasion tissulaire : colonisation bronchique, aspergillome
- Réaction d'hypersensibilité : sensibilisation, asthme et bronchite aspergillaires, aspergillose broncho-pulmonaire allergique
- Atteinte invasive

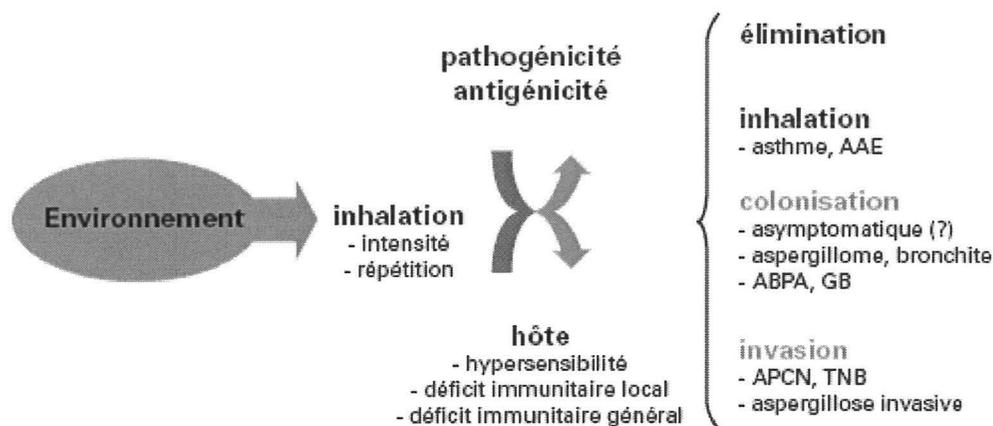


Figure 9 : Les différents types d'aspergilloses respiratoires

AAE : alvéolite allergique extrinsèque, ABPA : aspergillose broncho-pulmonaire allergique, GB : granulomateuse bronchocentrique, APCN : aspergillose pulmonaire chronique nécrosante, TNB : trachéo-bronchite nécrosante.

Les patients atteints de mucoviscidose présentent au cours de l'évolution de leur maladie de nombreux facteurs permettant l'expression de ces différentes facettes de la pathologie aspergillaire. L'ABPA est la forme allergique la plus sévère liée aux réactions d'hypersensibilités de type I, III et IVb aux allergènes et antigènes aspergillaires [9]. Mais d'autres moisissures peuvent générer ce même type de réponse, avec cependant une incidence beaucoup plus faible. Le développement aspergillaire peut être favorisé par différents facteurs diminuant les capacités de phagocytose (corticothérapie massive et de longue durée ou transplantation pulmonaire). La forme la plus redoutable étant alors l'aspergillose invasive rencontrée dans des circonstances d'immunodépression particulières (transplantation pulmonaire) et beaucoup plus rarement en dehors de ce contexte [66].

3.1. COLONISATION BRONCHIQUE

La colonisation chronique à *A. fumigatus* se définit par la présence de ce champignon dans l'arbre bronchique pendant au moins 6 mois, attestée par au moins 3 cultures positives à au moins 3 mois d'intervalle, sans signe direct (manifestations cliniques) ou indirects (anticorps spécifiques) d'infection. Elle résulte d'une croissance non pathogénique de spores fongiques suite à une inhalation [71].

Elle est favorisée par la production de protéases par la moisissure elle-même : il en résulte une pré-activation de la couche épithéliale bronchique et une production locale accrue de cytokines pro-inflammatoires, avec pour conséquence une adhérence facilitée des spores à

la surface de la bronche et une absorption amplifiée des antigènes aspergillaires. L'altération de la clairance bronchique en relation avec un mucus épais et visqueux constitue un autre facteur aggravant [83]. La colonisation simple à *Aspergillus sp* dans les expectorations n'est pas associée à une dégradation pulmonaire [71, 113].

3.2. SENSIBILISATION ASPERGILLAIRE

A. fumigatus, avec ses petites spores, peut être retrouvé plus fréquemment au niveau pulmonaire que dans les sécrétions respiratoires [101]. La sensibilisation aspergillaire est élevée chez les patients atteints de mucoviscidose, et témoigne du fait que cette espèce, ubiquitaire dans l'environnement, provoque des réponses immunologiques [77]. Plusieurs facteurs, comme la présence d'une atopie, l'augmentation de production de sécrétions bronchiques, et l'incapacité de chasser les micro-organismes de l'arbre respiratoire, facilitent la sensibilisation fongique chez les patients atteints de mucoviscidose [11]. Celle-ci est caractérisée par une augmentation des IgE spécifiques anti-*A. fumigatus* ($\geq 0,35$ UI/mL) et/ou des IgE contre les antigènes aspergillaires recombinants, et/ou une augmentation des IgE sériques totales [77]. Les IgE spécifiques anti-*A. fumigatus* reflètent une allergie respiratoire vis-à-vis des allergènes aspergillaires. La seule différence entre la sensibilisation et l'asthme aspergillaire est clinique (présence ou non d'un asthme).

3.3. ASTHME ASPERGILLAIRE

Face à un asthme sévère, la recherche d'une réactivité cutanée immédiate à *Aspergillus sp* est un élément clé [164]. L'étude de Maurya chez des patients sans mucoviscidose a montré que 28,5% des asthmatiques présentaient un test cutané positif aux allergènes aspergillaires, 7,6% d'entre eux produisaient des anticorps précipitants anti-*Aspergillus sp*, et 10,4% étaient positifs en IgG spécifiques anti-*A. fumigatus* [107], ce que n'ont pas démontré d'autres études [23, 142]. La prévalence de la sensibilisation aspergillaire de type IgE chez les sujets asthmatiques est de 20 à 30% [21]. La sensibilisation vis-à-vis des allergènes d'*A. fumigatus* semble conférer à l'asthme un caractère plus sévère [107]. Certains auteurs suggèrent la possibilité d'évolution vers l'ABPA chez une certaine catégorie d'asthmatiques sensibilisés à *A. fumigatus* [107, 138]. Un traitement par corticoïdes et bronchodilatateurs est conseillé. Il permet une amélioration des symptômes, et la prise d'itraconazole diminue le risque d'évolution vers une ABPA [15, 142].

3.4. BRONCHITE ASPERGILLAIRE

La bronchite aspergillaire muco-membraneuse est une inflammation bronchique non spécifique caractérisée par le développement du mycélium en nappe à la surface de l'épithélium bronchique, pouvant être responsable d'une obstruction. Cette infection superficielle n'envahit pas la paroi bronchique [59, 142]. Des perturbations des défenses naturelles de l'appareil respiratoire et notamment de l'activité phagocytaire macrophagique sont incriminées dans l'étiopathogénie de la bronchite aspergillaire [106].

Elle est peu fréquente, et à l'origine d'une symptomatologie bronchique prolongée : toux, bronchorrhée, moules bronchiques, parfois fièvre, altération modérée de l'état général ou hémoptysies, sans critères cliniques et biologiques d'ABPA [15, 106]. Le diagnostic repose sur l'endoscopie mettant en évidence cette inflammation, un bouchon muqueux et permet surtout d'isoler *A. fumigatus* dans les sécrétions bronchiques ou dans les bouchons muqueux aspirés. La sérologie est inconstamment positive [23]. Il n'y a normalement pas de réponse allergique, les IgG spécifiques d'*A. fumigatus* augmentent mais sans augmentation associée des IgE [24]. Ces patients ne répondent pas aux antibiotiques, mais sont sensibles aux antifongiques, comme l'itraconazole. L'amélioration clinique est instaurée sans corticothérapie systémique [143].

3.5. ABPA

3.5.1. INTRODUCTION

L'Aspergillose broncho-pulmonaire allergique (ABPA) est une réaction complexe alliant deux processus : une sensibilisation IgE dépendante vis-à-vis des allergènes aspergillaires, et une réponse IgA et IgG liée à la colonisation de la bronche, laquelle, en l'absence d'immunodépression, reste confinée à la seule lumière des voies aériennes [133, 164]. Le statut pulmonaire des patients atteints de mucoviscidose représente un environnement favorable pour le développement de l'ABPA, principale affection clinique de cette maladie [105]. Cette maladie a été reportée pour la première fois par Hinson *et al* en 1952 [74].

3.5.2. PATHOGENIE

Les macrophages alvéolaires constituent la première ligne de défense, et permettent la destruction des spores aspergillaires. Les altérations de la structure des bronches, la mauvaise qualité du mucus et notamment la dégradation de ses propriétés rhéologiques rendent compte de la germination de spores inhalées de l'environnement, et du développement d'hyphes aspergillaires en abondance dans la lumière bronchique [118, 133]. Lorsque les spores ont germé, une deuxième ligne de défense, assurée par les polynucléaires neutrophiles et des cellules mononucléées vont sécréter des substances toxiques pour le champignon. Cependant, localement, les spores fongiques, en germant, produisent des enzymes protéolytiques, comme l'élastase, la collagénase et la trypsine qui inhibent l'activité phagocytaire [163]. Ces enzymes lytiques induisent des dommages au niveau des voies respiratoires, une desquamation des cellules épithéliales, facilitant l'invasion fongique et stimulant la production de cytokines inflammatoires (IL6, IL8). Les cellules présentatrices d'antigènes vont endocyter les spores et les hyphes d'*A. fumigatus* et présenter les allergènes aux lymphocytes T présents dans le tissu lymphoïde broncho-alvéolaire par le système HLA-DR [46]. Cela participe au recrutement des lymphocytes Th2 CD4+. Des réponses immunes locale et systémique exagérées semblent être responsables de l'ABPA.

La réponse systémique implique l'activation des lymphocytes B et T. La réponse humorale de type Th2 permet la synthèse de cytokines proinflammatoires (IL4, IL5, IL13) par les lymphocytes, puis la production d'IgE totales et spécifiques anti-*A. fumigatus* stimulée par l'IL4, ainsi qu'une prolifération de mastocytes et une activation des éosinophiles, par l'IL5 [146, 164]. Les sujets atteints d'ABPA présentent d'avantage d'IL4 et IL5 que les patients sans ABPA, mais les taux d'IFN γ sont faibles [146]. Ils ont également une forte sensibilité à l'IL4, qui semble jouer un rôle central en augmentant la réponse humorale, par augmentation de l'expression des ligands CD86 et CD23 des lymphocytes B, et engendrant une réponse exagérée aux allergènes aspergillaires, avec une synthèse accrue d'IgE [118, 133]. La réponse cellulaire de type Th1 se caractérise par la production des IgA et IgG par les lymphocytes B.

Les IgE et IgA spécifiques d'*Aspergillus* semblent être produites localement par le tissu lymphoïde broncho-alvéolaire, indiquant que la réponse immune à la colonisation des voies respiratoires et à une exposition constante à un allergène est importante [133, 163].

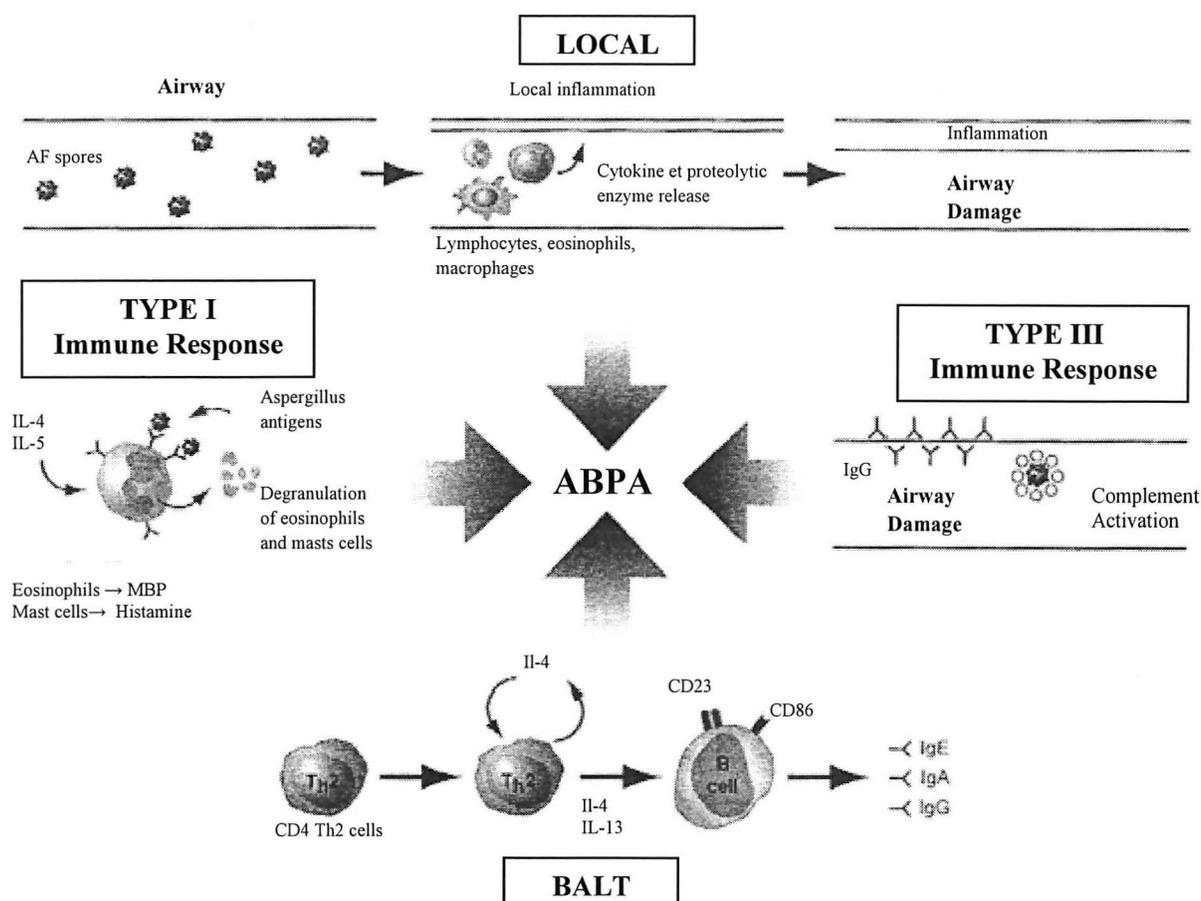


Figure 10 : Mécanismes impliqués dans l'immunopathogénie de l'ABPA. D'après [133]
 MBP : Major basic protein

3.5.3. FACTEURS FAVORISANTS

La présence d'une atopie, associée à l'affaiblissement de l'élimination mucociliaire et à l'inflammation des voies respiratoires, prédisposent ces patients au développement d'une ABPA. Des allergènes comme le pollen, les moisissures, la poussière, sont fréquemment impliqués dans la sensibilisation à l'atopie [121]. Une étude a également mis en évidence l'implication de certaines régions du complexe majeur d'histocompatibilité, en particulier les HLA-DR2 et DR5 dans la susceptibilité à l'ABPA, alors que HLA-DQ2 est associé à un état de résistance [31]. Par ailleurs, une relation a été suggérée entre les polymorphismes au niveau de la région du collagène de la protéine A2 du surfactant pulmonaire et une prédisposition et un degré de sévérité de l'ABPA [5]. Le diabète, complication fréquente de la mucoviscidose, se traduit par une altération des défenses anti-infectieuses pouvant ainsi constituer un facteur de risque aux infections fongiques, bien que peu de données de la littérature soient disponibles à ce sujet.

3.5.4. DIAGNOSTIC

Le diagnostic d'ABPA nécessite une appréciation des données cliniques, radiologiques et biologiques. Un diagnostic et un traitement précoces pourraient permettre la suppression de l'inflammation, et la prévention des dommages tissulaires irréversibles [5].

3.5.4.1. CLINIQUE

L'ABPA est responsable d'une sémiologie clinique d'aggravation persistante après antibiothérapie adaptée : exacerbations récurrentes d'asthme devenant dépendant aux corticostéroïdes, de la toux, des douleurs thoraciques, des crachats purulents, des hémoptysies associées à des modifications radiologiques récentes (infiltrats, atélectasies). Cette pathologie peut également engendrer des symptômes systémiques comme la fièvre, l'anorexie, les céphalées et le malaise. L'ABPA entraîne une réaction inflammatoire locale sans invasion des tissus environnants, ce qui la distingue de l'aspergillose invasive [98]. Les explorations fonctionnelles respiratoires (EFR) sont nécessaires au cours des épisodes d'exacerbations. Cependant, certains patients atteints d'ABPA sont asymptomatiques ou peu symptomatiques [9]. La pathologie pulmonaire de l'ABPA, particulièrement le développement de broncheectasies, semble être corrélée à l'accumulation locale de granulocytes, ainsi qu'à l'activation et la libération continues d'exoprotéases [118].

3.5.4.2. ANOMALIES RADIOGRAPHIQUES DANS L'ABPA

La pathogénie de l'ABPA a comme conséquence l'inflammation des voies aériennes et la production muqueuse excessivement épaisse, menant à l'obstruction des petites et grandes voies aériennes [98]. La radiographie thoracique peut montrer des infiltrats pulmonaires transitoires ou persistants. Durant les exacerbations aiguës, ils sont le plus souvent retrouvés en position centrale, et parfois au niveau des lobes supérieurs [71, 159]. Le scanner thoracique est considéré comme plus sensible, il est l'examen de référence. Durant les exacerbations, les données caractéristiques sont les infiltrats parenchymateux, les impactions mucoïdes ou bronchocèles [23, 159]. A un stade plus tardif, se développent des broncheectasies centrales, présentes chez 85% des patients atteints d'ABPA, et une fibrose pulmonaire [5, 124, 149]. La présence de broncheectasies est un marqueur associé à des rechutes fréquentes et un échec d'une rémission complète, souvent la conséquence des infections bactériennes [10, 11, 154]. Il est important de diagnostiquer cette pathologie avant

le développement de bronchectasies, marqueur de mauvais pronostic [9]. Cependant, celles-ci ne sont pas spécifiques d'une ABPA [133].

3.5.4.3. CONSENSUS DIAGNOSTIQUE

Le diagnostic d'ABPA chez un patient atteint de mucoviscidose est établi selon des critères essentiels, d'après une conférence internationale qui a eu lieu en juin 2001 [154] :

- Détérioration de l'état clinique non attribuable à une autre étiologie : toux, sibilants, majoration des expectorations, dégradation de la tolérance à l'exercice et de la fonction respiratoire
- Taux d'IgE totales sériques > 1000 UI/mL sauf si le patient est sous corticothérapie : le dosage sera alors fait après l'arrêt du traitement. Le taux minimum des IgE totales est de 500 UI/mL. Si une ABPA est fortement suspectée et que le taux se situe entre 200 et 500 UI/mL, il faut répéter le dosage 1 à 3 mois après.
- Test cutané immédiat positif aux réactions d'hypersensibilité aux allergènes aspergillaires (diamètre induration du Prick test > 3mm) ou présence d'IgE spécifiques anti-*A. fumigatus*.
- Présence d'IgG ou d'anticorps précipitants sériques vis-à-vis d'*A. fumigatus* (au moins 2 arcs ou présence d'un arc à activité de type catalase ou chymotrypsine) OU Anomalies radiologiques additionnelles (infiltrats, impaction mucoïde), ou bronchectasies au scanner.

Ces critères sont particulièrement valables pour le diagnostic dans le cas où l'état du patient s'est peu ou pas amélioré suite à la prise d'un traitement antibactérien bien conduit. En pratique, il est recommandé d'effectuer un dépistage systématique de l'ABPA tous les ans à partir de l'âge de 6 ans chez le patient mucoviscidosique [154].

3.5.4.4. CLASSIFICATION DES STADES D'ABPA

Patterson *et al* ont divisé ce syndrome en cinq stades qui aident à guider la décision thérapeutique [126]. Pendant la phase aiguë (stade I), les signes classiques sont présents et les corticostéroïdes permettent l'amélioration des symptômes et un déclin des IgE sériques et de l'éosinophilie. La phase de rémission (stade II) survient après traitement de la phase aiguë, et s'accompagne d'une amélioration des lésions pulmonaires et d'un déclin des IgE sériques. Les patients sont alors suivis par leurs taux d'IgE une fois tous les 6 mois voire une fois par

an. Au stade d'exacerbation (stade III), le patient a besoin d'un traitement régulier par bronchodilatateurs. Cette phase peut être cliniquement asymptomatique, et montre uniquement une hausse des critères biologiques. Elle est présente chez 25 à 50% des patients [9]. Au stade IV, les patients sont dépendants de la corticothérapie à cause de rechutes fréquentes de l'ABPA [11]. L'ABPA à long terme aboutit à des changements radiologiques et cliniques sévères et permanents, entraînant une fibrose pulmonaire (stade V) [46]. Les stéroïdes sont peu efficaces à ce stade. Ces patients présentent d'autres infections concomitantes à *Staphylococcus*, *Pseudomonas*, et mycobactéries atypiques [133].

Stades	Caractéristiques cliniques	Biologie	Radiologie
I : aigu	Fièvre, douleur	Augmentation des IgE sériques totales	Infiltrats
II : rémission	Asymptomatique	IgE sériques totales normales ou augmentées	Pas d'infiltrat en l'absence de corticoïdes depuis plus de 6 mois
III : exacerbation	Symptômes du stade aigu	Augmentation des IgE sériques totales	Infiltrats
IV : asthme corticodépendant	Asthme persistant sévère	IgE sériques totales normales ou augmentées	Présence ou absence d'infiltrats
V : fibrose	Cyanose, dyspnée, évolution vers l'IRC	IgE sériques totales normales ou augmentées	Lésions cavitaires, bronchectasies étendues, fibrose

Tableau 1 : Stades évolutifs de l'ABPA. D'après [126, 164]

La présentation clinique de l'ABPA, avec alternance d'exacerbations et de rémissions, peut causer une confusion diagnostique [11]. Le diagnostic d'ABPA est difficile car certains critères ne sont pas constants : infiltrats pulmonaires, éosinophilie sanguine, augmentation des IgE, et peuvent être absents en dehors des exacerbations, lors des traitements par corticoïdes, ou lors des stades IV et V de l'ABPA. De plus, les bronchectasies sont inconstantes [47].

Une autre classification résume ces différents stades en trois groupes [92].

ABPA-S	Stade précoce de l'ABPA. Forme clinique légère. Sérologie positive (IgE et IgG spécifiques <i>A. fumigatus</i> , éosinophilie). Absence de bronchectasie.
ABPA-CB	Forme clinique modérée. Sérologie positive (IgE et IgG spécifiques <i>A. fumigatus</i> , éosinophilie). Présence de bronchectasies centrales.
ABPA-CB-ORF	Forme clinique sévère. Sérologie fortement positive (IgE et IgG spécifiques <i>A. fumigatus</i> , éosinophilie). Présence de bronchectasies centrales et d'autres anomalies radiologiques.

Tableau 2 : Classification des stades d'ABPA selon les caractéristiques cliniques, biologiques et radiologiques. D'après [92]

ABPA-S : ABPA sérologique ; **ABPA-CB** : ABPA avec bronchectasies centrales ; **ABPA-CB-ORF** : ABPA avec bronchectasies centrales et autres caractéristiques radiologiques

3.5.4.5. NOUVELLES PERSPECTIVES DE DIAGNOSTIC

- ANTIGENES RECOMBINANTS

A cause des inconvénients concernant les variabilités liées aux complexités des diverses préparations antigéniques d'*A. fumigatus*, de nouvelles méthodes ont été appliquées pour standardiser la détection de ces antigènes spécifiques à partir d'allergènes purifiés [68]. Le recours possible aux antigènes recombinants d'*A. fumigatus* a suscité un grand intérêt. En effet, les antigènes extraits de ce champignon contiennent plus de 200 protéines et glycoprotéines différentes. Le recours aux antigènes purifiés recombinants, possédant des activités enzymatiques, a pour but de détecter la réponse immune de chaque patient envers chaque antigène et de comparer les réponses immunes entre différents centres et différents pays [41].

Plus de 20 allergènes recombinants ont été caractérisés et testés, dénommés rAspf1 à rAspf22, et détectés par ELISA (Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay) ou par un système ImmunoCAP [65, 159]. Parmi ces allergènes, rfAsp f1, f2, f3, f4 et f6 lient fortement les IgE spécifiques correspondantes lors d'asthme aspergillaire ou/et d'ABPA, entraînant donc une forte élévation du taux des IgE spécifiques lors de ces pathologies [28, 147, 164].

Les antigènes aspergillaires recombinants rfAspf1 et rfAspf3, produits peu après la germination de spores, seraient reconnus à la fois chez les patients sensibilisés et porteurs d'une ABPA [11, 72]. Une analyse longitudinale de trois ans montre que rAspf1 et rAspf3 sont reconnus par les anticorps des patients sensibilisés par *A. fumigatus* avec asthme avec une spécificité de 100% et une sensibilité de 88% [41]. Ces antigènes donnent lieu à une réponse précoce lors de la sensibilisation aspergillaire à *A. fumigatus* [89].

Dans l'ABPA, la réponse Th2 CD4+ est orientée par des allergènes fongiques et se traduit par une production d'IgE vis-à-vis des protéines aspergillaires spécifiques : Aspf2 (impliqué dans l'adhérence du champignon à la matrice extracellulaire), Aspf4 (protéine sécrétée), et/ou Aspf6 (protéine spécifique des hyphes produite par *Aspergillus*) [11, 47]. Selon une étude, 80% des sujets atteints d'ABPA développent une réponse IgE contre rAspf4, 55% contre rAspf6, et 90% des patients reconnaissent au moins un de ces deux antigènes. La réponse sérologique contre ces antigènes serait exclusivement retrouvée chez les patients atteints d'ABPA [41]. Par conséquent, rAspf4 et rAspf6 peuvent être des marqueurs spécifiques pour confirmer une suspicion clinique d'ABPA [11], avec une spécificité de 100% et une sensibilité de 79 à 100% selon les études [41, 72, 89]. En effet, l'ABPA se caractérise par une croissance fongique au niveau des bronches, croissance facilitée par la présence de mucus. La sécrétion quasi-permanente des allergènes assure alors une réponse immune aux composés endocellulaires et aux allergènes pariétaux. Ces patients sont alors capables d'accroître la réponse immune contre les protéines intracellulaires libérées par destruction des hyphes d'*A. fumigatus* [41]. La combinaison d'une augmentation des IgE sériques totales (>1000 UI/mL) et des IgE spécifiques contre rAspf4 et/ou rAspf6 montre une spécificité de 100% et une sensibilité de 64%, une VPP de 100% et une VPN de 94% [28].

Cette méthodologie devrait permettre à l'avenir de discriminer les patients avec ABPA et ceux ne présentant qu'une sensibilisation aspergillaire [72, 147, 164]. Ces marqueurs se montrent plus sensibles et plus spécifiques que les IgE totales et spécifiques anti-*A. fumigatus* [89, 159], et ces études devraient aider à déterminer avec précision le rôle diagnostique de ces allergènes recombinants. Cependant, certaines études ne confirment pas ces résultats et nuancent l'intérêt des recombinants dans le diagnostic d'ABPA chez les patients atteints de mucoviscidose [47, 93].

- TARC

Les thymus – and activation – regulated chemokines sont des cytokines produites majoritairement par les cellules dendritiques en cas de réaction immunitaire contre les moisissures, et auraient un rôle physiopathologique important dans l'évolution vers l'ABPA, qui serait lié à une orientation des défenses immunitaires vers le type Th2. Ces cytokines recrutent les cellules T-helper de type 2 (Th2) par l'intermédiaire d'un récepteur à chemokines CCR4 au niveau du site d'inflammation pulmonaire. Les cellules Th2 produisent l'interleukine 4, qui induit la production d'IgE par les cellules B [70, 97]. La pertinence des TARC comme marqueur de l'ABPA chez les patients atteints de mucoviscidose a été examinée dans deux études différentes.

Les TARC constituent un marqueur plus sensible et plus spécifique (92 et 95%) que les dosages des IgE totales et spécifiques, des IgG et des antigènes recombinants. Elles sont utiles pour l'identification de l'ABPA chez les patients atteints de mucoviscidose et aident à différencier l'ABPA des autres manifestations aspergillaires, et de l'atopie [97]. De plus, les taux de TARC s'élèvent avant le développement des critères cliniques d'ABPA (plus de 30 mois) et bien en amont de la hausse des IgE totales. Les TARC pourraient donc améliorer la précocité du diagnostic et sa prise en charge [97]. La corticothérapie systémique diminue le taux de TARC par suppression de la réponse immunologique à *A.fumigatus*. Le taux de TARC pourrait être aussi un marqueur d'efficacité du traitement par corticoïdes chez ces patients [70]. Ces études suggèrent donc que les TARC pourraient être des bio-marqueurs très spécifiques et précocément positifs dans le diagnostic de l'ABPA. Il reste à le démontrer dans des études cliniques impliquant un nombre représentatif de patients atteints de mucoviscidose.

- CELLULAR ALLERGEN STIMULATION TEST (CAST)

Il permet de mesurer les sulfidoleukotriènes, produits surtout par les polynucléaires basophiles, stimulés par des allergènes [68, 159]. Une étude a montré une sensibilité de 100% et une spécificité de 74% des CAST dans le diagnostic d'ABPA. La spécificité peut augmenter en ajoutant un paramètre diagnostique, comme des IgE totales > 500 UI/mL et une détection d'allergènes recombinants rAspf4 et/ou rAspf6 [132]. Les CAST sont des marqueurs de la sensibilisation à *A. fumigatus*. D'autres études sont cependant nécessaires pour évaluer l'intérêt des CAST dans la recherche d'une ABPA en routine.

- AUTRES ANTIGENES

D'autres antigènes ont été impliqués dans le diagnostic de l'ABPA, comme la recherche d'une réaction croisée impliquant des thioredoxines d'*A. fumigatus* produites comme protéines recombinantes Asp f28 et Asp f29, qui lient fortement les IgE des patients avec ABPA [63].

3.5.5. TRAITEMENT

Le traitement de l'ABPA implique la prévention et le traitement des exacerbations, afin de limiter sa progression vers la fibrose. Cela inclut le contrôle environnemental et les traitements de la mucoviscidose et de l'ABPA. Les buts du traitement sont triples :

- limiter le nombre et la sévérité des exacerbations
- éradiquer la colonisation et/ou la prolifération d'*A. fumigatus* dans les bronches
- contrôler l'asthme cortico-dépendant et la fibrose.

Ce traitement est basé sur deux types de molécules : corticostéroïdes pour traiter la réponse inflammatoire et antifongiques pour supprimer ou limiter la prolifération mycélienne [164, 171]. Seulement 26,2% des patients atteints d'ABPA sont traités avec des antifongiques (itraconazole ou amphotéricine B), 56% reçoivent une corticothérapie orale, et 75% des corticostéroïdes par voie inhalée [105].

3.5.5.1. CONTROLE ENVIRONNEMENTAL

L'éviction des zones où les spores aspergillaires sont présentes en fortes concentrations est essentielle. Une filtration efficace de l'air peut aider à enrayer la progression de la maladie [133].

3.5.5.2. CORTICOTHERAPIE SYSTEMIQUE

Les corticostéroïdes systémiques sont le pilier principal du traitement de l'ABPA car ils suppriment la réaction immunologique et la réponse inflammatoire induites par le champignon [71]. Ils agissent, par inhibition de l'activité de la phospholipase A2, sur le métabolisme de l'acide arachidonique, et permettent des réductions du taux d'IgE sériques et de l'éosinophilie, une amélioration des infiltrats pulmonaires, et une réduction du bronchospasme [154].

Nepomuco *et al* ont traité leurs patients avec des corticoïdes, avec une dose initiale de 2 mg/kg/jour pendant une semaine, puis 1 mg/kg/jour pendant une semaine, en diminuant ensuite les doses progressivement, jusqu'à la plus faible dose ne produisant pas d'augmentation des IgE, de l'éosinophilie et pas de détérioration clinique ou radiologique [121]. Cependant, la dose recommandée de corticoïdes systémiques est de 0,5 mg/kg/jour pendant 2 semaines, puis une diminution progressive des doses les 6 à 8 semaines suivantes [98, 163].

L'efficacité du traitement est reflétée par l'amélioration des symptômes, souvent notée par la diminution du bronchospasme et de la toux, ainsi qu'une amélioration de la radiographie thoracique [77, 98]. Au niveau biologique, l'éosinophilie périphérique diminue, ainsi que les IgE totales qui montrent une régression lente sur une période de 6 semaines [77, 98, 164]. Une réduction de 30 à 50 % des IgE totales est attendue avec le début de la thérapie [11]. Une étude réalisée entre 2006 et 2008 chez 54 patients atteints d'ABPA a montré une diminution moyenne de 38,8% du taux d'IgE totales, après 6 semaines de traitement par corticothérapie, avec une ABPA classée en rémission. Ce déclin est plus important chez les patients présentant un taux initial d'IgE totales supérieur à 2500 UI/mL. Cependant, l'évolution des différents paramètres sérologiques après traitement par corticothérapie systémique évolue beaucoup d'un patient à l'autre [10, 77]. Le taux des anticorps contre les antigènes recombinants rAspf4 et/ou 6, ainsi que des IgE sériques totales et des IgG déclinent également, mais ne se normalisent pas [28, 89]. De plus, l'importance de la diminution des IgE totales n'est pas corrélée au résultat clinique [10, 28].

Les patients en exacerbation aiguë répondent bien aux corticoïdes et ce traitement précoce des infiltrats pulmonaires évite les destructions parenchymateuses et bronchiques [164]. La corticothérapie est poursuivie jusqu'aux améliorations cliniques et radiographiques [153]. Après arrêt du traitement, les valeurs des anticorps contre les antigènes recombinants augmentent à nouveau [28].

Cependant, un traitement corticoïde à long terme n'est pas recommandé. En effet, celui-ci ne prévient pas l'apparition de nouveaux infiltrats, ni la progression ultérieure vers la fibrose [164]. De plus, leurs bénéfices à long terme sont peu notoires, et associés aux effets indésirables (ostéoporose, diabète, prise de poids, retard de croissance), favorisés par une augmentation des doses face à une rechute du traitement. Ces problèmes ont conduit à la recherche de traitements alternatifs [154].

3.5.5.3. ANTIFONGIQUES

En réduisant la colonisation fongique au niveau de l'appareil respiratoire, les antifongiques peuvent diminuer la stimulation antigénique, réduire la réponse inflammatoire, améliorer les symptômes et éventuellement réduire à long terme la progression de la maladie [154]. La thérapie antifongique est recommandée comme traitement adjuvant dans l'ABPA, surtout chez les patients exigeants de fortes doses de stéroïdes [133]. Des données suggèrent que la thérapie fongique doit être mise en place chez les patients avec exacerbations respiratoires associées à un isolement d'*A. fumigatus* dans les expectorations, lorsqu'il n'y a aucune réponse à une antibiothérapie appropriée [143]. Les agents actifs contre *A. fumigatus* incluent l'amphotéricine B et les antifongiques azolés, y compris le kétoconazole, l'itraconazole, et le voriconazole. Les azolés sont préférés à l'amphotéricine B en raison de leur facilité d'administration [98]. De nouvelles echinocandines sont également disponibles sur le marché.

- ITRACONAZOLE : SPORANOX®

Les azolés inhibent le cytochrome CYP3A4 des champignons, ce qui bloque la synthèse de l'ergostérol, constituant de la membrane fongique. Leur action est donc fongistatique. L'itraconazole est l'azolé le plus étudié et le plus utilisé. Il semble être efficace comme traitement adjuvant dans l'ABPA [137, 138, 163]. Cependant, les études de son action dans cette forme clinique ont été effectuées sur des courtes périodes d'observation avec des cohortes restreintes comportant peu de patients atteints de mucoviscidose [154].

Une étude en double aveugle contre placebo, randomisée, employant l'itraconazole à 200 mg deux fois par jour pendant 16 semaines montre une amélioration chez 46% des patients dans le groupe traité. Les critères de réponse étaient une réduction de la dose de corticostéroïdes de 50%, une diminution de la concentration des IgE totales de 25%, et une augmentation de la tolérance à l'exercice, une amélioration des tests pulmonaires, ou une diminution des infiltrats pulmonaires. Aucune toxicité significative n'a été associée à cette thérapie [155]. L'itraconazole peut être utilisé conjointement aux corticostéroïdes.

Wark *et al*, dans une autre étude contre placebo, randomisée en double aveugle, ont montré que l'itraconazole utilisé à la dose de 400 mg par jour pendant 16 semaines, réduit l'inflammation des voies aériennes, et diminue significativement le taux d'éosinophiles dans

les crachats (35% par semaine en moyenne), le taux sérique d'IgE totales (diminution moyenne de 310 UI/mL) et d'anticorps IgG anti-*A. fumigatus* (diminution moyenne de 15,4 UI/mL). De plus, le nombre d'exacerbations nécessitant l'utilisation de prednisolone diminue chez les sujets recevant de l'itraconazole [171].

Une autre étude a montré, après une thérapie antifongique de 6 mois chez les patients atteints d'ABPA, des réductions du taux d'éosinophiles (26,7%), des IgE totales (36,8%), des RAST (30,5%), et de la dose de corticoïdes oraux, avec une amélioration de la fonction pulmonaire [125].

- VORICONAZOLE

Le voriconazole est un azolé de seconde génération qui s'est montré efficace dans le traitement de l'aspergillose invasive et des infections fongiques réfractaires aux antifongiques classiques dues à *Scedosporium* et *Fusarium sp.* Il devrait devenir un médicament de référence dans les infections sévères à ces champignons filamenteux [79]. Il est également actif sur certaines espèces aspergillaires, comme *A. terreus*, qui est résistant à l'amphotéricine B [79]. Selon Hilliard *et al*, le voriconazole s'est montré efficace comme une thérapie antifongique alternative dans l'ABPA en pédiatrie, particulièrement lorsque les corticostéroïdes oraux sont inappropriés. Les limites de cette étude sont le nombre restreint de patients et le fait que ce soit une étude rétrospective [73]. Une autre étude a montré l'efficacité du voriconazole dans le traitement de l'ABPA, avec une diminution significative des doses de stéroïdes et des IgE totales chez ces patients [62].

- POSACONAZOLE

Le posaconazole n'a pas fait l'objet d'études publiées dans le contexte d'ABPA [170]. Il peut être utilisé en traitement et prophylaxie des infections fongiques invasives [71].

- TRAITEMENTS NEBULLISES

La forme nébullisée limite les effets toxiques d'un traitement. L'association de l'amphotéricine B et des corticoïdes inhalés entraîne une amélioration de l'ABPA sur le plan biologique et clinique [95].

- ECHINOCANDINES : ANIDULAFUNGINE

Les nouvelles echinocandines, caspofungine, micafungine et anidulafungine, interfèrent avec la synthèse de la paroi fongique par inhibition d'une β glucane synthétase, système enzymatique présent chez la plupart des champignons pathogènes [50]. Ces molécules présentent un large spectre d'action, notamment une bonne activité sur *Candida sp* et *Aspergillus sp*, *in vitro* et *in vivo* [53]. Elles sont généralement bien tolérées [53, 167]. *Fusarium* et *Scedosporium sp* semblent être, quant à eux, résistants [53].

L'anidulafungine (Ecalta®) est une molécule semi-synthétique fabriquée à partir d'un produit de fermentation d'*A. nidulans*. Elle est administrée par voie intraveineuse, et montre un bénéfice dans le traitement des candidémies et candidoses invasives. Quelques études *in vitro* ont aussi montré une forte activité sur *Aspergillus sp*, notamment en cas de résistance au fluconazole et à l'amphotéricine B [112, 167]. Cependant, ces agents n'ont pas été étudiés chez les patients atteints d'ABPA [71].

3.5.5.4. ALTERNATIVES THERAPEUTIQUES

- CORTICOTHERAPIE INHALEE

Les corticoïdes inhalés peuvent se révéler utiles comme thérapie adjuvante. Seaton *et al*, sur une étude de 15 ans, ont rapporté que les corticostéroïdes par voie inhalée peuvent apporter des bénéfices s'ils sont utilisés tôt au cours de l'ABPA et en continu en dose d'entretien [140]. Cependant, d'autres études les ont trouvés moins efficaces, avec peu d'amélioration dans la réduction de l'hyperréactivité bronchique chez les patients atteints d'ABPA [154]. Une étude incluant 171 patients n'a noté aucune différence sur la fonction respiratoire et sur la survenue d'exacerbations chez les patients, entre la prescription de corticoïdes inhalés ou celle de placebo [17]. Bien qu'aucun effet indésirable important n'ait été relevé, aucun bénéfice ne semble être attribué à ce médicament quant à son utilisation chez le patient atteint d'ABPA [4, 57, 154].

- CORTICOTHERAPIE INTRA VEINEUSE

Une corticothérapie orale prolongée est problématique du fait des prédispositions au diabète, à l'ostéopénie et aux retards de croissance. L'utilisation mensuelle de

méthylprednisolone IV à forte dose (10 à 15 mg/kg/jour pendant 3 jours consécutifs) semble traiter plus rapidement l'ABPA (diminution significative du VEMS et des taux d'IgE sériques), tout en améliorant de façon importante les effets secondaires liés à la corticothérapie orale au long cours [38, 161].

- OMALIZUMAB

L'omalizumab (Xolair®) est un anticorps anti-IgE monoclonal humanisé. Il a été utilisé dans peu de cas, mais semble réduire considérablement les taux d'IgE sériques et réguler l'expression des récepteurs IgE *in vitro* et *in vivo*. Il induit une inhibition des réactions inflammatoires IgE dépendantes, et améliore de façon significative la VEMS, la qualité de vie, en diminuant les exacerbations. Il s'agit d'une thérapie alternative chez le patient présentant des effets indésirables sous corticoïdes [82, 122].

3.5.5.5. RECOMMANDATIONS POUR LE TRAITEMENT DE L'ABPA

Les corticoïdes constituent la thérapie initiale pour le traitement d'une exacerbation de l'ABPA, avec une dose initiale de 0,5 à 2 mg/kg/jour, pendant deux à quatre semaines. Une amélioration clinique confirme le rôle de l'ABPA dans cette exacerbation. En l'absence de réponse clinique, le clinicien doit s'orienter sur d'autres étiologies de décompensation pulmonaire, puis augmenter les doses de corticoïdes ou mettre en place une thérapie antifongique [154]. L'itraconazole est ajouté si la réponse aux corticoïdes seuls est insuffisante, si l'ABPA est au stade cortico-dépendant ou si les effets indésirables de la corticothérapie sont trop importants. La dose initiale indiquée est de 5 mg/kg/jour, sans dépasser 400 mg/jour, pendant 3 à 6 mois [154].

3.5.6. SUIVI ET PRONOSTIC

Les patients atteints d'ABPA peuvent rechuter après résolution complète. La surveillance régulière des symptômes, des taux d'IgE, et des modifications radiologiques aideront à une identification rapide d'une rechute ou d'une exacerbation et une mise en place d'un traitement. Celui-ci est semblable à celui préconisé lors de l'étape aiguë. Le pronostic de l'ABPA est favorable chez les patients diagnostiqués et traités précocement, ce qui justifie des suivis fréquents [23]. Les exacerbations sont contrôlées par les thérapies antifongiques et stéroïdes, et à long terme ces patients ne présentent souvent aucun changement irréversible de

la fonction pulmonaire. Certains patients progressent en stade V, le pronostic à ce stade-là est en revanche mauvais [133]. Chez l'enfant, le pronostic de l'ABPA est plus réservé, la corticothérapie au long cours n'étant pas recommandée [119].

3.6. ASPERGILLOSE INVASIVE ET ASPERGILLOME

3.6.1. ASPERGILLOSE INVASIVE

La présence d'une aspergillose invasive hors contexte de transplantation reste exceptionnelle. Cependant, s'il existe une colonisation pré-transplantation, le traitement préventif est maintenu pendant au moins 6 mois, période durant laquelle l'immunosuppression reste forte [66]. L'atteinte bronchique initiale est caractérisée par une nécrose de l'épithélium bronchique, remplacée par une couronne de filaments mycéliens qui va croître et envahir petit à petit le parenchyme pulmonaire et les tissus adjacents (par sécrétion de toxines nécrosantes). Cette nécrose favorisera la thrombose et l'infarctus pulmonaire, réalisant ainsi une lésion en cible (nécrose ischémique et liseré hémorragique). Ultérieurement, la nécrose ischémique se décolle et provoque un séquestre donnant radiologiquement un « aspect en grelot » [3].

La symptomatologie clinique est caractérisée par des douleurs thoraciques, une fièvre résistante aux antibiotiques, une hémoptysie, une dyspnée [23, 149]. Sur le plan radiologique, cette forme se présente comme une opacité alvéolaire à bords flous, évoluant vers la nécrose et l'excavation. En tomographie, la présence de verre dépoli cernant les opacités rondes constitue le signe du halo. Ce signe apparaît comme une couronne hémorragique autour du nodule pulmonaire et est très évocateur de cette pathologie [1]. Ces signes évoluent tardivement vers la nécrose avec formation secondaire d'une image cavitaire ou l'apparition d'un séquestre donnant l'aspect d'un nodule surmonté d'un croissant gazeux [66]. Les éléments complémentaires sont la positivité et l'augmentation des antigènes aspergillaires dans le sérum ou le liquide de lavage broncho-alvéolaire (LBA). Une suspicion importante est aussi liée à la séroconversion en hémagglutination indirecte, ELISA ou immunofluorescence [66, 71, 149]. La sensibilité des examens mycologiques est faible pour les expectorations (environ 30%) et pour le LBA (environ 50%) mais avec une spécificité de 97% dans le LBA [23, 66, 149]. Le traitement par antifongiques reste empirique et est à débiter dès la suspicion diagnostique.

3.6.2. ASPERGILLOME

L'aspergillome se développe habituellement dans une cavité pulmonaire préformée, communiquant avec les bronches et ayant perdu ses défenses phagocytaires. Une boule fongique ou truffe aspergillaire se forme, elle envahit toute la cavité en laissant un espace clair au niveau du sommet (signe radiologique du « grelot »). Il est responsable de toux, expectoration, fièvre résistant aux antibiotiques, asthénie, amaigrissement, hémoptysie [27, 149]. Mais les aspergillomes sont parfois asymptomatiques [133, 160].

La recherche d'*Aspergillus* dans les prélèvements mycologiques doit être répétée mais reste négative dans 48 % des cas. *A. fumigatus* est l'espèce la plus souvent incriminée. La sérologie aspergillaire est le plus souvent positive, sauf s'il s'agit d'une espèce autre que *A. fumigatus* ou si le patient reçoit une corticothérapie [84]. L'étiologie aspergillaire est confirmée par la présence d'anticorps précipitants contre les antigènes aspergillaires [71, 142].

Il s'agit d'une forme extrêmement rare dans la mucoviscidose, puisque seulement quelques cas sont décrits dans la littérature. L'utilisation de corticoïdes par voie inhalée semble augmenter l'apparition de cette forme clinique, ainsi que celle de l'aspergillose invasive [28]. Du fait de la possibilité de guérisons spontanées, de l'importante morbimortalité liée à la chirurgie de l'aspergillome, l'abstention thérapeutique est la règle, notamment chez le patient asymptomatique [149]. Pour d'autres, la sévérité potentielle des complications justifie de proposer à tout malade opérable une chirurgie d'exérèse qui est le seul traitement permettant d'éviter ces complications et d'assurer la guérison [27]. Les recommandations d'experts américains suggèrent l'utilisation de l'itraconazole ou du voriconazole si la pathologie progresse ou en cas d'hémoptysies [133].

Le rôle et l'impact clinique des champignons filamenteux dans la mucoviscidose doivent donc être évalués, afin de permettre une prise en charge précoce et satisfaisante chez ces patients, et ralentir l'évolution de la pathologie pulmonaire.

PATIENTS ET METHODES

1. TYPE D'ETUDE

Le projet « Mucofong » repose sur une étude nationale multicentrique prospective centrée sur le suivi mycologique des patients atteints de mucoviscidose effectuée dans 7 centres investigateurs : Lille, Dunkerque, Angers, Bordeaux, Dijon, Rouen, Grenoble.

2. POPULATION

La population étudiée comprend 62 patients atteints de mucoviscidose, et pris en charge par le CRCM du CHU de Grenoble, ce qui correspond à 21% des patients inclus dans l'étude Mucofong multicentrique nationale.

N° de centre	Ville	Nombre d'inclus	Nombre
01	Lille	66 adultes	76
02	Lille	10 enfants	
03	Dunkerque	14 adultes	34
04	Dunkerque	20 enfants	
05	Grenoble	49 adultes	62
06	Grenoble	13 enfants	
07	Bordeaux	23 adultes	30
08	Bordeaux	7 enfants	
09	Angers	10 adultes	21
10	Angers	11 enfants	
11	Dijon	17 adultes	35
12	Dijon	18 enfants	
13	Rouen	33 adultes	41
14	Rouen	8 enfants	
	TOTAL	297 patients	

Tableau 3 : Répartition des patients inclus dans l'étude Mucofong multicentrique

2.1. SERVICES CONCERNES

La prise en charge des patients atteints de mucoviscidose est coordonnée par les CRCM situés en milieu hospitalier : le CRCM de suivi adulte (à partir de 18 ans) pris en

charge par les Dr Claire Cracowski et Dr Bérengère Coltey, et le CRCM de suivi enfant pris en charge par les Dr Catherine Llerena et Dr Isabelle Pin.

Le CRCM s'appuie sur une équipe pluridisciplinaire, constituée du médecin coordinateur, des infirmiers, du kinésithérapeute, du psychologue, de la diététicienne et de l'assistante sociale, et fonctionne en réseaux, d'une part avec d'autres services hospitaliers, et d'autre part avec l'équipe médicale en ville.

2.2. CRITERES D'INCLUSION

- 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
- Assuré social

2.3. CRITERES DE NON INCLUSION

- Patient greffé pulmonaire (les patients 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.

3. RECUEIL DE DONNEES

Les cahiers de recueil des données ou cahiers d'observation sont fournis par la Délégation à la Recherche du CHU de Lille. Ils englobent des données cliniques, biologiques et thérapeutiques qui sont remplis grâce au dossier clinique des patients. Ces fiches sont communes à tous les centres investigateurs et centralisées sur une base de données unique.

Les cahiers d'observations sont en duplicata : un exemplaire reste dans les centres investigateurs et le deuxième est remis à la DRI (Direct Rendering Infrastructure) afin que l'Assistant de Recherche Clinique (ARC) puisse saisir les données. L'ARC prend en charge le monitoring, c'est-à-dire le contrôle de la qualité des données inscrites dans le cahier et leur concordance avec les dossiers sources.

4. DONNEES CLINIQUES

4.1. FONCTIONS RESPIRATOIRES

4.1.1. EXPLORATIONS FONCTIONNELLES RESPIRATOIRES

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 par seconde (VEMS). Les résultats sont exprimés en pourcentage de la valeur attendue pour l'âge (en fonction de la taille et du poids de l'enfant).

4.1.2. ECHELLE DE DYSPNEE DE SADOUL

Elle attribue un indice numérique à des stades d'apparition de la dyspnée en permettant d'évaluer l'intensité de la dyspnée (voir annexe 7).

4.2. SCORE DE SHWACHMAN ET KULCZYCKI

Ce score intègre des critères cliniques et paracliniques précis (activité, examen clinique, croissance et nutrition, radiologie pulmonaire), et permet d'apprécier l'évolutivité de l'affection respiratoire (voir annexe 6).

5. OUTILS DU DIAGNOSTIC MYCOLOGIQUE

Le prétraitement des échantillons est réalisé en cas d'expectorations trop purulentes. Le prélèvement est alors fluidifié par incubation pendant 30 minutes à 37°C en présence d'un volume égal d'une solution aqueuse de 2,3-dihydroxy-1,4-dithiolbutane (Digest-EUR® ; Eurobio dilué au 1/10^{ème} dans de l'eau stérile). Ce protocole, commun à tous les centres, est détaillé en annexe 2. L'organisation générale de l'étude est décrite en annexe 1.

5.1. EXAMEN DIRECT PAR COLORATION DE MUSTO OU GOMORI GROCOTT

Cette coloration permet de détecter les éléments fongiques, grâce à la coloration en noir intense de la paroi par imprégnation argentique.

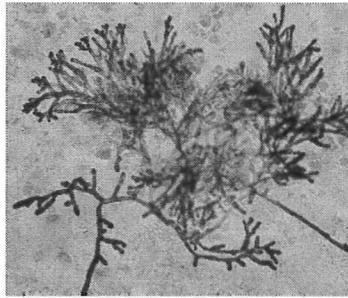


Figure 11 : Mise en évidence d'éléments fongiques par la coloration de Musto

5.2. LES CULTURES

5.2.1. MISE EN CULTURE

En association aux milieux usuels utilisés en mycologie médicale, plusieurs milieux semi-sélectifs ont été rajoutés pour détecter certaines espèces fongiques étroitement associées à la mucoviscidose et parfois difficiles à isoler sur les milieux habituels. Le mode opératoire pour la préparation des différentes géloses est rapporté en annexe 3. Pour chaque prélèvement, 7 milieux de culture sontensemencés à 2 températures d'incubation différentes : 27°C et 37°C, pendant 15 jours. L'ensemencement est quantitatif grâce à une oese de 10 µL. La lecture des milieux se fait quotidiennement.

Le milieu chromogène CAN 2 (Biomérieux®) à 37°C est un milieu chromogène, qui favorise un isolement et une identification rapide des levures. Il est actuellement ensemencé au laboratoire pour chaque prélèvement.

Le milieu Sabouraud-Chloramphénicol à 27°C (AES Laboratoire®) constitue un milieu classique pour la culture, l'isolement, et l'identification des levures et des champignons filamenteux. Le chloramphénicol est ajouté dans le but d'inhiber la croissance bactérienne. Ce milieu est également utilisé en routine au laboratoire pour les expectorations.

Le milieu Sabouraud-Chloramphénicol-Actidione (AES Laboratoire®) est incubé à 27°C et à 37°C, le cycloheximide (ou actidione) permet d'inhiber la croissance des moisissures.

Le milieu Benomyl est incubé à 37°C. Le Benomyl est un inhibiteur des microtubules d'où la formation de colonies plus petites, et une diminution de la croissance des champignons filamenteux. Ce milieu permet la mise en évidence des pathogènes opportunistes autres qu'*Aspergillus*, en particulier *Scedosporium apiospermum*, d'après Sybren De Hoog.

Le milieu à l'Erythritol, à 27°C et 37°C, représente une source de carbone sélective pour *E. dermatitidis*.

5.2.2. RESULTATS DES CULTURES

La levure *Candida albicans* apparaît en bleu sur le milieu chromogène. Les autres levures ne sont pas identifiées directement.

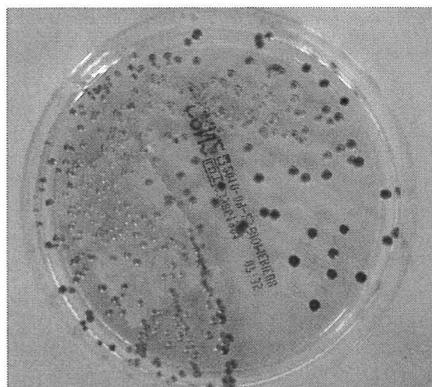


Figure 12 : Aspect macroscopique de *Candida albicans* sur milieu CAN2

Les champignons filamenteux sont identifiés selon la morphologie : aspect visuel du développement en culture, observation au microscope du mode de formation des spores, de leur type de groupement, de leur forme, de leur couleur. La technique du scotch au Bleu de Lactophénol permet l'identification microscopique des fructifications de champignons filamenteux. Un fragment de colonie est mis en contact avec un morceau de scotch et déposé sur lame avec 2 gouttes de Bleu de Lactophénol, puis recouvert d'une lamelle. La lecture au microscope optique se fait à l'objectif x20 ou x40.

Les méthodes conventionnelles phénotypiques sont parfois insuffisantes pour une identification complète du fait d'aspects atypiques des colonies en culture et de caractères biochimiques défailants. Dans ce cas, l'identification morphologique difficile ou incertaine pourra être complétée par une identification moléculaire par PCR suivie du séquençage des domaines ITS des gènes ribosomaux.

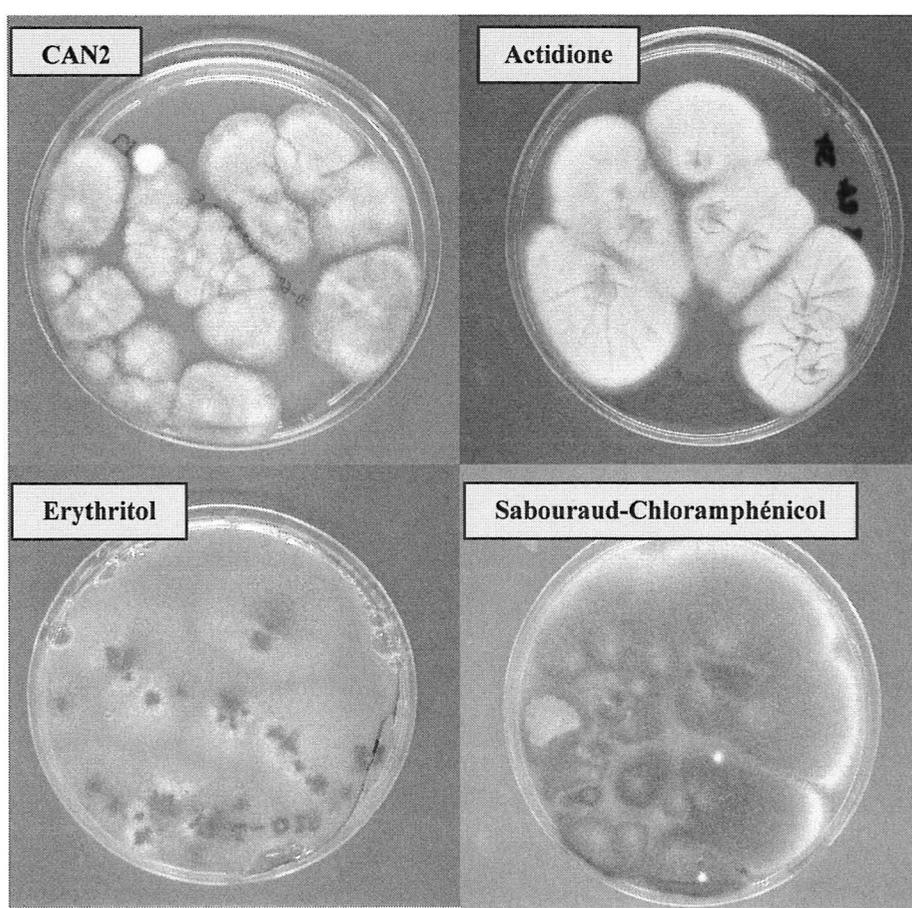


Figure 13 : Aspects macroscopiques d'*A. fumigatus* sur les différents milieux de l'étude

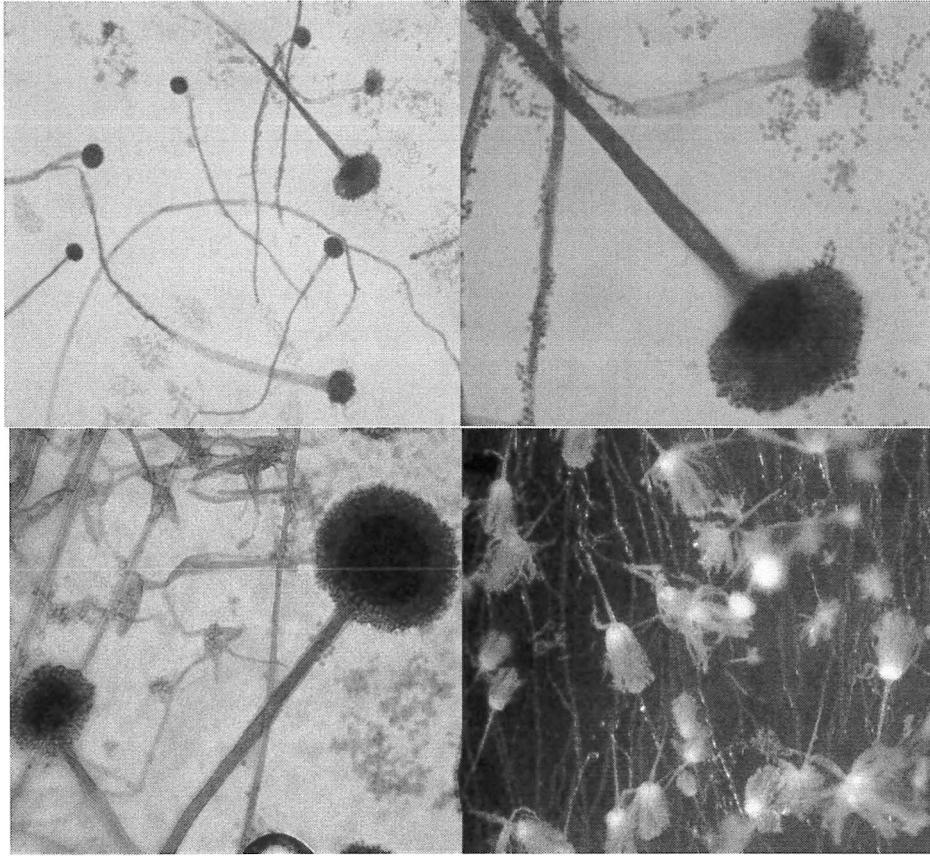


Figure 14 : Aspects microscopiques d'*A. fumigatus* (photos du haut : objectifs x20 et x40) et d'*A. flavus* (photo en bas à gauche, objectif x40) par coloration au bleu de lactophénol et aspect des têtes aspergillaires à la loupe binoculaire (photo en bas à droite)

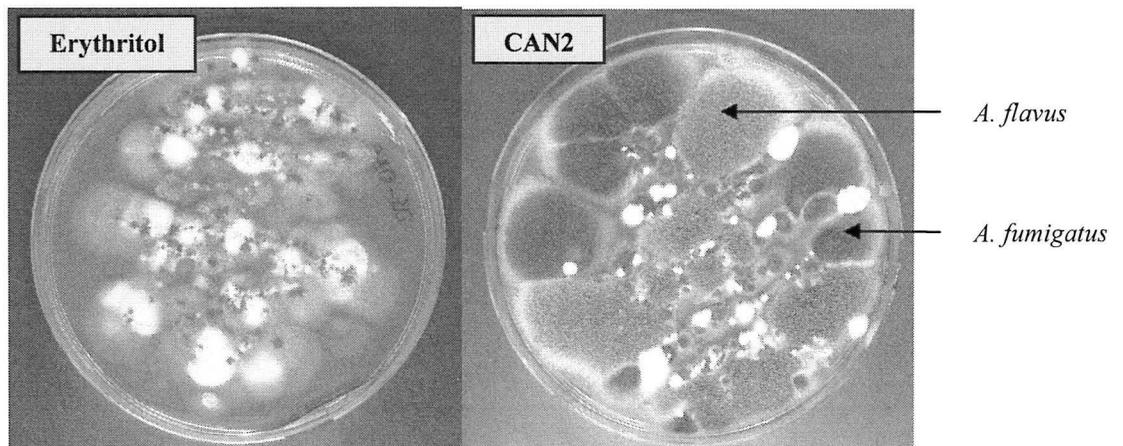


Figure 15 : Aspect macroscopique d'une expectoration

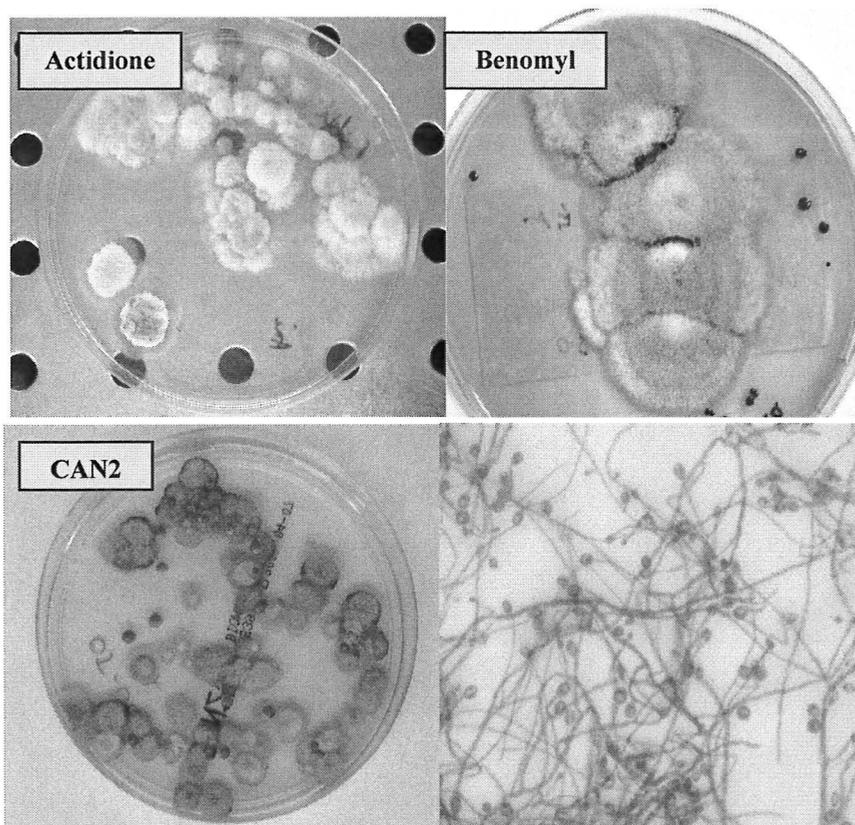


Figure 16 : Aspects macroscopiques sur différents milieux et aspect microscopique (x40) de *Scedosporium apiospermum*

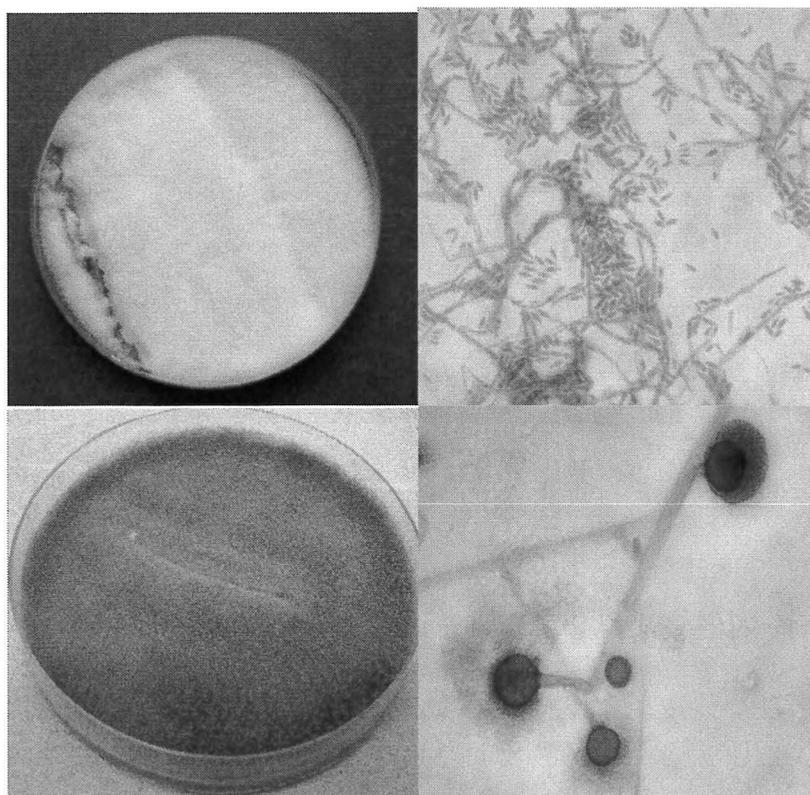


Figure 17 : Aspects macroscopiques et microscopiques (x40) de *Fusarium sp* (photos du haut) et *Mucor sp* (photos du bas)

5.3. L'ANTIFONGIGRAMME

La détermination de la sensibilité aux antifongiques se fait par la méthode E-Test, qui est une méthode de diffusion en gélose (milieu RPMI) permettant l'évaluation de la sensibilité des levures et/ou champignons filamenteux vis-à-vis de six antifongiques : itraconazole, amphotéricine B, caspofungine, voriconazole, posaconazole, et anidulafungine, grâce à des bandelettes imprégnées d'un gradient de concentration de l'antifongique choisi. La réalisation du test permet la détermination pour chacun d'entre eux d'une CMI (Concentration Minimale Inhibitrice). Cette caractérisation *in vitro* a pour objectif de mettre en évidence les isolats présentant des caractères de résistance. La méthodologie pour la réalisation des E-Test est décrite en annexe 4.

L'amphotéricine B est un fongicide, la lecture de la CMI se fait à 100% d'inhibition. Pour les azolés et les échinocandines qui sont fongistatiques, la lecture se fait à 80% d'inhibition (sans tenir compte des microcolonies).

Tous les champignons filamenteux sont souchés à l'aide d'un tube Sabouraud-Chloramphénicol, constituant ainsi une mycothèque. Les expectorations sont stockées à -80°C.

Antifongiques	Action antifongique	CMI ($\mu\text{g/mL}$)		
		Sensible	Sensible Dose Dépendant	Résistant
Itraconazole	fongistatique	$\leq 0,125$	$> 0,125$ et < 1	≥ 1
Amphotéricine B	fongicide	< 1	≥ 1 et ≤ 2	> 2
Voriconazole	fongistatique	< 1	≥ 1 et < 4	≥ 4
Posaconazole	fongistatique	$< 0,2$	$\geq 0,2$ et ≤ 1	> 1
		CMI basse		CMI haute
Casponfungine	fongistatique	$< 0,25$		> 1
Anidulafungine	fongistatique	?		?

Tableau 4 : Interprétation de la sensibilité des antifongiques en fonction des CMI

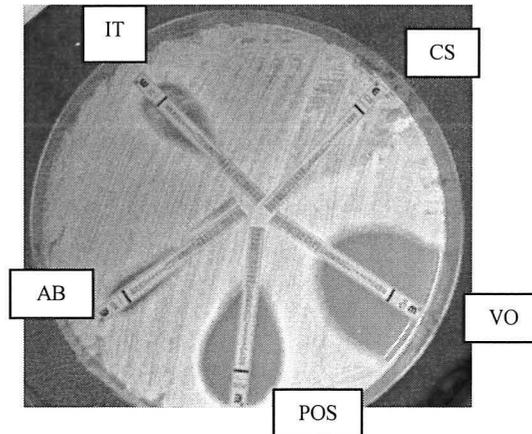


Figure 18 : Antifongigramme sur milieu RPMI

IT : itraconazole, CS : caspofungine, VO : voriconazole, POS : posaconazole, AB : amphotéricine B

5.4. SEROLOGIES FONGIQUES

Le bilan de sérologie aspergillaire fait partie du bilan systématique annuel des patients. Une connaissance précise du statut immunologique des patients lors d'épisodes immuno-allergiques semble indispensable à la prise en charge du risque fongique, que ce soit dans un but thérapeutique ou préventif.

5.4.1. TECHNIQUE ELISA QUANTITATIVE

La technique ELISA utilisée pour la recherche quantitative d'immunoglobulines IgG anti-*A. fumigatus* repose sur l'utilisation de plaques tapissées d'antigènes aspergillaires. Le seuil de positivité est à 0,45 et le seuil de spécificité est à 0,6 pour *A. fumigatus*. Cependant, dans le contexte de mucoviscidose où les contacts avec les micromycètes sont fréquents, un seuil de spécificité de 1 est plus indiqué. Le mode opératoire précis est décrit en annexe 5.

5.4.2. IMMUNOELECTROPHORESE

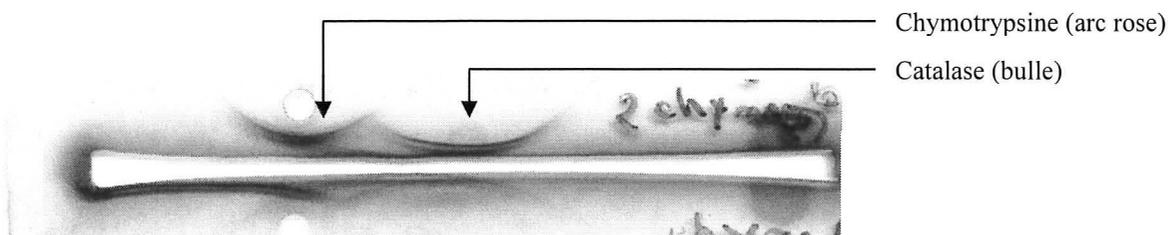


Figure 19 : Technique d'immunoélectrophorèse

L'immunoélectrophorèse (IEP) est une réaction de précipitation en milieu gélosé, moins sensible mais plus spécifique que l'ELISA, utilisée comme technique de confirmation. Elle combine la recherche des anticorps précipitants dans le sérum et la recherche des systèmes précipitants majeurs supportant les activités catalasique et chymotrypsique. Les immunoglobulines recherchées sont essentiellement des IgG dirigées contre les cinq principales espèces d'*Aspergillus* impliquées dans les infections aspergillaires : *A. fumigatus*, *A. flavus*, *A. nidulans*, *A. niger*, *A. terreus*. Le mode opératoire est détaillé en annexe 5. La réaction est considérée comme positive si elle présente au moins deux arcs pour une même espèce, ou un arc support d'une activité enzymatique (catase et/ou chymotrypsine).

Pour la sérothèque, les sérums sont ensuite conservés et congelés à -20°C.

6. DOSAGE DES IGE TOTALES ET IGE SPECIFIQUES ANTI- *ASPERGILLUS FUMIGATUS*

Les IgE sont des anticorps produits lors d'une hypersensibilité immédiate appelée allergie. Ces réactions de défense se produisent vis-à-vis d'antigènes particuliers, ou allergènes, provenant du milieu environnemental qui sont inhalés ou ingérés dans les cas les plus fréquents. Dans les manifestations allergiques, la concentration d'IgE est généralement corrélée à l'intensité de l'exposition à l'allergène et à la gravité des symptômes allergiques. Les résultats du dosage des IgE doivent toujours être interprétés en fonction des données cliniques et des autres résultats biologiques. Il est nécessaire de compléter le bilan par une recherche des spécificités allergéniques suspectées avec le dosage des IgE spécifiques. Ces dosages s'effectuent au Département de Biologie Intégrée (DBI).

Les IgE sériques totales sont dosées par immunoprécipitation sur immunonéphélomètre BN II Dade Behring. Chez l'adulte, le seuil supérieur de normalité des IgE totales se situe à 100 UI/mL. Le dosage des IgE spécifiques anti-*A. fumigatus* est réalisé par immunoanalyse par appareillage Unicap PhaDia. La sensibilité analytique du test est de 0,35 kUI/L et les valeurs chez les sujets sains sont inférieures à 0,35 kUI/L.

7. LA NUMERATION DES POLYNUCLEAIRES EOSINOPHILES

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

RESULTATS

1. CARACTERISTIQUES DE LA POPULATION ETUDIEE

L'étude Mucofong au CHU de Grenoble comprend 62 patients atteints de mucoviscidose. Pendant une période de 8 mois, de novembre 2008 à juin 2009, ces patients ont été suivis cliniquement par le CRCM du CHU de Grenoble et ont bénéficié d'examens mycologiques et sérologiques lors de bilans systématiques annuels, ou au cours d'hospitalisations lors des phases d'exacerbation. Leur première visite après l'inclusion dans le protocole Mucofong a été réalisée, en moyenne un an après l'inclusion.

Au cours de ce suivi, trois patients sont sortis de l'étude, pour diverses raisons qui sont respectivement : un patient pour greffe pulmonaire, un patient pour décès et un pour déménagement avec changement de CRCM. De plus, 2 patients n'ont pas réalisé leur première visite pendant ces 8 mois.

Au total, 57 patients ont réalisé leur première visite, dont 2 ont effectué également leur deuxième visite. L'âge de la population s'étend de 7 à 57 ans (moyenne de 24 ans), avec un sexe ratio de 1. L'âge moyen de dépistage de la mucoviscidose est de 5 ans 8 mois, avec des extrêmes allant de 0 mois à 44 ans.

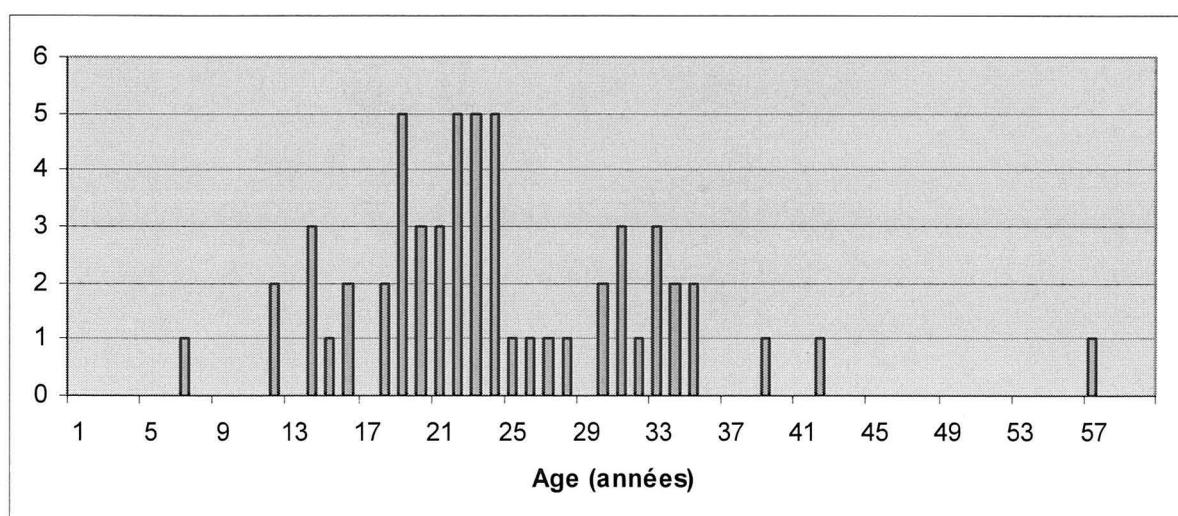


Figure 20 : Répartition de la population des patients du CHU de Grenoble ayant réalisé leur première visite (n=57 patients)

2. DONNEES CLINIQUES ET BACTERIOLOGIQUES

2.1. MUTATIONS DU GENE *CFTR*

La mutation DF508 homozygote représente 54% des mutations rencontrées dans notre population. Les patients hétérozygotes pour la mutation DF508 représentent 32% de la cohorte. Les autres mutations principales sont G542X, R553X, N1303K, associées à la mutation DF508. Ces mutations appartiennent aux classes I et II, comprenant les mutations les plus sévères. D'autres mutations sont plus rarement observées.

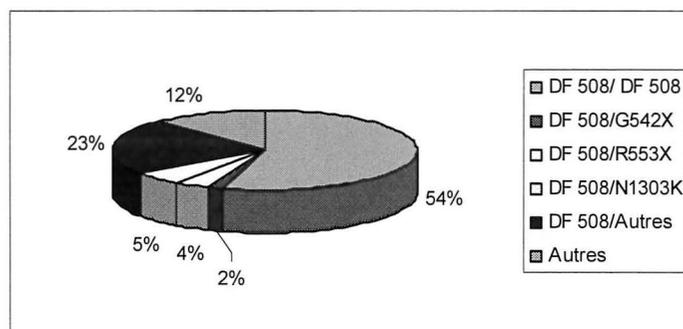


Figure 21 : Répartition des mutations du gène *CFTR* des patients de l'étude (n=57)

2.2. DONNEES CLINIQUES

Le suivi longitudinal de l'état clinique des patients peut permettre d'appréhender le rôle des pathogènes fongiques dans la dégradation de la fonction respiratoire de ces patients, qui domine leur pronostic. On retrouve une grande hétérogénéité clinique pour une même tranche d'âge. La CVF et la VEMS ont cependant tendance à diminuer avec l'âge.

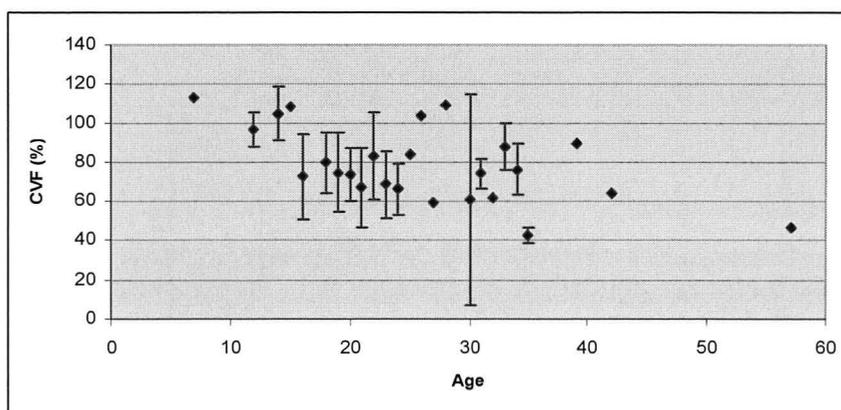


Figure 22 : Capacité Vitale Forcée (CVF) des patients en fonction de l'âge

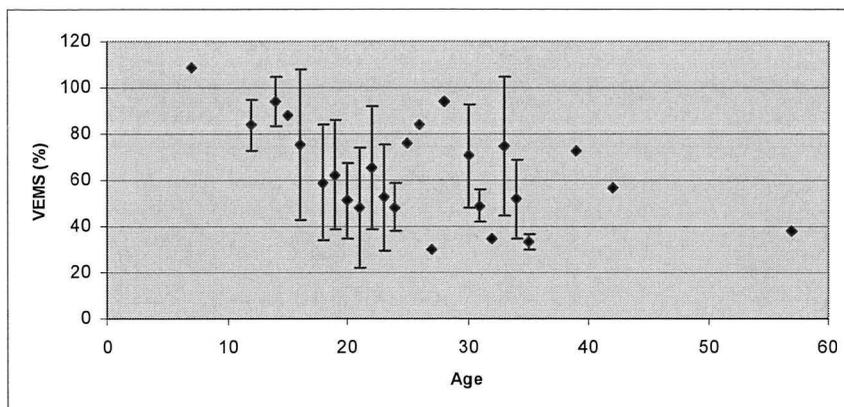


Figure 23 : Volume Expiratoire Maximal par Seconde (VEMS) en fonction de l'âge

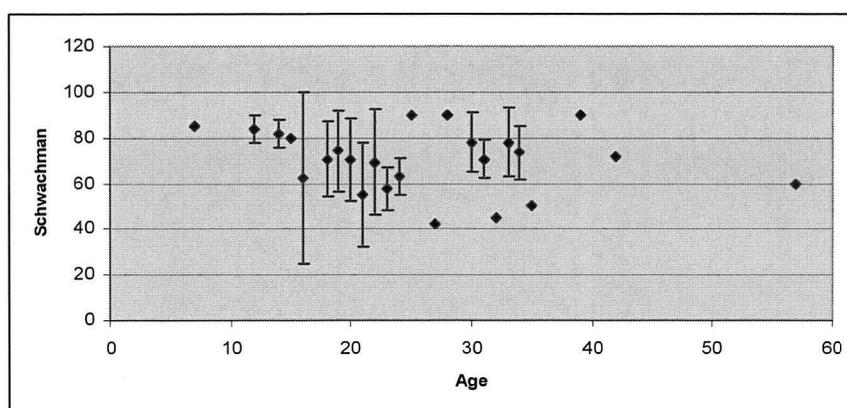


Figure 24 : Score de Schwachman en fonction de l'âge

2.3. RESULTATS BACTERIOLOGIQUES

Sur les 57 patients qui ont effectué leur première visite, 53 expectorations ont été obtenues pour une recherche bactériologique, chez 51 patients. *P. aeruginosa* est la bactérie la plus retrouvée chez les patients atteints de mucoviscidose, chez 57% des patients à cette visite (29/51). La forme muqueuse est largement répandue (93% des isolats de *P. aeruginosa*). Les résultats bactériologiques sont sensiblement les mêmes entre l'inclusion et la visite. Six patients seulement possèdent une flore broncho-pulmonaire normale.

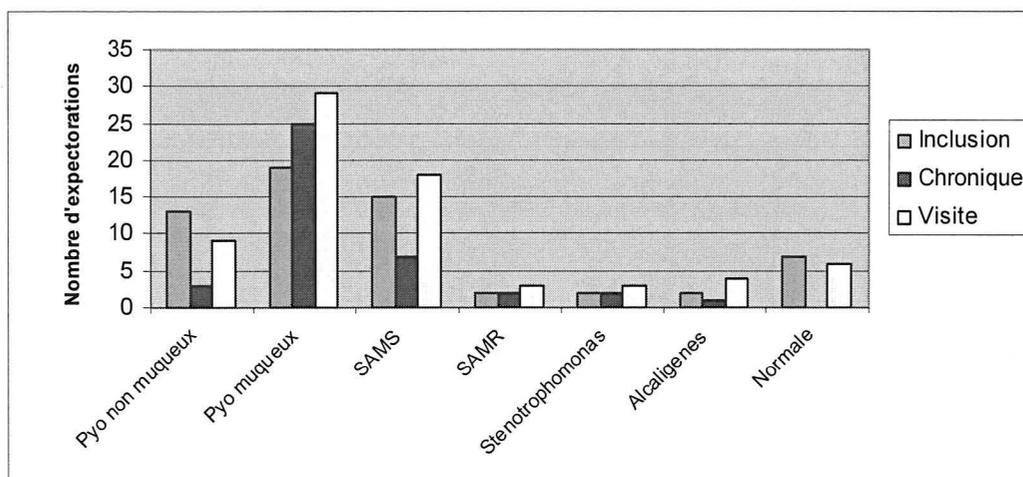


Figure 25 : Répartition des bactéries dans les expectorations (n=53)

3. RESULTATS MYCOLOGIQUES

3.1. COLONISATION FONGIQUE

Sur les 57 patients de l'étude Mucofung, 53 expectorations ont pu être analysées pour recherche fongique. Certains d'entre eux ont réalisé deux visites, afin d'avoir un bilan complet ou un bilan pendant une exacerbation, d'autres sont non expectorants.

3.1.1. LEVURES

C. albicans est isolé chez 76% des patients. Le résultat est à interpréter en fonction de la quantité de levures, puisqu'il peut y avoir des contaminations oro-pharyngées des prélèvements. Parmi nos patients, 12% (6/51) ont une expectoration présentant d'assez nombreuses levures. L'examen direct est positif chez seulement 11 patients. Les deux patientes présentant des signes cliniques de vaginite ont un examen direct positif. Les autres patients n'ont à priori pas de signes cliniques associés.

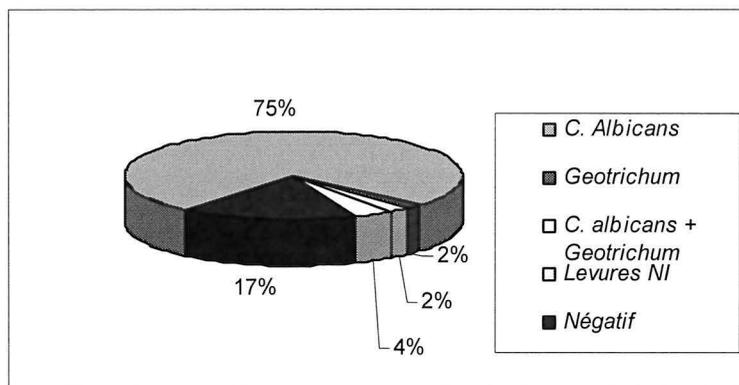


Figure 26 : Isolement des levures dans les expectorations

3.1.2. CHAMPIGNONS FILAMENTEUX

Des champignons filamenteux ont été isolés dans 66% des expectorations (35/53) à cette visite, alors que les cultures mycologiques étaient positives chez 62,5% des prélèvements à l'inclusion. Parmi les cultures négatives en filamenteux, 88% de celles-ci contiennent des levures, les autres étant strictement négatives.

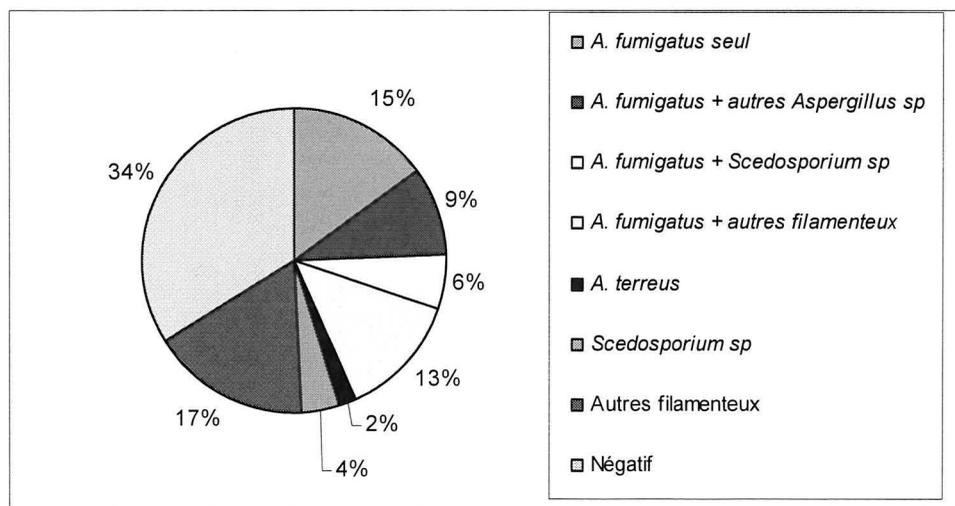


Figure 27 : Résultat des cultures mycologiques (53 expectorations)

Autres champignons filamenteux : *Penicillium sp*, *Eurotium amstelodami*, *Trichoderma*, *Fusarium sp*, *Cladosporium*, *Monilia sitophilia*, *Mucor sp*.

Les *Aspergillus sp* sont retrouvés dans 45,3% (24/53) des cultures, soit 47,1% des patients (24/51). Parmi les patients positifs en filamenteux, les *Aspergillus sp* ont été isolés dans 68% des expectorations. L'espèce majoritairement rencontrée est *A. fumigatus* (96% du genre et 43,3% des cultures), qui est retrouvé comme seul colonisant du tractus digestif chez

23% des patients positifs (8/35). Il est parfois associé à d'autres *Aspergillus sp*, comme *A. flavus* (14%) ou *A. nidulans* (3%), ou à d'autres espèces filamenteuses, comme *Scedosporium apiospermum* (11%). *A. terreus* est retrouvé seul chez 1,9% des patients. Pour la plupart des patients on peut parler de colonisation à *A. fumigatus*, puisque 82% des patients restent positifs un an après l'inclusion.

Scedosporium apiospermum est identifié chez 9,8% des patients (5/51) à cette visite, associé à d'autres espèces filamenteuses chez 3 patients sur 5. Sa prévalence était de 5,4% (3/56) des patients à l'inclusion.

D'autres champignons filamenteux, comme *Penicillium sp*, *Trichoderma*, *Fusarium sp*, *Mucor sp*, sont retrouvés dans 31% des expectorations. Ces mycètes sont abondants dans l'environnement, ils peuvent être isolés des voies respiratoires. Certains d'entre eux peuvent être considérés comme des contaminants de l'environnement.

L'examen direct montre la présence de filaments mycéliens chez seulement 8 patients (23% des expectorations positives en culture). Cet examen montre donc une très faible sensibilité par rapport à la culture. 75% des patients présentant un examen direct positif ont un grand nombre de colonies dans leurs expectorations après culture (>10 colonies par milieu).

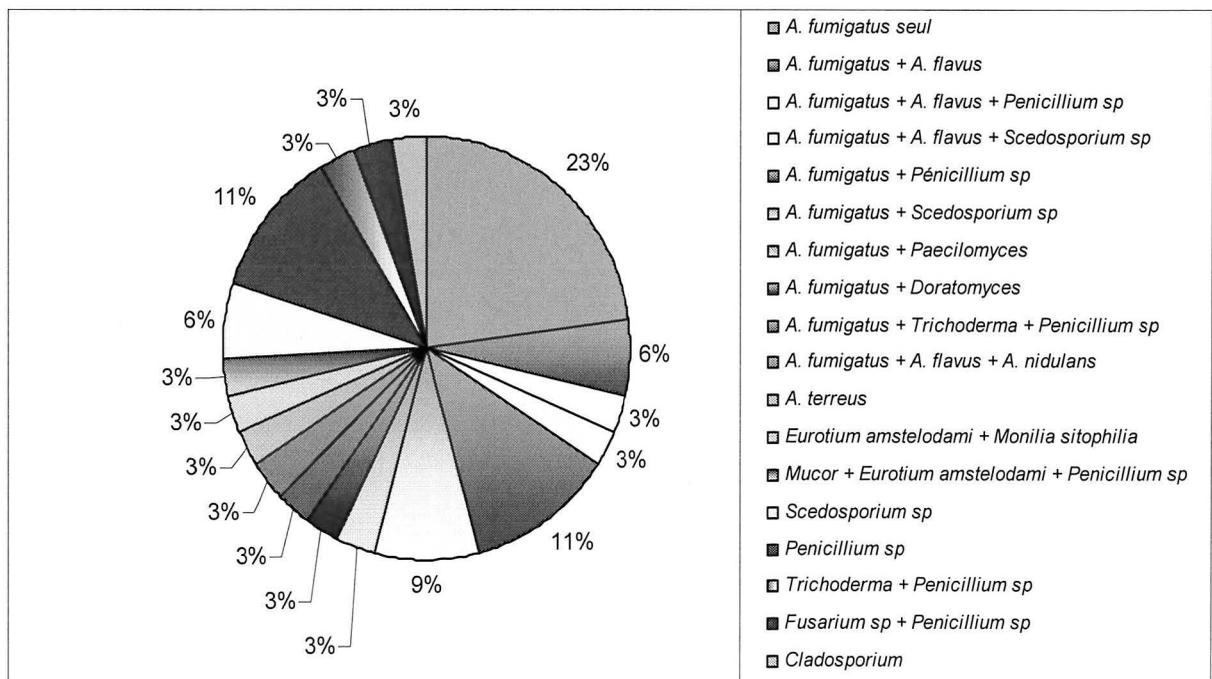


Figure 28 : Isolement des champignons filamenteux dans les expectorations positives (35/53)

Quarante-sept patients de notre population ont réalisé les deux expectorations (à l'inclusion et à la visite), 39% d'entre eux sont colonisés par *A. fumigatus* à ces deux périodes.

Au contraire, les cultures étaient négatives pour *A. fumigatus* aussi bien à l'inclusion qu'à la première visite pour 43% des patients. L'écologie fongique dans cette population reste sensiblement stable.

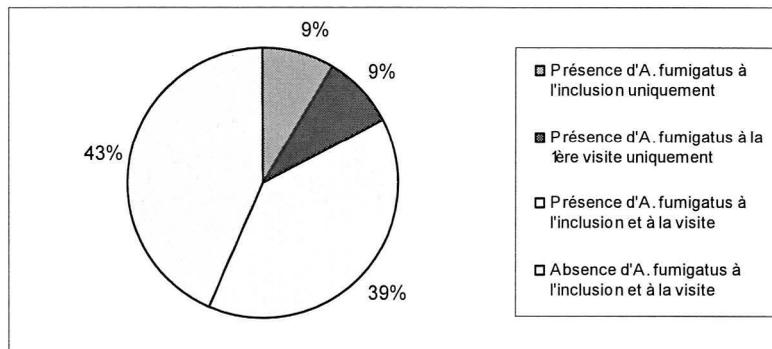


Figure 29 : Répartition des *Aspergillus sp* dans les expectorations à l'inclusion et à la visite

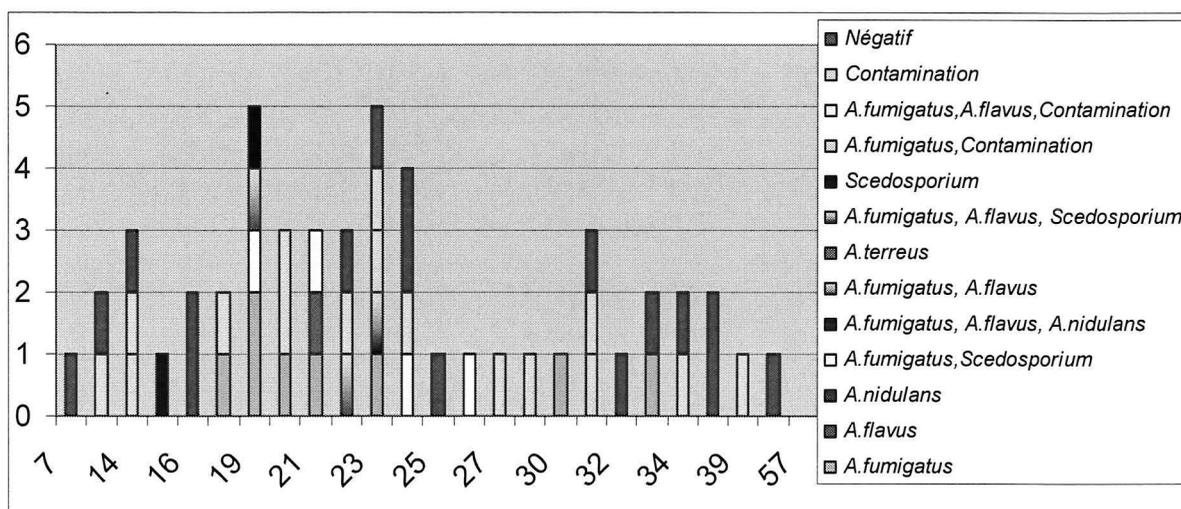


Figure 30 : Résultats des cultures fongiques des expectorations en fonction de l'âge des patients

L'âge moyen d'isolement d'*A. fumigatus* est de 22,3 ans avec une médiane de 21 ans, et des âges extrêmes allant de 14 à 31 ans. La prévalence augmente avec l'âge, avec un pic net dans la tranche d'âge 15-25 ans.

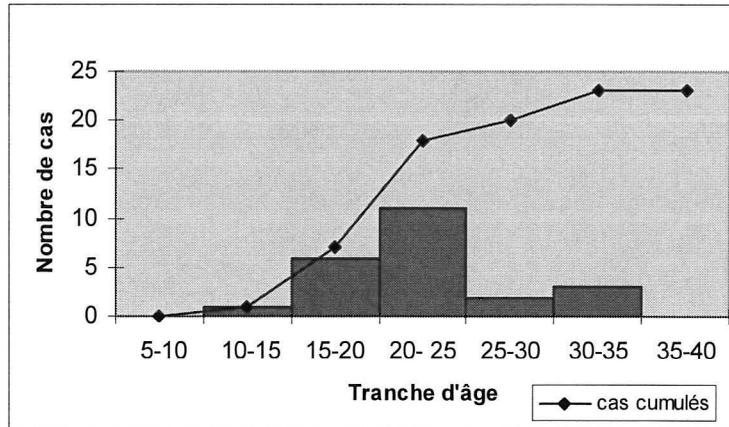


Figure 31 : Répartition par tranche d'âge des patients chez qui *A. fumigatus* a été isolé lors de la première visite après l'inclusion

3.2. COMPARAISON DES MILIEUX

La première visite a permis l'isolement dans les expectorations d'un nombre plus important de champignons filamenteux comparé à l'inclusion, cette tendance est observée sur tous les milieux. Les *Aspergillus* ont été isolés sur un nombre plus important de milieu de culture comparé à l'inclusion, mais au final, le nombre de patients colonisés est identique. Par contre, les patients à cette visite sont davantage colonisés par des contaminants.

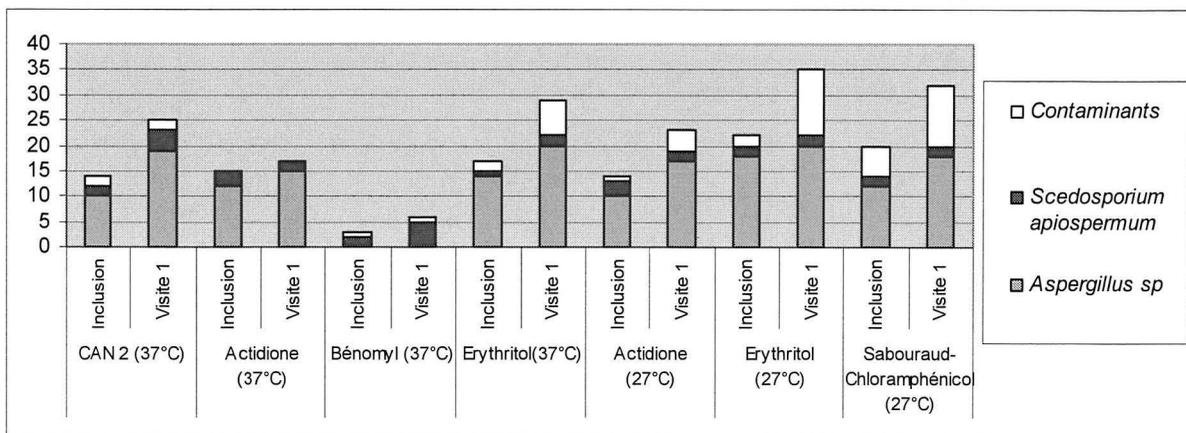


Figure 32 : Isolement des champignons filamenteux à l'inclusion et à la visite sur tous les milieux solides semi-sélectifs (n=53 expectorations)

	CAN2 37°C		Actidione 37°C		Benomyl 37°C		Erythritol 37°C		Actidione 27°C		Erythritol 27°C		Sabouraud 27°C	
	I	V	I	V	I	V	I	V	I	V	I	V	I	V
Détection d' <i>Aspergillus sp</i>	10	19	12	15	0	0	14	20	10	17	18	20	12	18
Détection <i>S. apiospermum</i>	2	4	3	2	2	5	1	2	3	2	2	2	2	2
Détection « contaminants »	2	2	0	0	1	1	2	7	1	4	2	13	6	12

Tableau 5 : Isolement des champignons filamenteux à l'inclusion et à la visite sur tous les milieux semi-sélectifs, sur 53 expectorations (I = inclusion, V = visite)

Il y a une importante différence de croissance des *Aspergillus sp* selon les différents milieux de culture utilisés. Ceux-ci se développent sur tous les milieux, excepté le milieu Bénomyl, qui inhibe totalement leur croissance. Les milieux contenant de l'actidione inhibent légèrement leur pousse également.

S. apiospermum a été isolé chez 3 patients lors de l'inclusion, et 6 patients lors de la première visite. A cette visite, le milieu Bénomyl a permis à lui seul d'isoler ce filamenteux dans les prélèvements de deux patients, parmi les 6 colonisés par cette espèce.

Sur le milieu Erythritol, plus spécifique de l'espèce *E. dermatitidis*, nous n'avons jamais identifié cette espèce. Ce milieu est peu spécifique car toutes les espèces aspergillaires ainsi que les contaminants se développent facilement sur ce milieu.

La croissance des contaminants est favorisée sur les milieux incubés à 27°C, comme l'Erythritol et le Sabouraud. Le milieu avec actidione incubé à 37°C ne permet pas la croissance des contaminants.

Les cultures sont gardées 15 jours, cependant à J7 tous les champignons ont poussé. Les champignons les plus lents à se développer sont *Eurotium amstelodami* et *Fusarium sp*.

3.3. COMPARAISON AVEC LES RESULTATS OBTENUS EN ROUTINE HOSPITALIERE

Le laboratoire de Mycologie du CHU de Grenoble utilise deux milieux pour la mise en culture des expectorations : une boîte CAN2 incubée à 37°C et un tube Sabouraud-Chloramphénicol à 27°C. La comparaison avec la routine est effectuée sur 48 échantillons (11

ne sont pas analysés à cause d'absence d'expectoration ou de demande en mycologie en routine).

Dans 48% des cas, les milieux de culture utilisés dans l'étude Mucofond et les milieux employés en routine isolent les mêmes champignons. Pour un patient, une colonie d'*A. fumigatus* a été identifiée en routine alors que cette espèce est absente sur tous les milieux Mucofond. Dans une autre expectoration, *A. terreus* a été retrouvé en routine, alors que sur les cultures Mucofond, nous avons isolé *A. fumigatus* (2% de discordances). Enfin, pour 48% des prélèvements, les milieux Mucofond se sont avérés plus performants. Parmi les cultures comparées, 15% d'entre elles isolent *Aspergillus sp* uniquement dans les milieux Mucofond (3 *A. fumigatus*, 4 *A. flavus*, 1 *A. nidulans*), 8% pour *S. apiospermum*, et 31% pour les « contaminants » (13 *Penicillium sp*, 1 *Fusarium sp*, 1 *Mucor sp*, 2 *Trichoderma*, 2 *Eurotium amstelodami*, 1 *Doratomyces*, 1 *Monilia sitophilia*, 1 *Cladosporium*).

La comparaison entre les différents milieux utilisés dans l'étude Mucofond est possible du fait des procédures plus rigoureuses lors de cette étude comparé à la routine, par l'ensemencement de 10 µL d'échantillon homogénéisé sur tous les milieux. Cette méthode permet également une standardisation au sein de tous les centres investigateurs.

4. CULTURES BACTERIOLOGIQUES ET MYCOLOGIQUES

4.1. RELATION ENTRE LES ISOLEMENTS DE *P. AERUGINOSA* ET *ASPERGILLUS SP*

La présence d'*Aspergillus* est identique, aussi bien en présence de *P. aeruginosa* qu'en son absence. La colonisation bactérienne à *P. aeruginosa* ne semble donc pas influencer sur le développement aspergillaire.

31 <i>P.aeruginosa</i>	<i>Aspergillus sp</i>	14	45%
	absence d' <i>Aspergillus sp</i>	17	55%
22 absence de <i>P.aeruginosa</i>	<i>Aspergillus sp</i>	10	45%
	absence d' <i>Aspergillus sp</i>	12	55%

Tableau 6 : Isolements de *P. aeruginosa* et *Aspergillus sp* dans les expectorations (n=53)

4.2. ETUDE DE LA CLINIQUE

L'impact de l'isolement de *P. aeruginosa* et/ou *Aspergillus sp* dans les expectorations sur la clinique est étudié, afin de déterminer le micro-organisme le plus impliqué dans la détérioration respiratoire. La clinique est basée sur l'étude des fonctions respiratoires (CVF, VEMS) et le score de Schwachman.

Comme cela avait été observé à l'inclusion, les dégradations de la fonction pulmonaire sont plus marquées en présence de *P. aeruginosa*. L'échantillonnage est encore trop faible pour discriminer les modifications en fonction de l'âge et les sévérités des mutations associées ou non aux colonisations bactérienne et/ou fongique, mais la diminution du VEMS est significativement plus importante ($p < 5\%$) en présence de *P. aeruginosa*. Dans cette population, la colonisation aspergillaire ne modifie pas les capacités pulmonaires. La présence concomitante de la moisissure semblerait même diminuer l'impact clinique de la colonisation bactérienne, en exerçant un effet protecteur.

	<i>Aspergillus sp</i>	<i>Aspergillus sp</i> et <i>P. aeruginosa</i>	<i>P. aeruginosa</i>	Cultures négatives pour <i>Aspergillus sp</i> et <i>P. aeruginosa</i>	p
Nombre	10	13	15	12	
CVF (%)	87,60 ± 17,12	76,54 ± 22,56	67,73 ± 17,29	83,58 ± 26,73	0,19
VEMS (%)	73,7 ± 18,66	56,31 ± 22,64	45,47 ± 20,55	74,5 ± 28,64	0,012
Schwachman	75,44 ± 15,35	66,14 ± 18,70	60,40 ± 15,85	76,33 ± 20,83	0,16

Tableau 7 : Relations entre les isollements de *P. aeruginosa* et *Aspergillus sp* et la clinique (n=53 expectorations)

5. CARACTERISTIQUES DES PATIENTS SELON LEUR TAUX D'IGE TOTALES

Les IgE totales reflètent une composante allergique et une sensibilisation possible à *Aspergillus* ou à d'autres allergènes. Un taux d'IgE supérieur à 500 UI/mL est un des critères diagnostiques d'une ABPA. Il est donc intéressant de comparer l'impact du taux d'IgE (inférieur ou supérieur à 500 UI/mL) sur la clinique des patients. Les critères biologiques sont ceux utilisés dans le diagnostic de l'ABPA (IgE spécifiques et IgG spécifiques anti-*A. fumigatus*, cultures mycologiques des expectorations).

Le taux d'IgE totales est bien corrélé à celui des IgE spécifiques dans les deux groupes de patients. Toutes les fonctions cliniques sont significativement meilleures dans le groupe présentant des IgE totales > 500 UI/mL. Le peu de patients présentant un fort taux d'IgE totales ne nous permet cependant pas de conclure sur ces résultats.

Caractéristiques des patients	IgE totales > 500 UI/mL	IgE totales < 500 UI/mL	p
Nombre	7	44	/
Age	20,71 ± 7,34	24,98 ± 9,02	0,24
Sexe ratio (H/F)	2/5	21/23	0,26
IgE totales (UI/mL)	1956,14 ± 1788,67	72,71 ± 71,75	/
IgE spécifiques (UI/mL)	48,36 ± 26,36	2,50 ± 2,69	<0,01
IgG spécifiques (Elisa)	1,26 ± 0,76	1,02 ± 0,80	0,46
CVF (%)	94,57 ± 18,01	74,86 ± 22,04	0,030
VEMS (%)	81,14 ± 27,72	58,37 ± 25,22	0,034
Schwachman	83,14 ± 14,12	66,54 ± 18,59	0,029
<i>A.fumigatus</i> dans expectorations (%)	50	45	0,82

Tableau 8 : Caractéristiques cliniques et biologiques des patients en fonction de leur taux d'IgE totales

6. DOSAGES DES IGG ANTI-*A. FUMIGATUS*

Les anticorps IgG spécifiques d'*A. fumigatus* sont un des critères principaux du diagnostic d'ABPA. Parmi tous les patients, 54 ont réalisé leurs sérologies complètes, permettant de comparer les résultats en ELISA (quantification des IgG anti-aspergillaires) et IEP (quantification des précipitines). Ces deux techniques montrent 35% de discordances dans notre étude, ce qui paraît élevé. Cependant, ces deux techniques « maison » ne se positivent pas au même moment lors de séroconversion ; de plus, la lecture de l'IEP est semi-quantitative et parfois difficile à réaliser lorsque les anticorps sont présents en faibles quantités.

La présence du micromycète n'est pas toujours corrélée à la présence d'anticorps spécifiques. L'isolement du champignon n'est pas relié à un développement *in situ*, seules quelques spores inhalées peuvent ensuite donner une culture positive. En effet, 5 patients ont une expectoration positive à *Aspergillus sp* avec une sérologie négative, alors que 4 d'entre

eux sont colonisés de façon chronique par *A. fumigatus*. D'autre part, 4 patients présentent une sérologie IgG positive sans isolement d'*Aspergillus* dans les expectorations. Cependant, 3 d'entre eux ont présenté une colonisation aspergillaire dans l'année précédente.

ELISA (>1)	IEP (≥ 2 arcs)	Comparaison ELISA/IEP	Mycologie expectorations : <i>Aspergillus sp</i>
23 positifs	12 positifs	11 discordances	8 positifs (67%) 4 négatifs (33%)
	11 négatifs		7 positifs (64%) 4 négatifs (36%)
31 négatifs	8 positifs	8 discordances	4 positifs (50%) 4 négatifs (50%)
	23 négatifs		5 positifs (22%) 18 négatifs (78%)

Tableau 9 : Comparaison des résultats IEP et Elisa IgG

ELISA positif : DO > 1

IEP positif : ≥ 2 arcs ou présence de catalase ou chymotrypsine

7. SENSIBILISATION ASPERGILLAIRE

La sensibilisation aspergillaire est définie par la présence d'IgE spécifiques anti-*A. fumigatus* à un taux supérieur ou égal à 0,35 UI/mL. Ces IgE témoignent d'une allergie respiratoire vis-à-vis des allergènes aspergillaires, et sont un des critères majeurs de diagnostic de l'ABPA. Le taux d'IgE totales est significativement plus élevé chez les patients sensibilisés.

Les patients de l'étude ont été évalués selon les mêmes critères cliniques et biologiques que précédemment, en fonction de la présence ou l'absence de sensibilisation aspergillaire. La sensibilisation aux allergènes d'*A. fumigatus* est retrouvée chez 55,7% des patients (29/52). Les résultats de l'étude ne montrent aucune différence significative au niveau de la clinique, entre les sujets sensibilisés ou non à *A. fumigatus*. Les IgE spécifiques ne sont pas simultanément corrélées à la mycologie des expectorations.

	Patients sensibilisés à <i>A.fumigatus</i> (IgE spécifiques ≥0,35 UI/mL)	Patients non sensibilisés à <i>A.fumigatus</i> (IgE spécifiques <0,35 UI/mL)	p
Nombre	29	23	
Age	24,79 ± 7,88	24,17 ± 10,06	0,80
Sexe ratio (H/F)	13/16	13/10	0,41
IgE totales (UI/mL)	573,60 ± 1172,50	36,16 ± 59,16	0,0033
IgE spécifiques (UI/mL)	14,23 ± 23,17	0,21 ± 0,07	/
IgG spécifiques (Elisa)	1,00 ± 0,69	1,11 ± 0,91	0,61
CVF (%)	80,25 ± 20,96	74,00 ± 23,76	0,32
VEMS (%)	63,18 ± 25,44	59,00 ± 27,74	0,58
Schwachman	71,31 ± 17,32	66,14 ± 20,42	0,33
<i>A.fumigatus</i> dans expectorations	48%	45%	0,84

Tableau 10 : Données cliniques et biologiques des patients en fonction de leur sensibilisation à *A. fumigatus*

8. BRONCHITE ASPERGILLAIRE

Pour une patiente, on suspecte une bronchite aspergillaire, voire une ABPA sans tous les critères biologiques. Cette patiente est fortement positive en IgG (Elisa à 2,33 et présence de 4 arcs spécifiques d'*A. fumigatus* à l'IEP, avec une catalase positive). Elle présente des IgE spécifiques anti-*A. fumigatus* (à 1,97 UI/mL), mais les IgE totales sont négatives. Elle est également colonisée de façon chronique à *A. fumigatus* au niveau bronchique. Elle ne présente pas de dégradation clinique. Elle a été traitée par cures d'azolés et par amphotéricine B pendant 7 mois, 1 mois sur 2, mais elle n'est plus traitée actuellement.

Son évolution sérologique depuis l'inclusion montre une stabilité des IgE. Les IgG varient en fonction du traitement antifongique. Les fonctions respiratoires restent stables.

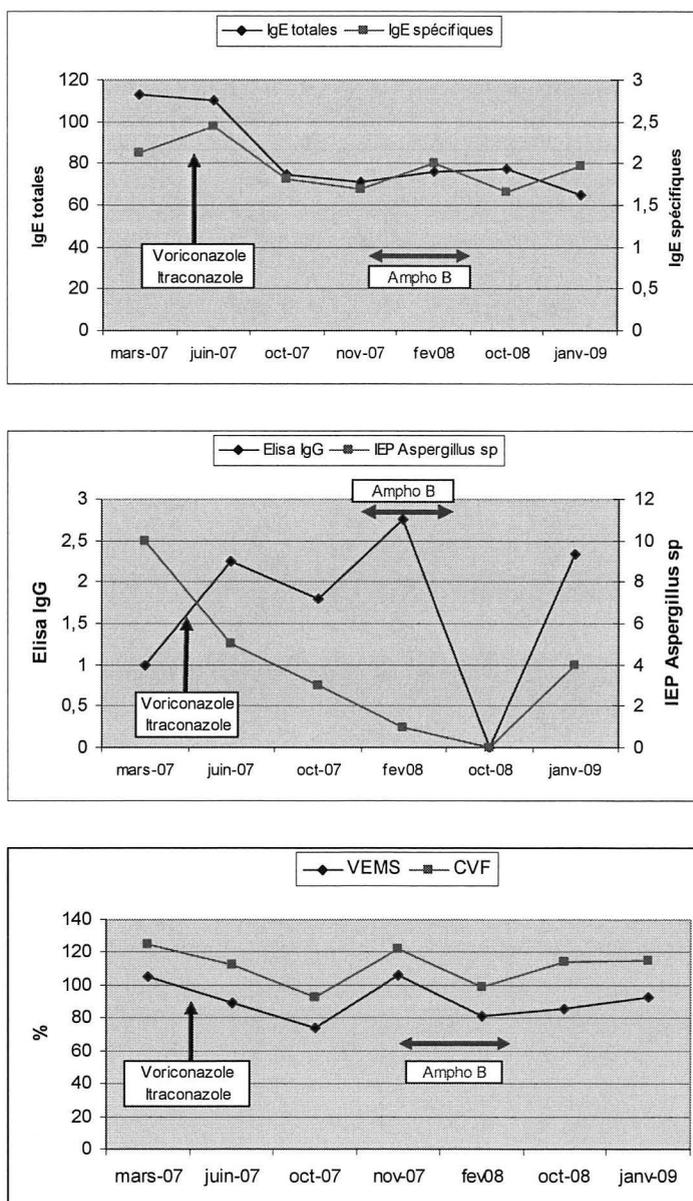


Figure 33 : Evolution des IgE, des IgG et des fonctions respiratoires depuis l'inclusion chez une patiente présentant une bronchite aspergillaire.

9. ABPA

Six patients (10,5%) répondent aux critères diagnostiques d'ABPA. Ces patients (4 adultes et 2 enfants) étaient déjà connus pour présenter une ABPA à l'inclusion. Cinq d'entre eux sont traités (trois par corticothérapie orale, un par antifongique, un par corticothérapie orale et antifongique). Un patient atteint d'une ABPA à l'inclusion ne présente plus les critères cliniques et biologiques, il est en rémission.

Au niveau biologique, ces patients présentent une augmentation des IgE totales sériques (> 500 UI/mL, sauf un patient traité par corticothérapie), ainsi que des IgE et IgG spécifiques anti-*A. fumigatus* en Elisa et/ou en immunoelectrophorèse. La colonisation aspergillaire est retrouvée pour quatre d'entre eux.

Peu d'examens radiologiques ont été réalisés chez ces patients, mais ceux-ci présentaient tous des bronchectasies, centrales ou localisées, sur des images radiologiques antérieures.

Age	IgE totales (UI/mL)	IgE spécifiques <i>A. fumigatus</i> (UI/mL)	ELISA IgG <i>Aspergillus</i> (UI/mL)	IEP <i>Aspergillus</i> (arcs)	Mycologie des expectorations
18	1030	27,6	0,92	2	<i>Trichoderma, Penicillium sp</i>
28	5420	83,3	2,07	3, catalase +	<i>A.fumigatus, Paecilomyces sp</i>
20	866	53,5	1,89	4	<i>A.fumigatus</i>
12	3370	84,3	0,71	3	<i>Mucor sp, Eurotium amstelodami, Penicillium sp</i>
15	1510	22,3	2,19	4, catalase+	<i>A.fumigatus, A.flavus, A.nidulans</i>
22	280	8,88	2,85	0	<i>A.fumigatus, A.flavus</i>

Tableau 11 : Données biologiques des patients ayant les critères d'ABPA

L'ABPA ne semble pas avoir d'impact sur les fonctions respiratoires, le CVF moyen étant de 93%, le VEMS moyen de 71% et le score de Schwachman de 80. Ces patients présentent une ABPA, mais sans exacerbation clinique au moment de la visite. Ces patients présentent tous la mutation DF508, à l'état homozygote ou hétérozygote.

	Dyspnée (Sadoul)	CVF (%)	VEMS (%)	Schwachman	Critères cliniques	Mutation CFTR
18	II	64	34	54	+	DF508/ND
28	0	109	94	90	+	DF508/N1303K
20	0	74	52	81	+	DF508/DF508
12	0	105	95	90	+	DF508/DF508
15	I	108	88	80	+	DF508/E585X
22	I	97	63	82	+	DF508/DF508

Tableau 12 : Données cliniques et caractéristiques de la mutation CFTR des patients ayant les critères d'ABPA

Critères cliniques : toux, expectorations, sibilants

10. TRAITEMENT ANTIFONGIQUE

10.1. RESULTAT MYCOLOGIQUE

Au moment de cette visite, deux patients étaient traités par antifongique (itraconazole) pour une ABPA. Douze autres patients avaient été traités depuis l'inclusion par divers antifongiques. Le fluconazole a été utilisé en traitement préventif pour cinq patients à risque de mycose pendant une cure antibiotique, et en curatif de candidoses localisées chez trois autres patients. Le voriconazole, l'itraconazole et l'amphotéricine B ont été employés pour traiter des ABPA. Une septicémie à *Candida albicans* a été traitée par l'association caspofungine et fluconazole. Environ la moitié des patients traités ou ayant été traités par antifongique dans l'année isolent *A. fumigatus* dans leur expectoration.

	Nombre	Traitement	Motif	Depuis	Mycologie
ATF en cours	2	2 Itraconazole	ABPA	9/09/08 17/06/08	1 <i>A.fumigatus</i>
Antécédents ATF	12	8 fluconazole 1 Voriconazole 1 AmphotéricineB 1 Itraconazole 1 Cancidas+Fluconazole	5 Prévention mycose 3 candidoses (périnéale + buccale ; buccale ; vaginale+digestive) 3 ABPA 1 septicémie à <i>Candida</i>		5 <i>A.fumigatus</i> (dont 1 avec <i>A.flavus</i>)

Tableau 13 : Caractéristiques des patients traités depuis l'inclusion par antifongiques

10.2. SENSIBILITE *IN VITRO* AUX ANTIFONGIQUES

Les espèces aspergillaires sont relativement sensibles aux azolés, à noter que la sensibilité de l'itraconazole est souvent « dose dépendante », voire résistante pour 2 isolats d'*A. fumigatus*. Le voriconazole et le posaconazole montrent une très bonne efficacité sur les souches d'*Aspergillus*. L'activité de l'amphotéricine B est fonction des espèces aspergillaires, elle est peu fongicide sur *A. flavus* et *A. terreus*. Les échinocandines (caspofungine, anidulafungine) présentent, quant à elles, une très bonne activité *in vitro* sur toutes les souches aspergillaires isolées et testées dans notre étude.

S. apiospermum présente un profil différent. Il est résistant ou présente une sensibilité intermédiaire à l'amphotéricine B. L'efficacité de l'itraconazole est très variable selon les souches. Le voriconazole et le posaconazole sont très efficaces *in vitro*. La sensibilité aux

échinocandines est hétérogène, et l’anidulafungine, nouvelle molécule, montre une résistance *in vitro* pour quatre des six isolats.

Pour trois autres espèces étudiées, *Mucor sp*, *Doratomyces* et *Fusarium sp*, les résistances aux antifongiques sont plus importantes, ce qui peut poser problème si on envisage un traitement. *E. amstelodami* est par contre relativement sensible *in vitro*.

Les résultats des antifongigrammes sont sensiblement les mêmes comparés à la visite d’inclusion. Aucune émergence de résistance n’a été observée depuis l’inclusion chez les patients déjà colonisés par *A. fumigatus* dans la cohorte de patients suivis.

Espèces	Nombre	Itraconazole	AmphoB	Voriconazole	Caspofungine	Posaconazole	Anidulafungine
<i>A. fumigatus</i>	23	10S, 2R 11SDD	19S 4SDD	23S	23CM Ib	23CM Ib	23CM Ib
<i>A. flavus</i>	5	3S 2SDD	1S, 3R 1 SDD	5S	5CM Ib	5CM Ib	5CM Ib
<i>A. nidulans</i>	1	S	S	S	CM Ib	CM Ib	CM Ib
<i>A. terreus</i>	1	SDD	I	S	CM Ib	CM Ib	CM Ib
<i>S. apiospermum</i>	6	1S, 1R 4SDD	4R 2 SDD	6S	4CM Ib, 1CM Ih 1 I	6CM Ib	2CM Ib, 4CM Ih
<i>Mucor sp</i>	1	S	S	R	CM Ih	CM Ib	CM Ih
<i>Doratomyces</i>	1	R	R	SDD	CM Ib	CM Ih	CM Ib
<i>Eurotium amstelodami</i>	2	1 S 1 SDD	1S, 1R	2 S	2 CM Ib	2 CM Ib	2 CM Ib
<i>Fusarium sp</i>	1	R	S	R	R	R	R

Tableau 14 : Résultats des antifongigrammes des différentes espèces de champignons filamenteux isolées

(R=résistant, S=sensible, SDD=sensible dose dépendant, I=intermédiaire, CM Ib=CMI basse, CM Ih=CMI haute)
AmphoB : Amphotéricine B

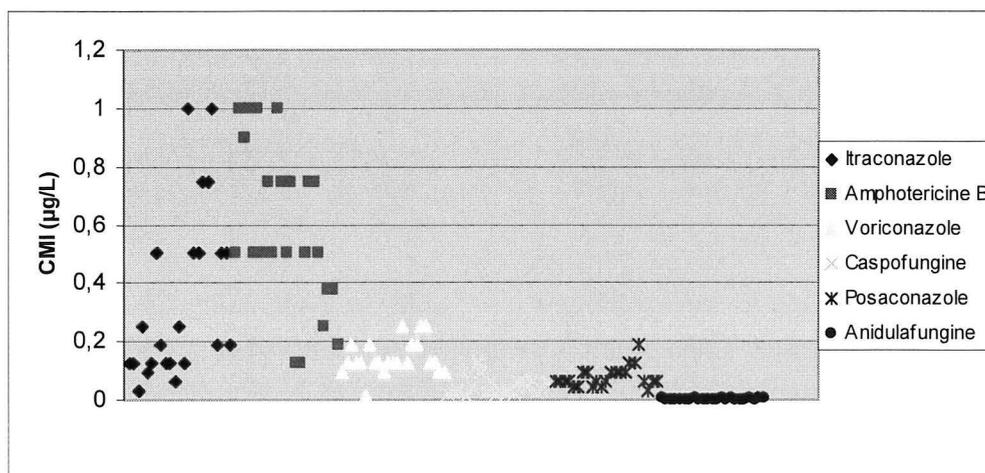


Figure 34 : Résultats des antifongigrammes des souches isolées d’*Aspergillus fumigatus*

11. INFLUENCE DES TRAITEMENTS SUR LA PRESENCE DE FILAMENTEUX

11.1. ANTIBIOTIQUES

Dans l'étude Mucofong, 86% des patients sont sous antibiothérapie au long cours. Ceux-ci sont traités par azithromycine (75% des patients), et/ou tobramycine ou colimycine par voie inhalée. En période d'exacerbation ou d'infections bactériennes importantes, des cures antibiotiques sont préconisées : au cours de l'année précédente, 79% des patients ont eu une cure orale d'antibiotiques, et 73% des patients une cure intraveineuse, d'une durée de 14 jours, nécessitant souvent une hospitalisation. Nous avons évalué l'influence d'une antibiothérapie au long cours sur l'isolement d'*Aspergillus sp* et de *Scedosporium sp*.

L'antibiothérapie utilisée contre les infections pulmonaires bactériennes ne semble pas favoriser la présence d'*Aspergillus sp* ou *S. apiospermum* dans les expectorations.

	Nombre	<i>Aspergillus sp</i>	<i>S. apiospermum</i>
Azithromycine	43	49 %	13 %
Absence d'azithromycine	14	42 %	8 %
ATB inhalés	35	52%	9%
Absence d'ATB inhalés	22	39%	9%

Tableau 15 : Résultats des cultures fongiques en fonction de l'antibiothérapie au long cours

11.2. ANTIFONGIQUES

Dans notre étude, 25% des patients ont été traités par antifongique durant l'année précédente, le plus souvent pendant une courte durée. L'impact des antifongiques sur la colonisation aspergillaire est difficile à évaluer du fait du peu de patients traités au long cours. La prise d'antifongiques ne semble cependant pas avoir d'impact sur la colonisation aspergillaire.

	Nombre	Colonisation aspergillaire	Présence de <i>S. apiospermum</i>
ATF en cours	2	50%	0%
Antécédents d'ATF	12	45%	8%
Absence d'ATF	43	47%	11%

Tableau 16 : Colonisation fongique en fonction de la prise d'antifongiques

11.3. CORTICOÏDES

Une grande partie des patients de l'étude (43 patients) sont traités par corticoïdes inhalés au long cours, alors que 5 patients bénéficient d'une corticothérapie systémique (4 d'entre eux présentant une ABPA), et 9 n'ont aucune corticothérapie au long cours. Ces patients sont classés en 3 groupes, afin d'évaluer les impacts clinique et mycologique du traitement par corticoïdes.

Aucune différence significative n'a été relevée entre les patients des 3 groupes, ni au niveau clinique, ni au niveau de l'isolement aspergillaire dans les expectorations. Cependant, il faut noter que les patients avec corticothérapie orale et sans corticothérapie sont peu nombreux.

	Corticoïdes <i>per os</i> (\pm inhalés)	Corticoïdes inhalés	Absence de corticothérapie	p
Nombre	5 (9%)	43 (75%)	9 (16%)	/
CVF (%)	93,2 \pm 26,25	75,61 \pm 20,90	81,25 \pm 22,95	0,21
VEMS (%)	75,6 \pm 24,70	59,09 \pm 25,43	68,13 \pm 29,07	0,32
Schwachman	80,4 \pm 12,28	67,29 \pm 19,54	70,11 \pm 17,18	0,34
<i>Aspergillus sp</i> dans expectorations (%)	75	46,2	37,5	0,47

Tableau 17 : Données cliniques des différents patients en fonction de la présence ou l'absence de corticothérapie

12. MUTATIONS DU GÈNE *CFTR* ET RISQUE FONGIQUE

12.1. IMPACT SUR LA CLINIQUE ET LA MYCOLOGIE

Les mutations du gène *CFTR* ont été classées ici en trois groupes : les patients homozygotes pour la mutation DF508, les patients hétérozygotes, et les patients ne présentant pas cette mutation. Les caractéristiques cliniques ont été évaluées pour ces trois groupes. L'impact de cette mutation est difficile à évaluer, puisque 88% des patients présentent la mutation DF508. Cependant, aucune différence significative n'a été notée, soit une absence de répercussion de la mutation DF508 sur la fonction pulmonaire, le statut nutritionnel, et la présence d'*Aspergillus sp* dans les expectorations.

Mutations	DF508/DF508	DF508/Autres	Autres
Nombre	31	19	7
CVF	80,23 ± 22,36	75,68 ± 21,74	74,57 ± 22,13
VEMS	61,9 ± 24,97	61,95 ± 27,93	61,43 ± 28,81
Schwachman	66,77 ± 18,64	72,69 ± 17,51	67,86 ± 23,78
<i>Aspergillus sp</i> dans expectoration	15 (48%)	6 (32%)	3 (43%)

Tableau 18 : Impact de la mutation *CFTR* sur la clinique des patients

12.2. IMPACT SUR L'ABPA

Nous avons comparé les patients avec ABPA et sans ABPA selon leurs mutations du gène *CFTR*. Les patients présentant une ABPA présentent toujours la mutation *CFTR*, à l'état homozygote (50%) ou à l'état hétérozygote (50%). Cependant, il est impossible de conclure puisque 88% des patients présentent la mutation DF508.

Mutations	DF508/DF508	DF508/Autres	Autres	Total
Nombre	31	19	7	
ABPA	3 (50%)	3 (50%)	0	6
Non ABPA	28 (55%)	15 (30%)	8 (16%)	51

Tableau 19 : Impact de la mutation *CFTR* sur la présence d'une ABPA

DISCUSSION

Les *Aspergillus sp* sont extrêmement résistants et ubiquitaires dans l'environnement. La sévérité des manifestations pulmonaires semble être corrélée à la quantité et la virulence des spores aspergillaires inhalées, au statut de défense de l'hôte et à sa susceptibilité aux infections fongiques. Les patients atteints de mucoviscidose sont donc prédisposés aux infections pulmonaires fongiques chroniques à cause d'importants dommages pulmonaires, des traitements antibiotiques à long terme et de l'exposition répétée aux micro-organismes.

1. EPIDEMIOLOGIE FONGIQUE

La fréquence d'isolement d'*A. fumigatus*, espèce la plus isolée dans les expectorations, montre de considérables variations selon les études, se situant de 1,3% à 63% [16, 154, 175]. Ces différences peuvent être attribuées à l'âge, aux conditions climatiques, à la quantité variable de spores fongiques dans l'air [16, 71]. La prévalence moyenne de son isolement dans l'étude Mucofong à Grenoble est de 41,3% des cultures (39,3% à l'inclusion, 43,3% à la première visite), donc de 42% des patients de cette étude. Pour 82% des patients, les cultures donnent le même résultat entre l'inclusion et la visite vis-à-vis d'*A. fumigatus*. La prévalence augmente avec l'âge, avec un pic net de 15 à 25 ans, cependant notre étude comporte peu d'enfants, et ceux-ci sont âgés de plus de 6 ans, alors que l'isolement d'*A. fumigatus* est rare avant 6 ans [35]. La prévalence de ce micro-organisme augmente depuis 10 ans [145], mais nous ne pouvons conclure s'il s'agit d'une augmentation de la fréquence d'isolement en culture, de l'amélioration des techniques, ou d'une augmentation de la prévalence de ce champignon dans les voies respiratoires.

Aspergillus flavus est retrouvé chez 9,4% des patients de l'étude, toujours en association avec *A. fumigatus*, la prévalence étant de 10,7% à l'inclusion. Trois patients sur les cinq chez qui a été isolé *A. flavus* présentent une colonisation chronique.

Aspergillus terreus a été isolé chez 1,9% des patients à cette visite, et 3,5% des patients à l'inclusion. Selon la littérature, cette espèce est retrouvée chez 1,9 à 6,2% des patients atteints de mucoviscidose [33, 128]. Une patiente de notre étude est colonisée depuis un an par ce champignon. Il serait intéressant de rechercher les génotypes, et voir si cela

suggère une réelle colonisation (clonalité) ou une présence transitoire de spores. Une étude a réalisé cette recherche chez trois patients, et il a été démontré que chaque patient possédait un même génotype, mais celui-ci n'était pas identique aux génotypes environnementaux [37].

Dans la littérature, *Candida albicans* est la deuxième espèce la plus fréquemment isolée après *P. aeruginosa*, chez 60,9 à 75,5% des patients [16, 34]. L'étude Mucofung retrouve cette espèce chez 76% des patients. Cependant, le portage buccal des candidoses sans manifestation clinique est de 30 à 50 % chez l'adulte. La fréquence de son isolement est donc à interpréter en fonction de la quantité de levures. Pour limiter ces contaminations, il faudrait réaliser systématiquement un lavage buccal avant l'expectoration. Malgré cette fréquence élevée, les infections candidosiques sont rares, même s'il existe de nombreux facteurs favorisants tels que la corticothérapie, et les traitements antibiotiques prolongés et récurrents [33]. Une septicémie à *C. albicans* s'est produite depuis l'inclusion, traitée par 20 jours d'antifongiques. Deux patientes présentent également une vaginite lors de la première visite.

L'étude Mucofung montre une fréquence d'isolement de *S. apiospermum* de 9,8% des patients à la première visite (5/51), alors qu'elle était de 5,4% à l'inclusion, soit une moyenne de 7,6% des patients. Cependant, l'importance de la colonisation est faible pour 4 patients. Pour deux patients, on retrouve *S. apiospermum* à l'inclusion et à la visite. Une étude publiée en 2000 classe *S. apiospermum* comme le deuxième agent le plus fréquent associé à la mucoviscidose, avec une prévalence de 8,6% [34]. Par ailleurs, *S. apiospermum* a été retrouvé habituellement associé à *A. fumigatus*, 4 patients sur les 5 sont colonisés par les deux espèces. Certains mycologues pensent que la surinfection aspergillaire, associée aux infections bactériennes, peut masquer ou contrarier le développement de ce champignon [29]. En utilisant les milieux Benomyl qui inhibent la pousse des *Aspergillus sp*, notre étude n'a mis en évidence qu'une très faible augmentation de l'isolement de *S. apiospermum* sur ces milieux.

Enfin, d'autres espèces ont été isolées des expectorations au cours de cette étude. Des isollements épisodiques de *Penicillium sp*, *Trichoderma sp*, *Cladosporium sp*, *Eurotium amstelodami*, ont été ainsi observés.

Selon Tonnel, l'examen mycologique des sécrétions bronchiques n'a d'intérêt que dans la mesure où des filaments mycéliens sont détectés à l'examen direct. Une culture positive est pratiquement sans valeur, compte tenu du caractère ubiquitaire de la moisissure dans l'environnement [164]. Dans notre étude, seulement 8 patients présentent un examen direct de l'expectoration positif avec présence de filaments mycéliens, d'où une faible

sensibilité de ce test. Il n'y a aucune culture négative après un direct positif. La positivité de l'examen direct n'est pas corrélée à une plus grande sévérité de l'infection fongique dans nos observations, mais 75% des patients présentant un examen direct positif ont un grand nombre de colonies dans leurs expectorations après culture (>10 colonies par milieu). Cet aspect devrait être précisé avec l'ensemble des résultats des différents centres.

2. CHOIX DES MILIEUX DE CULTURE FONGIQUE

Le taux d'isolement des espèces fongiques varie considérablement selon les études. Une des raisons est le manque de standardisation entre les laboratoires dans cette détection. Pour une culture fongique, l'utilisation de milieux spécifiques au développement des champignons, possédant des inhibiteurs de croissance bactérienne, est essentielle [120]. En effet, la pyocyanine sécrétée par *P. aeruginosa* inhibe la croissance fongique [87]. D'autre part, les champignons ne sont pas toujours détectés, à cause de l'envahissement bactérien des expectorations [120]. La présence de levures comme *C. albicans* inhibe également *in vitro* la croissance d'*A. fumigatus* [19].

Le milieu Sabouraud-Chloramphénicol constitue un milieu classique pour la culture, l'isolement et l'identification des levures et des moisissures saprophytes ou pathogènes. La plupart des bactéries isolées dans les expectorations sont inhibées par le chloramphénicol : *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *B. cepacia*. Chez certaines souches de *P. aeruginosa* présentant de fortes résistances, ces bactéries peuvent cependant se développer sur ce milieu. Une combinaison d'antibiotiques dans les milieux paraît de ce fait plus efficace [120].

Le milieu Sabouraud-Chloramphénicol-Actidione semble être un milieu intéressant en pratique. L'actidione inhibe la pousse de la plupart des « contaminants », alors que les *Aspergillus sp* se développent.

Le milieu Benomyl isole une minorité d'ascomycètes résistants à ce fongicide, et facilite l'isolement de *Scedosporium sp* [156]. Dans notre étude, une culture positive à *S. apiospermum* a été retrouvée chez 9,8% des patients, alors que cette espèce n'a été isolée uniquement sur milieu Benomyl chez 2 patients seulement. L'utilisation du milieu Benomyl en routine serait à discuter en fonction de l'ensemble des résultats de l'étude. Ce milieu n'a pas permis d'isoler de façon importante ce champignon alors que son inhibition est importante sur la croissance de l'ensemble des autres moisissures. De plus, la croissance

bactérienne sur ce milieu n'est pas totalement inhibée pour 44% des patients. La lecture peut être difficile dans ce cas et cette croissance peut aussi inhiber le développement fongique et fausser les résultats épidémiologiques.

La détection d' *E. dermatitidis* dans les expectorations par les techniques de routine est difficile, surtout en présence de *P. aeruginosa*, qui produit des composants toxiques capables d'inhiber la croissance de ce champignon [87]. Des taux d'isolement plus élevés ont été reportés grâce à l'utilisation d'un milieu de culture sélectif à base d'érythritol [75]. Pourtant, dans notre étude, cette espèce n'a été isolée dans aucune expectoration. Ce milieu assure par contre l'isolement de nombreux *Aspergillus sp* et *Fusarium sp* ; il n'est donc pas du tout spécifique d'*E. dermatitidis*. C'est cependant le milieu qui inhibe le mieux la croissance bactérienne.

3. IMPACT DES CHAMPIGNONS SUR LES VOIES RESPIRATOIRES

La fréquence exacte des micromycètes comme *S. apiospermum*, *Fusarium sp*, *Mucor sp* au niveau respiratoire, ainsi que leur impact sur l'évolution de l'atteinte pulmonaire restent très imparfaitement déterminés. Or, ceux-ci sont capables de dissémination, posant alors des questions d'ordre prophylactique et thérapeutique notamment en cas de greffe pulmonaire. Ces données sont d'autant plus préoccupantes que certaines espèces sont peu sensibles, voire naturellement résistantes, aux antifongiques systémiques existants.

Une infection à *Fusarium sp* entraîne des formes cliniques différentes, dépendantes surtout du statut immunitaire de l'hôte et de la porte d'entrée de l'infection. Chez les immunocompétents, la colonisation par *Fusarium sp* n'a pas un rôle pathogène réel. Une colonisation chronique demeure cependant préoccupante lors de greffe générant une immunosuppression, la neutropénie prolongée étant un risque de fusariose invasive, de pronostic redoutable. Ces champignons filamenteux présentent une résistance naturelle ou acquise aux différentes classes d'antifongiques systémiques [123]. Dans l'étude Mucofong, *Fusarium sp* a été isolé chez le même patient entre l'inclusion et la visite, mais n'a cependant pas été retrouvé dans les cultures de routine pendant l'année écoulée. Cette espèce possède de grandes résistances, et se montre sensible uniquement à l'amphotéricine B. Les dosages des IgE totales chez ce patient sont négatifs. Cependant, il possède une détérioration des fonctions

respiratoires, avec un score de Scwachman à 40, une CVF à 45% et une VEMS à 21%, similaires aux résultats cliniques de l'inclusion.

Une colonisation chronique par *Mucor sp* a déjà causé des pneumopathies d'hypersensibilité [169]. Son rôle pathogène peut également s'exprimer en cas de greffe pulmonaire, pouvant être responsable de mucormycoses disséminées [14, 116]. Son isolement chez un patient est à surveiller.

Scedosporium apiospermum est capable de coloniser de façon chronique les voies respiratoires des patients atteints de mucoviscidose. La pathogénicité de ce champignon au niveau pulmonaire est controversée. Certaines études montrent que la colonisation et/ou sensibilisation à ce champignon n'est pas associée à des symptômes infectieux ou allergiques [52]. Ce micro-organisme est alors considéré comme simple colonisant endobronchique, sans effet pathologique sur l'hôte. Cependant, d'autres études ont reporté quelques cas dans lesquels *S. apiospermum* semble avoir un rôle pathogène, en déclenchant une réponse inflammatoire, et pouvant se manifester par une pathologie broncho-pulmonaire allergique [34, 128]. Les répercussions cliniques dépendent de la fonction immune de l'hôte [40]. Des infections fongiques disséminées à cette espèce ont également été décrites après transplantation pulmonaire [157]. Dans ce contexte d'hétérogénéité clinique, il est difficile d'apprécier l'efficacité ou l'inefficacité d'un traitement antifongique, comme le pouvoir pathogène réel d'un champignon en raison de l'évolution souvent spontanée des manifestations respiratoires. Cette bactérie est capable de déclencher une réponse immunitaire chez l'hôte, les anticorps sériques étant présents chez 21,1% des patients. La présence d'anticorps chez des patients non colonisés peut s'expliquer par un passage transitoire dans les voies respiratoires ou par des réactions croisées entre *S. apiospermum* et d'autres champignons comme *A. fumigatus* [34]. Une patiente de notre étude est colonisée par ce champignon avec atteintes des fonctions respiratoires. Elle présente une réaction allergique, avec augmentation des IgE totales. *S. apiospermum* est retrouvé dans tous ses milieux, avec une trentaine de colonies sur chaque culture. Cependant, contrairement à nos attentes, cette patiente ne présentait pas d'anticorps sériques contre *S. apiospermum*.

Enfin, aucun champignon parmi *Penicillium sp*, *Trichoderma sp*, *Cladosporium sp*, *Eurotium amstelodami* n'a été incriminé dans un processus pathogène.

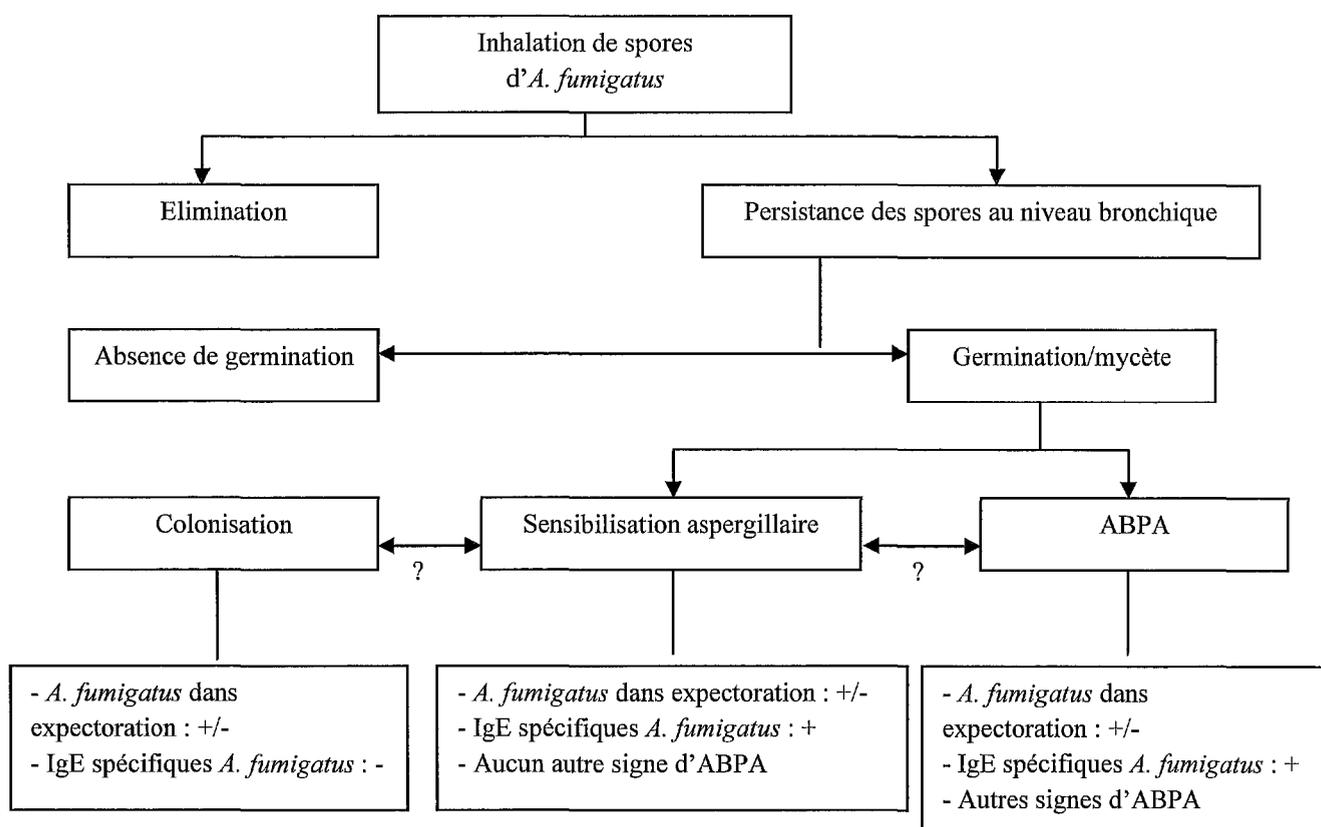


Figure 35 : Hypothèse des pathogénies de la colonisation, de la sensibilisation aspergillaire et de l'ABPA. D'après [134]

4. INFECTIONS FONGIQUES ASPERGILLAIRES

Les infections causées par *C. albicans* sont essentiellement endogènes, dues à une colonisation par les propres souches du patient, alors que les infections dues à *A. fumigatus* sont exogènes, résultat d'une inhalation de conidies envahissant l'environnement [75].

4.1. COLONISATION

Les infections aspergillaires sont parfois transitoires, celles-ci présentent plus rarement un impact clinique significatif [12, 113]. Dans notre étude, 39% des patients sont colonisés de façon chronique à *Aspergillus sp* (présence à l'inclusion et à la visite), alors que seulement 4% des patients (2 patients) sont colonisés sans réponse immunologique. La prise en charge des patients colonisés n'est pas définie, mais il faut savoir qu'environ 3% de la population progresse vers une maladie invasive [143]. Ces patients ne doivent pas être traités, une simple surveillance tous les 3 mois suffit [23].

Une étude des différents génotypes d'*A. fumigatus* retrouvés dans les expectorations serait intéressante pour définir la colonisation des voies respiratoires. En effet, les études de génotypes sur les isolats, effectuées par SSDP (sequence-specific DNA primer) ou RAPD (random amplification of polymorphic DNA), révèlent une grande diversité de génotypes, reflétant la diversité d'*A. fumigatus* dans l'environnement [36]. Une étude a génotypé 204 isolats d'*A. fumigatus* provenant de 36 patients atteints de mucoviscidose, sur une période de 10 ans. Pour 17% d'entre eux, le génotype était identique aux différentes périodes, indiquant une incapacité d'éliminer l'isolat aspergillaire. Dix-neuf pour cent des patients sont colonisés par un génotype prédominant, ceux-ci n'arrivent pas à éradiquer le premier isolat, et sont occasionnellement recolonisés par un autre génotype. Les génotypes se succèdent chez 28% des patients, qui sont capables d'éliminer les isolats aspergillaires, mais ils se recolonisent facilement. Les autres patients sont colonisés par un isolat d'*A. fumigatus* unique, et sont continuellement capables d'éradiquer le champignon des voies respiratoires [48].

Il semblerait aussi que des génotypes particuliers soient responsables de colonisation prolongée. Des études expérimentales lors d'aspergilloses invasives ont démontré des différences de virulence entre les souches, suggérant que la pathogénicité ne provient pas seulement du statut immunitaire de l'hôte, mais aussi de facteurs liés à la souche aspergillaire [117]. Dans l'étude Mucofung, toutes les isolats fongiques (trois isolats au maximum par expectoration positive) seront gardés pour génotypage. Cette caractérisation *in vitro* a pour objectif de mettre en évidence les isolats présentant des caractères de virulence, de résistance et de préciser leur association en fonction du tableau clinique (colonisation ou infection).

4.2. SENSIBILISATION ASPERGILLAIRE

Le taux de sensibilisation aspergillaire chez les patients atteints de mucoviscidose est variable selon les études, allant de 12 à 66% [20, 101, 134, 174]. Il varie selon le critère diagnostique utilisé. Ce taux peut être bas, 12% [134], si l'on prend en compte un critère (IgE anti-*A. fumigatus* et/ou rAspf1 augmentées, avec rAspf4 et rAspf6 normaux, chez des patients ne présentant pas tous les critères d'ABPA), ou élevé, 66% [20] en utilisant plusieurs critères (Test de réaction cutanée positif, ou IgE ou IgG anti-*A. fumigatus*, ou précipitines aspergillaires). Une des difficultés d'interprétation est le fait que ces taux peuvent varier très rapidement [134].

La fiabilité des tests cutanés est limitée car ceux-ci dépendent de la composition de la préparation des allergènes [134]. Elle n'est pas réalisée en routine au CHU de Grenoble. En utilisant le dosage des IgE spécifiques anti-*A. fumigatus*, nous avons trouvé un taux de sensibilisation aspergillaire à cette visite de 55,7%, similaire à celui de l'inclusion (59%). Il serait intéressant de comparer cette valeur élevée avec les autres centres, et voir s'il existe une différence géographique. Les antigènes aspergillaires recombinants f1 et f3 constituent des paramètres précoces et significatifs pour une sensibilisation à *A. fumigatus*, et sont donc un bon facteur prédictif d'ABPA [89]. La prévalence de la sensibilisation aspergillaire augmente avec l'âge, probablement à cause d'une exposition prolongée à la moisissure et de l'avancée des dommages pulmonaires [60]. De plus, elle est souvent associée à l'inhalation de corticoïdes inhalés, qui causent une immunodépression et conduisent à une synthèse accrue d'allergènes [134]. L'utilisation de corticoïdes, fréquente chez les patients de notre étude, est donc à surveiller.

Comme certaines études [21, 101], nous n'avons pas retrouvé d'accélération du déclin fonctionnel respiratoire en cas de sensibilisation à *A. fumigatus*. Certaines études ont associé une sensibilisation aspergillaire avec une détérioration clinique [81, 174], après ajustement des âge, sexe, taille, poids, surtout chez les patients qui présentaient également une augmentation des IgE totales [174].

La sensibilisation aspergillaire est le stade préliminaire avant l'ABPA [134]. Son identification permet donc de considérer les patients les plus susceptibles de développer une ABPA. Aucune recommandation thérapeutique n'est préconisée contre la sensibilisation aspergillaire [134], mais une bonne utilisation d'antifongiques semble améliorer la fonction pulmonaire chez les enfants sensibilisés à *A. fumigatus* [81]. Une évaluation de l'itraconazole oral pendant 32 semaines chez les patients avec asthme sévère et sensibilisation aspergillaire montre une nette amélioration de la qualité de vie chez 60% des patients, avec diminution des IgE totales [51]. Au CHU de Grenoble, les patients sensibilisés ne sont pas traités.

4.3. BRONCHITE ASPERGILLAIRE

Le diagnostic de bronchite aspergillaire est envisagé lors d'une présence massive d'*A. fumigatus* dans les expectorations, contrastant avec l'absence de toute réaction immune à la moisissure et une efficacité avérée de l'itraconazole, alors que l'antibiothérapie traditionnelle avait échoué [143]. Le diagnostic biologique est difficile, la sérologie étant inconstamment

positive [23, 143]. L'absence de réaction allergique pendant la bronchite aspergillaire signifie une absence d'IgE sériques, mais les IgG sériques sont souvent retrouvées [24].

Notre patiente est positive en IgG, et en IgE spécifiques anti-*A. fumigatus*, et négative en IgE totales. Elle est également colonisée à *A. fumigatus* au niveau bronchique. Elle ne présente pas de dégradation clinique. L'évolution de la bronchite aspergillaire est généralement favorable, mais elle peut se faire vers l'aspergillose pulmonaire invasive ou dans ce cas particulier vers l'aspergillose broncho-pulmonaire allergique [106]. Les récurrences sont possibles, probablement favorisées par les altérations préalables de la muqueuse ou du calibre bronchique [106]. La place des fongicides par voie générale n'est pas établie dans cette indication mais il faut souligner son efficacité vraisemblable dans plusieurs études [106]. Notre patiente a été traitée par cures d'azolés et par amphotéricine B pendant 7 mois, un mois sur deux, mais elle n'est plus traitée actuellement.

5. PREVALENCE DE L'ABPA

La prévalence de l'ABPA est de 2 à 15% chez les patients atteints de mucoviscidose [98, 139]. Le Registre Epidémiologique de la mucoviscidose a reporté une prévalence de 7,8% en 2000 en Europe, chez les patients atteints de mucoviscidose (allant de 2,1% en Suisse à 13,6% en Belgique) [105]. Cette disparité est due en majeure partie à l'hétérogénéité des critères retenus pour poser le diagnostic d'ABPA. Une standardisation des critères diagnostiques était indispensable pour clarifier l'épidémiologie de cette pathologie [154]. Elle est de 10,9% en moyenne chez les patients de notre étude. Pour certains auteurs, la prévalence semble équivalente entre les hommes et les femmes [105], d'autres trouvent une augmentation de la prévalence chez les hommes [60]. Elle est faible chez les enfants de moins de 6 ans [105], ce qui explique l'âge de recrutement des patients de l'étude Mucofond.

6. ASSOCIATION DE L'ABPA AVEC LA CLINIQUE

Malgré des critères de diagnostic bien définis, l'ABPA reste difficile à diagnostiquer dans le contexte de mucoviscidose. En effet, les caractéristiques cliniques de l'ABPA sont peu spécifiques et difficiles à distinguer de la clinique d'une simple mucoviscidose, surtout durant les phases d'exacerbations bactériennes [159]. L'ABPA peut donc être évoqué chez les patients dont la clinique ne s'améliore pas sous antibiothérapie pendant une phase

d'exacerbation [133]. Les complications respiratoires les plus fréquentes étant l'hémoptysie et le pneumothorax, clairement associés à l'ABPA [105]. Les symptômes cliniques sont cependant très importants à considérer dans la classification des stades de l'ABPA.

L'ABPA est généralement associée à une altération clinique : perte de poids, déclin de l'IMC, statut nutritionnel pauvre. Au niveau des fonctions pulmonaires, les sujets présentent en moyenne une baisse de 10% du VEMS, alors que l'ABPA est moins fréquente (7%) chez les patients avec une $VEMS \geq 70\%$. Un déclin de la CVF supérieur à 15% peut être une indication d'une exacerbation causée par l'ABPA [154]. Ces tests de fonction pulmonaire aident à catégoriser la sévérité de la pathologie pulmonaire, mais n'ont aucune valeur diagnostique de cette pathologie [9]. La gravité de l'obstruction bronchique dépend du stade de l'ABPA et de l'hôte [126]. Cependant, une bonne fonction pulmonaire ne protège pas entièrement contre l'ABPA. Dans l'étude de Geller *et al*, 10% des sujets avec ABPA ont une $VEMS > 100\%$, et 19% des patients ont une $CVF > 100\%$ [60]. Dans l'étude Mucofong, la fonction respiratoire des patients montre une grande hétérogénéité pour une même tranche d'âge. La CVF et le VEMS ont cependant tendance à diminuer avec l'âge. Cette pathologie, sur le faible échantillonnage des patients, ne semble pas avoir d'impact sur les fonctions respiratoires, la CVF moyenne étant de 93%, le VEMS de 71%, et le score de Schwachman de 80. Mais le suivi est impératif pour juger de l'évolution défavorable de l'ABPA au cours de multiples épisodes aigus.

Les infiltrats pulmonaires et les bronchectasies peuvent ainsi être observés dans la mucoviscidose en dehors de l'ABPA, notamment dans les infections bactériennes. Ils apparaissent trop tardivement dans la progression de l'ABPA pour être pris en compte dans son diagnostic [154].

7. ABPA ET DIAGNOSTIC BIOLOGIQUE

Le rôle pathogène d'un *Aspergillus* isolé dans une expectoration d'un patient atteint de mucoviscidose est d'autant plus probable que l'examen direct est positif, la pousse abondante et rapide, et que celui-ci est retrouvé sur plusieurs prélèvements [24]. Une culture d'une expectoration positive à *A. fumigatus* n'est certainement pas une condition suffisante pour le diagnostic d'ABPA [159]. Elle est positive dans 34 à 50% des cas [23, 60]. Les cultures peuvent également être négatives en cas de traitement par antifongiques [160]. De même, les conditions de cultures et les nutriments montrent une variabilité selon les laboratoires [133],

et selon l'hétérogénéité des prélèvements pour culture dans un même laboratoire, comme le montre nos résultats.

L'hyperéosinophilie sanguine ne fait plus partie des marqueurs diagnostiques, elle n'est pas un indicateur spécifique, et 53% des patients atteints d'ABPA ont un taux $<1000/\text{mm}^3$ [9, 144], alors que tous les patients avec ABPA ont un taux normal dans notre étude. De plus, l'hyperéosinophilie peut être retrouvée chez les patients présentant une infection chronique à *P. aeruginosa* [154].

Les tests de réactivité cutanée à *Aspergillus sp* ont une excellente valeur prédictive négative [65]. Cependant, ils ne sont pas spécifiques de cette pathologie [71], environ 30% des patients atteints de mucoviscidose mais sans ABPA présentent un test positif [103, 154], et 25% des patients asthmatiques ont des tests cutanés positifs vis-à-vis des antigènes aspergillaires [61, 154].

Les IgE sont les anticorps associés à l'allergie et à l'hypersensibilité de type I. Les IgE totales sériques sont un marqueur sensible du processus immunologique des patients avec ABPA, et le marqueur le plus utilisé dans le diagnostic et le suivi de ces patients [10, 24]. Plusieurs études ont étudié les caractéristiques des IgE totales dans le diagnostic d'ABPA. La sensibilité trouvée est d'environ 64%, et la spécificité varie entre 81 et 92% [28, 97]. En effet, les IgE totales sont présentes chez 27% des patients atteints de mucoviscidose, mais sans ABPA [103]. Les inconvénients dans l'utilisation des IgE totales comme marqueur de l'ABPA sont le fait que ce taux est influencé par la prise de corticoïdes et que l'ABPA a été décrite chez des patients sans présence d'IgE totales [20]. De plus, le taux d'IgE totales varie nettement avec l'âge [154], et leur augmentation reflète une sensibilisation à un allergène, donc pouvant être due à une atopie autre que l'ABPA. Les fluctuations peuvent servir de marqueur des exacerbations et de réponses thérapeutiques à la corticothérapie, conjointement à la clinique. Une rechute de l'ABPA est à envisager si le taux double [10, 103, 159]. La diminution des IgE totales de plus de 35% en 6 semaines serait en faveur d'une rémission de l'ABPA, cependant ce n'est pas un critère absolu [10]. Hutcherson *et al* ont montré sur une étude avec un suivi de 12 ans, que les meilleurs tests de screening d'une ABPA sont le dosage des IgE totales et des anticorps précipitants anti-*A. fumigatus* [77].

La présence d'IgE anti-*A. fumigatus* est un indicateur sensible d'ABPA comparé aux IgE totales seules, mais peu spécifique [154]. La recherche de l'immunité spécifique contre les antigènes aspergillaires est la clé du diagnostic d'ABPA. Le problème est le manque de

standardisation de l'antigène, et les laboratoires utilisent différents antigènes pour établir le diagnostic [47]. Les résultats des IgE spécifiques dépendent de la qualité de l'extrait fongique utilisé [68]. Dans notre étude, les IgE spécifiques ne sont pas corrélées à la mycologie des expectorations.

Les anticorps IgG spécifiques anti-*A. fumigatus* sont un des critères principaux pour le diagnostic d'ABPA [154], cependant ce test n'est pas standardisé. Les résultats peuvent être rendus qualitativement (positif ou négatif) ou semi-quantitativement (nombre d'arcs précipitants, titre) [144]. La méthode la plus utilisée est l'immunoprécipitation, où sont détectés les anticorps IgG spécifiques d'*A. fumigatus*, sans recherche d'isotype spécifique. L'IEP, normalement moins sensible mais plus spécifique que l'ELISA, est utilisée comme technique de confirmation [127]. Dans notre étude, les tests ELISA et IEP ne sont pas positifs au même moment (35% de discordances dans l'étude). La lecture de l'IEP est semi-quantitative et parfois difficile à réaliser lorsque les anticorps sont présents en quantité faible. Le seuil de positivité de l'ELISA est fixé à 1 chez les patients atteints de mucoviscidose, alors qu'il est à 0,6 chez les autres patients. Cela pourrait expliquer en partie les discordances entre ces deux techniques de recherche des IgG spécifiques. Les résultats de ces comparaisons lors de la visite permettent de remettre en cause la procédure actuelle en sérologie aspergillaire qui comporte un dépistage des IgG par ELISA et, seulement en cas de positivité, une confirmation en IEP. Cependant, l'ELISA est très sensible et se positive avant l'IEP, puis diminue plus rapidement, ce qui nuance les résultats liés à la corrélation entre les deux méthodes, celles-ci étant complémentaires. Hutcherson *et al*, sur une étude de 12 ans, ont trouvé que la présence d'anticorps IgG précipitants anti-*A. fumigatus* était très sensible (100%), mais peu spécifique du diagnostic d'ABPA, avec des variations temporelles [77]. En effet, les anticorps IgG spécifiques d'*A. fumigatus* sont présents chez 12% des patients atteints de mucoviscidose, mais sans ABPA [103], et ils augmentent avec l'âge, probablement à cause d'une longue exposition à la moisissure, des dommages pulmonaires progressifs, indépendamment de l'ABPA [60, 147]. Une étude de Skov *et al* a montré que les anticorps précipitants anti-*A. fumigatus* ont une VPP de 80% et une VPN de 50% dans le diagnostic d'ABPA [144]. La mesure des sous-classes d'IgG spécifiques anti-*A. fumigatus* peut également aider au diagnostic d'ABPA. L'augmentation des IgG1, IgG2 et IgG4 est retrouvée chez les patients atteints d'ABPA. L'IgG4 semble être le marqueur le plus spécifique (88%), avec une sensibilité entre 65 et 73%, et une VPN de 96% [147]. La détermination du taux

d'anticorps IgG et des sous-classes d'IgG anti-*A. fumigatus* pourrait servir, grâce à la forte VPN, de test pour exclure la présence d'une ABPA [147].

8. DIFFICULTES DU DIAGNOSTIC

Le diagnostic d'ABPA est difficile à poser dans un contexte de mucoviscidose, compte tenu de la superposition de signes cliniques, radiologiques ou biologiques liés aux deux pathologies, et de la difficulté de corrélation entre biologie et clinique.

Les signes radiologiques ne sont pas spécifiques, les bronchectasies pouvant être retrouvées dans d'autres contextes que l'ABPA chez les patients atteints de mucoviscidose. Des bronchectasies localisées ou étendues étaient retrouvées chez 89% des patients à l'inclusion.

Certains patients présentent plusieurs paramètres sérologiques de sensibilisation à *Aspergillus*, sans développement d'ABPA [77]. Ces paramètres montrent une importante variabilité, et démontrent l'importance des symptômes cliniques pour considérer le diagnostic d'ABPA. Une augmentation des IgE totales peut précéder une exacerbation clinique d'ABPA [77]. L'évaluation correcte des réactions immunologiques conduit à essayer d'améliorer les mesures sérologiques. Comme décrit précédemment, plusieurs marqueurs ont été évalués, mais aucun ne s'est montré parfait pour le diagnostic d'ABPA. Il semblerait que certains marqueurs indiquent une sensibilisation, d'autres un diagnostic précoce, la présence d'une exacerbation, ou l'efficacité d'un traitement.

Des difficultés d'interprétation existent également lorsque des patients présentent simultanément plusieurs critères diagnostiques majeurs d'ABPA, sans réunir l'ensemble du tableau [33]. La signification de ces formes incomplètes d'ABPA est difficile : faut-il les considérer comme des formes atténuées d'ABPA ou comme des « pré-ABPA »? Dans notre étude, les patients rassemblaient tous les critères diagnostiques de l'ABPA, excepté un patient avec des IgE totales à 280 UI/mL, causé par la corticothérapie systémique. Dans ce cas, il est conseillé de refaire un dosage après l'arrêt de la corticothérapie. Toutes les données cliniques, radiologiques et biologiques doivent donc être rassemblées pour poser le diagnostic d'ABPA. Les nouveaux marqueurs sérologiques auront un grand intérêt dans la confirmation du diagnostic d'ABPA.

9. ABPA ET TRAITEMENT

La corticothérapie *per os* constitue la première ligne de traitement de l'ABPA. Les corticoïdes sont largement utilisés chez les patients atteints de mucoviscidose. Une étude européenne montre que 56% des patients atteints d'ABPA sont traités par corticoïdes oraux, 75% par corticoïdes inhalés et 26,2% par antifongiques, alors que 39% des patients sans ABPA sont traités par corticoïdes [105]. Dans notre étude, 5 patients sur les 6 porteurs d'ABPA sont traités par corticoïdes inhalés (83%), et 4 patients sur les 6 par corticothérapie orale, les 2 autres patients avaient néanmoins été traités pendant l'année. Cependant, 75% des patients de toute notre cohorte reçoivent des corticoïdes inhalés. Il est donc difficile d'évaluer l'impact des corticoïdes sur la clinique des patients, même si aucune différence significative ne semble être relevée. Balfour-Lynn *et al* n'avaient pas montré de différences sur les fonctions respiratoires entre les sujets traités par corticoïdes ou placebo [17]. A cause de leur effet immuno-modulateur, les corticoïdes utilisés sur de longues périodes pourraient diminuer les défenses locales au niveau bronchique et faciliter l'implantation des micro-organismes, comme *A. fumigatus*. Dans notre étude, la prévalence de la colonisation aspergillaire ne semble pas plus élevée chez les patients sous corticothérapie.

Les antifongiques sont utilisés lors d'une ABPA pour éradiquer les champignons au niveau des voies respiratoires. Ils se sont montrés efficaces comme thérapie adjuvante de l'ABPA, en améliorant les symptômes cliniques et en réduisant les doses de corticoïdes nécessaires [137, 138]. Dans notre étude, 25% des patients ont été traités par antifongique durant l'année précédente, le plus souvent pendant une courte durée. Deux patients seulement sont traités à la visite de façon continue, sur les six patients présentant une ABPA. L'impact des antifongiques sur la colonisation aspergillaire est difficile à évaluer du fait du peu de patients traités. La prise d'antifongiques ne semble cependant pas avoir d'impact sur la colonisation aspergillaire. L'évolution sérologique après antifongique des IgE totales et IgG spécifiques d'*A. fumigatus* n'a pas pu être évaluée, du fait du peu de personnes traitées.

L'évaluation du traitement antifongique associé à la corticothérapie serait amplement justifié dans un suivi prospectif bien conduit et multicentrique. En effet, un nouveau PHRC en pédiatrie se met en place, afin d'évaluer la prise de corticoïdes systémiques avec antifongiques *versus* la prise de corticoïdes systémiques avec placebo, dans l'ABPA.



10. MUTATION DU GENE *CFTR* ET RISQUE FONGIQUE

Plusieurs études ont montré une association entre la mutation du gène *CFTR* et le développement d'une ABPA, indépendamment de la mucoviscidose [102, 115]. D'autres n'ont observé aucun impact des génotypes *CFTR* sur la présence d'ABPA [105, 134]. Les deux études de McKone montrent une dégradation clinique (nutritionnelle, pulmonaire) et une colonisation à *P. aeruginosa* beaucoup plus importantes chez certains patients, en fonction du gène *CFTR*, notamment en cas de mutation DF508 [108, 109]. Ces patients seraient peut-être plus susceptibles de développer une ABPA. Dans l'étude Mucofong, la mutation DF508 ne semble pas influencer l'évolution de la clinique et l'importance de la colonisation fongique. En revanche, on remarque que les patients porteurs d'une ABPA présentent tous la mutation DF508, à l'état homozygote ou hétérozygote. Le faible échantillonnage de notre étude ne nous permet pas de conclure de façon catégorique sur cette observation. La présence de certains phénotypes HLA peut aider à identifier les patients à risque d'ABPA, qui devraient être suivis très régulièrement. Comprendre comment certains types HLA (HLA-DR2, DR5, DQ2) adaptent la réponse immune pourrait aider à développer dans le futur une immunothérapie [31].

11. ROLE DES BACTERIES

Au cours de la mucoviscidose, il existe une altération profonde des sécrétions bronchiques favorisant la colonisation bactérienne par les pyogènes (*P. aeruginosa*, *S. aureus*, *H. influenzae*...). Les tableaux lésionnels sont alors très variés, et propices à la colonisation fongique. La colonisation bactérienne des voies respiratoires semble plus importante chez les patients atteints d'ABPA, démontrant aussi l'importance des lésions épithéliales favorisant l'implantation fongique [105].

11.1. *PSEUDOMONAS AERUGINOSA*

Chez les patients atteints de mucoviscidose, la prévalence de la colonisation à *P. aeruginosa* semble stable depuis quelques années [114]. Elle se situe entre 50 et 80% des patients [16, 114, 166, 175], mais ces données sont délicates à interpréter à cause de l'hétérogénéité de l'âge de la population et donc des micro-organismes isolés dans les

bronches. En effet, l'analyse des prévalences des bactéries par tranche d'âge montre une augmentation constante de la colonisation à *P. aeruginosa* avec l'âge. Dans l'étude, 57% des patients (29/51) sont colonisés à *P. aeruginosa* à cette visite, et 65% des patients hébergent cette bactérie au moins une fois dans l'année précédente, taux stables comparés à ceux de l'inclusion. Parmi eux, 27 patients présentent une souche muqueuse associée ou non à une souche non muqueuse.

La colonisation à *P. aeruginosa* favoriserait la survenue d'*Aspergillus sp*, ainsi que la sensibilisation aspergillaire [60, 89, 134], en altérant *in vitro* la croissance et le phénotype d'*A. fumigatus* [121]. Cependant, comme une autre étude [145], nous n'avons pas retrouvé cet impact de *P. aeruginosa* sur la croissance fongique, celui-ci étant retrouvé dans 58% des expectorations positives à *A. fumigatus*. Plusieurs études ont également suggéré une association entre une infection à *P. aeruginosa* et un risque accru d'ABPA [60, 71, 105, 159]. Une autre étude contraste ces résultats, en montrant une distribution similaire entre les trois groupes d'infections à *P. aeruginosa* (infection chronique, intermittente, absente), et la présence ou non d'ABPA ou d'*A. fumigatus* [147]. Une colonisation précoce à *P. aeruginosa* chez l'enfant favorise le développement d'une ABPA [119], ce que nous confirmons dans notre étude, puisque le seul enfant chez qui a été isolé *P. aeruginosa* présente une ABPA.

D'une façon générale, un tournant dramatique est pris lors de la colonisation bronchique à *P. aeruginosa* [29]. Responsable de suppurations chroniques, il va altérer la paroi bronchique. C'est dans ce micro-environnement inflammatoire, au sein même de sécrétions et de mucosités visqueuses, que seront piégées les spores fongiques. Comme ce qui a été trouvé à l'inclusion, les infections bactériennes, et notamment les infections à *P. aeruginosa*, sont le facteur de risque principal des exacerbations et de l'altération des fonctions pulmonaires. En effet, la diminution du VEMS est significativement plus importante chez les sujets colonisés à *P. aeruginosa*, alors que la présence concomitante d'*Aspergillus* semblerait même diminuer l'impact clinique de la colonisation bactérienne, en exerçant un effet protecteur.

11.2. STAPHYLOCOCCUS AUREUS

La prévalence des infections à *S. aureus* reste stable. Durant l'année 2007, le registre américain (Cystic Fibrosis Patient Registry) enregistrait la survenue d'une colonisation à *S. aureus* chez 51,4% des patients suivis [175]. D'après notre étude, 33% isolaient cette bactérie

à cette visite, et 50% des patients ont été colonisés au moins une fois pendant l'année écoulée. L'infection à *S. aureus* apparaît de façon précoce dans la vie, six enfants sur les neuf de notre cohorte ont été colonisés au moins une fois dans l'année. Par contre, l'acquisition d'un SARM (*S. aureus* résistant à la méticilline) se produit le plus souvent chez les patients adultes avec une fonction pulmonaire détériorée, et suite à une utilisation accrue d'antibiotiques [4, 114, 151]. Son taux varie de 5 à 21% des patients [25, 114, 166, 175], il est de 4% dans notre cohorte. Les effets de *S. aureus* sur la présence d'ABPA restent controversés. Mastella *et al* ont montré *S. aureus* ne semblait pas influencer sur la venue d'une ABPA, probablement car cette bactérie colonise les sujets jeunes [105]. Par contre, Shah *et al* démontrent une association entre ABPA et infection à *S. aureus* [141].

11.3. HAEMOPHILUS INFLUENZAE

La colonisation à *H. influenzae* a tendance à diminuer par la prise d'antibiotiques initialement utilisés pour traiter les infections à *P. aeruginosa*, mais efficaces aussi sur ce micro-organisme. Millar *et al* ont trouvé en 2005 une colonisation chez 6% des patients [114], contre 2% seulement dans notre étude. Ce faible pourcentage est expliqué par le peu d'enfants inclus dans notre population. Ceci justifie aussi un taux d'infection plus élevé chez les patients sans ABPA [105], les infections fongiques se révélant plus tardivement.

11.4. PATHOGENES EMERGENTS

Chez les patients atteints de mucoviscidose, la colonisation prolongée à *Stenotrophomonas maltophilia* [71, 105, 134] et à *Burkholderia cepacia* [105] favorise le risque de développer une ABPA. Leur prévalence est très faible dans l'étude Mucofond, puisque 6% des patients seulement sont colonisés à *S. maltophilia*, et un patient seulement est colonisé par *B. cepacia* pendant l'année. Aucun de ces patients ne présente d'ABPA.

11.5. IMPACT DE L'ANTIBIOTHERAPIE AU LONG COURS

Depuis que des études ont démontré un déclin rapide de la fonction respiratoire en cas d'infection chronique à *P. aeruginosa*, des traitements agressifs par voie inhalée sont utilisés contre cette bactérie, comme l'azithromycine, la colimycine et la tobramycine. En effet, 86% des patients de l'étude sont sous antibiothérapie au long cours. La forte prévalence d'A.

fumigatus serait, pour certains auteurs, dépendante de la prise au long cours d'une antibiothérapie orale, inhalée, ou parentérale, dans le but de diminuer ou éradiquer les infections bactériennes broncho-pulmonaires chroniques chez le patient atteint de mucoviscidose [18, 26, 101, 145, 159]. La colonisation aspergillaire augmente significativement chez les patients recevant de la tobramycine inhalée [26], alors que l'inhalation de colimycine ne semble pas la favoriser [78]. Millar *et al* n'ont par contre pas retrouvé d'augmentation d'*Aspergillus sp* malgré une utilisation importante d'antibiotiques [114]. Dans notre étude, la prise d'antibiotiques au long cours oraux ou inhalés ne semble pas favoriser l'isolement d'*Aspergillus sp* dans les expectorations. Cependant, il est difficile de conclure sur cette observation, étant donné la faible proportion de patients n'ayant pas recours aux antibiotiques. Chez les enfants, l'augmentation de la prévalence d'*Aspergillus sp* pourrait être due à la plus importante utilisation d'antibiotiques chez le sujet jeune [114]. Il serait important de voir si l'utilisation d'antibiotiques à un âge précoce favorise l'émergence d'*Aspergillus sp* ou d'autres espèces émergentes, et évaluer le bénéfice-risque d'un traitement chez les enfants. Cette recherche n'est pas possible dans notre étude, qui comprend peu d'enfants. Selon certains auteurs, l'ABPA est plus fréquente chez les personnes traitées par une antibiothérapie continue (11%) que chez les patients recevant une antibiothérapie en intermittence (5,7%) ou lors des exacerbations (3,6%) [105].

12. SENSIBILITE *IN VITRO* AUX ANTIFONGIQUES

Les résistances peuvent être primaires (innées) lorsqu'un pathogène fongique est intrinsèquement résistant à l'antifongique, ou secondaires (acquises) quand un organisme développe la résistance durant l'exposition à un antifongique, à cause d'une mutation spontanée ou l'acquisition d'une résistance par un transfert génétique d'une source extérieure [30, 90]. L'EUCAST a publié un document afin de préciser une méthodologie standard pour la détermination de la résistance des champignons aux antifongiques [135]. Il reste quand même des problèmes de standardisation des techniques entre les laboratoires, comme l'inoculum fongique, la température et le temps d'incubation.

A. fumigatus est l'espèce la plus sensible *in vitro*, même si les sensibilités *in vitro* sont variables d'une souche à l'autre [96]. Les azolés sont les antifongiques les plus répandus, leurs sensibilités sont importantes à rechercher, surtout en cas de réponse limitée après traitement, ou en cas de détérioration après une première réponse [76], afin de guider le

traitement et surveiller l'épidémiologie des *Aspergillus sp* [13]. L'exposition à de fortes concentrations ou à un traitement à long terme par itraconazole est un risque potentiel de développement d'une résistance aux azolés, par pression de sélection [76, 168]. En général, la concentration minimale fongicide se situe 1 à 3 dilutions après la CMI correspondante [96]. L'acquisition d'un isolat résistant de l'environnement est aussi possible [148]. La fréquence de la résistance à cet azolé pour *A. fumigatus* se situe entre 2 à 3% [76]. Dans notre étude, 48% des souches d'*A. fumigatus* sont sensibilité dose-dépendante, et 9% (2/23) des souches sont résistantes à l'itraconazole. Toutes les souches sont sensibles au voriconazole et au posaconazole, ainsi qu'aux échinocandines (caspofungine et anidulafungine), alors que l'amphotéricine B inhibe *in vitro* 83% des souches. *A. flavus* présente des CMI élevées pour l'amphotéricine B [90]. Par contre, il est généralement très sensible aux azolés. Le voriconazole et le posaconazole montrent une excellente activité antifongique *in vitro* et *in vivo* [90]. Dans notre étude, les 5 souches isolées sont de sensibilité variable à l'itraconazole, et plutôt résistantes à l'amphotéricine B, tous les autres antifongiques étant très actifs. La résistance aux polyènes est fréquente chez *A. terreus*, à cause de la faible teneur en ergostérol contenue dans sa membrane cellulaire [30]. L'*A. terreus* isolé dans notre étude présente une sensibilité intermédiaire à l'amphotéricine B.

Comme ce qui a été retrouvé précédemment dans la littérature [43, 88, 111, 173], *S. apiospermum* a montré dans notre étude une bonne sensibilité au voriconazole, au posaconazole, et celle-ci est variable à l'itraconazole, à l'amphotéricine B et à l'anidulafungine. Le voriconazole et le posaconazole seront plus susceptibles d'être choisis chez notre patiente colonisée à *S. apiospermum*. Une étude a montré que l'activité *in vitro* du voriconazole induisait une réponse clinique chez 55% des patients infectés par *S. apiospermum* [165]. A cause de l'activité modérée *in vitro* des antifongiques contre *S. apiospermum* et de la gravité associée aux infections invasives, une thérapie combinée post-greffe pourrait être l'alternative de la monothérapie, les azolés présentant une grande synergie avec la caspofungine [42].

Les *Fusarium sp* sont relativement résistants aux antifongiques [56, 123], d'ailleurs dans notre étude, seulement l'amphotéricine B est efficace *in vitro* sur ce champignon. Pour le traitement de *Mucor sp*, l'amphotéricine B et le posaconazole sont les agents les plus efficaces [14, 96], ce que nous avons observé *in vitro* dans notre étude.

L'augmentation de l'utilisation prophylactique et thérapeutique de l'itraconazole pourrait entraîner des résistances croisées entre l'itraconazole et les triazolés de nouvelle génération, et causer des problèmes majeurs de traitement [88]. Les isolats d'*Aspergillus* présentant une CMI haute à l'itraconazole ont également souvent une CMI importante aux azolés de structure similaire, comme le posaconazole [30]. Chez nos patients traités par antifongiques au long cours, aucune émergence de résistance n'a cependant été observée. Certains centres de l'étude Mucofung réaliseront un séquençage des souches d'*A. fumigatus* résistantes, dans le but de rechercher les gènes responsables de la résistance.

Le problème de ces tests est que la résistance fongique *in vitro* n'est pas toujours associée à un échec clinique. De même, la sensibilité *in vitro* ne prédit pas toujours le succès thérapeutique [88, 96].

13. NICHES ECOLOGIQUES FONGIQUES

Les champignons isolés des expectorations sont inhalés à partir de l'environnement entourant ces patients. Mieux connaître la niche écologique de chaque champignon permettrait une meilleure prise en charge du risque fongique, avec en particulier des mesures préventives peu onéreuses et rationnelles, comme la simple éviction de la source lorsqu'elle est identifiée. C'est pour cette raison que le cadre de vie des patients a été renseigné (citadin, rural, jardin, plantes en pot...). Certains auteurs ont montré que les patients vivant en zone rurale étaient plus fortement colonisés [60], ce que nous avons pas retrouvé dans notre étude.

Des micro-organismes comme *A. fumigatus* sont retrouvés de façon ubiquitaire dans l'environnement. Il est donc difficile de comparer les souches environnementales avec leurs répercussions cliniques à cause de cette forte prévalence [172]. La recherche des niches écologiques dans ce cadre montre peu d'intérêt. Dans certains cas de positivité du bilan fongique, sera recherchée une niche écologique fongique avec comparaison moléculaire des souches isolées chez le patient et dans son environnement. Pour cela, deux types de prélèvements seront réalisés : l'aspiration d'un volume d'air par l'utilisation de biocollecteurs, et les écouvillonnages et empreintes directes à l'aide de boîtes de Pétri contact.

Les plantes en pots constituent un facteur de risque de colonisation des voies aériennes à *S. apiospermum* [128]. L'étude Mucofung retrouve cette donnée puisque tous les patients

colonisés à *S. apiospermum* possèdent des plantes en pots dans leur logement. Il serait intéressant de voir si les mêmes génotypes sont aussi présents dans la terre des plantes.

A cause du faible pronostic associés à la fusariose et aux mucormycoses chez l'immunodéprimé, associé à la sensibilité limitée de ces champignons aux antifongiques, la prévention de cette infection est essentielle en cas d'immunosuppression [123].

Ainsi, le suivi un an après l'inclusion conforte les premières observations faites par Yolande LEMEILLE, particulièrement impliquée dans l'inclusion des patients au CHU de Grenoble. L'épidémiologie fongique souligne dans ce suivi la part importante d'*A. fumigatus* dans la colonisation, la sensibilisation et l'émergence de formes cliniques plus ou moins sévères (bronchite aspergillaire et ABPA). Les observations confirment la nécessité de parfaitement préciser les milieux de cultures utiles et l'intérêt d'une standardisation des méthodes mycologiques. Les relations complexes entre *P. aeruginosa* et *A. fumigatus* seront examinées sur l'ensemble des patients des sept centres. Ainsi ce travail constitue une base primordiale pour des recherches complémentaires aussi bien sur les isolats que sur les sérums.

THESE SOUTENUE PAR : Clémence CRUYPENINCK

TITRE : « Evaluation et prise en charge du risque fongique chez le patient atteint de mucoviscidose : résultats de la première visite de l'étude Mucofong au CHU de Grenoble, un an après l'inclusion ».

CONCLUSION

Dans la mucoviscidose, le pronostic est principalement lié à la détérioration des fonctions respiratoires, celle-ci étant dépendante du degré de colonisation et de surinfections broncho-pulmonaires. L'impact de la colonisation bactérienne, en particulier de *Pseudomonas aeruginosa*, sur la dégradation clinique est reconnu sans conteste. Cependant, l'importance de la colonisation et des infections par la flore fongique dans la mucoviscidose, ainsi que leur impact sur l'évolution de l'atteinte pulmonaire restent peu évalués et controversés. Le programme hospitalier de recherche clinique (PHRC) « Mucofong » devrait permettre de déterminer le rôle et l'implication des champignons microscopiques filamenteux dans la dégradation de la fonction pulmonaire, de proposer un protocole mycologique afin d'améliorer la détection et la prise en charge du risque fongique chez ces patients.

Sur les 62 patients inclus au CHU de Grenoble de novembre 2007 à mai 2008, 57 ont réalisé la première visite un an après l'inclusion. Trois patients sont sortis de l'étude (greffe pulmonaire, décès, changement de CRCM) et 2 patients n'ont pas eu de visite entre novembre 2008 et juin 2009.

Plusieurs milieux semi-sélectifs ont été ensemencés de façon quantitative pour détecter toute espèce fongique, y compris les espèces à croissance difficile sur les milieux usuels. *Aspergillus fumigatus* a été isolé en moyenne dans 41,3% des expectorations (39,3% à l'inclusion, 43,3% à la visite). Les autres espèces aspergillaires sont nettement moins fréquentes, *A. flavus* est la seconde espèce isolée dans 10% des expectorations, toujours associée à *A. fumigatus*, puis *A. terreus* est présent dans 2,7% des prélèvements (3,5% à l'inclusion, 1,9% à la visite). *Scedosporium apiospermum*, dont la pathogénicité est incertaine, est retrouvé chez 7,6% des patients. Chez un des patients colonisé, cette espèce pourrait être à l'origine d'une mycose broncho-pulmonaire allergique. La colonisation par *Fusarium sp* ou par les mucorales est plus rare mais est à surveiller, compte tenu des

difficultés thérapeutiques et des capacités de dissémination, en cas d'effondrement des défenses immunitaires comme lors de greffe pulmonaire.

La colonisation bronchique par *Aspergillus sp* est associée le plus souvent à une réponse immunologique. L'impact des antibiotiques et de la corticothérapie sur la colonisation fongique est impossible à déterminer car 86% des patients bénéficient d'une antibiothérapie et 75% de corticoïdes inhalés au long cours. Une patiente de notre étude présente une bronchite aspergillaire et six patients une aspergillose broncho-pulmonaire allergique (ABPA), soit 10,9% des patients de l'étude. Les prélèvements recueillis seront utiles à l'évaluation de nouveaux marqueurs sérologiques (antigènes recombinants, TARC...) qui pourraient améliorer le diagnostic d'ABPA, parfois difficile à poser. Aucune corrélation significative n'a pu être démontrée entre mutation du gène *CFTR* et atteinte fongique.

Les dégradations des fonctions pulmonaires sont plus marquées en présence de *P. aeruginosa*. Paradoxalement, la présence concomitante d'*Aspergillus* semblerait diminuer l'impact clinique de la colonisation bactérienne, en exerçant un effet protecteur.

Les *Aspergillus sp* sont sensibles *in vitro* aux antifongiques, sauf *A. terreus* qui est résistant à l'amphotéricine B. Cependant, d'autres espèces, comme *Mucor sp* ou *Fusarium sp*, présentent une résistance d'emblée importante vis-à-vis des antifongiques systémiques. En revanche, aucune émergence de résistance n'a été observée depuis l'inclusion chez les patients déjà colonisés par *A. fumigatus* dans la cohorte de patients suivis.

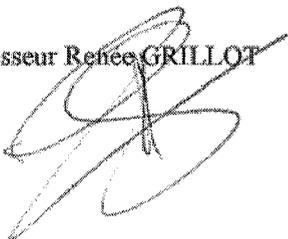
La prise en compte des données recueillies sur 3 ans par l'étude Mucofond dans les 7 centres investigateurs permettra d'obtenir des observations sur un plus grand nombre de patients, assurant des données précises concernant l'épidémiologie fongique et la pathogénicité des champignons filamenteux chez les patients atteints de mucoviscidose.

VU ET PERMIS D'IMPRIMER

Grenoble, le 15/03/2010

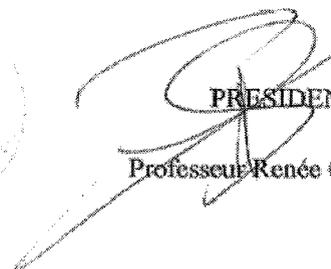
LE DOYEN

Professeur Renée GRILLOT



PRÉSIDENT DE THESE

Professeur Renée GRILLOT



BIBLIOGRAPHIE

• OUVRAGES

1. Gangi A., Jeung M.Y., Roy C. Atlas d'imagerie thoracique. *Edition Elsevier Masson*, 1999. 273 pages.
2. Chabasse D., Bouchara J.P., De Gentile L., Brun S., Cimon B., Penn P. Cahier de formation biologie médicale Bioforma n°25, 2002.
3. Leophonte P. Pneumonies. *Edition John Libbey Eurotext*, 2001, 246 pages.
4. Parikh D. Crabbe D., Auldish A., Rothenberg S. Pediatric Thoracic Surgery. *Edition Springer*, 2009, 614 pages.

• ENCYCLOPEDIES

5. Dejardin Botelho A. Tillie-Leblond I. Aspergillose bronchopulmonaire allergique. *Encyclopédie médico-chirurgicale*, Pneumologie, 6-039-A-30, 2006.
6. Hubert D. Mucoviscidose. *Encyclopédie médico-chirurgicale*, 6-0945, 2005.
7. Sermet-Gaudelus I. L.G., Berche P., Ricour C., Lacaille F., Bonnefond J.P., Robert J.J., *et al.* Mucoviscidose : physiopathologie, génétique, aspects cliniques et thérapeutiques. *Encyclopédie médico-chirurgicale*, Pédiatrie, 4-060-P-10, 2002.
8. Travert G. Dépistage néonatal. *Encyclopédie médico-chirurgicale*, Pédiatrie, 4-002-F-61, 2007.

• ARTICLES

9. Agarwal R. Allergic bronchopulmonary aspergillosis. *Chest*. 2009, **135**:805-26.
10. Agarwal R., Gupta D., Aggarwal A.N., Saxena A.K., Saikia B., Chakrabarti A., *et al.* Clinical significance of decline in serum IgE levels in allergic bronchopulmonary aspergillosis. *Respir Med*. 2009.
11. Almeida M.B., Bussamra M.H., Rodrigues J.C. ABPA diagnosis in cystic fibrosis patients: the clinical utility of IgE specific to recombinant *Aspergillus fumigatus* allergens. *J Pediatr (Rio J)*. 2006, **82**:215-20.
12. Amin R., Dupuis A., Aaron S.D., Ratjen F. The effect of chronic infection with *Aspergillus fumigatus* on lung function and hospitalization in patients with cystic fibrosis. *Chest*. 2010, **137**:171-6.

13. Arendrup M.C., Perkhofers S., Howard S.J., Garcia-Effron G., Vishukumar A., Perlin D., *et al.* Establishing *in vitro-in vivo* correlations for *Aspergillus fumigatus*: the challenge of azoles versus echinocandins. *Antimicrob Agents Chemother.* 2008, **52**:3504-11.
14. Arthurs S.K., Eid A.J., Deziel P.J., Marshall W.F., Cassivi S.D., Walker R.C., *et al.* The impact of invasive fungal diseases on survival after lung transplantation. *Clin Transplant*, Aug 2009.
15. Baculard A. Les infections fongiques dans la mucoviscidose. *J Mycol Med.* 1999, **9**:24-9.
16. Bakare N., Rickerts V., Bargon J., 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.
17. Balfour-Lynn I.M., Lees B., Hall P., Phillips G., Khan M., Flather M., *et al.* Multicenter randomized controlled trial of withdrawal of inhaled corticosteroids in cystic fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med.* 2006, **173**:1356-62.
18. Bargon J., Dauletbaev N., Kohler B., Wolf M., Posselt H.G., Wagner T.O. Prophylactic antibiotic therapy is associated with an increased prevalence of *Aspergillus* colonization in adult cystic fibrosis patients. *Respir Med.* 1999, **93**:835-8.
19. Becker A., Akkad N., Forster D.H., Kniehl E. Growth of *Aspergillus fumigatus* is inhibited by *Candida species* on sealed Sabouraud agar plates but not sealed Columbia agar plates. *Clin Microbiol Infect.* 2004, **10**:507.
20. Becker J.W., Burke W., McDonald G., Greenberger P.A., Henderson W.R., Aitken M.L. Prevalence of allergic bronchopulmonary aspergillosis and atopy in adult patients with cystic fibrosis. *Chest.* 1996, **109**:1536-40.
21. Benghida R., Ghezzi H., Malo J.L. Sensitization to *Aspergillus fumigatus* and functional outcome of asthma. *Rev Mal Respir.* 2007, **24**:23-31.
22. Bienvenu T. Cystic fibrosis: relationship between genotype and phenotype. *Arch Pediatr.* 2003, **10 Suppl 2**:318s-24s.
23. Blandin S., David G. Aspergillosis for the pulmonologist. *Rev Pneumol Clin.* 2008, **64**:202-10.
24. Bremont F., Ritties J.L., Rance F., Juchet A., Recco P., Linas M.D., *et al.* Aspergillose bronchopulmonaire allergique chez l'enfant. *Arch Pediatr.* 1999, **6 Suppl 1**:87-93.
25. Burns J.L., Emerson J., Stapp J.R., Yim D.L., Krzewinski J., Loudon L., *et al.* Microbiology of sputum from patients at cystic fibrosis centers in the United States. *Clin Infect Dis.* 1998, **27**:158-63.
26. Burns J.L., Van Dalfsen J.M., Shawar R.M., Otto K.L., Garber R.L., Quan J.M., *et al.* Effect of chronic intermittent administration of inhaled tobramycin on respiratory microbial flora in patients with cystic fibrosis. *J Infect Dis.* 1999, **179**:1190-6.

27. Camuset J., Lavole A., Wisley M., Khalil A., Bellocq A., Bazelly B., *et al.* Infections aspergillaires broncho-pulmonaires du sujet non immunodéprimé. *Rev Pneumol Clin.* 2007, **63**:155-66.
28. Casaulta C., Fluckiger S., Cramer R., Blaser K., Schoeni M.H. Time course of antibody response to recombinant *Aspergillus fumigatus* antigens in cystic fibrosis with and without ABPA. *Pediatr Allergy Immunol.* 2005, **16**:217-25.
29. Chabasse D., Bouchara J.P., Chazalette J.P., Carriere J., Ginies J.L., De Gentile L., *et al.* Mucoviscidose et colonisation fongiques à *Scedosporium apiospermum*. *J Mycol Med.* 1991, **1**:152-5.
30. Chandrasekar P.H. Antifungal resistance in *Aspergillus*. *Med Mycol.* 2005, **43 Suppl 1**:S295-8.
31. Chauhan B., Santiago L., Hutcheson P.S., Schwartz H.J., Spitznagel E., Castro M., *et al.* Evidence for the involvement of two different MHC class II regions in susceptibility or protection in allergic bronchopulmonary aspergillosis. *J Allergy Clin Immunol.* 2000, **106**:723-9.
32. Chinet T. Physiopathology of cystic fibrosis lung disease. *Rev Mal Respir.* 1999, **16**:339-45.
33. Cimon B., Carrere J., Chazalette J.P., Ginies J.L., Chabasse D., Bouchara J.P. Mycoses bronchopulmonaires au cours de la mucoviscidose, Résultats d'une étude épidémiologique longitudinale sur une période de 5 ans. *J Mycol Med.* 2000, **10**:128-35.
34. Cimon B., Carrere J., Vinatier J.F., Chazalette J.P., Chabasse D., Bouchara J.P. Clinical significance of *Scedosporium apiospermum* in patients with cystic fibrosis. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2000, **19**:53-6.
35. Cimon B., Chabasse D., Bouchara J.P. Rôle des champignons dans la pathologie respiratoire au cours de la mucoviscidose. *Revue francophone des laboratoires.* 2007, **397**:59-65.
36. Cimon B., Symoens F., Zouhair R., Chabasse D., Nolard N., Defontaine A., *et al.* Molecular epidemiology of airway colonisation by *Aspergillus fumigatus* in cystic fibrosis patients. *J Med Microbiol.* 2001, **50**:367-74.
37. Cimon B., Zouhair R., Symoens F., Carrere J., Chabasse D., Bouchara J.P. *Aspergillus terreus* in a cystic fibrosis clinic: environmental distribution and patient colonization pattern. *J Hosp Infect.* 2003, **53**:81-2.
38. Cohen-Cymerknoh M., Blau H., Shoseyov D., Mei-Zahav M., Efrati O., Armoni S., *et al.* Intravenous monthly pulse methylprednisolone treatment for ABPA in patients with cystic fibrosis. *J Cyst Fibros.* 2009, **8**:253-7.
39. Collins M.S., Abbott M.A., Wakefield D.B., Lapin C.D., Drapeau G., Hopfer S.M., *et al.* Improved pulmonary and growth outcomes in cystic fibrosis by newborn screening. *Pediatr Pulmonol.* 2008, **43**:648-55.
40. Cooley L., Spelman D., Thursky K., Slavin M. Infection with *Scedosporium apiospermum* and *S. prolificans*, Australia. *Emerg Infect Dis.* 2007, **13**:1170-7.

41. Cramer R., Hemmann S., Ismail C., Menz G., Blaser K. Disease-specific recombinant allergens for the diagnosis of allergic bronchopulmonary aspergillosis. *Int Immunol.* 1998, **10**:1211-6.
42. Cuenca-Estrella M., Alastruey-Izquierdo A., Alcazar-Fuoli L., Bernal-Martinez L., Gomez-Lopez A., Buitrago M.J., *et al.* *In vitro* activities of 35 double combinations of antifungal agents against *Scedosporium apiospermum* and *Scedosporium prolificans*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2008, **52**:1136-9.
43. Cuenca-Estrella M., Gomez-Lopez A., Mellado E., Buitrago M.J., Monzon A., Rodriguez-Tudela J.L. Head-to-head comparison of the activities of currently available antifungal agents against 3,378 Spanish clinical isolates of yeasts and filamentous fungi. *Antimicrob Agents Chemother.* 2006, **50**:917-21.
44. Davies J.C., Alton E.W., Bush A. Cystic fibrosis. *BMJ.* 2007, **335**:1255-9.
45. Davis P.B., Schluchter M.D., Konstan M.W. Relation of sweat chloride concentration to severity of lung disease in cystic fibrosis. *Pediatr Pulmonol.* 2004, **38**:204-9.
46. De Almeida M.B., Bussamra M.H., Rodrigues J.C. Allergic bronchopulmonary aspergillosis in paediatric cystic fibrosis patients. *Paediatr Respir Rev.* 2006, **7**:67-72.
47. De Oliveira E., Giavina-Bianchi P., Fonseca L.A., Franca A.T., Kalil J. Allergic bronchopulmonary aspergillosis' diagnosis remains a challenge. *Respir Med.* 2007, **101**:2352-7.
48. De Valk H.A., Klaassen C.H., Yntema J.B., Hebestreit A., Seidler M., Haase G., *et al.* Molecular typing and colonization patterns of *Aspergillus fumigatus* in patients with cystic fibrosis. *J Cyst Fibros.* 2009, **8**:110-4.
49. Demko C.A., Stern R.C., Doershuk C.F. *Stenotrophomonas maltophilia* in cystic fibrosis: incidence and prevalence. *Pediatr Pulmonol.* 1998, **25**:304-8.
50. Denning D.W. Echinocandin antifungal drugs. *Lancet.* 2003, **362**:1142-51.
51. Denning D.W., O'Driscoll B.R., Powell G., Chew F., Atherton G.T., Vyas A., *et al.* Randomized controlled trial of oral antifungal treatment for severe asthma with fungal sensitization: The Fungal Asthma Sensitization Trial (FAST) study. *Am J Respir Crit Care Med.* 2009, **179**:11-8.
52. Dupont B., Improvisi L., Ronin O. Aspects épidémiologiques et cliniques des infections à *Scedosporium* et à *Pseudoallescheria*. *J Mycol Med.* 1991, **1**:33-42.
53. Estes K.E., Penzak S.R., Calis K.A., Walsh T.J. Pharmacology and antifungal properties of anidulafungin, a new echinocandin. *Pharmacotherapy.* 2009, **29**:17-30.
54. Farrell P.M. The prevalence of cystic fibrosis in the European Union. *J Cyst Fibros.* 2008, **7**:450-3.
55. Farrell P.M., Rosenstein B.J., White T.B., Accurso F.J., Castellani C., Cutting G.R., *et al.* Guidelines for diagnosis of cystic fibrosis in newborns through older adults: Cystic Fibrosis Foundation consensus report. *J Pediatr.* 2008, **153**:S4-S14.

56. Fleming R.V., Walsh T.J., Anaissie E.J. Emerging and less common fungal pathogens. *Infect Dis Clin North Am.* 2002, **16**:915-33, vi-vii.
57. Flume P.A., O'Sullivan B.P., Robinson K.A., Goss C.H., Mogayzel P.J., Jr., Willey-Courand D.B., *et al.* Cystic fibrosis pulmonary guidelines: chronic medications for maintenance of lung health. *Am J Respir Crit Care Med.* 2007, **176**:957-69.
58. Frederiksen B., Koch C., Hoiby N. Antibiotic treatment of initial colonization with *Pseudomonas aeruginosa* postpones chronic infection and prevents deterioration of pulmonary function in cystic fibrosis. *Pediatr Pulmonol.* 1997, **23**:330-5.
59. Freymond N., Le Loch J.B., Devouassoux G., Harf R., Rakotomalala A., Pacheco Y. *Aspergillus* bronchitis and aspergilloma treated successfully with voriconazole. *Rev Mal Respir.* 2005, **22**:811-4.
60. Geller D.E., Kaplowitz H., Light M.J., Colin A.A. Allergic bronchopulmonary aspergillosis in cystic fibrosis: reported prevalence, regional distribution, and patient characteristics. Scientific Advisory Group, Investigators, and Coordinators of the Epidemiologic Study of Cystic Fibrosis. *Chest.* 1999, **116**:639-46.
61. Girodet P.O., Casset A., Magnan A., de Blay F., Chanez P., Tunon De Lara J.M. IgE and respiratory disease. *Rev Mal Respir.* 2005, **22**:967-81.
62. Glackin L., Leen G., Elnazir B., Grealley P. Voriconazole in the treatment of allergic bronchopulmonary aspergillosis in cystic fibrosis. *Ir Med J.* 2009, **102**:29.
63. Glaser A.G., Menz G., Kirsch A.I., Zeller S., Cramer R., Rhyner C. Auto- and cross-reactivity to thioredoxin allergens in allergic bronchopulmonary aspergillosis. *Allergy.* 2008, **63**:1617-23.
64. Goss C.H., Otto K., Aitken M.L., Rubenfeld G.D. Detecting *Stenotrophomonas maltophilia* does not reduce survival of patients with cystic fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med.* 2002, **166**:356-61.
65. Greenberger P.A. Allergic bronchopulmonary aspergillosis. *J Allergy Clin Immunol.* 2002, **110**:685-92.
66. Guillot M., El Hachem C., Amiour M., Delaisi B., Reinert P. Aspergillosis in cystic fibrosis patients. *Arch Pediatr.* 2003, **10 Suppl 5**:588s-91s.
67. Haase G., Skopnik H., Kusenbach G. *Exophiala dermatitidis* infection in cystic fibrosis. *Lancet.* 1990, **336**:188-9.
68. Hafen G.M., Hartl D., Regamey N., Casaulta C., Latzin P. Allergic bronchopulmonary aspergillosis: the hunt for a diagnostic serological marker in cystic fibrosis patients. *Expert Rev Mol Diagn.* 2009, **9**:157-64.
69. Harrison F. Microbial ecology of the cystic fibrosis lung. *Microbiology.* 2007, **153**:917-23.

70. Hartl D., Latzin P., Zissel G., Krane M., Krauss-Etschmann S., Griese M. Chemokines indicate allergic bronchopulmonary aspergillosis in patients with cystic fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med.* 2006, **173**:1370-6.
71. Hatziagorou E., Walsh T.J., Tsanakas J.N., Roilides E. *Aspergillus* and the paediatric lung. *Paediatr Respir Rev.* 2009, **10**:178-85.
72. Hemmann S., Nikolaizik W.H., Schoni M.H., Blaser K., Cramer 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**:1155-60.
73. Hilliard T., Edwards S., Buchdahl R., Francis J., Rosenthal M., Balfour-Lynn I., *et al.* Voriconazole therapy in children with cystic fibrosis. *J Cyst Fibros.* 2005, **4**:215-20.
74. Hinson K.F., Moon A.J., Plummer N.S. Broncho-pulmonary aspergillosis; a review and a report of eight new cases. *Thorax.* 1952, **7**:317-33.
75. Horre R., Schaal K.P., Siekmeier R., Sterzik B., De Hoog G.S., Schnitzler N. Isolation of fungi, especially *Exophiala dermatitidis*, in patients suffering from cystic fibrosis. A prospective study. *Respiration.* 2004, **71**:360-6.
76. Howard S.J., Pasqualotto A.C., Denning D.W. Azole resistance in allergic bronchopulmonary aspergillosis and *Aspergillus* bronchitis. *Clin Microbiol Infect.* 2009.
77. Hutcheson P.S., Knutsen A.P., Rejent A.J., Slavin R.G. A 12-year longitudinal study of *Aspergillus* sensitivity in patients with cystic fibrosis. *Chest.* 1996, **110**:363-6.
78. Jensen T., Pedersen S.S., Garne S., Heilmann C., Hoiby N., Koch C. Colistin inhalation therapy in cystic fibrosis patients with chronic *Pseudomonas aeruginosa* lung infection. *J Antimicrob Chemother.* 1987, **19**:831-8.
79. Johnson L.B., Kauffman C.A. Voriconazole: a new triazole antifungal agent. *Clin Infect Dis.* 2003, **36**:630-7.
80. Jordan P.W., Stanley T., Donnelly F.M., Elborn J.S., McClurg R.B., Millar B.C., *et al.* Atypical mycobacterial infection in patients with cystic fibrosis: update on clinical microbiology methods. *Lett Appl Microbiol.* 2007, **44**:459-66.
81. Kanthan S.K., Bush A., Kemp M., Buchdahl R. Factors effecting impact of *Aspergillus fumigatus* sensitization in cystic fibrosis. *Pediatr Pulmonol.* 2007, **42**:785-93.
82. Kanu A., Patel K. Treatment of allergic bronchopulmonary aspergillosis (ABPA) in CF with anti-IgE antibody (omalizumab). *Pediatr Pulmonol.* 2008, **43**:1249-51.
83. Kauffman H.F., Tomee J.F., Van de Riet M.A., Timmerman A.J., Borger P. Protease-dependent activation of epithelial cells by fungal allergens leads to morphologic changes and cytokine production. *J Allergy Clin Immunol.* 2000, **105**:1185-93.
84. Kawamura S., Maesaki S., Tomono K., Tashiro T., Kohno S. Clinical evaluation of 61 patients with pulmonary aspergilloma. *Intern Med.* 2000, **39**:209-12.

85. Kerem E., Corey M., Kerem B.S., Rommens J., Markiewicz D., Levison H., *et al.* The relation between genotype and phenotype in cystic fibrosis--analysis of the most common mutation (delta F508). *N Engl J Med.* 1990, **323**:1517-22.
86. Kerem E., Kerem B. Genotype-phenotype correlations in cystic fibrosis. *Pediatr Pulmonol.* 1996, **22**:387-95.
87. Kerr J.R., Taylor G.W., Rutman A., Hoiby N., Cole P.J., Wilson R. *Pseudomonas aeruginosa* pyocyanin and 1-hydroxyphenazine inhibit fungal growth. *J Clin Pathol.* 1999, **52**:385-7.
88. Kontoyiannis D.P., Lewis R.E. Antifungal drug resistance of pathogenic fungi. *Lancet.* 2002, **359**:1135-44.
89. Kraemer R., Delosea N., Ballinari P., Gallati S., Cramer R. Effect of allergic bronchopulmonary aspergillosis on lung function in children with cystic fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med.* 2006, **174**:1211-20.
90. Krishnan S., Manavathu E.K., Chandrasekar P.H. *Aspergillus flavus*: an emerging non-*fumigatus Aspergillus species* of significance. *Mycoses.* 2009, **52**:206-22.
91. Kulczycki L.L., Kostuch M., Bellanti J.A. A clinical perspective of cystic fibrosis and new genetic findings: relationship of CFTR mutations to genotype-phenotype manifestations. *Am J Med Genet A.* 2003, **116A**:262-7.
92. Kumar R. Mild, moderate, and severe forms of allergic bronchopulmonary aspergillosis: a clinical and serologic evaluation. *Chest.* 2003, **124**:890-2.
93. Kurup V.P., Knutsen A.P., Moss R.B., Bansal N.K. Specific antibodies to recombinant allergens of *Aspergillus fumigatus* in cystic fibrosis patients with ABPA. *Clin Mol Allergy.* 2006, **4**:11.
94. Kusenbach G., Skopnik H., Haase G., Friedrichs F., Dohmen H. *Exophiala dermatitidis* pneumonia in cystic fibrosis. *Eur J Pediatr.* 1992, **151**:344-6.
95. Laoudi Y., Paolini J.B., Grimfed A., Just J. Nebulised corticosteroid and amphotericin B: an alternative treatment for ABPA? *Eur Respir J.* 2008, **31**:908-9.
96. Lass-Flörl C., Mayr A., Perkhofer S., Hinterberger G., Hausdorfer J., Speth C., *et al.* Activities of antifungal agents against yeasts and filamentous fungi: assessment according to the methodology of the European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. *Antimicrob Agents Chemother.* 2008, **52**:3637-41.
97. Latzin P., Hartl D., Regamey N., Frey U., Schoeni M.H., Casaulta C. Comparison of serum markers for allergic bronchopulmonary aspergillosis in cystic fibrosis. *Eur Respir J.* 2008, **31**:36-42.
98. Lazarus A.A., Thilagar B., McKay S.A. Allergic bronchopulmonary aspergillosis. *Dis Mon.* 2008, **54**:547-64.
99. LeGrys V.A., Yankaskas J.R., Quittell L.M., Marshall B.C., Mogayzel P.J., Jr. Diagnostic sweat testing: the Cystic Fibrosis Foundation guidelines. *J Pediatr.* 2007, **151**:85-9.

100. Li Z, Kosorok M.R., Farrell P.M., Laxova A., West S.E., Green C.G., *et al.* Longitudinal development of mucoid *Pseudomonas aeruginosa* infection and lung disease progression in children with cystic fibrosis. *JAMA*. 2005, **293**:581-8.
101. Maiz L., Cuevas M., Quirce S., Canon J.F., Pacheco A., Sousa A., *et al.* Serologic IgE immune responses against *Aspergillus fumigatus* and *Candida albicans* in patients with cystic fibrosis. *Chest*. 2002, **121**:782-8.
102. Marchand E., Verellen-Dumoulin C., Mairesse M., Delaunois L., Brancalone P., Rahier J.F., *et al.* Frequency of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator gene mutations and 5T allele in patients with allergic bronchopulmonary aspergillosis. *Chest*. 2001, **119**:762-7.
103. Marchant J.L., Warner J.O., Bush A. Rise in total IgE as an indicator of allergic bronchopulmonary aspergillosis in cystic fibrosis. *Thorax*. 1994, **49**:1002-5.
104. Mariani-Kurkdjian P., Bingen E. Pathogenic bacteria in cystic fibrosis. *Arch Pediatr*. 2003, **10 Suppl 2**:342s-6s.
105. Mastella G., Rainisio M., Harms H.K., Hodson M.E., Koch C., Navarro J., *et al.* Allergic bronchopulmonary aspergillosis in cystic fibrosis. A European epidemiological study. Epidemiologic Registry of Cystic Fibrosis. *Eur Respir J*. 2000, **16**:464-71.
106. Maurer C., Collon T., Bodiguel V., Cymbalista M., Adotti F., Piquet J. Bronchite aspergillaire chez un patient immunocompétent. *Rev Pneumol Clin*. 2001, **57**:221-4.
107. Maurya V., Gugnani H.C., Sarma P.U., Madan T., Shah A. Sensitization to *Aspergillus* antigens and occurrence of allergic bronchopulmonary aspergillosis in patients with asthma. *Chest*. 2005, **127**:1252-9.
108. McKone E.F., Emerson S.S., Edwards K.L., Aitken M.L. Effect of genotype on phenotype and mortality in cystic fibrosis: a retrospective cohort study. *Lancet*. 2003, **361**:1671-6.
109. McKone E.F., Goss C.H., Aitken M.L. CFTR genotype as a predictor of prognosis in cystic fibrosis. *Chest*. 2006, **130**:1441-7.
110. Meghdas I., Loiez C., Baida N., Dabboussi F., Hamze M., Husson M.O., *et al.* Epidemiology of infections associated to "*Burkholderia cepacia complex*" in the course of cystic fibrosis. *Arch Pediatr*. 2004, **11**:360-6.
111. Meletiadi J., Meis J.F., Mouton J.W., Rodriguez-Tudela J.L., Donnelly J.P., Verweij P.E. *In vitro* activities of new and conventional antifungal agents against clinical *Scedosporium* isolates. *Antimicrob Agents Chemother*. 2002, **46**:62-8.
112. Menichetti F. Anidulafungin, a new echinocandin: effectiveness and tolerability. *Drugs*. 2009, **69 Suppl 1**:95-7.
113. Milla C.E. Allergic bronchopulmonary aspergillosis and cystic fibrosis. *Pediatr Pulmonol*. 1999, **27**:71-3.

114. Millar F.A., Simmonds N.J., Hodson M.E. Trends in pathogens colonising the respiratory tract of adult patients with cystic fibrosis, 1985-2005. *J Cyst Fibros*. 2009, **8**:386-91.
115. Miller P.W., Hamosh A., Macek M., Jr., Greenberger P.A., MacLean J., Walden S.M., *et al*. Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) gene mutations in allergic bronchopulmonary aspergillosis. *Am J Hum Genet*. 1996, **59**:45-51.
116. Minet C., Bonadona A., Tabah A., Karkas A., Mescam L., Schwebel C., *et al*. Mucormycose disséminée d'évolution favorable chez une greffée pulmonaire. *Rev Mal Respir*. 2009, **26**:998-1002.
117. Mondon P., De Champs C., Donadille A., Ambroise-Thomas P., Grillot R. Variation in virulence of *Aspergillus fumigatus* strains in a murine model of invasive pulmonary aspergillosis. *J Med Microbiol*. 1996, **45**:186-91.
118. Moss R.B. Pathophysiology and immunology of allergic bronchopulmonary aspergillosis. *Med Mycol*. 2005, **43 Suppl 1**:S203-6.
119. Mussaffi H., Greif J., Kornreich L., Ashkenazi S., Levy Y., Schonfeld T., *et al*. Severe allergic bronchopulmonary aspergillosis in an infant with cystic fibrosis and her asthmatic father. *Pediatr Pulmonol*. 2000, **29**:155-9.
120. Nagano Y., Millar B.C., Goldsmith C.E., Walker J.M., Elborn J.S., Rendall J., *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**:566-72.
121. Nepomuceno I.B., Esrig S., Moss R.B. Allergic bronchopulmonary aspergillosis in cystic fibrosis: role of atopy and response to itraconazole. *Chest*. 1999, **115**:364-70.
122. Nowak D. Management of asthma with anti-immunoglobulin E: a review of clinical trials of omalizumab. *Respir Med*. 2006, **100**:1907-17.
123. Nucci M., Anaissie E. *Fusarium* infections in immunocompromised patients. *Clin Microbiol Rev*. 2007, **20**:695-704.
124. Panchal N., Bhagat R., Pant C., Shah A. Allergic bronchopulmonary aspergillosis: the spectrum of computed tomography appearances. *Respir Med*. 1997, **91**:213-9.
125. Pasqualotto A.C., Powell G., Niven R., Denning D.W. The effects of antifungal therapy on severe asthma with fungal sensitization and allergic bronchopulmonary aspergillosis. *Respirology*. 2009, **14**:1121-7.
126. Patterson R., Greenberger P.A., Radin R.C., Roberts M. Allergic bronchopulmonary aspergillosis: staging as an aid to management. *Ann Intern Med*. 1982, **96**:286-91.
127. Persat F., Ranque S. Intérêts et limites du sérodiagnostic fongique. *La lettre de l'infectiologue*. janvier-février 2009.
128. Pihet M., Carrere J., Cimon B., Chabasse D., Delhaes L., Symoens F., *et al*. Occurrence and relevance of filamentous fungi in respiratory secretions of patients with cystic fibrosis - a review. *Med Mycol*. 2008:1-11.

129. Pin I., Grenet D., Scheid P., Domblides P., Stern M., Hubert D. Specific aspects and care of lung involvement in adults with cystic fibrosis. *Rev Mal Respir.* 2000, **17**:758-78.
130. Pressler T., Frederiksen B., Skov M., Garred P., Koch C., Hoiby N. Early rise of anti-*Pseudomonas* antibodies and a mucoid phenotype of *Pseudomonas aeruginosa* are risk factors for development of chronic lung infection--a case control study. *J Cyst Fibros.* 2006, **5**:9-15.
131. Reynaud-Gaubert M. Respiratory disease in cystic fibrosis: from physiopathology to therapy. Kinesitherapy and pulmonary transplantation excluded. *Rev Mal Respir.* 1999, **16**:495-509.
132. Ringer S., Hipler U.C., Elsner P., Zintl F., 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**:314-8.
133. Riscili B.P., Wood K.L. Noninvasive pulmonary *Aspergillus* infections. *Clin Chest Med.* 2009, **30**:315-35.
134. Ritz N., Ammann R.A., Casaulta Aebischer C., Schoeni-Affolter F., Schoeni M.H. Risk factors for allergic bronchopulmonary aspergillosis and sensitisation to *Aspergillus fumigatus* in patients with cystic fibrosis. *Eur J Pediatr.* 2005, **164**:577-82.
135. Rodriguez-Tudela J.L., Arendrup M.C., Denning D.W., Donnelly F.M., Lass-Flörl C. *et al.* Method for determination of broth dilution minimum inhibitory concentrations of antifungal agents for conidia forming moulds. *Clin Microbiol Infect.* 2008, **14**:982-4.
136. Ross L.F. Newborn screening for cystic fibrosis: a lesson in public health disparities. *J Pediatr.* 2008, **153**:308-13.
137. Salez F., Bricchet A., Desurmont S., Grosbois J.M., Wallaert B., Tonnel A.B. Effects of itraconazole therapy in allergic bronchopulmonary aspergillosis. *Chest.* 1999, **116**:1665-8.
138. Santos A., Loureiro G., Faria E., Chieira C. Itraconazole, an effective adjunctive treatment for allergic bronchopulmonary aspergillosis. *J Invest Allergol Clin Immunol.* 2009, **19**:404-8.
139. Schwartz H.J., Greenberger P.A. The prevalence of allergic bronchopulmonary aspergillosis in patients with asthma, determined by serologic and radiologic criteria in patients at risk. *J Lab Clin Med.* 1991, **117**:138-42.
140. Seaton A., Seaton R.A., Wightman A.J. Management of allergic bronchopulmonary aspergillosis without maintenance oral corticosteroids: a fifteen-year follow-up. *QJM.* 1994, **87**:529-37.
141. Shah P.L., Mawdsley S., Nash K., Cullinan P., Cole P.J., Wilson R. Determinants of chronic infection with *Staphylococcus aureus* in patients with bronchiectasis. *Eur Respir J.* 1999, **14**:1340-4.
142. Sharma O.P., Chwogule R. Many faces of pulmonary aspergillosis. *Eur Respir J.* 1998, **12**:705-15.

143. Shoseyov D., Brownlee K.G., Conway S.P., Kerem E. *Aspergillus* bronchitis in cystic fibrosis. *Chest*. 2006, **130**:222-6.
144. Skov M., Koch C., Reimert C.M., Poulsen L.K. Diagnosis of allergic bronchopulmonary aspergillosis (ABPA) in cystic fibrosis. *Allergy*. 2000, **55**:50-8.
145. Skov M., McKay K., Koch C., Cooper P.J. Prevalence of allergic bronchopulmonary aspergillosis in cystic fibrosis in an area with a high frequency of atopy. *Respir Med*. 2005, **99**:887-93.
146. Skov M., Poulsen L.K., Koch C. Increased antigen-specific Th-2 response in allergic bronchopulmonary aspergillosis (ABPA) in patients with cystic fibrosis. *Pediatr Pulmonol*. 1999, **27**:74-9.
147. Skov M., Pressler T., Jensen H.E., Hoiby N., Koch C. Specific IgG subclass antibody pattern to *Aspergillus fumigatus* in patients with cystic fibrosis with allergic bronchopulmonary aspergillosis (ABPA). *Thorax*. 1999, **54**:44-50.
148. Snelders E., van der Lee H.A., Kuijpers J., Rijs A.J., Varga J., Samson R.A., *et al*. Emergence of azole resistance in *Aspergillus fumigatus* and spread of a single resistance mechanism. *PLoS Med*. 2008, **5**:e219.
149. Soubani A.O., Chandrasekar P.H. The clinical spectrum of pulmonary aspergillosis. *Chest*. 2002, **121**:1988-99.
150. Speert D.P. Advances in *Burkholderia cepacia* complex. *Paediatr Respir Rev*. 2002, **3**:230-5.
151. Spicuzza L., Sciuto C., Vitaliti G., Di Dio G., Leonardi S., La Rosa M. Emerging pathogens in cystic fibrosis: ten years of follow-up in a cohort of patients. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2009, **28**:191-5.
152. St Denis M., Ramotar K., Vandemheen K., Tullis E., Ferris W., Chan F., *et al*. Infection with *Burkholderia cepacia* complex bacteria and pulmonary exacerbations of cystic fibrosis. *Chest*. 2007, **131**:1188-96.
153. Stevens D.A., Kan V.L., Judson M.A., Morrison V.A., Dummer S., Denning D.W., *et al*. Practice guidelines for diseases caused by *Aspergillus*. Infectious Diseases Society of America. *Clin Infect Dis*. 2000, **30**:696-709.
154. Stevens D.A., Moss R.B., Kurup V.P., Knutsen A.P., Greenberger P., Judson M.A., *et al*. Allergic bronchopulmonary aspergillosis in cystic fibrosis--state of the art: Cystic Fibrosis Foundation Consensus Conference. *Clin Infect Dis*. 2003, **37 Suppl 3**:S225-64.
155. Stevens D.A., Schwartz H.J., Lee J.Y., Moskovitz B.L., Jerome D.C., Catanzaro A., *et al*. A randomized trial of itraconazole in allergic bronchopulmonary aspergillosis. *N Engl J Med*. 2000, **342**:756-62.
156. Summerbell R.C. The benomyl test as a fundamental diagnostic method for medical mycology. *J Clin Microbiol*. 1993, **31**:572-7.

157. Symoens F., Knoop C., Schrooyen M., Denis O., Estenne M., Nolard N., *et al.* Disseminated *Scedosporium apiospermum* infection in a cystic fibrosis patient after double-lung transplantation. *J Heart Lung Transplant.* 2006, **25**:603-7.
158. Talmaciu I., Varlotta L., Mortensen J., Schidlow D.V. Risk factors for emergence of *Stenotrophomonas maltophilia* in cystic fibrosis. *Pediatr Pulmonol.* 2000, **30**:10-5.
159. Thia L.P., Balfour Lynn I.M. Diagnosing allergic bronchopulmonary aspergillosis in children with cystic fibrosis. *Paediatr Respir Rev.* 2009, **10**:37-42.
160. Thompson G.R., Patterson T.F. Pulmonary aspergillosis. *Semin Respir Crit Care Med.* 2008, **29**:103-10.
161. Thomson J.M., Wesley A., Byrnes C.A., Nixon G.M. Pulse intravenous methylprednisolone for resistant allergic bronchopulmonary aspergillosis in cystic fibrosis. *Pediatr Pulmonol.* 2006, **41**:164-70.
162. Thorn S.T., Brown M.A., Yanes J.J., Sherrill D.L., Pugmire J., Anderson K.A., *et al.* Pulmonary nocardiosis in cystic fibrosis. *J Cyst Fibros.* 2009, **8**:316-20.
163. Tillie-Leblond I., Tonnel A.B. Allergic bronchopulmonary aspergillosis. *Allergy.* 2005, **60**:1004-13.
164. Tonnel A.B., Tillie-Leblond I. Refractory asthma: diagnosing allergic bronchopulmonary aspergillosis. *Presse Med.* 2008, **37**:161-6.
165. Troke P., Aguirrebengoa K., Arteaga C., Ellis D., Heath C.H., Lutsar I., *et al.* Treatment of scedosporiosis with voriconazole: clinical experience with 107 patients. *Antimicrob Agents Chemother.* 2008, **52**:1743-50.
166. Valenza G., Tappe D., Turnwald D., Frosch M., Konig C., Hebestreit H., *et al.* Prevalence and antimicrobial susceptibility of microorganisms isolated from sputa of patients with cystic fibrosis. *J Cyst Fibros.* 2008, **7**:123-7.
167. Vazquez J.A. Anidulafungin: a new echinocandin with a novel profile. *Clin Ther.* 2005, **27**:657-73.
168. Verweij P.E., Mellado E., Melchers W.J. Multiple-triazole-resistant aspergillosis. *N Engl J Med.* 2007, **356**:1481-3.
169. Villar A., Munoz X., Cruz M.J., Morell F. Hypersensitivity pneumonitis caused by *Mucor species* in a cork worker. *Arch Bronconeumol.* 2009, **45**:405-7.
170. Walsh T.J., Anaissie E.J., Denning D.W., Herbrecht R., Kontoyiannis D.P., Marr K.A., *et al.* Treatment of aspergillosis: clinical practice guidelines of the Infectious Diseases Society of America. *Clin Infect Dis.* 2008, **46**:327-60.
171. Wark P.A., Hensley M.J., Saltos N., Boyle M.J., Toneguzzi R.C., Epid G.D., *et al.* Anti-inflammatory effect of itraconazole in stable allergic bronchopulmonary aspergillosis: a randomized controlled trial. *J Allergy Clin Immunol.* 2003, **111**:952-7.

172. Warris A., Verweij P.E. Clinical implications of environmental sources for *Aspergillus*. *Med Mycol.* 2005, **43 Suppl 1**:S59-65.

173. Wiederhold N.P., Lewis R.E. Antifungal activity against *Scedosporium species* and novel assays to assess antifungal pharmacodynamics against filamentous fungi. *Med Mycol.* 2009, **47**:422-32.

174. Wojnarowski C., Eichler I., Gartner C., Gotz M., Renner S., Koller D.Y., *et al.* Sensitization to *Aspergillus fumigatus* and lung function in children with cystic fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med.* 1997, **155**:1902-7.

- **REGISTRES**

175. Cystic fibrosis foundation patient registry : annual data report 2007.

- **SITES INTERNET**

176. **Cystic Fibrosis Mutation Database.** Site Internet: <http://www.genet.sickkids.on.ca/cftr>
- Consulté le 08/03/2009

177. **La mucoviscidose.** Site Internet: <http://www.orpha.net/data/patho/Pub/fr/Mucoviscidose-FRfrPub49.pdf> - Consulté le 19/04/2009.

178. **Mucoviscidose et gène CFTR.** Site Internet: <http://atlasgeneticsoncology.org/Educ/CisticFibFr.html> - Consulté le 08/03/2009.

179. **Mucoviscidose et gène CFTR** Site Internet: <http://atlasgeneticsoncology.org/Educ/CisticFibFr.html> - Consulté le 08/03/2009.

ANNEXES

Annexe 1 : Organisation de l'étude

Annexe 2 : Protocole de culture d'analyses biologiques des expectorations

Annexe 3 : Méthode de préparation des géloses

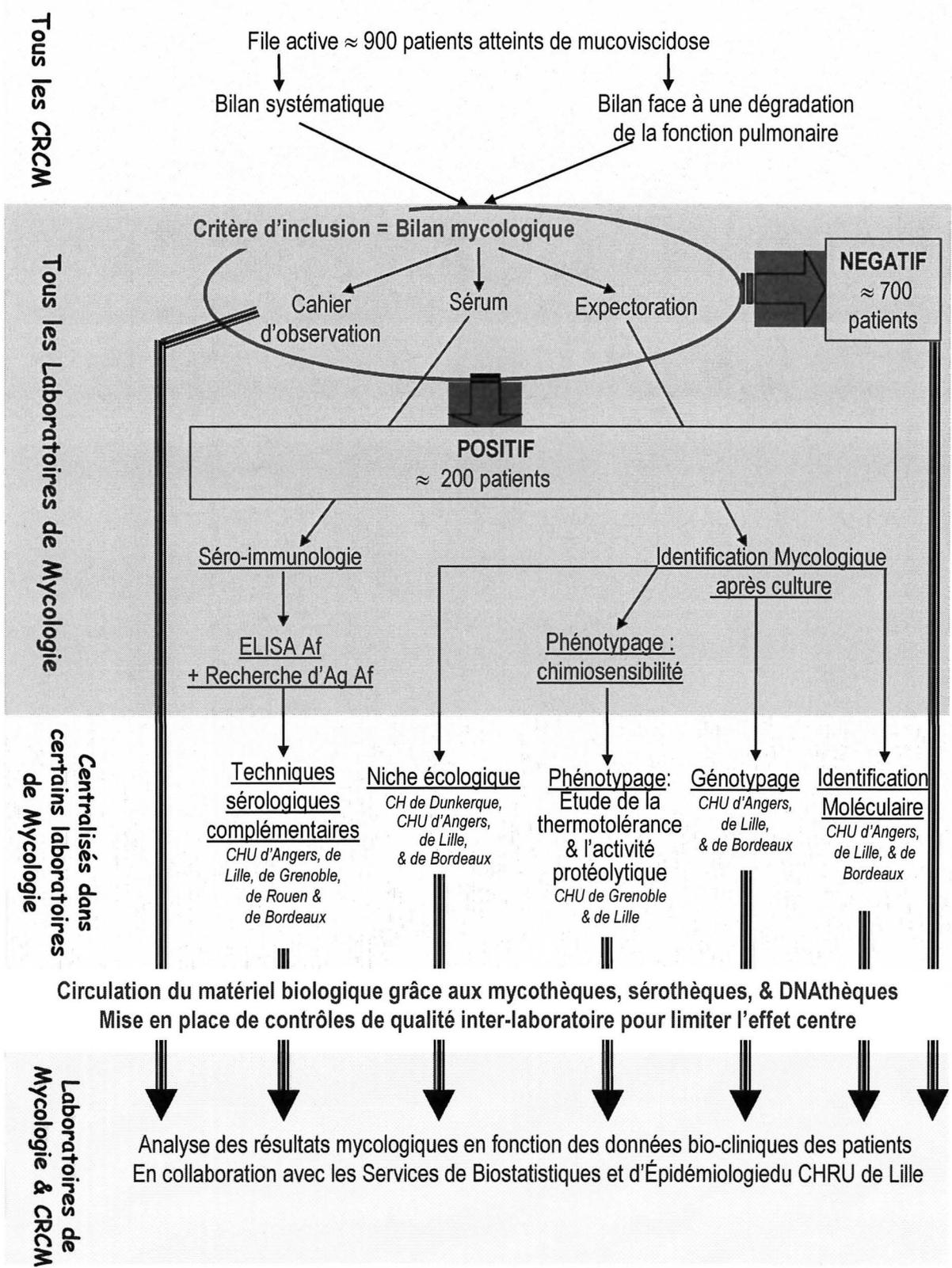
Annexe 4 : Détermination des CMI par la méthode E-Test

Annexe 5 : Techniques sérologiques pour la détection d'IgG dirigées contre *Aspergillus fumigatus*

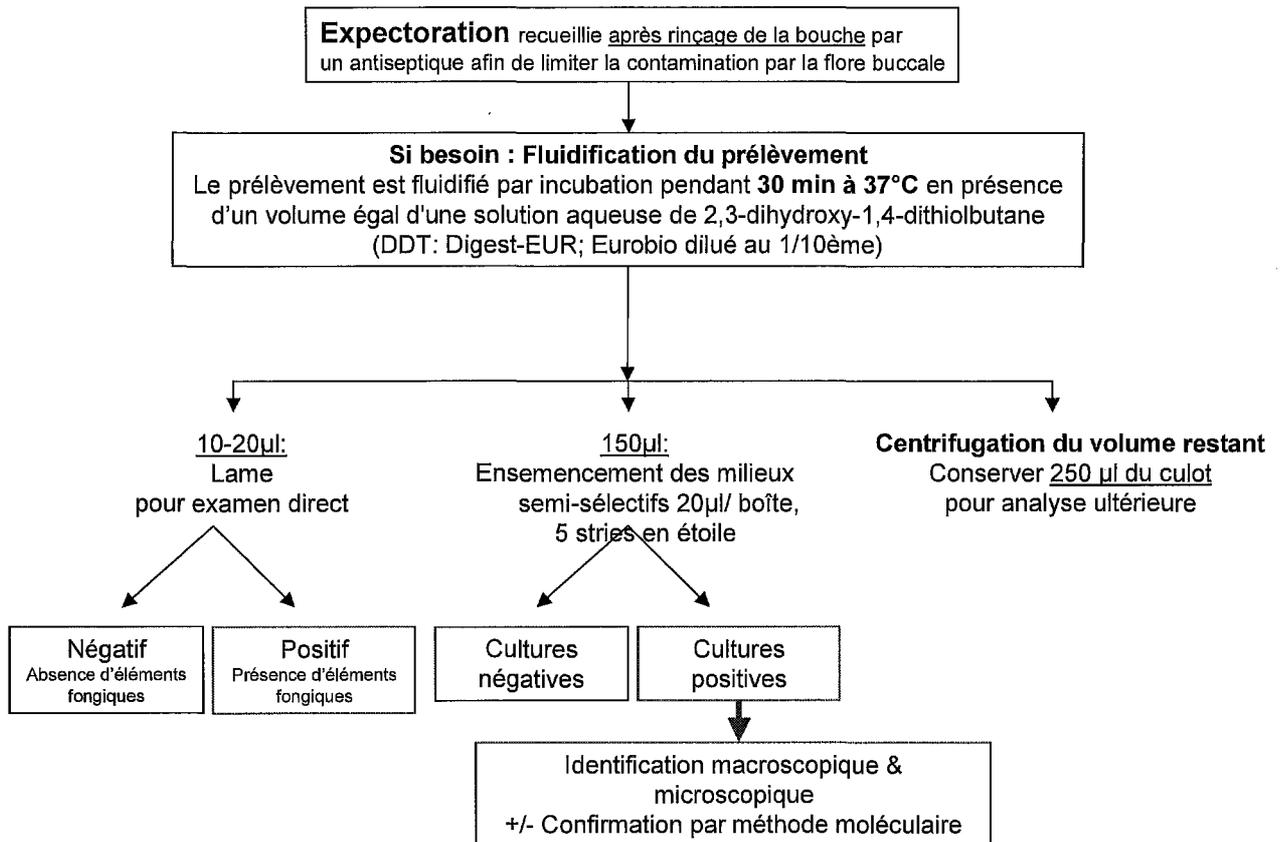
Annexe 6 : Score de Shwachman-Kulczychi

Annexe 7 : Echelle de dyspnée selon Sadoul

Annexe 1 : Organisation de l'étude



Annexe 2 : Protocole de culture d'analyses biologiques des expectorations



Annexe 3 : Méthode de préparation des géloses

Milieu chromogène CAN2 (Biomérieux®)

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

Prix : 1,3 € la gélose

Milieu Sabouraud Chloramphénicol (laboratoires AES®)

Yeast extract.....	5 g
Peptone.....	10 g
Glucose.....	20 g
Agar.....	20 g
Chloramphénicol.....	0,5 g
Eau distillée.....	q.s.p.....1000 mL

Prix : 1,2 € la gélose

Milieu Sabouraud Chloramphénicol Cycloheximide (Becton Dickinson®)

Yeast extract.....	5 g
Peptone.....	10 g
Glucose.....	20 g
Agar.....	20 g
Chloramphénicol.....	0,5 g
Eau distillée.....	q.s.p.....1000 mL
Cycloheximide.....	0,5 g

Prix : 1,2 € la gélose

Milieu Erythritol :

Yeast nitrogen base.....	6,7 g
Méso-érythritol.....	10 g
Chloramphénicol.....	0,5 g
Agar.....	25 g
Eau distillée.....	q.s.p.....1000 mL

Mettre à chauffer 30 minutes au bain-marie à 100°C. Autoclaver 10 minutes à 115°C.

Couler en boîtes de Pétri.

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

Milieu Dichloran-rose bengal additionné de Benomyl :

DRBC agar base.....	31,5 g
Chloramphénicol.....	0,1 g
Eau distillée.....	q.s.p.....1000 mL

Autoclaver 15 minutes à 110°C.

Bénomyl (en sortie d'autoclavage).....	0.008 g
----------------------------------------	---------

Couler en boîtes de Pétri.

Prix : 6.95 € par litre, soit 0,14 € la gélose

Annexe 4 : Détermination des CMI par la méthode E-test

Matériel :

Milieux RPMI : Milieux RPMI 1640 + 2% de glucose + Bacto agar (Casitone agar modifié pour azolés)

Préparation de l'inoculum :

Mise en suspension de colonies isolées à partir d'une colonie pure dans de l'eau physiologique l'aide d'un écouvillon, de manière à obtenir un inoculum équivalent à 0,5 Mac Farland (à contrôler au densitomètre).

Plonger l'écouvillon stérile dans l'inoculum et l'appliquer horizontalement sur un milieu RPMI pour une répartition uniforme.

Laisser sécher 15 minutes.

Dépôt des bandelettes.

Incubation à 27°C pendant 48 heures, voire plus (*Scedosporium sp.*).

Lecture des CMI directement grâce à la bandelette graduée, au point d'intersection avec l'ellipse :

- lecture à 100% d'inhibition pour l'amphotéricine B
- lecture à 80% d'inhibition pour les azolés, la caspofungine et l'anidulafungine.

Annexe 5 : Techniques sérologiques pour la détection d'IgG dirigées contre *Aspergillus fumigatus*

- SEROLOGIE ASPERGILLAIRE PAR ELISA (NON COMMERCIALISEE) :

Principe :

Immuno-essai enzymatique pour détecter toutes les classes d'anticorps anti-*Aspergillus fumigatus* en un temps de réalisation plus court que l'immunoélectrophorèse.

Mode opératoire :

Les plaques sont sensibilisées avec l'antigène aspergillaire obtenu par culture. Elles sont d'abord saturées avec une solution 1 : tampon de lavage + lait à 5%. Cette solution est éliminée. Les témoins positif et négatif, ainsi que les sérums de malades sont dilués au 1/400 dans la solution 1, puis déposés en double sur la plaque. L'incubation est de 30 minutes à 37°C.

Après lavages et séchage de la plaque, le conjugué, un anticorps anti-IgG couplé à un enzyme, est dilué (7 µL dans 10 mL) puis ajouté et incubé pendant 30 minutes à 37°C.

La plaque est ensuite lavée. On prépare par la suite la solution substrat + chromogène, par dissolution d'une capsule de tampon citrate-phosphate et de perborate de sodium dans 100 mL d'eau distillée, en ajoutant à 40 mL de cette solution une pastille de 30 mg d'OPD (ortho-phénylène diamine dihydrochloride). 100 µL de cette solution sont alors rajoutés dans chaque cupule. L'incubation est de 10 à 20 minutes à l'obscurité à température ambiante.

La solution est alors arrêtée par 200 µL d'acide sulfurique dans chaque puits. La lecture se fait au spectrophotomètre Titertek Multiskan MCC/340 à une densité optique de 492 nm. On accepte une différence de densité optique (DO) < 20% entre les deux valeurs trouvées pour un même sérum. Le résultat sera la moyenne des deux DO corrigé par un facteur de correction.

Tampon de lavage :

- Chlorure de sodium NaCl	42,5g
- Disodium hydrogénophosphate Na ₂ HPO ₄	10,65g
- Sodium dihydrogénophosphate Na ₂ H ₂ PO ₄ .2H ₂ O	1,95g
- Tween 20	2,5mL
- Eau permutée	5000mL
- Acide orthophosphorique à 30% H ₃ PO ₄	

Interprétation :

Seuil de positivité pour les patients atteints de mucoviscidose : 1

Zone intermédiaire : 0,6 – 1

- **TECHNIQUE IEP** : TECHNIQUE « MAISON »

Principe :

C'est une technique plus analytique qui associe la sensibilité de la séparation électrophorétique à la spécificité de l'immunoprécipitation. Elle combine la recherche des anticorps précipitants dans le sérum et la recherche des systèmes précipitants majeurs supportant les activités catalasique et chymotrypsique. Les immunoglobulines recherchées sont des IgG dirigées contre les cinq espèces d'*Aspergillus* : *A. fumigatus*, *A. flavus*, *A. nidulans*, *A. niger*, *A. terreus*.

Facteurs de virulence : La catalase est une enzyme du champignon soit pariétale soit cytoplasmique et sécrétée. Elle constitue un système de défense contre les substances oxydantes. La chymotrypsine est sécrétée par le champignon pour lyser les tissus, démontrant ainsi une agressivité plus forte du champignon. La présence ou l'absence de ces systèmes enzymatiques est bien corrélée avec une aggravation ou une amélioration clinique.

Mode opératoire :

Les lames sont déposées sur le cadre portoir, et la gélose est découpée avec le porte-poinçon glissé sur le cadre portoir. Les cuves à IEP sont remplies avec du tampon BAB (450 mL de tampon BAB dans 450 mL d'eau distillée pour chaque cuve). Le portoir de lames est placé sur la cuve, les puits du côté de l'électrode négative. Les antigènes, lyophilisés dans l'eau et vortexés, sont alors déposés dans les puits (10 µL). Les bandes de papier Watman sont déposées pour recouvrir la gélose, et les électrodes sont introduites dans la cuve, pour une migration d'une heure et demie. Ensuite, on enlève la gélose des gouttières et on remplit avec 200 µL de sérum pur à tester vis-à-vis de tous les antigènes. La diffusion est alors de 24 heures à température ambiante et en atmosphère humide.

Le deuxième jour, les lames sont déposées dans un bac contenant le citrate de sodium à 5%, pendant 3 à 5 heures. On effectue quatre lavages avec le tampon de lavage sous agitation, pendant 45 minutes. On réalise une première déminéralisation.

Le troisième jour, les trois autres déminéralisations sont effectuées. Les lames sont séchées, et on réalise les réactions enzymatiques (chymotrypsine et catalase) et la coloration selon la technique globale de l'immunodiffusion.

La lecture se fait par l'absence ou la présence d'arc de précipitation, représentant des complexes antigène/anticorps formé dans le gel.

Interprétation :

La présence de 2 arcs de précipitation ou plus permet d'affirmer le diagnostic d'aspergillose.

État	Nombre de points	Activité	Examen clinique	Croissance nutrition	Radio pulmonaire
Excellent (85 à 100 points)	25 points par case	<ul style="list-style-type: none"> • Activité normale • Tolérance à l'effort normale • Fréquentation scolaire régulière • Joie de vivre 	<ul style="list-style-type: none"> • Ne tousse pas • Pouls et respiration normaux • Pas de dilatation thoracique • Pas d'hippocratisme 	<ul style="list-style-type: none"> • Poids et taille au-dessus de - 0,6 DS • Bon appétit • Selles d'aspect normales 	<ul style="list-style-type: none"> • 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	<ul style="list-style-type: none"> • Légère limitation de l'effort • Parfois passif ou irritable • Bonne fréquentation scolaire 	<ul style="list-style-type: none"> • Petite toux sèche de temps en temps • Pous et respiration normaux au repos • Légère dilatation thoracique • Hippocratisme débutant 	<ul style="list-style-type: none"> • Poids et taille au-dessus de - 1,2 DS • Appétit normal • Selles fréquentes et anormalement molles 	<ul style="list-style-type: none"> • Emphysème minime • Légère accentuation des axes broncho-vasculaires • Pas d'infiltration, pas d'atélectasie
Moyen (56 à 70 points)	15 points par case	<ul style="list-style-type: none"> • Se repose souvent • Passif ou irritable • Assez bonne fréquentation scolaire 	<ul style="list-style-type: none"> • 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 + 	<ul style="list-style-type: none"> • Poids et taille au-dessus de - 2 DS • Maigreur modérée • Appétit normal • Selles volumineuses et fétides 	<ul style="list-style-type: none"> • Emphysème modéré • Hyperclarté pulmonaire • Exagération des opacités broncho-vasculaires • Quelques atélectasies localisées • Parfois infiltrats transitoires
Mauvais (41 à 55 points)	10 points par case	<ul style="list-style-type: none"> • Activité physique diminuée • Dyspnée d'effort • Susceptible, irritable • Mauvaise assiduité scolaire 	<ul style="list-style-type: none"> • Toux chronique, productive • Fréquence du pouls et de la respiration augmentée • Dilatation thoracique avec déformation • Hippocratisme ++ • Cyanose fréquente 	<ul style="list-style-type: none"> • Poids et taille au-dessous de -2 DS • Amyotrophie, maigreur • Appétit diminué • Selles malformées, volumineuses, grasseuses, très fétides 	<ul style="list-style-type: none"> • Emphysème thoracique prononcé • Silhouette cardiaque étroite • Parfois atélectasie segmentaire ou lobaire • Opacités persistantes • Bulles d'emphysème • Franche accentuation des axes broncho-vasculaires
Grave (40 et au-dessous)	5 points par case	<ul style="list-style-type: none"> • Limitation sévère de l'activité physique • Dyspnée d'effort et orthopnée • Inactif • Impossibilité de fréquenter l'école 	<ul style="list-style-type: none"> • Accès de toux fréquents, souvent avec vomissements • Tachypnée, tachycardie • Thorax dilaté en barillet • Râles disséminés • Hippocratisme +++ • Cyanose 	<ul style="list-style-type: none"> • Petit, dénutri • Arrêt de la croissance • Selles fréquentes et volumineuses • Prolapsus rectal fréquent 	<ul style="list-style-type: none"> • Lésions étendues • Emphysème marqué avec nombreux aspects kystiques • Infiltrats et atélectasies, lobaires ou étendues • Bronchectasies et abcès

Annexe 7 : Echelle de dyspnée selon Sadoul

Stade 0 : Dyspnée pour les efforts soutenus (montée 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 en marchant sur terrain plat à son propre rythme

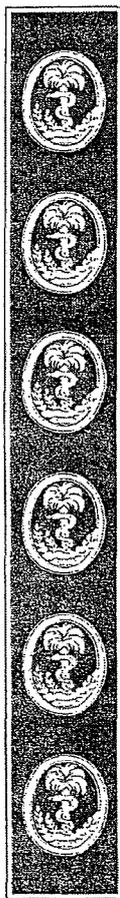
Stade 3 : Dyspnée obligeant à s'arrêter pour reprendre son souffle après quelques minutes ou une centaine de mètres sur terrain plat

Stade 4 : Dyspnée au moindre effort de la vie courante (habillage, déshabillage). Trop essoufflé pour quitter le domicile.





Serment des Apothicairez



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 mœurs 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.

« Evaluation et prise en charge du risque fongique chez le patient atteint de mucoviscidose : résultats de la première visite de l'étude Mucofong au CHU de Grenoble, un an après l'inclusion. »

RESUME :

Les infections broncho-pulmonaires représentent le problème majeur pour les patients atteints de mucoviscidose, et le rôle des infections et/ou colonisation par les micromycètes n'est pas clairement défini. Le programme hospitalier de recherche clinique (PHRC) « Mucofong » a pour but d'améliorer leur détection, de déterminer le rôle pathogène des champignons filamenteux, et de parfaire la prise en charge du risque fongique chez ces patients. Ce travail rapporte les données épidémiologiques, cliniques et biologiques observées chez les 57 patients inclus dans ce programme au cours de la première visite, un an après l'inclusion.

L'épidémiologie fongique de ces observations confirme qu'*Aspergillus fumigatus* est l'espèce majoritairement isolée (41,3% des expectorations). Les autres espèces aspergillaires (*A. flavus* et *A. terreus*) sont moins fréquentes. *Scedosporium apiospermum*, dont la pathogénicité est controversée, est retrouvé chez 7,6% des patients. La colonisation par *Fusarium sp* ou par les mucorales est plus rare mais est à surveiller, compte tenu des difficultés thérapeutiques et des capacités de dissémination, en cas de greffe pulmonaire. La colonisation bronchique aspergillaire est associée le plus souvent à une réponse immunologique. Les infections aspergillaires prouvées correspondent à un cas de bronchite aspergillaire et six cas d'aspergilloses broncho-pulmonaires allergiques (ABPA), soit 10,9% des patients de l'étude. Les dégradations des fonctions pulmonaires sont plus marquées en présence de *P. aeruginosa* et non aggravées par la présence concomitante d'*Aspergillus sp*.

Les *Aspergillus sp* sont sensibles *in vitro* aux antifongiques. D'autres espèces, comme *Mucor sp* ou *Fusarium sp*, présentent une résistance d'emblée importante vis-à-vis des antifongiques systémiques. Aucune émergence de résistance n'a été observée depuis l'inclusion chez les patients déjà colonisés par *A. fumigatus* dans la cohorte de patients suivis.

La prise en compte des données recueillies sur 3 ans par l'étude Mucofong dans les 7 centres investigateurs permettra d'obtenir des observations sur un plus grand nombre de patients, assurant des données précises concernant l'épidémiologie fongique et la pathogénicité des champignons filamenteux chez les patients atteints de mucoviscidose.

MOTS-CLES :

Mucoviscidose, *Aspergillus fumigatus*, *Scedosporium apiospermum*, ABPA, colonisation, *Pseudomonas aeruginosa*, marqueurs biologiques, culture

Présidente du jury : Madame le Professeur R. GRILLOT

Membres :

Monsieur le Professeur H. PELLOUX

Madame le Docteur C. PINEL

Madame le Docteur C. LLERENA

Madame le Docteur C. CRACOWSKI

Thèse soutenue publiquement à la faculté de Grenoble, le 30 avril 2010.

CRUYPENINCK Clémence 3, lot les cerisiers, 38550 CLONAS SUR VAREZE