



**HAL**  
open science

# Caractérisation des atteintes aspergillaires bronchopulmonaires chez les adultes mucoviscidosiques

Lucile Regard

► **To cite this version:**

Lucile Regard. Caractérisation des atteintes aspergillaires bronchopulmonaires chez les adultes mucoviscidosiques. Médecine humaine et pathologie. 2019. dumas-03215134

**HAL Id: dumas-03215134**

**<https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-03215134>**

Submitted on 3 May 2021

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

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



Distributed under a Creative Commons Attribution - NonCommercial - NoDerivatives 4.0  
International License

## AVERTISSEMENT

Cette thèse d'exercice est le fruit d'un travail approuvé par le jury de soutenance et réalisé dans le but d'obtenir le diplôme d'Etat de docteur en médecine. Ce document est mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

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 toute poursuite pénale.

*Code de la Propriété Intellectuelle. Articles L 122.4*

*Code de la Propriété Intellectuelle. Articles L 335.2-L 335.10*

UNIVERSITÉ PARIS DESCARTES  
Faculté de Médecine PARIS DESCARTES

Année 2019

N° 247

THÈSE  
POUR LE DIPLÔME D'ÉTAT  
DE  
DOCTEUR EN MÉDECINE

Caractérisation des atteintes aspergillaires bronchopulmonaires  
chez les adultes mucoviscidosiques

Présentée et soutenue publiquement  
le 23 octobre 2019

Par

***Lucile Regard***

Née le 24 mars 1986 à Paris

Dirigée par M. le Professeur Pierre-Régis Burgel, PU-PH

Jury :

M. Le Professeur Daniel Dusser, PU-PH ..... Président

M. Le Docteur André Paugam, MCU-PH

Mme Le Docteur Clémence Martin, MCU-PH

Mme Le Docteur Isabelle Honore, PH

*Je dédie cette thèse à ma grand-mère, partie trop tôt.*

## **REMERCIEMENTS**

### **Au Président du Jury**

Monsieur le Professeur Daniel DUSSEY,

Je vous remercie de m'avoir accueillie au sein de votre service et de me faire l'honneur de présider le jury de cette thèse. Veuillez trouver l'expression de toute ma gratitude.

### **A mon directeur de thèse**

Monsieur le Professeur Pierre-Régis BURGEL,

Merci de m'avoir confié ce travail et de l'avoir dirigé.

Merci pour ta confiance, ton soutien et ta disponibilité. C'est un honneur pour moi de pouvoir apprendre et travailler à tes côtés.

### **Aux membres du jury :**

Monsieur le Docteur André PAUGAM,

Je vous remercie de l'aide précieuse que vous m'avez apportée pour la réalisation de ce travail. Merci d'avoir accepté de faire partie du jury de cette thèse.

Madame le Docteur Isabelle HONORE,

Je te remercie sincèrement d'avoir accepté de juger ce travail et de me faire l'honneur d'être membre du jury de cette thèse.

Madame le Docteur Clémence MARTIN,

Merci de l'intérêt que tu as bien voulu porter à ce travail.

Merci également pour ton aide, tes conseils et ton soutien indéfectible.

C'est un honneur de te compter parmi les membres du jury de cette thèse.

A Monsieur Jean-Louis PAILLASSEUR, je vous remercie sincèrement de l'aide que vous m'avez apportée pour la réalisation des analyses statistiques qui ont permis l'aboutissement de ce projet.

Aux médecins qui m'ont tant appris et qui m'ont fait grandir tout au long de mon internat : Cécile TOPER, merci d'avoir été une chef de clinique aussi patiente et aidante. Je n'aurai pu souhaiter mieux pour débiter mon internat. Je suis heureuse de pouvoir te compter parmi mes amies. Caroline SATTNER et Laurent SAVALE, merci pour votre bonne humeur et votre joie de vivre, j'ai adoré travailler et apprendre à vos côtés. Fabrice BERTRAND, merci de m'avoir appris à quel point le sens clinique était important. Anthony CHAUVAT, merci d'avoir tenté de m'apprendre l'échographie cardiaque.

A mes compagnons d'internat aux côtés de qui j'ai eu la chance d'apprendre mon métier dans la joie et la bonne humeur, indispensables au quotidien dans l'exercice de notre profession : Alexandre, Léo, Jonathan, Huy-Long, Barbara, Marie-Noëlle, Nicolas, Tiphaine, Delphine, et Hélène.

A mes deux externes préférées : Delphine et Charlotte. Sans vous, mon premier semestre d'internat aurait sûrement eu moins de saveur.

A mes compagnons d'externat, avec qui j'ai passé de nombreuses journées à la bibliothèque universitaire pour réviser ce fichu ECN ... et de nombreuses nuits à danser : Agathe, Morgane, Matthieu, Vincent, Julia, François.

A mes amis de longue date : Aurélie, Marianne, Daniel. A toi Nicolas, merci pour ta présence et tes si précieux conseils.

A mes parents et à mon frère, pour leur soutien indéfectible. Merci de m'avoir guidée. Merci d'avoir toujours répondu présents dans les moments de doute.

A mon grand-père, pour m'avoir transmis son goût pour le travail. Tu as toujours été un exemple pour moi.

A toi Bertrand, sans qui rien ne serait possible.

A toi mon Raphaël, toi avec qui j'apprends depuis bientôt 7 ans le plus incroyable métier du monde.

A toi ma Juliette, ma force vive, mon énergie, ma source d'inspiration quotidienne.

A toi Mamie. J'aurai tant aimé que tu sois là.

## TABLE DES MATIERES

LISTE DES ABREVIATIONS.....	7
INTRODUCTION.....	8
<b>PARTIE I : MALADIE ASPERGILLAIRE DANS LA MUCOVISCIDOSE ETAT ACTUEL DES CONNAISSANCES</b>	
1. <b><u>Rappels physiopathologiques et épidémiologiques sur la mucoviscidose</u></b> .....	9
2. <b><u>Aspergillus fumigatus : caractéristiques mycologiques et pathogénicité</u></b> .....	11
3. <b><u>Réponse immunitaire anti-aspergillaire chez les patients mucoviscidosiques</u></b> .....	13
3.1. <u>Immunité innée</u> .....	13
3.2. <u>Immunité adaptative</u> .....	14
4. <b><u>Méthodes de détection d'Aspergillus fumigatus</u></b> .....	14
4.1. <u>Culture fongique des prélèvements respiratoires</u> .....	14
4.2. <u>Dosage du galactomannane</u> .....	14
4.3. <u>PCR en temps réel</u> .....	15
5. <b><u>Aspergillus fumigatus dans la mucoviscidose : épidémiologie</u></b> .....	16
6. <b><u>Spectre des atteintes aspergillaires dans la mucoviscidose</u></b> .....	17
6.1. <u>Colonisation à Aspergillus fumigatus</u> .....	17
6.2. <u>Bronchite aspergillaire</u> .....	18
6.3. <u>De la sensibilisation à l'aspergillose broncho-pulmonaire allergique</u> .....	18

## **PARTIE II : CARACTERISATION DES ATTEINTES ASPERGILLAIRES BRONCHO-PULMONAIRES CHEZ LES ADULTES MUCOVISCIDOSIQUES**

<b>1. Matériel et méthodes.....</b>	<b>24</b>
1.1. <u>Population de l'étude</u> .....	24
1.2. <u>Recueil des données à l'inclusion</u> .....	24
1.3. <u>Méthodes de détection d'<i>Aspergillus fumigatus</i></u> .....	25
1.3.1. <i>Cultures des expectorations</i> .....	25
1.3.2. <i>Dosage du galactomannane dans les expectorations</i> .....	25
1.3.3. <i>PCR <i>Aspergillus fumigatus</i></i> .....	26
1.4. <u>Définition des groupes</u> .....	26
1.5. <u>Critères de jugement</u> .....	27
1.6. <u>Analyses en clusters</u> .....	27
1.7. <u>Aspects réglementaires et éthiques</u> .....	28
1.8. <u>Méthodologie statistique</u> .....	28
<b>2. Résultats.....</b>	<b>29</b>
2.1. <u>Prévalence des atteintes aspergillaires</u> .....	29
2.2. <u>Impact de l'ABPA et de la sensibilisation sur la fonction respiratoire</u> .....	33
2.3. <u>Évolution des marqueurs aspergillaires au cours du temps</u> .....	35
2.4. <u>Colonisation à <i>A. fumigatus</i> : caractéristiques et impact sur la fonction respiratoire</u> .....	37
2.5. <u>Détection d'<i>Aspergillus fumigatus</i> dans les expectorations</u> .....	39
2.6. <u>Analyse en clusters</u> .....	44
<b>3. Discussion.....</b>	<b>50</b>
<b>CONCLUSION.....</b>	<b>54</b>
<b>BIBLIOGRAPHIE.....</b>	<b>55</b>

## LISTE DES ABREVIATIONS

*A. fumigatus* : *Aspergillus fumigatus*

ABPA : aspergillose broncho-pulmonaire allergique

AIA : asthme induit par *Aspergillus fumigatus*

CFTR: Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator

CRMV : Centre de Référence des Maladies Rares

CVF : Capacité Vitale Forcée

DO : Densité Optique

ECBC : Examen Cytobactériologique des Crachats

GM : Galactomannane

IgE : Immunoglobulines E

IgG : Immunoglobulines G

PCR : Polymerase Chain Reaction

VEMS : Volume Expiratoire Maximal en une Seconde

## INTRODUCTION

La mucoviscidose est une pathologie autosomique récessive dont l'atteinte respiratoire est la manifestation prédominante. Les infections bactériennes pulmonaires chroniques surviennent chez la quasi-totalité des patients, conduisant à un déclin progressif de la fonction respiratoire jusqu'à l'insuffisance respiratoire terminale. Dans la population adulte mucoviscidosique, *Aspergillus fumigatus* (*A. fumigatus*) est le champignon filamenteux le plus fréquemment retrouvé dans les prélèvements des voies aériennes basses. Il est responsable d'un ensemble de manifestations respiratoires allant de la colonisation asymptomatique à l'aspergillose broncho-pulmonaire allergique (ABPA). Chez les enfants mucoviscidosiques, la sensibilisation aspergillaire et l'ABPA sont associées à une augmentation de la consommation antibiotique et des hospitalisations pour exacerbation respiratoire. Peu de données ont été publiées sur la prévalence et l'impact de certaines atteintes respiratoires induites par *A. fumigatus* (sensibilisation, colonisation) sur l'évolution de la fonction respiratoire des patients adultes mucoviscidosiques.

Les objectifs de cette étude sont multiples :

- Décrire la prévalence des atteintes aspergillaires broncho-pulmonaires (sensibilisation, ABPA, colonisation) chez les adultes mucoviscidosiques du Centre de Références des Maladies Rares (CRMRR, filière mucoviscidose) de Cochin et évaluer leur impact sur l'évolution de la fonction respiratoire.
- Évaluer les performances de deux méthodes de détection d'*Aspergillus fumigatus* dans les expectorations des patients mucoviscidosiques, non utilisées en pratique courante : le galactomannane et la PCR en temps réel (PCR).
- Proposer une nouvelle classification construite à partir d'une analyse en clusters et évaluer sa pertinence clinique.

## **PARTIE I : MALADIE ASPERGILLAIRE DANS LA MUCOVISCIDOSE ETAT ACTUEL DES CONNAISSANCES**

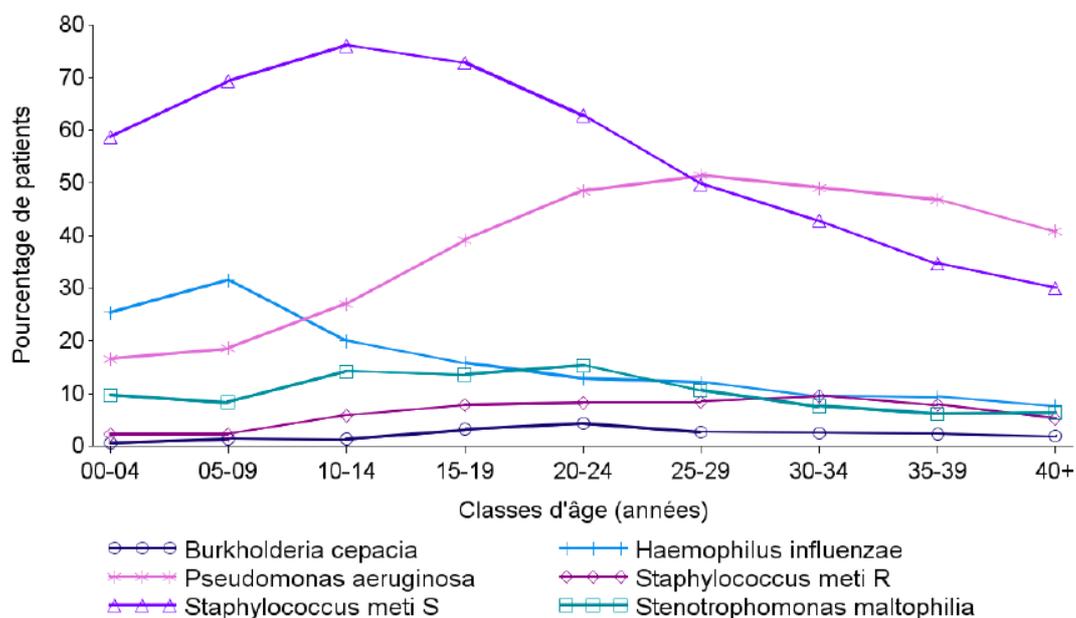
### **1. Rappels physiopathologiques et épidémiologiques sur la mucoviscidose**

La mucoviscidose est une maladie génétique autosomique récessive due à des mutations du gène codant pour la protéine CFTR (Cystic Fibrosis Transmembrane conductance Regulator). C'est la maladie génétique la plus fréquente dans la population caucasienne avec plus de 70 000 individus atteints dans le monde (1). La protéine CFTR est un canal ionique exprimé à la surface des cellules épithéliales des organes producteurs de mucus (voies respiratoires, pancréatiques, biliaires, intestinales, canaux déférents, glandes sudoripares) (2). Son dysfonctionnement entraîne une hyperviscosité des sécrétions épithéliales et est responsable d'une atteinte multisystémique : dilatation des bronches pouvant conduire à l'insuffisance respiratoire, l'insuffisance pancréatique, la dysfonction hépatique, l'infertilité, ou encore entraîner des troubles du métabolisme osseux. Il y a 60 ans, l'espérance de vie des patients mucoviscidosiques ne dépassait pas un an et la principale cause de mortalité était la malnutrition (3). La compréhension des mécanismes physiopathologiques impliqués dans cette pathologie a permis d'améliorer considérablement la prise en charge des patients (mise en place du dépistage néonatal systématique, création des centres spécialisés dans la mucoviscidose, prise en charge nutritionnelle et amélioration des traitements à visée respiratoire), conduisant à une augmentation progressive de la médiane de vie qui dépasse aujourd'hui 45 ans. Avec plus de la moitié de la population mucoviscidosiques ayant atteint l'âge de 18 ans ou plus, la mucoviscidose n'est plus considérée comme une pathologie pédiatrique (1, 4). De récentes études ont estimé qu'en Europe, le nombre global de patients mucoviscidosiques doublerait entre 2010 et 2025, avec une augmentation proche de 75% chez les adultes (5, 6).

A l'heure actuelle, l'atteinte respiratoire est la manifestation prédominante et, malgré les progrès réalisés en terme de prise en charge, elle reste la première cause de mortalité chez les patients atteints de mucoviscidose (7). Le dysfonctionnement de la protéine CFTR entraîne une augmentation de la viscosité du mucus conduisant à une altération de la clairance mucociliaire. S'y associe alors la survenue d'infections bactériennes pulmonaires aiguës récidivantes conduisant à l'infection chronique de l'arbre bronchique par une ou plusieurs bactéries (8). L'infection broncho-pulmonaire chronique s'accompagne d'un état inflammatoire persistant des voies aériennes proximales et distales, associé à des

modifications structurales de type dilatations des bronches, conduisant à une pathologie respiratoire obstructive d'évolution progressive jusqu'à l'insuffisance respiratoire terminale (8). Les pathogènes les plus fréquemment retrouvés dans les expectorations des adultes atteints de mucoviscidose, sont *Pseudomonas aeruginosa* (une bactérie bacille à gram négatif) et *Staphylococcus aureus* (une bactérie encapsulée à gram positif) (Figure 1). L'infection bronchique chronique à *P. aeruginosa* représente un tournant évolutif de la maladie et est associée à un pronostic défavorable, notamment à une altération plus rapide et plus marquée de la fonction respiratoire (9). D'autres pathogènes semblent également impliqués dans l'évolution de la pathologie respiratoire, comme par exemple les mycobactéries non tuberculeuses et les champignons (10). *Aspergillus* est le premier champignon isolé dans les expectorations des patients mucoviscidosiques (11). Grâce à l'utilisation de la spectrométrie de masse et/ou de méthodes de biologie moléculaire, il a été montré qu'au sein du genre *Aspergillus*, *Aspergillus fumigatus* était l'espèce la plus fréquemment retrouvée dans les voies aériennes des patients atteints de mucoviscidose (11-13).

**Figure 1. Répartition des principales bactéries retrouvées dans les poumons des patients atteints de mucoviscidose en fonction de l'âge. D'après (4).**



## **2. *Aspergillus fumigatus* : caractéristiques mycologiques et pathogénicité**

*Aspergillus fumigatus* (*A. fumigatus*) est un champignon filamenteux saprophyte ubiquitaire issu du genre *Aspergillus* et dont les sols sont les principaux réservoirs. Il peut également être retrouvé dans les poussières et les matières organiques en décomposition. *A. fumigatus* est un micro-organisme aéroporté que l'on retrouve dans l'air sous forme de conidies (spores asexués), dont le diamètre compris entre 2 et 3 micromètres lui permet d'être aisément transporté des voies aériennes supérieures jusqu'aux alvéoles pulmonaires ou aux sinus (14). *A. fumigatus* est un pathogène opportuniste : il possède peu de facteurs de virulence et, bien qu'une grande majorité de la population inhale régulièrement des conidies, il ne peut se développer chez son hôte que dans certaines conditions favorisantes (15). Les principaux facteurs favorisant le développement d'*A. fumigatus* dans les voies aériennes chez l'homme sont :

- Des facteurs locaux : rupture de l'intégrité de la barrière épithéliale ou du tapis mucociliaire, cavités pulmonaires néoformées (caverne, bulle d'emphysème), anomalies bronchiques.
- Des facteurs généraux : l'immunosuppression (hémopathies, allogreffe de cellules souches hématopoïétiques, neutropénie, traitements immunosuppresseurs...) et l'hypersensibilité.
- Des facteurs environnementaux comme une forte exposition aux conidies (sources de poussières ou d'humidité inhabituellement importantes par exemple).

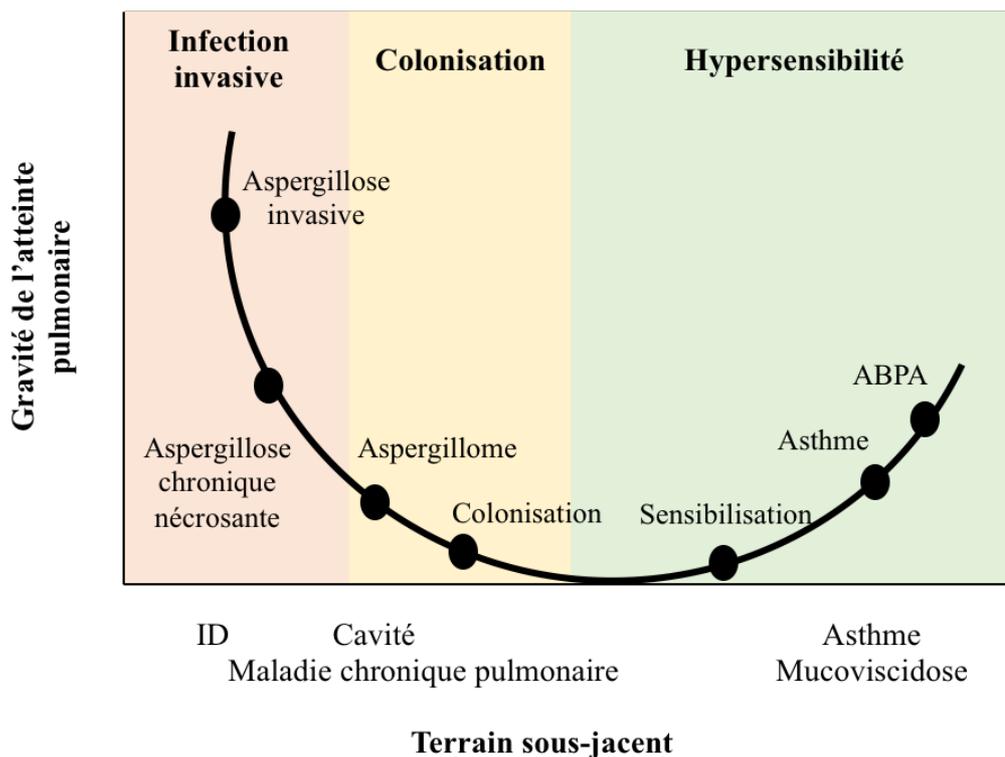
*A. fumigatus* peut être responsable d'atteintes pulmonaires très variables selon le terrain et le statut immunitaire de l'hôte (Figure 2). La colonisation des voies aériennes par *A. fumigatus* semble être une étape préalable indispensable au développement d'une maladie aspergillaire chronique (16). Cependant, la définition de la colonisation bronchique à *A. fumigatus* n'est pas consensuelle et varie selon les auteurs : certains la considèrent dès lors que le champignon est retrouvé dans les prélèvements respiratoires d'un patient (17) ; pour d'autres, la colonisation à *A. fumigatus* implique des prélèvements positifs répétés (au moins 2 positifs) pendant un laps de temps significatif (au moins 6 mois) (18).

On distingue habituellement quatre grandes catégories de pathologies : (a) les infections invasives touchant essentiellement les patients fortement immunodéprimés et caractérisées par la présence de filaments dans les tissus ; (b) les formes chroniques causées par la colonisation des muqueuses et touchant les patients présentant des pathologies pulmonaires

chroniques et/ou une immunodépression modérée ; (c) les formes cavitaires (aspergillome) ; (d) les manifestations d'hypersensibilité (sensibilisation, asthme, aspergillose broncho-pulmonaire allergique) (14).

Les patients atteints de mucoviscidose sont particulièrement sujets au développement de pathologies aspergillaires allergiques (sensibilisation, ABPA). L'aspergillose pulmonaire invasive et les aspergilloses pulmonaires chroniques sont des pathologies qui ne sont qu'exceptionnellement rencontrées chez les patients mucoviscidosiques non transplantés ; elles ne seront donc pas abordées ici.

**Figure 2. Représentation graphique des atteintes pulmonaires dues à *Aspergillus fumigatus* en fonction du terrain et du statut immunitaire de l'hôte.**



ABPA : aspergillose broncho-pulmonaire allergique ; ID : immunodépression. D'après (19) et (20), modifiés.

### **3. Réponse immunitaire anti-aspergillaire chez les patients mucoviscidosiques**

#### **3.1. Immunité innée**

Différents mécanismes de défense sont impliqués dans l'immunité innée anti-aspergillaire. La première barrière de défense est celle constituée par l'épithélium respiratoire. L'altération de la clairance mucociliaire induite par les anomalies du canal CFTR chez les patients mucoviscidosiques constitue un des principaux facteurs favorisant la colonisation de l'arbre bronchique par *A. fumigatus*. Les conidies inhalées sont bloquées dans le mucus visqueux et ne sont pas éliminées des voies aériennes (21). Un rôle direct de CFTR dans la clairance des spores aspergillaires par les cellules épithéliales a également été suggéré (22) et serait confirmé par les résultats obtenus avec l'ivacaftor, une molécule potentialisatrice de CFTR. L'ivacaftor réduirait la colonisation à *A. fumigatus* chez les patients traités porteurs de la mutation G551D (23). Par ailleurs, la Pentraxine 3 (un récepteur PRR – Pattern Recognition Receptor) est sécrétée par les cellules épithéliales bronchiques en réponse à *A. fumigatus* et contribue à son élimination (24). Les taux de Pentraxine 3 seraient plus faibles dans les expectorations des patients mucoviscidosiques.

Au niveau alvéolaire, les principales cellules de l'immunité innée mise en jeu dans la défense anti-aspergillaire sont les macrophages et les polynucléaires neutrophiles (PNN). Les macrophages alvéolaires ont un rôle clé dans la défense antifongique, via la destruction directe des conidies par phagocytose, mais également par la régulation de la réponse inflammatoire induite par *A. fumigatus*. Il existe à ce jour peu de données sur l'interaction macrophage – *A. fumigatus* dans la mucoviscidose. Certaines études ont montré des anomalies de phagocytose dans la défense anti-pseudomonas par les macrophages de patients mucoviscidosiques, ce qui laisse suggérer que de telles anomalies pourraient être impliquées avec *A. fumigatus* (25). De plus, les corticoïdes inhiberaient partiellement la phagocytose des spores par les macrophages. Les polynucléaires ont également un rôle dans l'élimination des conidies et des filaments aspergillaires (26). La protéine CFTR est exprimée dans les parois des phagosomes des PNN. La dysfonction de CFTR dans les phagosomes entraînerait une surproduction de radicaux libres lors de la phagocytose d'*A. fumigatus* qui favoriserait l'inflammation locale et serait associée au degré de sévérité de l'atteinte pulmonaire (27).

### 3.2. Immunité adaptative

Le rôle des lymphocytes T dans la défense pulmonaire anti-aspergillaire est bien établie. Les lymphocytes T Th1 CD4<sup>+</sup> permettent l'inflammation et la clairance fongique, tandis que les cellules Th17 sont essentielles au recrutement des neutrophiles. Les cellules Th2 sont impliquées dans la réaction allergique et enfin la réponse Th9 joue un rôle dans le développement de la fibrose. Les lymphocytes T déficients en CFTR présentent une réponse inadaptée aux pathogènes avec une réponse Th2 excessive et une tendance au développement de pathologies respiratoires allergiques en réponse à *A. fumigatus* mettant en jeu les IgE (28).

## 4. Méthodes de détection d'*Aspergillus fumigatus*

### 4.1. Culture fongique des prélèvements respiratoires

C'est la méthode la plus utilisée pour mettre en évidence la présence d'*A. fumigatus* dans les voies respiratoires des patients. La culture des prélèvements (expectoration, aspiration, lavage broncho-alvéolaire) doit être réalisée sur un milieu spécifique (ex : milieu de Sabouraud). Cette méthode présente plusieurs inconvénients : elle est peu standardisée et donc sujette à des variations de sensibilité selon les centres prenant en charge les patients mucoviscidosiques (traitement différent des échantillons, milieux et temps de culture différents) (29). La répétition des prélèvements en cas de suspicion clinique et/ou radiologique de pathologie aspergillaire est donc recommandée. Du fait de la mauvaise sensibilité de cette technique, plusieurs auteurs se sont intéressés aux méthodes permettant de détecter *A. fumigatus* de façon indépendante de la culture classique : la détection d'antigène aspergillaire (galactomannane) et la détection d'ADN aspergillaire (PCR en temps réel).

### 4.2. Dosage du galactomannane

Le galactomannane (GM) est un polysaccharide de la paroi produit lors de la phase de croissance logarithmique d'*A. fumigatus* mais aussi d'autres champignons (ex : *Penicillium spp.*). Sa présence au sein d'un prélèvement témoigne d'une croissance fongique active ; le GM reflèterait donc un processus infectieux plutôt qu'une simple colonisation (30). Il peut

être dosé par méthode ELISA dans le sérum ou dans les prélèvements respiratoires (expectorations ou LBA).

Le dosage du GM dans le sérum est principalement utilisé dans le diagnostic de l'aspergillose pulmonaire invasive chez les patients fortement immunodéprimés (31). Chez les patients atteints de mucoviscidose, l'API reste un diagnostic exceptionnel (32). Récemment, Träger et al. ont montré que les patients mucoviscidosiques colonisés à *A. fumigatus* avaient des taux sériques plus élevés de GM, sans pour autant retrouver de corrélation significative entre l'élévation du GM sérique et la fonction respiratoire (33). Ces résultats s'opposent à ceux de Warren et al. en 2012. Ces derniers avaient dosé le GM dans le sérum de 137 patients : tous les dosages étaient négatifs et il n'y avait pas de différence entre les patients colonisés ou non à *A. fumigatus*. L'intérêt de doser le GM dans le sérum des patients atteints de mucoviscidose apparaît limité à ce jour.

Le dosage du GM dans les expectorations des patients mucoviscidosiques a été évalué pour la première fois en 2013 par Baxter et al. (34). Dans cette étude, les auteurs montraient que le dosage du GM dans les expectorations pouvait être réalisé de manière reproductible et fiable. Ils suggéraient également qu'un dosage négatif de GM dans les expectorations (index de DO < 0,5) pouvait être utile pour identifier les patients ne présentant pas d'atteinte respiratoire liée à *A. fumigatus*. Plus récemment, Brandt et al. ont utilisé le dosage du GM dans les expectorations de patients mucoviscidosiques pour diagnostiquer les bronchites aspergillaires (35). Dans leur cohorte de 22 patients, 10 (45,5%) avaient un dosage positif du GM dans les expectorations, dont les 2 patients (100%) présentant une bronchite aspergillaire. Ces études suggèrent que le dosage du GM dans les expectorations de patients mucoviscidosiques pourrait avoir un intérêt pour distinguer un « portage asymptomatique » d'*A. fumigatus* d'un processus infectieux bronchique débutant ou en cours, nécessitant potentiellement un traitement antifongique.

#### 4.3. PCR en temps réel

La PCR en temps réel permet d'amplifier l'ADN d'*Aspergillus* au sein d'un prélèvement. En l'absence de standardisation des techniques, elle n'est actuellement pas utilisée en routine pour rechercher *A. fumigatus* dans les expectorations des patients mucoviscidosiques. En 2013, Baxter et al. avaient comparé les performances de la PCR aspergillaire à celle de la culture standard et avaient montré que la PCR était plus sensible pour détecter *Aspergillus* dans les expectorations d'adultes mucoviscidosiques (34). Plus

récemment, Guegan et al. ont comparé différents types de PCR aspergillaire (Kits commerciaux et PCR dites « maisons ») dans les expectorations de patients mucoviscidosiques. Les auteurs ont obtenu des résultats comparables entre les techniques, avec une sensibilité supérieure de la PCR par rapport à la culture fongique standard (36).

## **5. *Aspergillus fumigatus* dans la mucoviscidose : épidémiologie**

Selon les études les plus récentes et les données de registre, *A. fumigatus* serait retrouvé dans les prélèvements respiratoires de 11% à 57% des patients mucoviscidosiques, avec une fréquence plus élevée chez les adolescents et les adultes (4, 37-41). L'âge moyen d'acquisition d'*A. fumigatus* se situerait entre 9 et 16 ans selon les études (37, 39, 42), bien que, du fait des difficultés de prélèvement chez les jeunes enfants (< 6 ans), la prévalence d'*A. fumigatus* soit vraisemblablement sous-estimée dans la population pédiatrique. Les données issues de registre sont probablement également sous-estimées du fait d'une importante hétérogénéité dans le type, la fréquence et les méthodes de culture des échantillons selon les centres (25).

Les variations de prévalence rapportées entre les études prospectives récentes peuvent aussi s'expliquer par plusieurs autres facteurs. Tout d'abord, il n'existe actuellement aucun consensus pour définir la colonisation à *A. fumigatus* (qu'elle soit associée ou non à une pathologie aspergillaire). Dans une grande majorité des études réalisées jusqu'à la fin des années 90, la colonisation bronchique à *A. fumigatus* était définie par la présence d'au moins un prélèvement respiratoire positif en culture (25) avec une grande hétérogénéité dans les populations étudiées et dans le nombre de prélèvements effectués durant l'étude. Dans ce contexte, certains auteurs ont proposé des critères plus stringents pour définir la colonisation à *A. fumigatus*. En 1999, Bargon et al. la définissaient par au moins 2 cultures positives sur un minimum de 4 échantillons sur une période d'un an (43). Dans une étude hollandaise de 2011, les auteurs ont quant à eux défini la colonisation à *A. fumigatus* par la présence d'au moins 50% des cultures positives en 1 an (44). En 2012, Fillaux et al. définissaient les « cultures positives persistantes » quand *A. fumigatus* était retrouvé dans au moins 3 prélèvements réalisés à 1 mois d'intervalle minimum sur une période de 6 mois (45). Plus récemment, Saunders et al. introduisaient le terme de colonisation chronique persistante ( $\geq$  2 cultures positives pendant 1 an) et de colonisation transitoire (1 culture positive sur 1 an) (42). C'est cette dernière définition qui est maintenant la plus utilisée dans la littérature (37, 46). D'autres

facteurs tels que l'exposition environnementale (des concentrations variables en conidies au domicile des patients par exemple (47)), l'interaction avec d'autres pathogènes (inhibition de la croissance d'*A. fumigatus* par des produits de sécrétion de *Pseudomonas aeruginosa* (48)), ou les traitements entrepris (croissance d'*A. fumigatus* favorisée par les corticoïdes inhalés (49) ou l'azithromycine (18)) pourraient contribuer à l'hétérogénéité des prévalences rapportées dans la littérature. Un point important à souligner est que, outre la disparité des définitions utilisées, une grande majorité des études publiées sur la prévalence de la colonisation à *A. fumigatus* porte sur des cohortes pédiatriques. L'étude de grande envergure la plus récente portait sur une population mixte et l'âge moyen des patients inclus était de 15,5 ans (37).

## **6. Spectre des atteintes aspergillaires dans la mucoviscidose**

### **6.1. Colonisation à *A. fumigatus***

Bien que sa définition ne soit pas consensuelle, de nombreuses études se sont intéressées à l'impact de la colonisation pulmonaire à *A. fumigatus* sur la fonction respiratoire des patients mucoviscidosiques, avec des résultats souvent discordants. Ramsey et al. ont analysé les LBA d'enfants entre l'âge de 3 mois et 2 ans et ont corrélé les cultures des LBA au VEMS de ces mêmes enfants à l'âge scolaire. Ils ont montré que la présence précoce de pathogènes pro-inflammatoires (*Haemophilus influenzae*, *Streptococcus pneumoniae* et *Aspergillus*) dans les voies aériennes des enfants était associée à une réduction de la fonction respiratoire (50). Dans d'autres études, les patients colonisés à *A. fumigatus* présentaient des exacerbations respiratoires plus fréquentes, une fonction respiratoire plus basse (46) ou un déclin plus rapide de la fonction respiratoire (45, 51). Mc Mahon et al. ont également montré que la colonisation à *A. fumigatus* était significativement associée à une atteinte scannographique plus sévère chez les patients mucoviscidosiques (52). Cependant, dans un nombre non négligeable d'études, la colonisation aspergillaire n'était pas significativement liée à l'évolution de la fonction respiratoire (18, 37, 44, 53). Ces résultats discordants peuvent s'expliquer par l'hétérogénéité des pratiques (type et fréquence des prélèvements, technique de culture), l'utilisation de critères différents pour définir la colonisation aspergillaire, mais aussi l'utilisation de critères de jugements peu sensibles dans les études (VEMS seul par exemple). Par ailleurs, tout comme sa prévalence, l'impact de la colonisation à *A. fumigatus* sur le pronostic respiratoire des patients mucoviscidosiques n'a été étudié que quasi-exclusivement

dans des populations pédiatriques. Les données publiées chez les adultes sont soit anciennes, soit mélangées à des données pédiatriques.

## 6.2. Bronchite aspergillaire

La bronchite aspergillaire est une entité clinique décrite pour la première fois chez les patients atteints de mucoviscidose en 2006 par Shoseyov et al. (54). Elle a été définie par les auteurs comme une association de : (a) cultures des expectorations positives à *A. fumigatus* ; (b) exacerbations respiratoires persistantes malgré des traitements antibiotiques ; (c) exclusion du diagnostic d'ABPA ; et (d) évolution favorable sous antifongiques (54). Presque 10 ans plus tard, Baxter et al. proposaient une définition modifiée : élévation du galactomannane (index de densité optique > 0,5) et PCR *Aspergillus* positive dans les expectorations, augmentation des IgG anti-aspergillaire (> 75mg/l), le tout associé à un taux bas d'IgE totales (< 500kU/l) et d'IgE spécifiques (Tableau I) (34). La prévalence de la bronchite aspergillaire est assez faible parmi les patients mucoviscidosiques. Selon les définitions et selon les études, elle serait estimée entre 2% et 8% (35, 54, 55).

## 6.3. De la sensibilisation à l'aspergillose broncho-pulmonaire allergique

La sensibilisation à *A. fumigatus* est définie par un test cutané positif à *A. fumigatus* et/ou un taux sérique élevé d'IgE spécifiques anti-*A. fumigatus*. Selon Baxter et al., le diagnostic de sensibilisation aspergillaire chez les adultes mucoviscidosiques est porté indépendamment des résultats de la culture ou de la PCR *Aspergillus* dans les expectorations. Les IgE totales peuvent être légèrement élevées (généralement < 500 kU/l), le galactomannane est négatif et le taux d'IgG anti-aspergillaire est faible (34) (Tableau I). Sa prévalence serait estimée entre 25 et 40% chez les patients mucoviscidosiques (56, 57). Plusieurs auteurs la considèrent comme une forme précoce d'ABPA (34, 58).

L'ABPA est une maladie induite par le développement d'une hypersensibilité aux antigènes aspergillaires qui induisent une réaction de type I (médiée par les IgE) mais également des réactions de type III (médiées par les IgG) et IV (médiation de type cellulaire), sans invasion tissulaire (59). Cette pathologie touche essentiellement les patients asthmatiques et les patients atteints de mucoviscidose, mais elle peut également toucher les patients présentant une dilatation des bronches ou une broncho-pneumopathie chronique obstructive (BPCO). L'ABPA est une pathologie respiratoire fréquente chez les patients atteints de

mucoviscidose. Dans une revue de la littérature ayant analysé les données de 45 études à travers le monde, sa prévalence variait entre 3 et 25%, avec une prévalence poolée de 10,1% chez les adultes (56). Les auteurs rapportaient néanmoins une grande hétérogénéité des populations étudiées et des critères utilisés pour le diagnostic positif d'ABPA. Des critères diagnostiques spécifiques à la population mucoviscidosique ont été publiés en 2003 et restent aujourd'hui la référence (60). Les signes cliniques, fonctionnels et radiologiques de l'ABPA se chevauchant avec ceux de l'atteinte respiratoire de la mucoviscidose (expectorations épaisses, dyspnée sifflante, syndrome obstructif, dilatation des bronches ...), les critères proposés par la CFF (Cystic Fibrosis Foundation) diffèrent de ceux utilisés chez les patients non mucoviscidosiques (Tableau II) (60). Afin de ne pas méconnaître le diagnostic, les auteurs recommandent de pratiquer une surveillance annuelle des IgE totales, en particulier chez les patients de plus de 6 ans, à compléter par un dosage des IgE aspergillaires et de la sérologie si les IgE totales sont > 500 kUI/l (60). Baxter et al. ont proposé en 2013 une nouvelle classification des atteintes respiratoires aspergillaires chez les patients adultes mucoviscidosiques, basée uniquement sur l'utilisation des marqueurs biologiques : le dosage du GM et la PCR *Aspergillus* dans les expectorations, les taux sériques d'IgE totales, d'IgE *Aspergillus* et la sérologie aspergillaire. Cette classification a été développée afin de proposer un algorithme diagnostique permettant de classer les patients en 4 catégories : (I) Absence d'atteinte ; (II) ABPA ; (III) Sensibilisation aspergillaire ; (IV) Bronchite aspergillaire (Tableau I.).

La sensibilisation aspergillaire et l'ABPA sont toutes deux associées à une augmentation de la morbidité chez les patients mucoviscidosiques. En 1997, Wojnarowski et al. montraient que les enfants mucoviscidosiques sensibilisés à *A. fumigatus* (IgE spécifiques et/ou prick test positifs, IgE totales élevées) avaient une moins bonne fonction respiratoire que les patients non sensibilisés (57). Toujours dans la population pédiatrique, une étude datant de 2006 retrouvait un déclin plus rapide de la fonction respiratoire chez les enfants mucoviscidosiques sensibilisés, qu'ils présentent ou non des critères d'ABPA (58). D'autres études plus récentes mêlant des populations pédiatriques et adultes retrouvaient des données similaires (45, 61). Dans leur étude, Baxter et al. trouvaient que les patients adultes mucoviscidosiques sensibilisés à *A. fumigatus* recevaient environ deux fois plus d'antibiotiques intraveineux que les patients non sensibilisés sur une période de suivi de 2 ans (34). Dans une étude cas-contrôle datant de 2018, De Baets et al. montraient qu'au moment du diagnostic d'ABPA (basé sur l'utilisation des critères CFF), les patients mucoviscidosiques (cohorte mixte pédiatrique et adulte) avaient une fonction respiratoire significativement plus

basse que les patients du groupe contrôle (62). Dans l'année suivant le diagnostic, les patients du groupe ABPA étaient hospitalisés plus souvent et recevaient plus d'antibiotiques intraveineux que les patients du groupe contrôle.

Comme pour la colonisation aspergillaire, les études portant sur l'impact de la sensibilisation aspergillaire et de l'ABPA sur le pronostic respiratoire des patients sont anciennes et portent quasi-exclusivement sur des cohortes pédiatriques ou mixtes.

**Tableau I. Classification des atteintes respiratoires induites par *A. fumigatus* chez les adultes atteints de mucoviscidose. D'après (34).**

Classe	GM (Expect.)	PCR <i>Aspergillus</i> (Expect)	IgE Tot.	IgE <i>Aspergillus</i>	Sérologie aspergillaire
<b>I : Pas d'atteinte</b>	-	+/-	N	N	-
<b>II : ABPA</b>	+	+	↑	↑	↑
<b>III : Sensibilisation à <i>A. fumigatus</i></b>	-	+/-	↑*	↑*	-
<b>IV : Bronchite aspergillaire</b>	+	+	N	N	↑

ABPA : aspergillose broncho-pulmonaire allergique ; *A. fumigatus* : *Aspergillus fumigatus* ; GM : galactomannane ; Expect. : expectorations ; N : normal ; \* moins élevé que dans l'ABPA.

**Tableau II. Critères diagnostiques de l'aspergillose broncho-pulmonaire allergique chez les patients mucoviscidosiques selon les recommandations de la Cystic Fibrosis Foundation. D'après (60).**

ABPA certaine (= Classic Case)	ABPA possible (Minimal diagnostic criteria)
<b>1. Exacerbation respiratoire aiguë ou subaiguë sans autre cause identifiée</b>	1. Exacerbation respiratoire aiguë ou subaiguë sans autre cause identifiée
<b>2. IgE totales &gt; 1000 kU/l *</b>	2. IgE totales > 500 kU/l **
<b>3. Prick test <i>Aspergillus</i> positif ou IgE <i>A. fumigatus</i> sériques élevées</b>	3. Prick test <i>Aspergillus</i> positif ou IgE <i>A. fumigatus</i> sériques élevées
<b>4. Sérologie aspergillaire positive</b>	4. Un des 2 critères suivants :
<b>5. Apparition d'images radiologiques compatibles (RP ou scanner) malgré un traitement à visée respiratoire optimal (antibiothérapie, kinésithérapie, ...)</b>	- Sérologie aspergillaire positive <b>Ou</b> - Apparition d'images radiologiques compatibles (RP ou scanner) malgré un traitement à visée respiratoire optimal

\* sauf en cas de corticothérapie systémique (arrêt des corticoïdes et répéter le dosage).

\*\* répéter le dosage dans les 1 à 3 mois si IgE totales 200-500 kU/l ou bien à distance de l'arrêt des corticoïdes

ABPA : aspergillose broncho-pulmonaire allergique ; RP : radiographie pulmonaire

En pratique, l'ABPA doit être suspectée chez tout patient mucoviscidosique présentant une dégradation de la fonction respiratoire ne répondant pas aux traitements habituels (antibiothérapie, kinésithérapie, mucolytiques...) (63). Une fois le diagnostic confirmé, un traitement doit être instauré et dont les principaux objectifs sont : (a) d'empêcher l'évolution vers la fibrose et (b) de retarder le déclin de la fonction respiratoire (64). La prise en charge thérapeutique est similaire à celle des patients non mucoviscidosiques et associe en premier lieu l'éviction des sources potentielles d'*A. fumigatus* (poussières, humidité, moisissures) et la corticothérapie systémique (60, 65). Les antifongiques azolés peuvent être utilisés en deuxième intention, chez les patients présentant une ABPA cortico-résistante, corticodépendante ou présentant des effets indésirables importants des corticoïdes par voie générale (60). De plus, chez certains patients présentant une sensibilisation à *A. fumigatus* associée à une dégradation de la fonction respiratoire malgré une prise en charge respiratoire optimale (antibiothérapie, kinésithérapie), l'introduction d'un traitement antifongique peut se discuter au cas par cas (30). Dans tous les cas, des dosages thérapeutiques doivent être effectués régulièrement (risque d'inefficacité et d'émergence de résistance en cas de sous-dosage, risque de iatrogénie en cas de surdosage). L'efficacité de l'omalizumab est incertaine dans cette indication, les données publiées étant discordantes (66-69) (70). La seule étude randomisée comparant différentes doses d'omalizumab dans le traitement de l'ABPA chez des patients mucoviscidosiques a dû être interrompue en raison de difficultés de recrutement et d'effets secondaires importants (71).

Comme nous l'avons vu, *A. fumigatus* est responsable d'une morbidité significative dans la population mucoviscidique. Néanmoins, l'impact de certaines manifestations comme la colonisation reste controversé. De plus, les études portant uniquement sur les patients adultes sont rares.

L'objectif principal de cette étude est de décrire la prévalence des atteintes aspergillaires broncho-pulmonaires chez les adultes mucoviscidosiques du Centre de Références des Maladies Rares (CRMR, filière mucoviscidose) de l'hôpital Cochin et d'évaluer leur impact sur l'évolution de la fonction respiratoire.

Les objectifs secondaires sont :

- Évaluer les performances de deux méthodes de détection d'*Aspergillus fumigatus* dans les expectorations des patients mucoviscidosiques, non utilisées en pratique courante : le galactomannane et la PCR en temps réel (PCR).
- Proposer une nouvelle classification des atteintes aspergillaires chez les patients adultes mucoviscidosiques, construite à partir d'une analyse en clusters et évaluer sa pertinence clinique.

## **PARTIE II : CARACTERISATION DES ATTEINTES ASPERGILLAIRES BRONCHO-PULMONAIRES CHEZ LES ADULTES MUCOVISCIDOSIQUES**

### **1. Matériel et méthodes**

#### 1.1. Population de l'étude

Pour répondre à nos objectifs, nous avons mené une étude de cohorte observationnelle monocentrique prospective au sein du CRMR du service de pneumologie de l'hôpital Cochin entre juin 2015 et décembre 2018. Le CRMR possède une file active d'environ 470 patients adultes atteints de mucoviscidose qui bénéficient de bilans annuels systématiques.

Des patients adultes mucoviscidosiques ont été inclus entre juin 2015 et octobre 2017, lors de leur bilan annuel en hôpital de jour ou bien lors de consultations de suivi programmées. Tous les patients étaient âgés d'au moins 18 ans au moment de l'inclusion. Le diagnostic de mucoviscidose devait être confirmé par la présence de deux mutations causales et/ou par un test de la sueur positif (chlore > 60mmol/l). Afin d'être inclus dans l'étude, les patients devaient être capable de produire au moins une expectoration lors de l'inclusion.

Tous les patients se présentant en hôpital de jour ou en consultation avec des signes d'exacerbation (baisse de la fonction respiratoire, majoration de l'encombrement, hémoptysie, fièvre) ont été exclus de l'étude. Nous avons également exclu tous les patients qui recevaient un traitement par azolés au moment de l'inclusion.

#### 1.2. Recueil des données à l'inclusion

Pour chaque patient, les données démographiques à l'inclusion ont été recueillies, à savoir :

- L'âge, le sexe, l'indice de masse corporelle (IMC), les types de mutation du gène codant pour la protéine CFTR (D $\Delta$ F508 homozygote, D $\Delta$ F508 hétérozygote, autres).
- Les comorbidités associées à la mucoviscidose : insuffisance pancréatique, diabète.
- Les colonisations chroniques bactériennes (*Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, mycobactéries non tuberculeuses).
- Le nombre de jours sous antibiotiques intraveineux reçus dans l'année précédant l'inclusion.

- Les traitements à l'inclusion et en particulier : les corticoïdes par voie inhalée ou orale, les macrolides, les antibiotiques nébulisés, l'omalizumab et les traitements modulateurs de CFTR.

Les patients ont également bénéficié d'un bilan fonctionnel respiratoire et d'un bilan biologique comprenant :

- Mesure du Volume Maximal Expiratoire en une Minute (VEMS) et la Capacité Vitale Forcée (CVF), tous deux exprimés en valeur absolue (litres) et en pourcentage par rapport à la norme attendue pour l'âge, le sexe et la taille.
- Les données de mycologie : culture fongique (examen direct microscopique, culture), dosage du galactomannane (GM) dans les expectorations (Platelia™ *Aspergillus* Ag, Bio RAD, Marne la Coquette, France) et PCR *Aspergillus fumigatus* dans les expectorations (MycoGenie® DNA Extraction Kit, Ademtech, Pessac, France).
- Les données sérologiques : dosage des IgG spécifiques *Aspergillus fumigatus* (Platelia™ *Aspergillus* AC, Bio RAD, Marne la Coquette, France), dosage des IgE totales et dosage des IgE spécifiques *Aspergillus fumigatus* (ImmunoCAP®, Phadia).
- Le dosage des polynucléaires éosinophiles sanguins.

### 1.3. Méthodes de détection d'*Aspergillus fumigatus*

#### 1.3.1. *Cultures des expectorations*

Afin de rechercher les champignons filamenteux et notamment *A. fumigatus*, les prélèvements respiratoires ont été mis en culture sur milieu de Sabouraud contenant du chloramphénicol et de la gentamicine (Bio RAD, Marne la Coquette, France) et incubés pendant 10 jours à 30+/- 2°C.

#### 1.3.2. *Dosage du galactomannane dans les expectorations*

Le dosage du GM dans les expectorations a été réalisé grâce au test ELISA utilisé en routine pour la détection de l'antigène aspergillaire dans le sérum ou dans le lavage broncho-alvéolaire (Platelia™ *Aspergillus* Ag, Bio RAD, Marne la Coquette, France). Les expectorations ont été fluidifiées au préalable par un ajout, volume à volume par

dithiothréitol par utilisation d'une solution de Digest-EUR® (Eurobio, Courtaboeuf, France). Un échantillon de 300 µl de crachat fluidifié est utilisé pour la détection de GM (72). Le dosage du GM était considéré comme positif quand l'index (rapport de la DO de l'échantillon testé sur celle du sérum contrôle) était supérieur à 0,5 (34, 35).

### 1.3.3. *PCR Aspergillus fumigatus*

#### - Extraction d'ADN

L'ADN des crachats a été extrait à l'aide du kit MycoGenie® DNA Extraction Kit (Ademtech, Pessac, France). Un échantillon de 200 µl de crachat était déposé dans le puits d'une plaque de 12 puits et placé dans l'automate AutoMag (Ademtech, Pessac, France) qui est un système de purification d'ADN par particules magnétiques et qui a été utilisé selon les recommandations du fabricant.

#### - PCR

Un échantillon de 10 µl d'ADN extrait est utilisé pour la détection d'ADN d'*Aspergillus fumigatus* (gène d'ARN ribosomal/cyp51A mutations TR34/L98H), réalisé à l'aide du kit MycoGenie® *Aspergillus fumigatus* PCR assay (Ademtech, Pessac, France) et utilisé selon les recommandations du fabricant. Les performances de ce test ont été évaluées récemment dans une étude qui retrouvait une haute sensibilité de ce kit pour la détection d'*A. fumigatus* dans les expectorations des patients mucoviscidosiques (36). Le seuil de détection pour ce kit est de 40 cycles de PCR (seuil fournit par le fabricant).

## 1.4. Définition des groupes

Les patients ont été classés selon les critères suivant :

- ABPA (certaine ou probable) selon les critères CFF 2003 (voir Tableau II).
- Sensibilisation aspergillaire : IgE aspergillaires > 0,35 kUI/l, IgE totales < 500 KUI/l).
- Absence d'hypersensibilité : patients ne présentant aucun des critères d'ABPA ou de sensibilisation.

Dans un second temps, nous avons classé les patients selon leur statut colonisé ou non à *A. fumigatus*. Pour cela, nous avons utilisé la définition la plus fréquemment retrouvée dans la littérature sur les 5 dernières années à savoir : au moins 2 cultures fongiques positives à *A. fumigatus* dans l'année précédant l'inclusion (37, 39, 42).

### 1.5. Critères de jugement

Le critère de jugement principal était un critère composite permettant d'apprécier l'évolution de la fonction respiratoire des patients au bout d'un an de suivi. Il associait :

- La variation du VEMS sur 1 an.
- La variation entre le nombre de jours d'antibiotiques par voie intraveineuse entre l'année précédant l'inclusion et l'année de suivi.

Nous avons par ailleurs consigné les modifications thérapeutiques en rapport avec l'ABPA : la corticothérapie par voie systémique, l'omalizumab ou les antifongiques, survenue pendant la période d'étude.

Enfin, nous avons recueillis les valeurs de la sérologie aspergillaire, des IgE totales, des IgE aspergillaires et le taux de polynucléaires éosinophiles sanguins au terme d'un an de suivi.

### 1.6. Analyse en clusters

Nous avons tenté de déterminer s'il existait des groupes homogènes de patients caractérisés uniquement par les variables aspergillaires (phénotypes ou clusters aspergillaires) à l'inclusion, à savoir :

- La culture fongique
- La PCR et le GM dans les expectorations
- Le taux d'IgE totales et d'IgE aspergillaires
- Le taux d'IgG aspergillaires
- Le taux de polynucléaires éosinophiles sanguins.

Pour l'analyse en clusters nous avons utilisé le logiciel SAS V4.2. Du fait de l'hétérogénéité des types de variables (qualitatives, binaires, ordinales, numériques) nous avons utilisé une Analyse Factorielle sur Données Mixtes (AFDM) qui est une Analyse en Composantes

Principales (ACP) après normalisation des données non numériques. Le processus de construction des clusters a été le suivant :

- 1) Classification des variables utilisées dont l'objectif est de détecter des regroupements de variables qui permettraient de réduire leur nombre.
- 2) Analyse factorielle de données mixtes (AFDM) dont l'objectif est de remplacer les variables initialement utilisées par un plus petit nombre de variables indépendantes. Cette analyse agit comme un filtre pour éliminer les redondances (corrélations) qui existent dans la cohorte.
- 3) Classification Ascendante Hiérarchique (CAH) à partir des valeurs des patients sur les nouvelles variables indépendantes et détermination sans *a priori* du nombre de groupes (phénotypes).

#### 1.7. Aspects réglementaires et éthiques

Nous avons utilisé les données de patients consignées dans une base de données nominatives déclarée à la CNIL (N° 1858351). Lors de leur première venue à l'hôpital Cochin, tous les patients du service sont informés (formulaire de déclaration simplifié) du traitement informatique de leur données et peuvent à tout moment s'opposer, accéder ou rectifier les renseignements collectés à visée scientifique (loi « informatique et libertés » du 6 janvier 1978).

#### 1.8. Méthodologie statistique

Les données quantitatives sont exprimées en médiane et interquartile. Les données qualitatives sont exprimées en pourcentage avec la valeur absolue de l'effectif correspondant. La comparaison des différents groupes a été faite en utilisant le test non paramétrique de Mann-Whitney ou de Kruskal-Wallis (Test *post-hoc* de Dunns pour les comparaisons de plus de 2 groupes) pour les variables continues et le test non paramétrique de Chi2 pour les variables qualitatives. Une valeur de  $p < 0,05$  était considérée comme statistiquement significative. Les analyses statistiques ont été réalisées grâce au logiciel GraphPad Prism version 7.0.

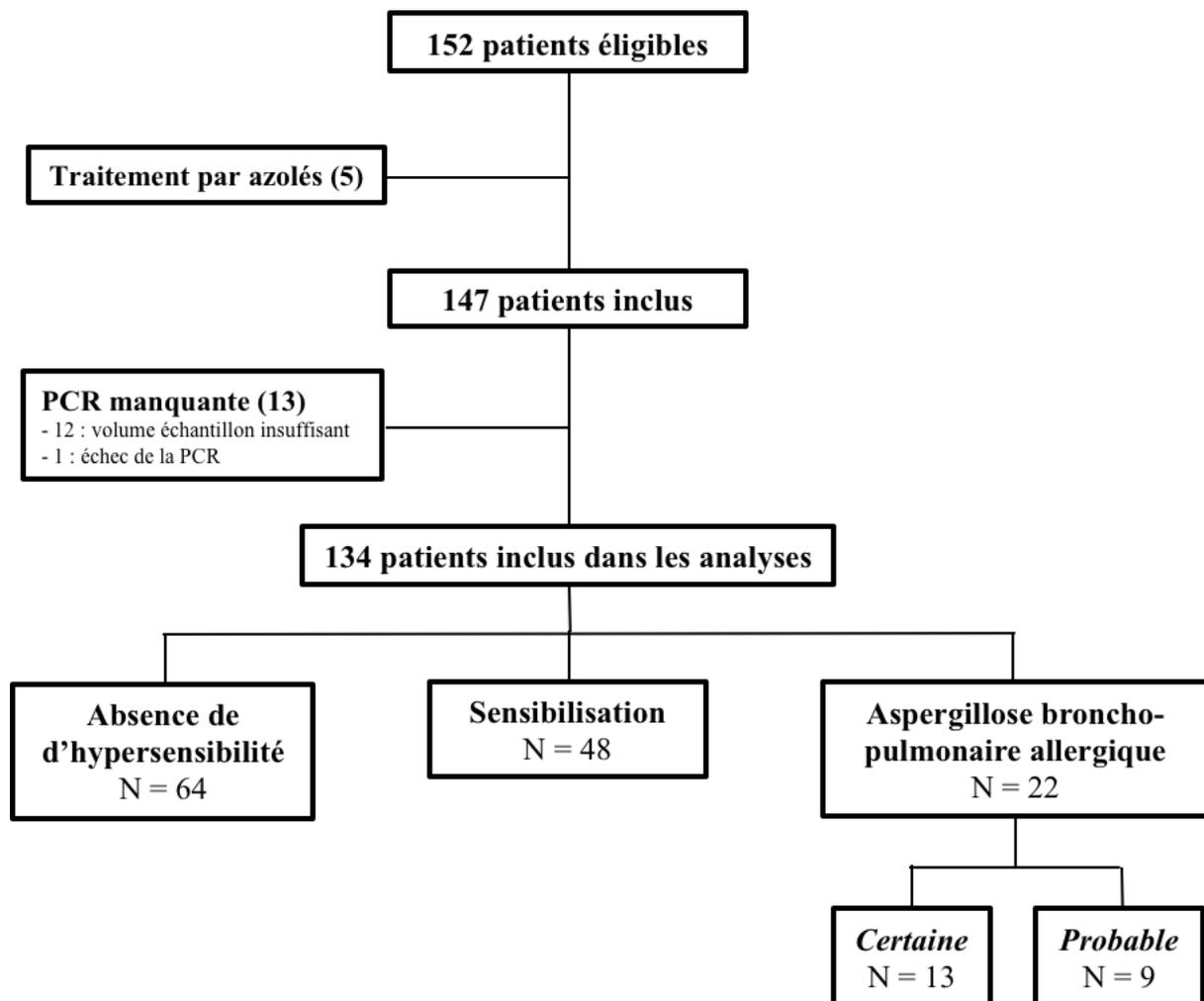
## 2. Résultats

### 2.1. Prévalence des atteintes aspergillaires

Entre juin 2015 et octobre 2017, 152 patients adultes mucoviscidosiques suivis en hôpital de jour ou en consultation au CRCM de Cochin ont présenté les critères d'éligibilité pour être inclus dans l'étude. Après exclusion des patients sous azolés et ceux pour lesquels la PCR était manquante, 134 patients ont été inclus dans l'étude et les analyses. Parmi ces 134 patients, 16,4% (22/134) présentaient les critères d'ABPA et 35,8% (48/134) présentaient une sensibilisation aspergillaire (Figure 3).

Tous les patients inclus ont été réévalués cliniquement après un suivi médian de 12 mois.

Figure 3. Diagramme des flux de l'étude.



On ne retrouvait pas de différence significative à l'inclusion entre les groupes sur le genre, l'âge, l'IMC, le statut pancréatique, la présence de diabète, les colonisations bactériennes chroniques, la colonisation aspergillaire, la fonction respiratoire (VEMS, CVF) et les traitements par macrolides, antibiotiques nébulisés ou encore les modulateurs de CFTR (Tableau III). Les patients du groupe « ABPA » avaient une proportion de mutations  $\Delta F508$  homozygotes plus importante que les patients ne présentant pas d'hypersensibilité (59,1% vs 39,4%) sans que cette différence ne soit cependant statistiquement significative. Les patients du groupe « Sensibilisation » avaient reçu une durée plus importante d'antibiotiques IV dans l'année précédant l'inclusion par rapport aux patients présentant une ABPA (médiane 28,5 jours vs 0 jour,  $p = 0,046$ ).

Les patients du groupe « ABPA » recevaient plus souvent une corticothérapie systémique et les patients des groupes « ABPA » et « Sensibilisation » recevaient plus souvent une corticothérapie inhalée, que les patients ne présentant pas d'hypersensibilité. Aucun des patients du groupe ABPA ne recevait de modulateur de CFTR au moment de l'inclusion sans que la différence de proportion ne soit significative entre les groupes ( $p = 0,2$ ).

**Tableau III. Caractéristiques cliniques des patients à l'inclusion.**

	Absence d'hypersensibilité N = 64	Sensibilisation N = 48	ABPA N = 22	Total N = 134	P
<b>Sexe masculin</b>	51,6 (33)	50,0 (24)	72,7 (16)	54,5 (73)	0,19
<b>Age (années)</b>	31,6 (25,5-38,5)	30,7 (26,6-36,5)	26,7 (23,0 – 38,8)	30 (25-37)	0,54
<b>Mutations ΔF508</b>					
<i>Homozygote</i>	34,4 (22)	47,9 (23)	59,1 (13)	43,3 (58)	0,09
<i>Hétérozygote</i>	42,2 (27)	37,5 (18)	27,3 (6)	38,0 (51)	0,40
<i>Autres</i>	23,4 (15)	14,6 (7)	13,6 (3)	18,7 (25)	0,46
<b>IMC (kg/m<sup>2</sup>)</b>	21,3 (19-23)	20,6 (18,9-22,3)	19,9 (19-22,6)	21 (19-23)	0,52
<b>Insuffisance pancréatique externe</b>	78,1 (50)	85,4 (41)	90,9 (20)	82,8 (111)	0,14
<b>Diabète</b>	20,3 (13)	25,0 (12)	27,3 (6)	23,1 (31)	0,57
<b>VEMS (%)</b>	56 (40-80)	49,5 (35,8 – 65) <sup>s</sup>	60 (41,7-72,5)	55 (40-69)	0,23
<b>CVF (%)</b>	76 (61-92)	72 (54-86,2) <sup>s</sup>	74,5 (63-93,2)	73 (58-90)	0,38
<b>Colonisations bactériennes*</b>					
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	62,5 (40)	58,3 (28)	50,0 (11)	59,0 (79)	0,31
<i>Staphylococcus aureus</i>	45,3 (29)	41,7 (20)	59,1 (13)	46,3 (62)	0,42
<i>Mycobactéries non tuberculeuses</i>	3,1 (2)	4,2 (2)	4,5 (1)	3,7 (5)	0,73
<b>Colonisation à <i>A. fumigatus</i></b>	45,3 (29)	29,8 (14)	63,6 (14)	42,5 (57)	0,42
<b>ABT IV dans l'année (jours)</b>	14 (0-41,7)	28,5 (0-58,5)	0 (0-32,5)	15 (0-44)	0,03
<b>Traitement à l'inclusion</b>					
<i>Corticoïdes oraux</i>	1,5 (1)	4,1 (2)	27,3 (6)	6,7 (9)	0,002
<i>Corticoïdes inhalés</i>	26,6 (17)	50,0 (24)	50,0 (11)	38,8 (52)	<0,0001
<i>Omalizumab</i>	0,0 (0)	4,1 (2)	13,6 (6)	3,7 (5)	0,005
<i>Azithromycine</i>	57,8 (37)	66,7 (32)	54,6 (11)	60,4 (81)	0,93
<i>Antibiotiques nébulisés<sup>#</sup></i>	62,5 (40)	62,5 (30)	50,0 (12)	60,4 (81)	0,39
<i>Modulateurs de CFTR</i>	14,1 (9)	16,7 (8)	0,0 (0)	12,7 (17)	0,20

Les valeurs sont représentées en % (n) ou en médiane (Interquartile). \* Certains patients sont colonisés à plusieurs germes. # Tobramycine ou colimycine ou aztréonam. <sup>s</sup>: Donnée manquante pour 1 patient. IMC : indice de masse corporelle ; VEMS : volume expiratoire maximal en 1 seconde ; CVF : Capacité Vitale Forcée ; ABT : antibiotiques ; IV : intraveineux ; CFTR : Cystic Fibrosis Transmembrane conductance Regulator.

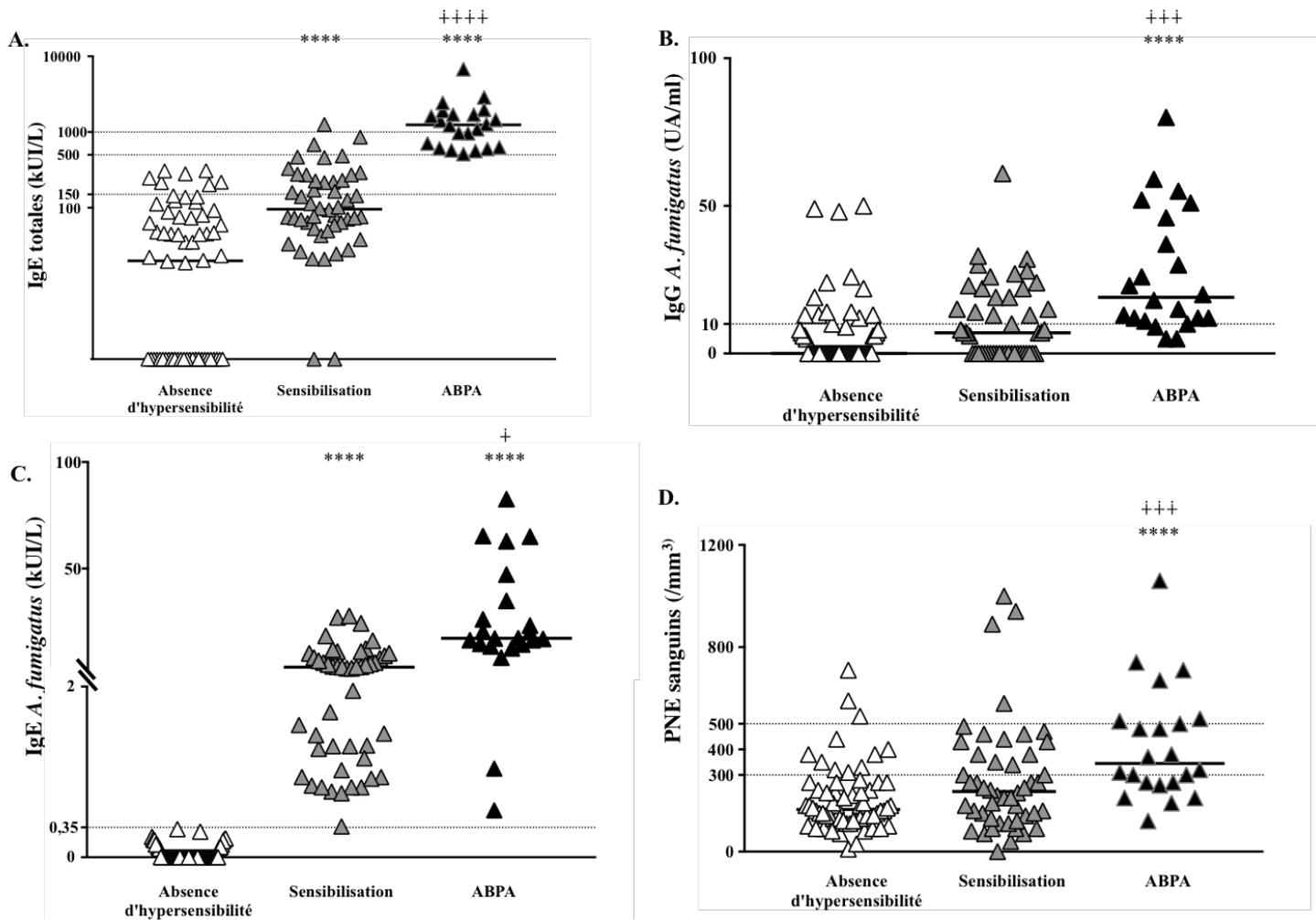
De façon attendue, le taux d'IgE totales du groupe « ABPA » était significativement plus élevé que celui du groupe « Absence d'hypersensibilité » et « Sensibilisation » (Médianes 1245 kUI/L vs 96 kUI/L et 19,9 kUI/L respectivement,  $p < 0,0001$  pour les 2 comparaisons). Le taux d'IgE totales du groupe « Sensibilisation » (qui n'intervient pas dans la définition de cette dernière) était significativement plus élevé que celui du groupe « Absence d'hypersensibilité » (96 kUI/L vs 19,9 kUI/L respectivement,  $p < 0,0001$ ) (Figure 4.A).

Le taux d'IgG anti-*A. fumigatus* était similaire entre les groupes « Sensibilisation » et « Absence d'hypersensibilité » (Figure 4.B).

Le taux d'IgE *A. fumigatus* était significativement plus élevé dans les groupes « ABPA » et « Sensibilisation » par rapport au groupe « Absence d'hypersensibilité » (Médianes 17,3 kUI/L et 3,8 kUI/L vs 0 kUI/L respectivement,  $p < 0,0001$  pour les 2 comparaisons). La différence était également significative entre le groupe « ABPA et « Sensibilisation » ( $p = 0,02$ ) (Figure 4.C).

Enfin, le taux de PNE sanguins était significativement plus élevé dans le groupe ABPA par rapport aux deux autres groupes (Médianes 345/mm<sup>3</sup> vs 235/mm<sup>3</sup> et 165/mm<sup>3</sup> respectivement,  $p < 0,0001$  et  $p = 0,009$  respectivement) (Figure 4.D).

**Figure 4. Marqueurs aspergillaires sérologiques et taux de polynucléaires sanguins.**



**Légende.** A. IgE totales sériques. Échelle logarithmique. Les lignes pointillées marquent les seuils utilisés pour les classifications (1000 et 500 kUI/l) et le seuil de positivité (150 kUI/L). B. IgG *Aspergillus fumigatus* sériques. La ligne pointillée marque le seuil de positivité (10 UA/ml). C. IgE *Aspergillus fumigatus* sérique. La ligne pointillée marque le seuil de positivité (0,35 kUI/L). D. Taux de polynucléaires éosinophiles sanguins. ABPA : aspergillose broncho-pulmonaire allergique ; *A. fumigatus* : *Aspergillus fumigatus*. Chaque triangle représente un patient. Les barres horizontales représentent les médianes. ABPA : aspergillose broncho-pulmonaire allergique ; *A. fumigatus* : *aspergillus fumigatus*.

\*\*\*\*  $p < 0,0001$  par rapport au groupe « Absence d'hypersensibilité ». +++  $p < 0,0001$  ; +  $p < 0,05$  : par rapport au groupe « Sensibilisation ». Test de Kruskal Wallis suivi du test *Post hoc* de Dunns.

## 2.2. Impact de l'ABPA et de la sensibilisation sur la fonction respiratoire

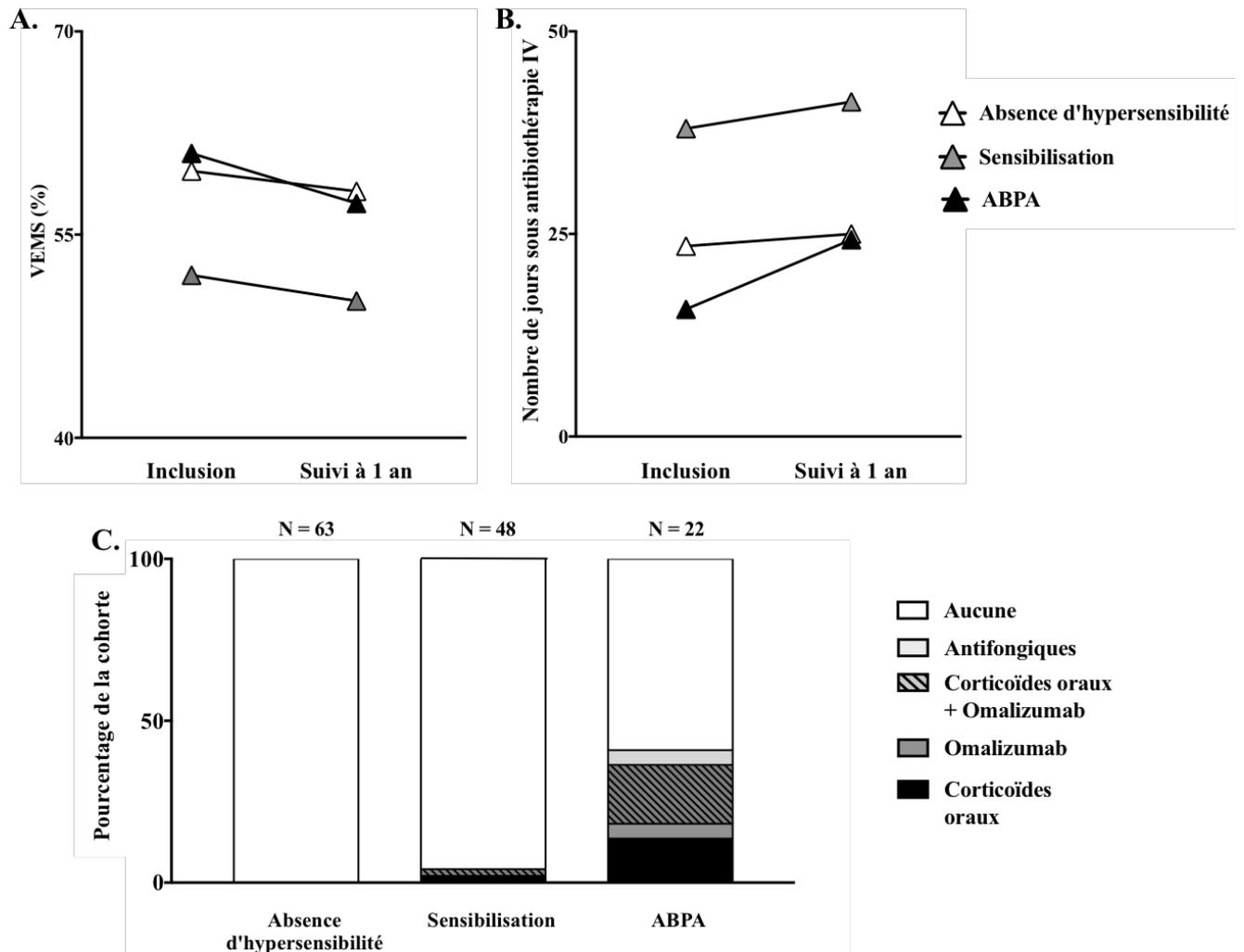
Sur l'ensemble de la cohorte, nous avons observé une chute médiane significative de 2% (Interquartile -6 à +3,  $p = 0,0063$ ) du VEMS à un an de suivi.

Au bout d'un an de suivi, le déclin du VEMS était plus important chez les patients des groupes « Sensibilisation » et « ABPA » avec en médiane -1% (IQ -7 à +2,75) et -3,5% (IQ -10 à +1,5) respectivement, contre +1% (IQ -3 à +5) dans le groupe « Absence d'hypersensibilité ». La différence avec le groupe « Absence d'hypersensibilité » n'était cependant pas significative ( $p = 0,15$  et  $p = 0,008$  respectivement pour les groupes « Sensibilisation » et « ABPA ») (Figure 5.A).

Les patients des groupes « ABPA » et « Sensibilisation » étaient ceux qui présentaient la plus importante augmentation du nombre de jours d'antibiothérapie IV avec respectivement +8,6 et +3,3 jours en moyenne pendant la période de suivi, contre +1,5 jours dans le groupe « Absence d'hypersensibilité ». Les différences n'étaient cependant pas significatives (Test de Kruskal Wallis :  $p = 0,16$ ) (Figure 5.B).

Enfin, nous nous sommes intéressés aux modifications thérapeutiques (introduction ou intensification thérapeutique) en rapport avec la pathologie aspergillaire à savoir : (1) la corticothérapie systémique (introduction ou augmentation des doses), (2) l'omalizumab (introduction ou augmentation des doses) et (3) les antifongiques (introduction). Dans le groupe « ABPA », 40,1% (9/22) des patients ont été soumis à des modifications thérapeutiques en rapport avec la pathologie aspergillaire durant l'année de suivi et 4,2% dans le groupe « Sensibilisation ». Aucun des patients du groupe « Absence d'hypersensibilité » n'a reçu de corticoïdes, d'omalizumab ou d'antifongiques pendant le suivi (Figure 5.C).

**Figure 5. Évolution de la fonction respiratoire et modifications thérapeutiques au cours du suivi.**



**Légende.** A. Variation du VEMS entre l'inclusion et le suivi à 1 an. B. Variation du nombre de jours d'antibiothérapie intraveineuse entre l'année précédant l'inclusion et la période de suivi. Chaque triangle représente la valeur moyenne pour chacun des groupes. C. Pourcentage de patients ayant été soumis à une introduction ou une intensification de traitement en rapport avec une pathologie aspergillaire au cours du suivi en fonction de l'atteinte aspergillaire sous-jacente. ABPA : aspergillose broncho-pulmonaire allergique.

### 2.3. Évolution des marqueurs aspergillaires au cours du temps

Afin, d'étudier en détail l'évolution des marqueurs aspergillaires au cours du temps, nous avons séparé nos 3 groupes initiaux en 6 sous-groupes :

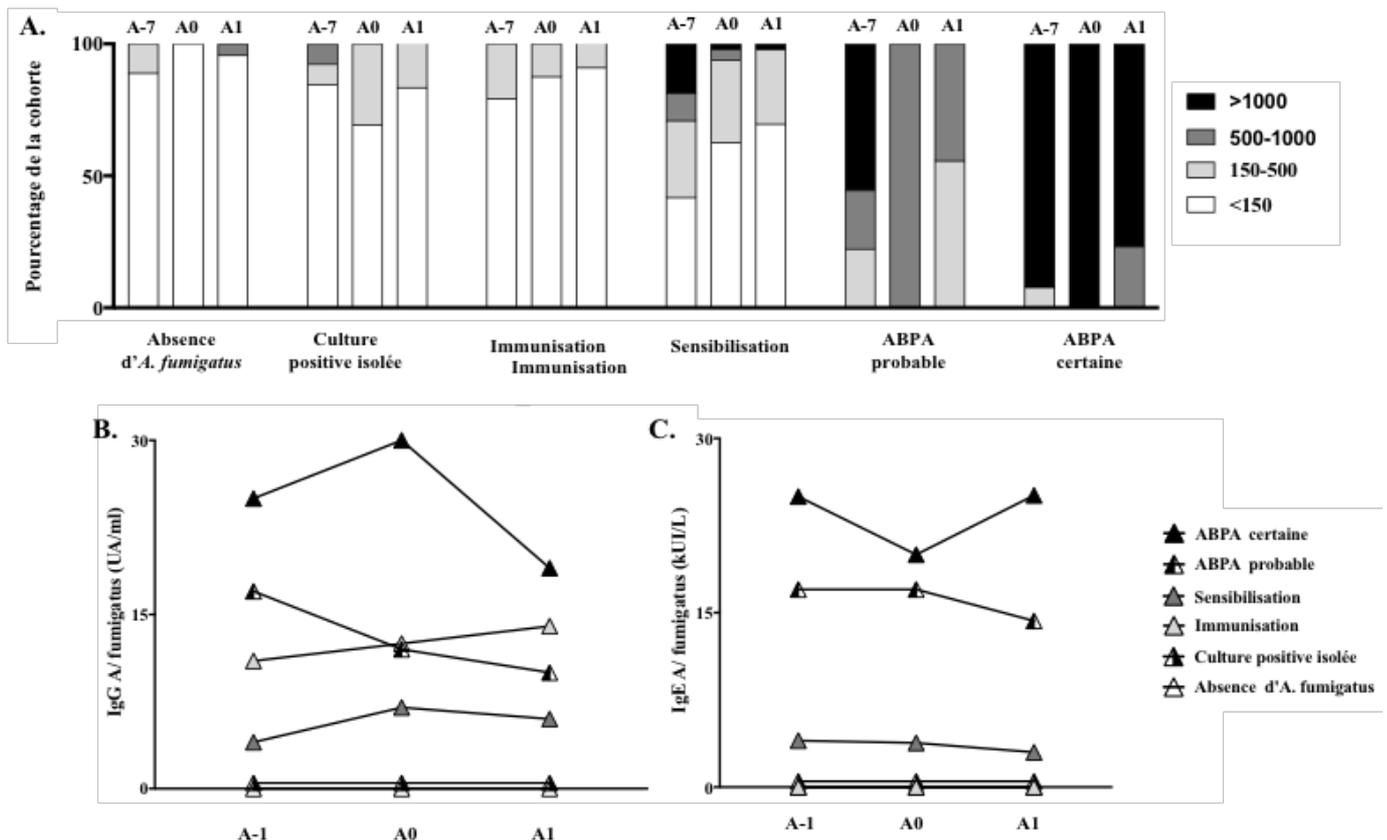
- Au sein du groupe ABPA, nous avons distingué les patients présentant une ABPA certaine et une ABPA probable.
- Nous avons conservé le groupe « Sensibilisation ».
- Au sein du groupe « Absence d'hypersensibilité » nous avons distingué les patients présentant une immunisation aspergillaire (Sérologie *A. fumigatus* positive, groupe « Immunisation »), ceux présentant une culture fongique positive à *A. fumigatus* sans immunisation anti-aspergillaire (groupe « Culture positive isolée ») et enfin les patients ne présentant aucun marqueur aspergillaire (Groupe « Absence d'*A. fumigatus* »).

Dans les groupes « ABPA certaine » et « ABPA probable », respectivement 92,2% (12/13) et 55,6% (5/9) des patients avaient déjà eu des IgE totales > 1000 kUI/L dans les 7 années précédant le suivi (Figure 6.A). De façon notable, 18,8% (9/48) des patients du groupe sensibilisation avaient également déjà eu un taux d'IgE totales > 1000 kUI/L dans les 7 ans précédant l'inclusion. Aucun patient des 3 autres groupes n'avait eu un taux d'IgE > 1000 kUI/L ou compris entre 500 et 1000 kUI/L sur la même période sauf 1 patient du groupe « Culture positive isolée » qui avait présenté des IgE comprise entre 500 et 1000 kUI/L. Aucun patient des groupes « ABPA certaine » et « ABPA probable » n'a présenté un taux d'IgE totales < 500 kUI/L au cours du suivi. Enfin, seul 1 patient du groupe « Absence d'*A. fumigatus* » a présenté une augmentation significative du taux d'IgE (qui est passé de < 150 à > 500 kUI/L).

Nous n'avons pas observé de variations significatives au sein des groupes concernant les taux d'IgG *A. fumigatus* (Figure 6.B) et d'IgE *A. fumigatus* (Figure 6.C). Nous avons constaté que tous les patients des groupes « ABPA certaine » et « ABPA probable » avaient un taux d'IgE *A. fumigatus* positif (> 0,35kUI/L) que ce soit 12 à 24 mois après l'inclusion ou après 1 an de suivi. Dans le groupe « Sensibilisation », seuls 2 patients avaient négativé leur taux d'IgE *A. fumigatus*. Dans les autres groupes, seul 1 patient du groupe « Absence d'*A. fumigatus* » a positivé son taux d'IgE *A. fumigatus*.

Enfin, nous n'avons pas observé de variation significative du taux de PNE que ce soit dans le groupe « ABPA », « Sensibilisation » ou « Absence d'hypersensibilité » après 1 an de suivi. Les patients du groupe « ABPA » avaient toujours un taux de PNE significativement plus élevé que les patients du groupe « Absence d'hypersensibilité » (Médiane 285/mm<sup>3</sup>, IQ 157,5-507,5 contre 180/mm<sup>3</sup>, IQ 110-287,5,  $p = 0,03$ ). Le taux de PNE du groupe « Sensibilisation » était également plus élevé que le celui du groupe « Absence d'hypersensibilité » sans que la différence ne soit significative (Médiane 240/mm<sup>3</sup>, IQ 150-330 contre 180/mm<sup>3</sup>,  $p = 0,33$ ).

**Figure 6. Évolution des marqueurs sériques aspergillaires au cours du temps.**



**Légende.** A. Taux d'IgE total maximal dans les 7 années précédant l'inclusion (A-7), à l'inclusion (A0) et au bout d'un an de suivi (A1) selon les groupes. B. Variation du taux d'IgG *A. fumigatus* en fonction du temps (12 à 24 mois avant l'inclusion : A1, à l'inclusion : A0 et au bout d'un an de suivi : A1). C. Variation du taux d'IgE *A. fumigatus* en fonction du temps (12 à 24 mois avant l'inclusion : A1, à l'inclusion : A0 et au bout d'un an de suivi : A1). Chaque triangle représente la valeur médiane pour le groupe et le temps donné. ABPA : aspergillose broncho-pulmonaire allergique ; *A. fumigatus* : *Aspergillus fumigatus*.

#### 2.4. Colonisation à *A. fumigatus* : caractéristiques et impact sur la fonction respiratoire

Dans notre cohorte, 42,9 % (57/134) des patients présentaient une colonisation à *A. fumigatus* (au moins 2 expectorations positives sur les 12 derniers mois) (Tableau IV). A l'inclusion, les patients colonisés à *A. fumigatus* présentaient un statut nutritionnel et une fonction respiratoire (VEMS et nombre de jours sous antibiotiques IV dans l'année précédant l'inclusion) similaires aux patients non colonisés. On observait une proportion significativement plus importante de patients insuffisants pancréatiques chez les patients colonisés à *A. fumigatus* (85,9 % contre 48,7 % dans le groupe de patients non colonisés,  $p < 0,0001$ ) sans qu'il n'y ait de différence significative sur le type de mutation entre les 2 groupes. Alors que le pourcentage de patients colonisés à *Pseudomonas aeruginosa* était similaire dans les 2 groupes, on observait une proportion plus importante de patients colonisés à *Staphylococcus aureus* dans le groupe colonisé à *A. fumigatus* (65,8 % contre 34,2 %,  $p = 0,0027$ ). Sur le plan biologique, les patients colonisés à *A. fumigatus* avait une valeur médiane de GM plus élevée (Index de DO 2,34 contre 1,12,  $p = 0,0048$ ), un taux médian d'IgE totales plus élevé (113 contre 66,9,  $p = 0,045$ ) et un taux médian d'IgG anti-aspergillaire plus élevé (0 contre 12,  $p < 0,0001$ ) que les patients non colonisés à *A. fumigatus*. Le taux d'IgE aspergillaire n'était pas différent entre les 2 groupes. Enfin, le taux de PNE sanguins était statistiquement supérieur chez les patients non colonisés par rapport aux patients colonisés (245 contre 180/mm<sup>3</sup>,  $p = 0,032$ ).

On constatait que presque la moitié des patients colonisés (28/57, 49,1 %) appartenait au groupe « Absence d'hypersensibilisation ». Les patients présentant une ABPA présentaient un fort taux de colonisation avec 57% du groupe colonisé à *A. fumigatus* (Tableau III). De manière intéressante, les patients non colonisés appartenant au groupe « Sensibilisation » avaient une chute du VEMS significativement plus importante que ceux du même groupe qui étaient colonisés (-3 vs. +2 %,  $p = 0,035$ ).

Après 1 an de suivi, les patients non colonisés avaient une chute médiane du VEMS plus importante que les patients non colonisés, sans que cette différence soit cependant significative (- 4,4% contre -1,1%,  $p = 0,29$ ). Alors que le nombre de jours d'antibiotiques IV reçus dans l'année précédant l'inclusion était similaire entre les 2 groupes (14 et 15 jours en médiane), les patients non colonisés avaient reçu plus de jours d'antibiothérapie IV durant l'année de suivi que les patients du groupe colonisé (28 contre 14 jours en médiane respectivement,  $p = 0,035$ ).

Tableau IV. Impact de la colonisation chronique à *Aspergillus fumigatus*.

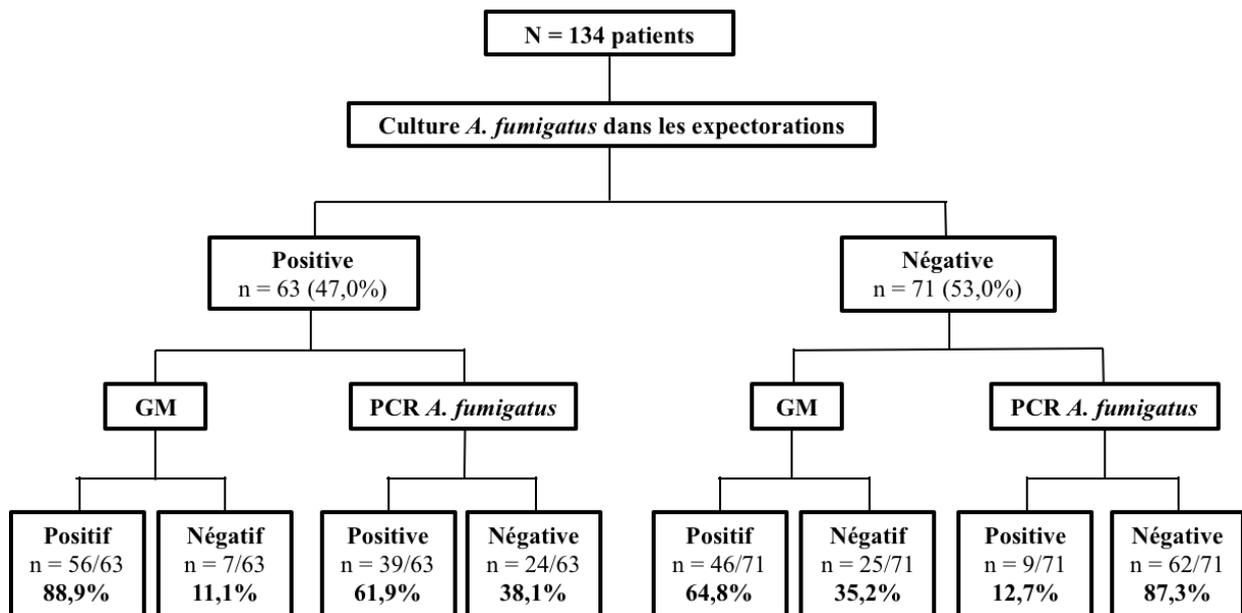
	Absence de colonisation N = 76*	Colonisation chronique N =57*	p
Age (années)	31,3 (24,9–38,8)	30,4 (25,5-35,8)	0,62
IMC (kg/m <sup>2</sup> )	20,8 (19,0-22,9)	(19,0–22,7) 20,6	0,49
<b>Mutations ΔF508</b>			0,59
<i>Homozygote</i>	39,5% (30)	47,4 % (27)	
<i>Hétérozygote</i>	42,1 % (32)	33,3 % (19)	
<i>Autres</i>	18,4 % (14)	19,3 % (11)	
IPE, n (%)	48,7 % (37)	85,9 % (49)	<0,001
VEMS (%)	50,5 (38,3-68,3)	57,5 (44,5-70,8)	0,19
<b>Colonisation, n (%)</b>			
<i>P. aeruginosa</i>	57,9 % (44)	59,7 % (34)	0,86
<i>S. aureus</i>	42,6 % (26)	57,4 % (35)	<b>0,003</b>
ABT IV (jours)	15 (0-46,8)	14 (0-36,6)	0,28
Corticoïdes oraux	5,3 % (4)	8,8% (5)	> 0,999
Modificateurs de CFTR	17,1 % (13)	7,0 % (4)	0,12
Culture <i>A.f.</i> positive	18,4% (14)	86,0 % (49)	<0,001
IgG <i>A.f.</i> (U/ml)	0 (0-11,8)	12 (5,5-26)	<0,001
IgE totales (kUI/l)	66,9 (0-217,3)	113 (29,2 – 600,5)	<b>0,0448</b>
IgE <i>A.f.</i> (kUI/l)	0,78 (0-7,6)	0,33 (0-13,1)	0,71
PNE sanguins	245 (152,5-377,5)	180 (115-285)	<b>0,032</b>
GM (Index de DO)	1,12 (0,3-2,9)	2,34 (0,9-4,8)	<b>0,005</b>
Δ VEMS à 1 an (%)	- 4,4 (-12,2-+4,4)	-1,1 (-12,6-+6,2)	0,29
ABT IV à 1 an (jours)	28 (0-62)	14 (0-41)	<b>0,035</b>

Les données sont présentées en médiane (IQ) ou en % (nombre). IMC : indice de masse corporelle ; IPE : insuffisance pancréatique externe ; VEMS : volume expiratoire maximal en 1 seconde ; *P. aeruginosa* : *Pseudomonas aeruginosa* ; *S. aureus* : *Staphylococcus aureus* ; *A.f.* : *Aspergillus fumigatus* ; ABT : antibiotiques ; IV : intraveineux ; PNE : polynucléaires éosinophiles ; GM : galactomannane ; DO : densité optique ; Δ : variation\* : cohorte totale de 133 patients (donnée manquante pour un patient).

## 2.5. Détection d'*Aspergillus fumigatus* dans les expectorations

Chez 47,0% (63/134) des patients inclus, la culture fongique des expectorations était positive pour *A. fumigatus* (Figure 7). La PCR *A. fumigatus* dans les expectorations n'était positive que chez 48/134 (35,8%) patients et l'on constatait que dans plus d'un tiers des cas où la culture fongique était positive pour *A. fumigatus*, la PCR était négative. Enfin, le dosage du GM dans les expectorations était positif chez une forte proportion de patients : 102 patients, soit 76,1% de la population. Parmi les patients dont la PCR était positive, 89,6% avaient un dosage du GM positif.

**Figure 7. Résultats du dosage du galactomannane et de la PCR *Aspergillus fumigatus* dans les expectorations en fonction des résultats des cultures fongiques.**



Le dosage du galactomannane était considéré comme positif pour un index de DO > 0,5. La PCR était considérée comme positive pour un nombre de cycles de PCR < 40. *A. fumigatus* : *aspergillus fumigatus* ; GM : galactomannane.

A partir de ces données, et en considérant la culture fongique comme le Gold Standard pour la détection d'*A. fumigatus* dans les expectorations, nous avons calculé la sensibilité et la spécificité du GM et de la PCR (Tableau VI et VII) pour identifier *A. fumigatus*. En utilisant un seuil de positivité d'index de DO à 0,5, le GM possède une sensibilité de 88,9 % (IC 95% 78,8 – 94,5) et une spécificité de 35,2 % (IC 95% 25,1 – 46,8) pour la détection d'*A. fumigatus*. A l'inverse, la PCR *A. fumigatus* présente une sensibilité moyenne de 61,9 % (IC 95% 49,6 – 72,9) et une spécificité de 87,3 % (IC 95% 77,6 – 93,2).

**Tableau VI. Tableau de contingence pour le calcul de la sensibilité et de la spécificité du GM.**

	<b>Culture positive</b>	<b>Culture négative</b>	<b>Total</b>
<b>GM positive</b>	56	46	<b>102</b>
<b>GM négative</b>	7	25	<b>32</b>
<b>Total</b>	<b>63</b>	<b>71</b>	<b>134</b>

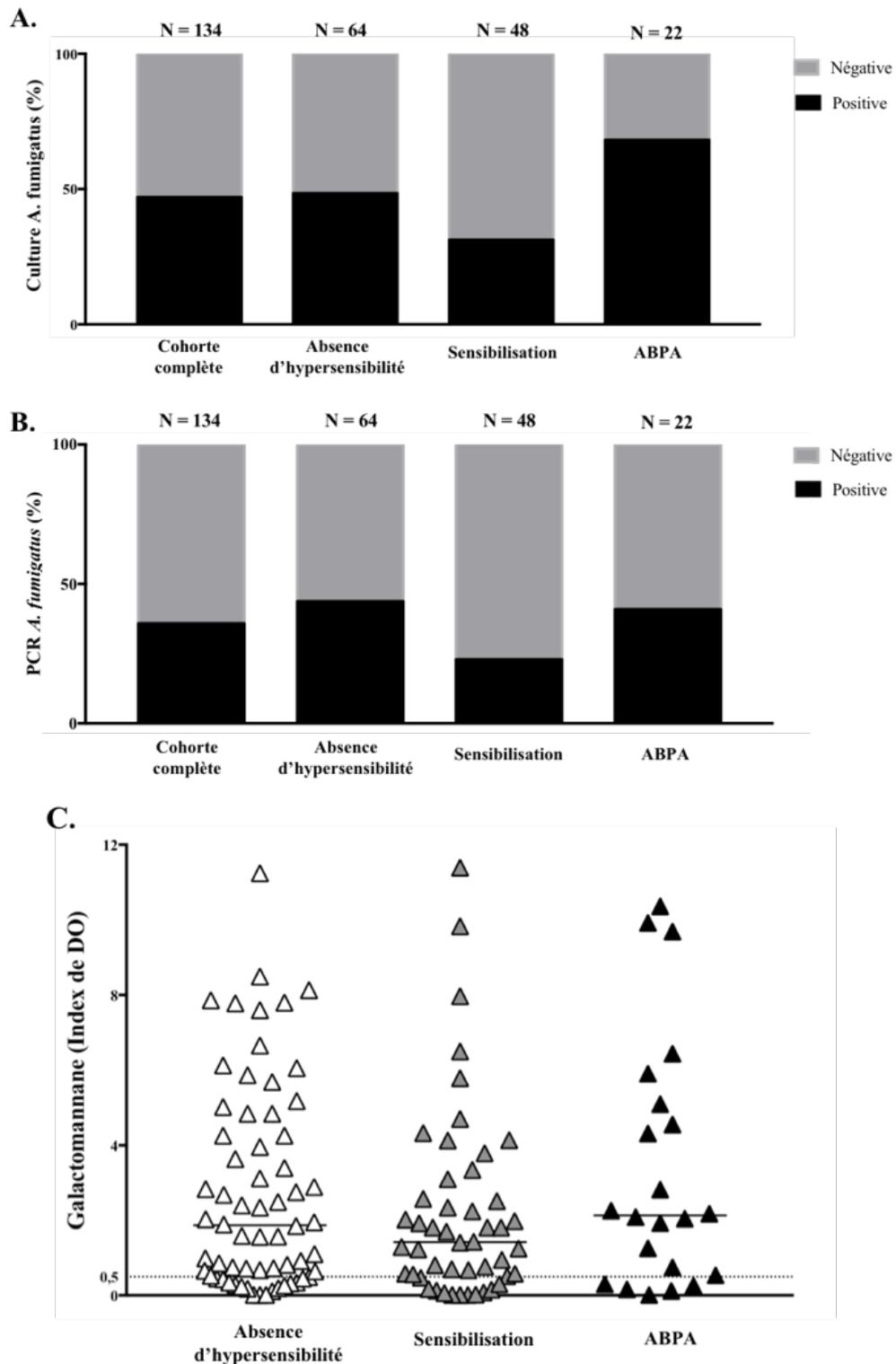
GM : Galactomannane

**Tableau VII. Tableau de contingence pour le calcul de la sensibilité et de la spécificité de la PCR *A. fumigatus*.**

	<b>Culture positive</b>	<b>Culture négative</b>	<b>Total</b>
<b>PCR positive</b>	39	9	<b>48</b>
<b>PCR négative</b>	24	62	<b>86</b>
<b>Total</b>	<b>63</b>	<b>71</b>	<b>134</b>

Parmi les patients ne présentant pas de marqueurs d'hypersensibilité, la PCR était bien corrélée à la culture fongique avec respectivement 43,8 et 48,4% d'échantillons positifs (Figure 8.A et 8.B). Dans le groupe « Sensibilisation » 22,9% avaient une PCR positive contre 40,9 % dans le groupe « ABPA ». La valeur médiane du GM était respectivement de 2,13 (IQ 0,5-5,3), 1,42 (IQ 0,5-2,9) et 1,87 (IQ 0,5-4,7) dans les groupes « ABPA », « Sensibilisation » et « Absence de sensibilisation » (Figure 8.C). Ces résultats indiquent que la PCR telle que réalisée dans notre étude est peu sensible pour détecter *A. fumigatus*, et que le dosage du GM ne semble pas être un marqueur discriminant entre les différentes atteintes aspergillaires.

Figure 8. Détection d'*Aspergillus fumigatus* dans les expectorations selon les groupes



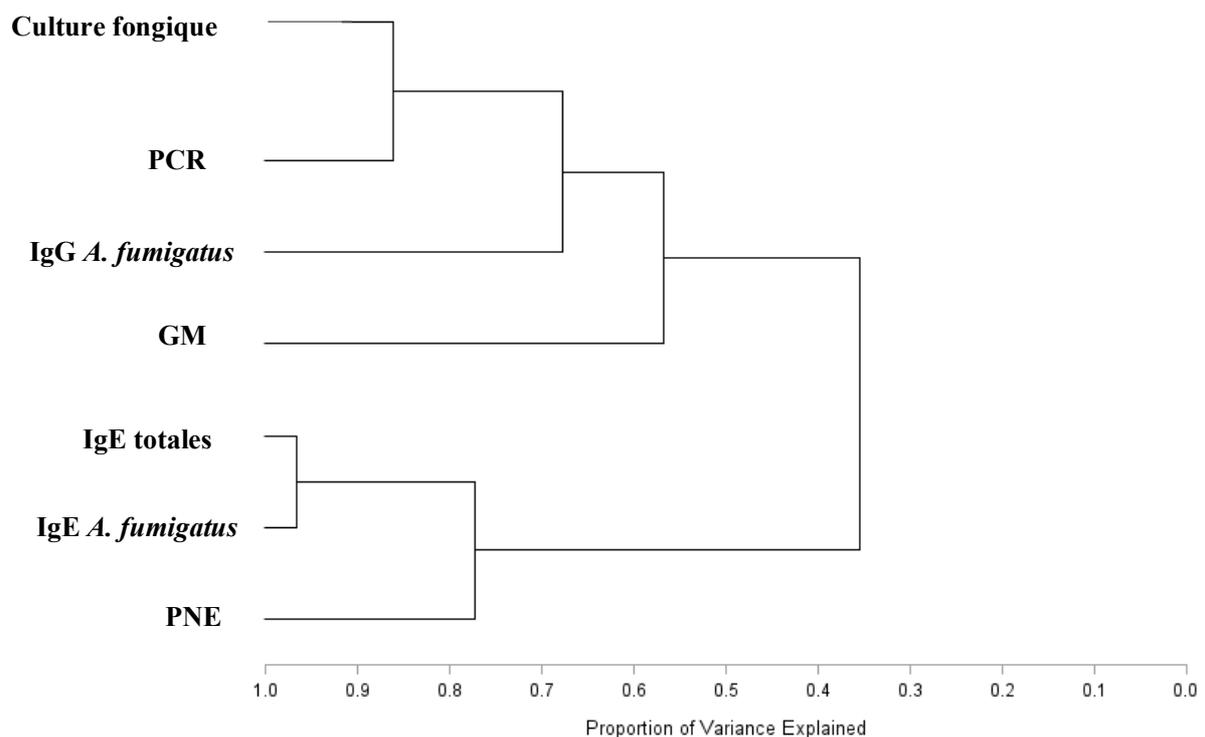
**Légende :** A. Culture fongique des expectorations à l'inclusion. B. PCR aspergillaire dans les expectorations à l'inclusion. Pour A et B, les résultats sont exprimés en pourcentage par rapport à l'effectif de chaque groupe. C. GM dans les expectorations à l'inclusion. Chaque triangle représente un patient. Les barres horizontales représentent les médianes. La ligne pointillée représente le seuil de positivité (Index de DO à 0,5). ABPA : aspergillose broncho-pulmonaire allergique. *A. fumigatus* : *Aspergillus fumigatus*.

De manière intéressante, parmi les patients ne présentant pas de marqueur d'hypersensibilité liée à *A. fumigatus*, nous avons identifié un sous-groupe de patients présentant une immunisation anti-aspergillaire (IgG positives) et rassemblant 17,9 % (24/134) des patients (Figure 6). Dans ce groupe, 83,3 % des cultures fongiques étaient positives pour *A. fumigatus* et le GM et la PCR étaient positifs chez respectivement 83,3 % et 70,8 % des patients. Ce groupe de patients ne semblait pas avoir de pronostic respiratoire plus défavorable puisque la variation médiane du VEMS à un an était de -1% (IQ -4 à +3), sans variation du nombre de jours d'antibiotiques IV (IQ -14 à 0).

## 2.6. Analyse en cluster

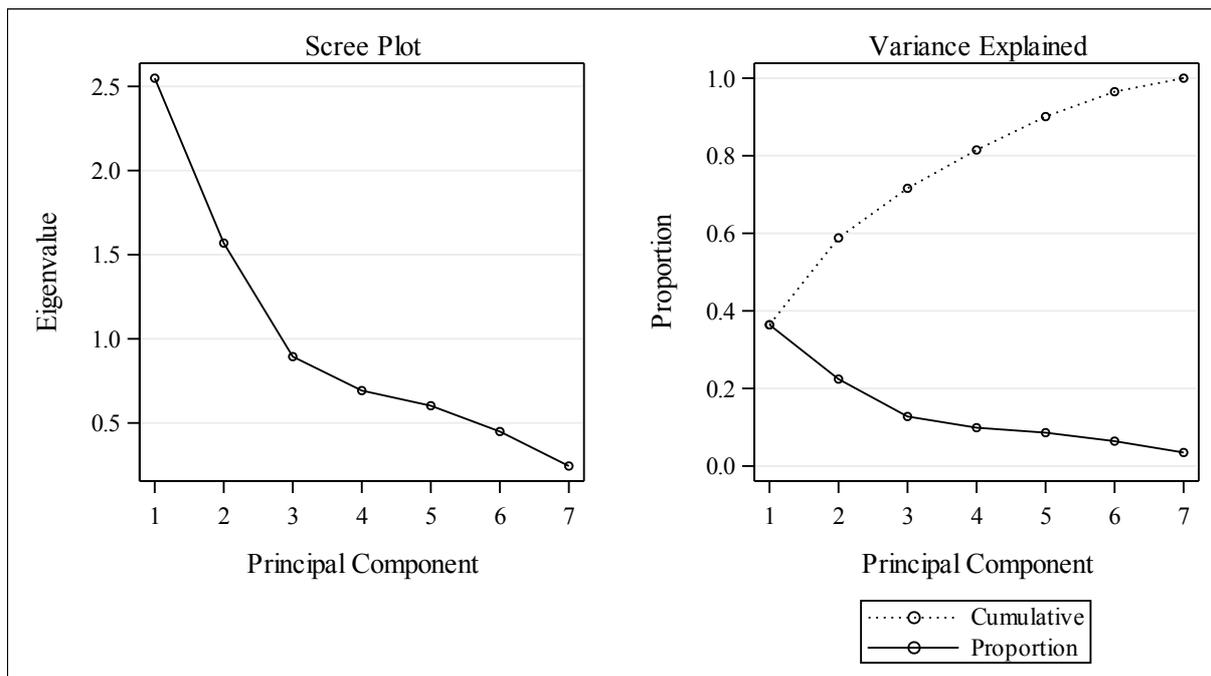
Dans un premier temps, nous avons procédé à une classification hiérarchique des variables. Cette analyse permet d'étudier la proximité des variables entre elles selon leurs valeurs. Statistiquement, les variables en rapport avec l'hypersensibilité aspergillaires (IgE totales, IgE aspergillaires et PNE) étaient très proches avec une forte corrélation notamment entre IgE totales et IgE aspergillaires ( $r = 0,77$ ,  $p < 0,001$ ). Les variables culture fongiques, PCR, IgG aspergillaires et GM se regroupent également (Figure 9).

**Figure 9. Dendrogramme représentant la proximité des variables utilisées pour l'analyse en clusters.**



L'analyse factorielle (AFDM) nous a ensuite permis de remplacer les 7 variables de départ par 2 variables indépendantes (Figure 10). Nous avons ainsi obtenu une matrice complète de 134 patients mesurés sur 2 variables indépendantes. C'est cette matrice qui a été utilisée pour construire les regroupements de patients dans l'étape suivante.

**Figure 10. Analyse factorielle de données mixtes (AFDM).**



**Légende.** Les 2 premiers axes factoriels sont associés à des valeurs propres  $\geq 1$ , ils représentent 59% de l'information contenue dans la cohorte.

Pour l'étape suivante, nous avons appliqué la méthode de classification ascendante hiérarchique qui est une technique de regroupement des individus (ici 134 patients) selon leur ressemblance en utilisant leurs valeurs sur les axes factoriels issus de l'Analyse Factorielle. Cette technique ne nécessite aucune hypothèse *a priori* concernant le nombre de groupes et leur composition. Cette analyse a permis d'identifier 5 clusters (ou phénotypes) aspergillaires dont les caractéristiques biologiques sont décrites dans le Tableau V. Du fait de la petite taille des groupes et du fort risque de biais induit par ces petits effectifs, nous n'avons pas réalisé d'analyses statistiques comparatives entre les groupes

Dans le Cluster 1, l'ensemble des marqueurs aspergillaires étaient négatifs. Dans le Cluster 2, tous les patients avaient une culture fongique positive et le taux médian d'IgG était élevé (12 UA/mL). Dans ce même groupe, la PCR était positive ( $\Delta Ct$  8,1) et le taux de GM élevé (Index de DO 3,4). En revanche, les marqueurs d'hypersensibilité aspergillaires étaient bas. Le Cluster 3 était proche du Cluster 2 : les IgE totales et aspergillaires étaient basses, le GM élevé (mais moins que dans le Cluster 2) et le taux de culture fongique positive était non négligeable (64,3%). En revanche, la sérologie était négative (taux médian d'IgG aspergillaire = 0 UA/ml). Les patients des Clusters 4 et 5 présentaient des marqueurs d'hypersensibilité aspergillaire avec des taux élevés d'IgE totales et aspergillaires. Le taux de PNE était

également plus élevé dans ces 2 Clusters. Le taux d'IgG aspergillaire était plus élevé dans le Cluster 5 par rapport à tous les autres groupes.

Par ailleurs, les 5 groupes semblaient comparables sur le genre, l'âge, le type de mutation et l'IMC. Le taux de patients présentant une insuffisance pancréatique externe était plus important dans le cluster 4 (93,8%) et le taux de patients colonisés à *P. aeruginosa* était plus important dans le cluster 3 (82,1 %). Il ne semblait pas y avoir de différence majeure entre les groupes sur le niveau de fonction respiratoire (VEMS ou antibiotiques IV). Enfin, on constatait que 92,3% (24/26) des patients du Cluster 2 étaient colonisés à *A. fumigatus* contre seulement 8,9% dans le Cluster 1.

Les patients des Clusters 4 et 5 présentaient la plus forte chute de VEMS (-4 et -8 % respectivement) et l'augmentation du nombre de jours d'antibiothérapie IV la plus forte (+8 jours) par rapport aux autres groupes (Figure 11. A et B respectivement). Les patients des Clusters 2 et 3 semblent avoir une meilleure évolution respiratoire (peu ou pas d'augmentation de nombre de jours sous antibiothérapie IV et stabilité du VEMS). Le Cluster 1 présente des résultats légèrement discordants en termes de fonction respiratoire avec une variation de VEMS positive mais une forte augmentation du nombre de jours d'antibiothérapie IV.

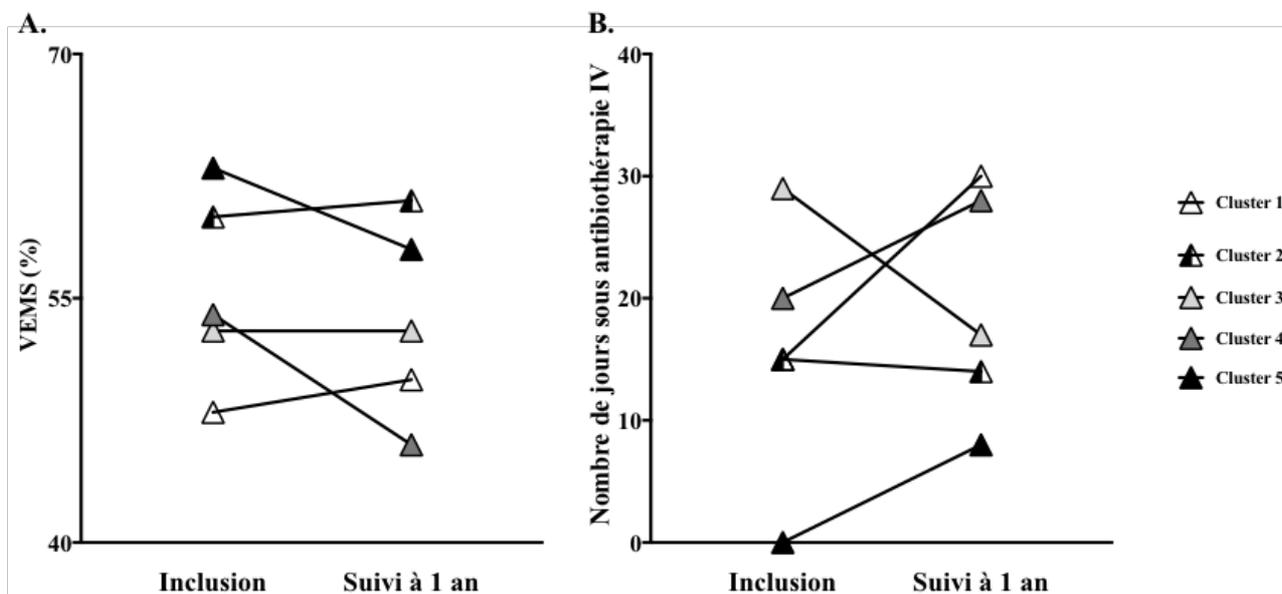
**Tableau V. Caractéristiques biologiques des patients selon les clusters.**

	<b>Cluster 1 N=56</b>	<b>Cluster 2 N=26</b>	<b>Cluster 3 N=28</b>	<b>Cluster 4 N=16</b>	<b>Cluster 5 N=8</b>
<b>Culture positive</b>	0 % (0)	<b>100 % (26)</b>	<b>64.3 % (18)</b>	<b>81.3 % (13)</b>	<b>75.0 % (6)</b>
<b>PCR (<math>\Delta</math>Ct)</b>	0 (0-0)	<b>8.1 (6.8 -9.6)</b>	0.0 (0.0 -3.1)	1.4 (0.0 -8.1)	3.4 (0.0 -9.6)
<b>GM (Index de DO)</b>	0.6 (0.2 - 1.9)	<b>3.4 (2.0 - 5.0)</b>	<b>2.8 (0.7 - 5.8)</b>	<b>1.9 (1.0 - 5.0)</b>	<b>3.6 (2.1 - 9.8)</b>
<b>IgE totales (kUI/L)</b>	49.9 (10.5 - 135)	73.8 (0 – 140)	29.2 (0 - 107.1)	<b>913 (516.5 -1340)</b>	<b>1795 (1415 -2650)</b>
<b>IgE <i>A. fumigatus</i> (kUI/L)</b>	0.9 (0.0 -7.3)	0.1 (0.0 -0.9)	0.0 (0.0 -0.2)	<b>15.6 (7.1 - 20.3)</b>	<b>55.1 (30.6 - 65.2)</b>
<b>IgG <i>A. fumigatus</i> (UA/mL)</b>	0.0 (0.0 -7.5)	<b>13.0 (8.0 - 27.0)</b>	0.0 (0.0 -5.0)	11.0 (6.0 - 24.5)	<b>31.5 (20.5 - 50.5)</b>
<b>PNE</b>	235 (165 -345)	130 (100 -230)	160 (120 -220)	<b>350 (265 -545)</b>	<b>595 (490 -725)</b>

Les données sont présentées en médiane (IQ) ou en % (nombre).

$\Delta$ Ct : La PCR est exprimée comme différence entre le seuil de positivité (40 cycles) et le nombre de cycles de PCR effectué par l'automate. PNE : polynucléaires éosinophiles ; GM : galactomannane ; DO : densité optique.

**Figure 11. Évolution des paramètres de fonction respiratoire au cours du suivi selon les Clusters.**



**Légende.** A. Variation du VEMS entre l'inclusion et le suivi à 1 an selon l'atteinte aspergillaire sous-jacente. B. Variation du nombre de jours d'antibiothérapie intraveineuse entre l'année précédant l'inclusion et la période de suivi. Chaque triangle représente la médiane pour chacun des groupes. ABPA : aspergillose broncho-pulmonaire allergique ; *A. fumigatus* : *Aspergillus fumigatus*.

Enfin, nous avons comparé les Clusters identifiés aux groupes de patients issus des classifications usuelles (Tableau VI). Les patients présentant une ABPA étaient majoritairement retrouvés dans les Clusters 4 et 5. Dans le cluster 1, on retrouvait plus d'un tiers (23/63) des patients qui ne présentaient pas d'hypersensibilité mais également 30 des 48 patients présentant une sensibilisation aspergillaire. Les Clusters 2 et 3 pour lesquels les marqueurs d'hypersensibilité aspergillaires étaient bas mais dont les marqueurs de présence aspergillaire étaient élevés (culture, sérologie, GM, PCR) regroupaient en majorité des patients issus du groupe « Absence d'hypersensibilité ».

	<b>Absence d'hypersensibilité N = 63</b>	<b>Sensibilisation N =48</b>	<b>ABPA N = 22</b>
<b>Cluster 1 N=56</b>	<b>23</b>	<b>30</b>	<b>3</b>
<b>Cluster 2 N=26</b>	18	8	Aucun
<b>Cluster 3 N=28</b>	22	4	2
<b>Cluster 4 N=16</b>	1	6	<b>9</b>
<b>Cluster 5 N=8</b>	Aucun	Aucun	<b>8</b>

**Tableau VI. Répartition des patients selon leur groupe et leur Cluster d'appartenance.**

En résumé, l'adéquation entre les phénotypes (clusters) aspergillaires et la classification clinico-biologique n'est pas parfaite, notamment sur le diagnostic d'ABPA qui se retrouve reparti de manière équivalente dans 2 clusters différents. On retiendra que les patients des clusters 4 et 5 présentent des profils sérologiques d'hypersensibilité avec une évolution respiratoire plus défavorable, alors que les patients des clusters 2 et 3 présentent des profils de colonisation et d'immunisation anti-aspergillaire et semblent avoir un pronostic respiratoire plus favorable. Les patients du Cluster 1 qui ne présentent aucun marqueurs aspergillaire ou alors une élévation isolée et modeste des IgE aspergillaires semblent également avoir un pronostic respiratoire favorable.

### 3. Discussion

Dans cette étude prospective incluant 134 patients adultes atteints de mucoviscidose et suivis au CRMR de l'hôpital Cochin, nos résultats indiquent que :

(1) La sensibilisation aspergillaire est très fréquente mais son association à un déclin plus rapide de la fonction respiratoire n'était pas statistiquement significative.

(2) L'ABPA touche environ 1 patient sur 6 des patients de notre cohorte. Ces derniers avaient tendance à présenter un déclin du VEMS plus rapide et une augmentation de la consommation d'antibiotiques IV plus importante que les patients ne présentant pas de marqueur d'hypersensibilité.

(3) La prévalence de la colonisation bronchique à *A. fumigatus* était également élevée puisqu'elle touchait 42,9 % des patients de notre cohorte, sans être associée à un pronostic respiratoire défavorable.

(4) L'analyse en clusters a montré que les variables en rapport avec l'hypersensibilité aspergillaire (IgE totales et aspergillaires et PNE) étaient fortement corrélées et évoluaient indépendamment des autres marqueurs (culture, sérologie, PCR et GM).

Les prévalences de l'ABPA (16,9%) et de la sensibilisation aspergillaire (35,8%) dans notre cohorte sont concordantes avec les données de la littérature. Dans leur analyse des données de 45 études, Maturu et al. rapportaient une prévalence poolée de 10,1% d'ABPA chez les adultes mucoviscidosiques et 39,1% de sensibilisation aspergillaire (cohorte mixte) (56). Avec leur nouvelle classification, Baxter et al. retrouvaient chez les adultes une prévalence de 17,7% pour l'ABPA et de seulement 14,6% pour la sensibilisation aspergillaire (34).

Dans notre étude, nous n'avons pas constaté de différence sur la fonction respiratoire à l'inclusion (VEMS, durée d'antibiothérapie IV) entre les patients présentant une ABPA et les autres groupes contrairement aux résultats de De Baets et al. (62). Ceci pourrait s'expliquer par le fait que nous n'avons inclus dans notre étude que des patients à l'état stable. Les patients les plus graves (cures antibiotiques fréquentes, hospitalisations) et présentant une détérioration de leur fonction respiratoire en rapport avec l'ABPA n'ont donc pas été inclus dans notre étude. Une autre explication résiderait dans le fait que nous n'avons inclus que des patients capables de produire des expectorations. Or, les patients non expectorants présentent

plus souvent une fonction respiratoire normale et un faible de taux de colonisation microbienne.

Par ailleurs, nos résultats ont retrouvé une tendance à la dégradation de la fonction respiratoire (chute du VEMS et durée de l'antibiothérapie IV) dans le groupe « ABPA » sans pour autant atteindre de significativité statistique. Ce résultat pourrait s'expliquer par trois facteurs. D'abord, par la « courte » durée de suivi et les effectifs réduits, notamment dans le groupe « ABPA ». La variation attendue du VEMS dans la population générale adulte mucoviscidose est d'environ -2% par an (8). Nous aurions vraisemblablement pu augmenter la puissance de notre étude et obtenir des résultats statistiquement significatifs avec une plus grande cohorte et une durée de suivi d'au moins 2 ans. Par ailleurs, l'exclusion des patients à l'état instable est également un biais de sélection puisque nous avons potentiellement exclu les patients les plus graves avec une détérioration plus importante de la fonction respiratoire. Enfin, une forte proportion des patients présentant une ABPA recevait un traitement pour cette indication au moment de l'inclusion, ou ont bénéficié d'une introduction ou d'une intensification du traitement au cours du suivi avec possiblement un impact sur la fonction respiratoire.

Nous avons décrit un groupe de patients (17,9%) présentant une immunisation aspergillaire (sérologie, IgG) sans marqueurs d'hypersensibilité mais avec des marqueurs élevés de « colonisation aspergillaire » : culture, GM et PCR positive. En 2013, Baxter et al. avaient également décrit un groupe similaire appelé « bronchite aspergillaire » mais dont la proportion était beaucoup plus importante (39/130 patients soit 30%) (34). La prévalence de la bronchite aspergillaire telle que définie précédemment (voir 2.5.2) était nulle dans notre cohorte. Contrairement aux résultats de Baxter et al., les patients du groupe « Immunisation » de notre population n'avaient pas de déclin de la fonction respiratoire plus important que les patients ne présentant aucune atteinte aspergillaire.

Dans notre cohorte, nous avons retrouvé une proportion importante (42,8%) de patients colonisés à *A. fumigatus*. Ce chiffre diffère des prévalences rapportées dans la littérature avec, pour les études les plus récentes, des résultats variant entre 18 et 23,5% (42, 44, 45). Cette différence pourrait s'expliquer par le fait que la plupart des études ayant évalué la prévalence de la colonisation aspergillaire chez les patients mucoviscidosiques étaient des études réalisées en pédiatrie. A notre connaissance, c'est la première fois que la prévalence de la colonisation aspergillaire définie sur la base de plusieurs prélèvements positifs sur une

période donnée est évaluée dans une population adulte mucoviscidique. De manière intéressante, nous avons montré en analyse univariée que les patients colonisés étaient plus fréquemment immunisés contre *A. fumigatus* (Sérologie IgG positive), qu'ils avaient un taux de polynucléaires sanguins plus bas et des marqueurs de fonction respiratoire meilleurs (durée de l'antibiothérapie IV) au terme du suivi que les patients non colonisés. Par ailleurs, nous avons constaté que plus de 50% des patients colonisés à *A. fumigatus* ne présentaient pas de marqueurs d'hypersensibilité liés à *A. fumigatus*. Enfin, chez les patients sensibilisés à *A. fumigatus*, les patients colonisés avaient une évolution respiratoire significativement meilleure que les patients non colonisés.

Ces résultats suggèrent qu'il existe 2 grandes catégories de manifestations aspergillaires : d'une part, les patients présentant une colonisation et/ou une immunisation sans marqueurs d'hypersensibilité associés et dont le pronostic respiratoire ne serait pas différent des patients ne présentant aucune atteinte aspergillaire ; et, d'autre part, les patients présentant une hypersensibilité aspergillaire dont la sensibilisation et l'ABPA formerait un continuum physiopathologique et chez lesquels l'évolution vers l'ABPA entraînerait une morbidité significative.

Nous avons obtenu un faible taux de positivité de la PCR *A. fumigatus* (35,8%). Baxter et al. trouvaient un taux de PCR positive de 74% en utilisant une PCR *Aspergillus* amplifiant toutes les espèces issues du groupe *Aspergillus* et pouvant donc détecter la présence d'autres espèces qu'*A. fumigatus* et ainsi surestimer la prévalence de PCR positive (34). Une étude plus récente ayant comparé différents types de PCR dont celle utilisée dans notre étude pour la détection d'*A. fumigatus* dans les expectorations de patients mucoviscidiques retrouvait un taux de PCR positive de 53,8% pour un taux de culture positive de 35,3% (36). Nos résultats, discordants avec ceux de la littérature, pourraient être dus à un échec technique (difficultés dans le traitement des échantillons, mauvaise conservation des échantillons).

Le taux de prélèvements pour lesquels le GM était positif était fortement élevé dans notre cohorte (76,1%), ce qui diffère des résultats obtenus par Baxter et al. ainsi que Brandt et al. qui trouvaient respectivement 46% et 45,5% de prélèvements positifs pour le GM (34) (35). Il existe principalement 2 causes de faux positifs pour le GM : la réaction croisée avec le GM produit par d'autres champignons et la présence de bêta-lactamines hémisynthétiques dans les expectorations. Dans notre cohorte, nous avons identifié 7 patients (5,2 % de la

cohorte) pour lesquels le dosage du GM était positif alors que la culture fongique et la PCR étaient négatives. Chez ces 7 patients, la culture fongique était en revanche positive pour des champignons impliqués dans une réaction croisée avec le GM d'*A. fumigatus* (*penicillinum*, *Geotrichum*). De plus, une forte proportion de patients recevait régulièrement des antibiotiques par voie intraveineuse, dont l'association pipéracilline-tazobactam, pouvant interférer avec le dosage du GM. Nos résultats suggèrent donc que l'utilisation du GM est faisable en routine mais n'a pas un apport diagnostique significatif (pas de corrélation entre GM et atteinte aspergillaire), sauf peut-être pour le sous-groupe de patients présentant une immunisation. L'utilisation de la PCR semble moins évidente en routine. Une étude récente soulignait également les difficultés rencontrées avec cette technique pour la détection d'*A. fumigatus* dans les expectorations de patients BPCO et colonisés à *A. fumigatus* (73).

Un des résultats importants de notre étude réside dans les résultats obtenus à partir de l'analyse en clusters et en particulier ceux obtenus lors de la première étape du processus, à savoir la classification des variables. Nous avons montré que les variables d'hypersensibilité liée à *A. fumigatus* étaient statistiquement corrélées les unes aux autres tout comme l'étaient entre elles les variables associées à la présence d'*A. fumigatus* dans les bronches. Ces 2 groupes de variables n'étaient cependant pas reliés entre eux. Ce résultat conforterait l'hypothèse de l'existence de 2 grands phénotypes aspergillaires : hypersensibilité d'une part et colonisation/immunisation d'autre part, le premier ayant un pronostic défavorable. Bien que notre analyse ait permis l'identification de 5 phénotypes (clusters) aspergillaires dont les caractéristiques cliniques et de suivi corroborent partiellement l'hypothèse énoncée ci-dessus, l'adéquation entre les phénotypes (clusters) aspergillaires et la classification clinico-biologique ne semble pas parfaite, notamment sur le diagnostic d'ABPA qui se retrouve reparti de manière équivalente dans 2 clusters différents. Par ailleurs, le faible effectif des différents clusters a empêché la réalisation d'analyses statistiques et de comparaison entre les groupes. Néanmoins, les clusters identifiés ne semblent pas présenter une pertinence clinique supérieure à celles des classifications habituelles.

Les limites de notre étude et l'interprétation des résultats obtenus résident principalement dans l'effectif insuffisant de la cohorte et la courte durée de suivi. Nos résultats devraient être validés sur une plus large cohorte d'adultes mucoviscidosiques, incluant des patients suivis dans plusieurs centres sur une durée d'au moins deux ans.

## CONCLUSION

En conclusion, notre étude rapporte pour la première fois la prévalence et l'impact clinique de la sensibilisation et de la colonisation aspergillaire dans la population adulte mucoviscidique. Elle suggère également l'existence de 2 grandes catégories d'atteintes aspergillaires dont les potentiels évolutifs diffèrent : d'une part les patients présentant des signes de colonisation et d'immunisation (cultures fongiques positives de manière répétées, sérologie positive) sans manifestation d'hypersensibilité ; et d'autre part les patients présentant des atteintes avec manifestations d'hypersensibilité induite par *A. fumigatus*. L'hypersensibilité aspergillaire semble être un continuum physiopathologique allant de la sensibilisation à l'ABPA, cette dernière étant associée à une morbidité respiratoire plus importante. Ces données, si elles étaient confirmées sur une plus large cohorte, suggèreraient que l'instauration systématique d'un traitement antifongique chez les patients présentant une colonisation ou une immunisation à *A. fumigatus* ne serait pas justifiée (balance bénéfice risque défavorable). Une étude randomisée multicentrique serait ensuite nécessaire pour valider cette hypothèse.

## BIBLIOGRAPHIE

1. Stephenson AL, Stanojevic S, Sykes J, Burgel P-R. The changing epidemiology and demography of cystic fibrosis. *La Presse Médicale*. 2017;46(6):e87-e95.
2. Ong T, Ramsey BW. Update in Cystic Fibrosis 2014. *American journal of respiratory and critical care medicine*. 2015;192(6):669-675.
3. Davis PB. Cystic Fibrosis Since 1938. *American journal of respiratory and critical care medicine*. 2006;173(5):475-482.
4. Vaincre la Mucoviscidose I. Registre français de la mucoviscidose-Bilan des données 2017. 2018 2018.
5. Burgel P-R, Bellis G, Elborn JS. Modelling future trends in cystic fibrosis demography using the French Cystic Fibrosis Registry: update and sensitivity analysis. *European Respiratory Journal*. 2017;50(2):1700763.
6. Burgel P-R, Bellis G, Olesen HV, Viviani L, Zolin A, Blasi F, Elborn JS, Europe EETFoPoCfAwCFi. Future trends in cystic fibrosis demography in 34 European countries. *The European respiratory journal*. 2015;46(1):133-141.
7. Martin C, Hamard C, Kanaan R, Boussaud V, Grenet D, Abély M, Hubert D, Munck A, Lemonnier L, Burgel P-R. Causes of death in French cystic fibrosis patients: The need for improvement in transplantation referral strategies! *Journal of Cystic Fibrosis*. 2016;15(2):204-212.
8. Stoltz DA, Meyerholz DK, Welsh MJ. Origins of Cystic Fibrosis Lung Disease. *New England Journal of Medicine*. 2015;372(4):351-362.
9. Courtney JM, Bradley J, McCaughan J, O'Connor TM, Shortt C, Bredin CP, Bradbury I, Elborn JS. Predictors of mortality in adults with cystic fibrosis. *Pediatric pulmonology*. 2007;42(6):525-532.
10. Chmiel JF, Aksamit TR, Chotirmall SH, Dasenbrook EC, Elborn JS, LiPuma JJ, Ranganathan SC, Waters VJ, Ratjen FA. Antibiotic management of lung infections in cystic fibrosis. II. Nontuberculous mycobacteria, anaerobic bacteria, and fungi. *Annals of the American Thoracic Society*. 2014;11(8):1298-1306.
11. Fischer J, van Koningsbruggen-Rietschel S, Rietschel E, Vehreschild MJ, Wisplinghoff H, Kronke M, Hamprecht A. Prevalence and molecular characterization of azole resistance in *Aspergillus* spp. isolates from German cystic fibrosis patients. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*. 2014;69(6):1533-1536.
12. Sabino R, Ferreira JA, Moss RB, Valente J, Verissimo C, Carolino E, Clemons KV, Everson C, Banaei N, Penner J, Stevens DA. Molecular epidemiology of *Aspergillus* collected from cystic fibrosis patients. *Journal of cystic fibrosis : official journal of the European Cystic Fibrosis Society*. 2015;14(4):474-481.

13. Engel TGP, Erren E, Vanden Driessche KSJ, Melchers WJG, Reijers MH, Merkus P, Verweij PE. Aerosol Transmission of *Aspergillus fumigatus* in Cystic Fibrosis Patients in the Netherlands. *Emerging infectious diseases*. 2019;25(4):797-799.
14. Chabi ML, Goracci A, Roche N, Paugam A, Lupo A, Revel MP. Pulmonary aspergillosis. *Diagnostic and interventional imaging*. 2015;96(5):435-442.
15. McCormick A, Loeffler J, Ebel F. *Aspergillus fumigatus*: contours of an opportunistic human pathogen. *Cellular microbiology*. 2010;12(11):1535-1543.
16. Page ID, Richardson M, Denning DW. Antibody testing in aspergillosis--quo vadis? *Medical mycology*. 2015;53(5):417-439.
17. Uffredi ML, Mangiapan G, Cadranel J, Kac G. Significance of *Aspergillus fumigatus* isolation from respiratory specimens of nongranulocytopenic patients. *European journal of clinical microbiology & infectious diseases : official publication of the European Society of Clinical Microbiology*. 2003;22(8):457-462.
18. Jubin V, Ranque S, Stremmer Le Bel N, Sarles J, Dubus JC. Risk factors for *Aspergillus* colonization and allergic bronchopulmonary aspergillosis in children with cystic fibrosis. *Pediatric pulmonology*. 2010;45(8):764-771.
19. Park SJ, Mehrad B. Innate immunity to *Aspergillus* species. *Clinical microbiology reviews*. 2009;22(4):535-551.
20. Soubani AO, Chandrasekar PH. The clinical spectrum of pulmonary aspergillosis. *Chest*. 2002;121(6):1988-1999.
21. Bhargava V, Tomaszefski JF, Jr., Stern RC, Abramowsky CR. The pathology of fungal infection and colonization in patients with cystic fibrosis. *Human pathology*. 1989;20(10):977-986.
22. Chaudhary N, Datta K, Askin FB, Staab JF, Marr KA. Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator regulates epithelial cell response to *Aspergillus* and resultant pulmonary inflammation. *American journal of respiratory and critical care medicine*. 2012;185(3):301-310.
23. Heltshe SL, Mayer-Hamblett N, Burns JL, Khan U, Baines A, Ramsey BW, Rowe SM. *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis patients with G551D-CFTR treated with ivacaftor. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America*. 2015;60(5):703-712.
24. Garlanda C, Hirsch E, Bozza S, Salustri A, De Acetis M, Nota R, Maccagno A, Riva F, Bottazzi B, Peri G, Doni A, Vago L, Botto M, De Santis R, Carminati P, Siracusa G, Altruda F, Vecchi A, Romani L, Mantovani A. Non-redundant role of the long pentraxin PTX3 in anti-fungal innate immune response. *Nature*. 2002;420(6912):182-186.
25. Warris A, Bercusson A, Armstrong-James D. *Aspergillus* colonization and antifungal immunity in cystic fibrosis patients. *Medical mycology*. 2019;57(Supplement\_2):S118-s126.
26. Margalit A, Kavanagh K. The innate immune response to *Aspergillus fumigatus* at the alveolar surface. *FEMS microbiology reviews*. 2015;39(5):670-687.

27. Brunel SF, Willment JA, Brown GD, Devereux G, Warris A. Aspergillus-induced superoxide production by cystic fibrosis phagocytes is associated with disease severity. *ERJ open research*. 2018;4(2).
28. Mueller C, Braag SA, Keeler A, Hodges C, Drumm M, Flotte TR. Lack of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator in CD3+ lymphocytes leads to aberrant cytokine secretion and hyperinflammatory adaptive immune responses. *American journal of respiratory cell and molecular biology*. 2011;44(6):922-929.
29. Borman AM, Palmer MD, Delhaes L, Carrere J, Favennec L, Ranque S, Gangneux JP, Horre R, Bouchara JP. Lack of standardization in the procedures for mycological examination of sputum samples from CF patients: a possible cause for variations in the prevalence of filamentous fungi. *Medical mycology*. 2010;48 Suppl 1:S88-97.
30. Burgel PR, Paugam A, Hubert D, Martin C. Aspergillus fumigatus in the cystic fibrosis lung: pros and cons of azole therapy. *Infection and drug resistance*. 2016;9:229-238.
31. De Pauw B, Walsh TJ, Donnelly JP, Stevens DA, Edwards JE, Calandra T, Pappas PG, Maertens J, Lortholary O, Kauffman CA, Denning DW, Patterson TF, Maschmeyer G, Bille J, Dismukes WE, Herbrecht R, Hope WW, Kibbler CC, Kullberg BJ, Marr KA, Munoz P, Odds FC, Perfect JR, Restrepo A, Ruhnke M, Segal BH, Sobel JD, Sorrell TC, Viscoli C, Wingard JR, Zaoutis T, Bennett JE. Revised definitions of invasive fungal disease from the European Organization for Research and Treatment of Cancer/Invasive Fungal Infections Cooperative Group and the National Institute of Allergy and Infectious Diseases Mycoses Study Group (EORTC/MSG) Consensus Group. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America*. 2008;46(12):1813-1821.
32. Massam J, Bitnun A, Solomon M, Somers GR, Guerguerian AM, van Wylick R, Waters V. Invasive aspergillosis in cystic fibrosis: a fatal case in an adolescent and review of the literature. *The Pediatric infectious disease journal*. 2011;30(2):178-180.
33. Trager J, Melichar VO, Meyer R, Rauh M, Bogdan C, Held J. Serum (1->3)-beta-D-glucan and galactomannan levels in patients with cystic fibrosis: a retrospective cohort study. *BMC pulmonary medicine*. 2018;18(1):52.
34. Baxter CG, Dunn G, Jones AM, Webb K, Gore R, Richardson MD, Denning DW. Novel immunologic classification of aspergillosis in adult cystic fibrosis. *The Journal of allergy and clinical immunology*. 2013;132(3):560-566.e510.
35. Brandt C, Roehmel J, Rickerts V, Melichar V, Niemann N, Schwarz C. Aspergillus Bronchitis in Patients with Cystic Fibrosis. *Mycopathologia*. 2018;183(1):61-69.
36. Guegan H, Chevrier S, Belleguic C, Deneuille E, Robert-Gangneux F, Gangneux JP. Performance of Molecular Approaches for Aspergillus Detection and Azole Resistance Surveillance in Cystic Fibrosis. *Frontiers in microbiology*. 2018;9:531.
37. Hong G, Psoter KJ, Jennings MT, Merlo CA, Boyle MP, Hadjiliadis D, Kawut SM, Lechtzin N. Risk factors for persistent Aspergillus respiratory isolation in cystic fibrosis. *Journal of cystic fibrosis : official journal of the European Cystic Fibrosis Society*. 2018;17(5):624-630.

38. Paugam A, Baixench MT, Demazes-Dufeu N, Burgel PR, Sauter E, Kanaan R, Dusser D, Dupouy-Camet J, Hubert D. Characteristics and consequences of airway colonization by filamentous fungi in 201 adult patients with cystic fibrosis in France. *Medical mycology*. 2010;48 Suppl 1:S32-36.
39. Coron N, Pihet M, Frealle E, Lemeille Y, Pinel C, Pelloux H, Gargala G, Favennec L, Accoceberry I, Durand-Joly I, Dalle F, Huet F, Fanton A, Boldron A, Loeuille GA, Domblides P, Coltey B, Pin I, Llerena C, Troussier F, Person C, Marguet C, Wizla N, Thumerelle C, Turck D, Bui S, Fayon M, Duhamel A, Prevotat A, Wallaert B, Leroy S, Bouchara JP, Delhaes L. Toward the Standardization of Mycological Examination of Sputum Samples in Cystic Fibrosis: Results from a French Multicenter Prospective Study. *Mycopathologia*. 2018;183(1):101-117.
40. Reece E, Segurado R, Jackson A, McClean S, Renwick J, Grealley P. Co-colonisation with *Aspergillus fumigatus* and *Pseudomonas aeruginosa* is associated with poorer health in cystic fibrosis patients: an Irish registry analysis. *BMC pulmonary medicine*. 2017;17(1):70.
41. Burgel PR, Baixench MT, Amsellem M, Audureau E, Chapron J, Kanaan R, Honore I, Dupouy-Camet J, Dusser D, Klaassen CH, Meis JF, Hubert D, Paugam A. High prevalence of azole-resistant *Aspergillus fumigatus* in adults with cystic fibrosis exposed to itraconazole. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2012;56(2):869-874.
42. Saunders RV, Modha DE, Claydon A, Gaillard EA. Chronic *Aspergillus fumigatus* colonization of the pediatric cystic fibrosis airway is common and may be associated with a more rapid decline in lung function. *Medical mycology*. 2016;54(5):537-543.
43. Bargon J, Daultbaev N, Kohler B, Wolf M, Posselt HG, Wagner TO. Prophylactic antibiotic therapy is associated with an increased prevalence of *Aspergillus* colonization in adult cystic fibrosis patients. *Respiratory medicine*. 1999;93(11):835-838.
44. de Vrankrijker AM, van der Ent CK, van Berkhout FT, Stellato RK, Willems RJ, Bonten MJ, Wolfs TF. *Aspergillus fumigatus* colonization in cystic fibrosis: implications for lung function? *Clinical microbiology and infection : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*. 2011;17(9):1381-1386.
45. Fillaux J, Bremont F, Murriss M, Cassaing S, Rittie JL, Tetu L, Segonds C, Abbal M, Bieth E, Berry A, Pipy B, Magnaval JF. Assessment of *Aspergillus* sensitization or persistent carriage as a factor in lung function impairment in cystic fibrosis patients. *Scandinavian journal of infectious diseases*. 2012;44(11):842-847.
46. Amin R, Dupuis A, Aaron SD, Ratjen F. The effect of chronic infection with *Aspergillus fumigatus* on lung function and hospitalization in patients with cystic fibrosis. *Chest*. 2010;137(1):171-176.
47. Rocchi S, Richaud-Thiriez B, Barrera C, Grenouillet F, Dalphin JC, Millon L, Reboux G. Evaluation of mold exposure in cystic fibrosis patients' dwellings and allergic bronchopulmonary risk. *Journal of cystic fibrosis : official journal of the European Cystic Fibrosis Society*. 2015;14(2):242-247.

48. Briard B, Bomme P, Lechner BE, Mislin GL, Lair V, Prevost MC, Latge JP, Haas H, Beauvais A. *Pseudomonas aeruginosa* manipulates redox and iron homeostasis of its microbiota partner *Aspergillus fumigatus* via phenazines. *Scientific reports*. 2015;5:8220.
49. Noni M, Katelari A, Dimopoulos G, Kourlaba G, Spoulou V, Alexandrou-Athanassoulis H, Doudounakis SE, Tzoumaka-Bakoula C. Inhaled corticosteroids and *Aspergillus fumigatus* isolation in cystic fibrosis. *Medical mycology*. 2014;52(7):715-722.
50. Ramsey KA, Ranganathan S, Park J, Skoric B, Adams AM, Simpson SJ, Robins-Browne RM, Franklin PJ, de Klerk NH, Sly PD, Stick SM, Hall GL. Early respiratory infection is associated with reduced spirometry in children with cystic fibrosis. *American journal of respiratory and critical care medicine*. 2014;190(10):1111-1116.
51. Noni M, Katelari A, Dimopoulos G, Doudounakis SE, Tzoumaka-Bakoula C, Spoulou V. *Aspergillus fumigatus* chronic colonization and lung function decline in cystic fibrosis may have a two-way relationship. *European journal of clinical microbiology & infectious diseases : official publication of the European Society of Clinical Microbiology*. 2015;34(11):2235-2241.
52. McMahon MA, Chotirmall SH, McCullagh B, Branagan P, McElvaney NG, Logan PM. Radiological abnormalities associated with *Aspergillus* colonization in a cystic fibrosis population. *European journal of radiology*. 2012;81(3):e197-202.
53. Chotirmall SH, Branagan P, Gunaratnam C, McElvaney NG. *Aspergillus*/allergic bronchopulmonary aspergillosis in an Irish cystic fibrosis population: a diagnostically challenging entity. *Respiratory care*. 2008;53(8):1035-1041.
54. Shoseyov D, Brownlee KG, Conway SP, Kerem E. *Aspergillus* bronchitis in cystic fibrosis. *Chest*. 2006;130(1):222-226.
55. Delfino E, Del Puente F, Briano F, Sepulcri C, Giacobbe DR. Respiratory Fungal Diseases in Adult Patients With Cystic Fibrosis. *Clin Med Insights Circ Respir Pulm Med*. 2019;13:1179548419849939.
56. Maturu VN, Agarwal R. Prevalence of *Aspergillus* sensitization and allergic bronchopulmonary aspergillosis in cystic fibrosis: systematic review and meta-analysis. *Clinical and experimental allergy : journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology*. 2015;45(12):1765-1778.
57. Wojnarowski C, Eichler I, Gartner C, Gotz M, Renner S, Koller DY, Frischer T. Sensitization to *Aspergillus fumigatus* and lung function in children with cystic fibrosis. *American journal of respiratory and critical care medicine*. 1997;155(6):1902-1907.
58. Kraemer R, Delosea N, Ballinari P, Gallati S, Cramer R. Effect of allergic bronchopulmonary aspergillosis on lung function in children with cystic fibrosis. *American journal of respiratory and critical care medicine*. 2006;174(11):1211-1220.
59. Shah A, Panjabi C. Allergic Bronchopulmonary Aspergillosis: A Perplexing Clinical Entity. *Allergy, asthma & immunology research*. 2016;8(4):282-297.
60. Stevens DA, Moss RB, Kurup VP, Knutsen AP, Greenberger P, Judson MA, Denning DW, Cramer R, Brody AS, Light M, Skov M, Maish W, Mastella G. Allergic

bronchopulmonary aspergillosis in cystic fibrosis--state of the art: Cystic Fibrosis Foundation Consensus Conference. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America*. 2003;37 Suppl 3:S225-264.

61. Peetermans M, Goeminne P, De Boeck C, Dupont LJ. IgE sensitization to *Aspergillus fumigatus* is not a bystander phenomenon in cystic fibrosis lung disease. *Chest*. 2014;146(3):e99-e100.

62. De Baets F, De Keyzer L, Van Daele S, Schelstraete P, Van Biervliet S, Van Braeckel E, Thomas M, Wanyama SS. Risk factors and impact of allergic bronchopulmonary aspergillosis in *Pseudomonas aeruginosa*-negative CF patients. *Pediatric allergy and immunology : official publication of the European Society of Pediatric Allergy and Immunology*. 2018;29(7):726-731.

63. Castellani C, Duff AJA, Bell SC, Heijerman HGM, Munck A, Ratjen F, Sermet-Gaudelus I, Southern KW, Barben J, Flume PA, Hodková P, Kashirskaya N, Kirszenbaum MN, Madge S, Oxley H, Plant B, Schwarzenberg SJ, Smyth AR, Taccetti G, Wagner TOF, Wolfe SP, Drevinek P. ECFS best practice guidelines: the 2018 revision. *Journal of Cystic Fibrosis*. 2018;17(2):153-178.

64. Wark PA, Gibson PG. Allergic bronchopulmonary aspergillosis: new concepts of pathogenesis and treatment. *Respirology (Carlton, Vic.)*. 2001;6(1):1-7.

65. Greenberger PA. Chapter 18: Allergic bronchopulmonary aspergillosis. *Allergy and asthma proceedings*. 2012;33 Suppl 1:61-63.

66. van der Ent CK, Hoekstra H, Rijkers GT. Successful treatment of allergic bronchopulmonary aspergillosis with recombinant anti-IgE antibody. *Thorax*. 2007;62(3):276-277.

67. Wong R, Wong M, Robinson PD, Fitzgerald DA. Omalizumab in the management of steroid dependent allergic bronchopulmonary aspergillosis (ABPA) complicating cystic fibrosis. *Paediatric respiratory reviews*. 2013;14(1):22-24.

68. Zirbes JM, Milla CE. Steroid-sparing effect of omalizumab for allergic bronchopulmonary aspergillosis and cystic fibrosis. *Pediatric pulmonology*. 2008;43(6):607-610.

69. Brinkmann F, Schwerk N, Hansen G, Ballmann M. Steroid dependency despite omalizumab treatment of ABPA in cystic fibrosis. *Allergy*. 2010;65(1):134-135.

70. Nove-Josserand R, Grard S, Auzou L, Reix P, Murriss-Espin M, Bremont F, Mammar B, Mely L, Hubert D, Durieu I, Burgel PR. Case series of omalizumab for allergic bronchopulmonary aspergillosis in cystic fibrosis patients. *Pediatric pulmonology*. 2017;52(2):190-197.

71. Jat KR, Walia DK, Khairwa A. Anti-IgE therapy for allergic bronchopulmonary aspergillosis in people with cystic fibrosis. *The Cochrane database of systematic reviews*. 2015(11):Cd010288.

72. Husain S, Paterson DL, Studer SM, Crespo M, Pilewski J, Durkin M, Wheat JL, Johnson B, McLaughlin L, Bentsen C, McCurry KR, Singh N. *Aspergillus galactomannan antigen* in

the bronchoalveolar lavage fluid for the diagnosis of invasive aspergillosis in lung transplant recipients. *Transplantation*. 2007;83(10):1330-1336.

73. Everaerts S, Lagrou K, Vermeersch K, Dupont LJ, Vanaudenaerde BM, Janssens W. *Aspergillus fumigatus* Detection and Risk Factors in Patients with COPD-Bronchiectasis Overlap. *International journal of molecular sciences*. 2018;19(2).

## **Caractérisation des atteintes aspergillaires broncho-pulmonaires chez les adultes mucoviscidosiques.**

*Aspergillus fumigatus* (*A.f.*) est le champignon le plus fréquemment isolé dans les bronches des patients mucoviscidosiques. Il peut entraîner des atteintes respiratoires allant de la colonisation à l'aspergillose broncho-pulmonaire allergique (ABPA). Les données publiées portent essentiellement sur des populations pédiatriques. Les objectifs de cette étude étaient : (1) déterminer la prévalence des atteintes aspergillaires et leur impact sur la fonction respiratoire chez les adultes mucoviscidosiques, (2) étudier les performances du galactomannane (GM) et de la PCR *A.f.* dans les expectorations et (3) évaluer la pertinence clinique d'une nouvelle classification issue d'une analyse en clusters. Nous avons inclus 134 patients dans cette cohorte prospective. La sensibilisation aspergillaire était l'atteinte la plus fréquente (35,8%), devant l'ABPA qui était retrouvée chez 16,4% des patients. Toutes deux semblaient associées à un déclin plus rapide de la fonction respiratoire. La colonisation à *A.f.* n'était pas associée à une accélération du déclin de la fonction respiratoire. La culture fongique était positive pour *A.f.* chez 47% des patients alors que la PCR n'était positive que dans 35,8% des cas. Le dosage du GM dans les expectorations était positif chez 76,1% des patients et n'était pas spécifique d'une atteinte aspergillaire. Parmi les cinq phénotypes aspergillaires identifiés par l'analyse en clusters, ceux présentant des marqueurs d'hypersensibilité aspergillaire semblaient avoir un pronostic respiratoire plus défavorable. Ces résultats montrent que l'hypersensibilité induite par *A.f.* serait un facteur de comorbidité chez les patients adultes mucoviscidosiques. Ils suggèrent que la colonisation à *A.f.* n'aurait pas d'impact sur la fonction respiratoire chez ces patients.

Mots clés : *Aspergillus fumigatus*, Aspergillose broncho-pulmonaire allergique, Galactomannane, Mucoviscidose, Sensibilisation aspergillaire

## **Clinico-biological presentation of pulmonary aspergillosis in adult patients with cystic fibrosis.**

*Aspergillus fumigatus* (*A.f.*) is the most common fungi isolated in adult cystic fibrosis (CF) patients. A wide range of clinico-immunological presentations have been reported, from asymptomatic colonization to allergic bronchopulmonary aspergillosis (ABPA). Most available published data on pulmonary aspergillosis in CF patients come from pediatric cohort. Our objectives were (1) to determine the prevalence of pulmonary aspergillosis manifestations and their impact on lung function in adults with CF, (2) to evaluate the performance of sputum galactomannan (GM) and real-time PCR to detect *A.f.*, and (3) to assess the clinical relevance of a new classification built with cluster analysis. We conducted a monocentric prospective study including 134 adults with CF. *A.f.* sensitization was highly prevalent (35.8%) and ABPA was present in 16.4% of patients. Both conditions were associated with worse lung function decline. *A.f.* colonization was not associated with accelerated lung function decline. Fungal culture was overall positive in 47% of patients whereas sputum *A.f.* PCR was positive in only 35.8% of patients. Sputum GM was positive in 76.1% patients and was not correlated to a specific aspergillosis-related manifestation. Among the 5 phenotypes identified with cluster analysis, those with high *A.f.* hypersensitivity markers had worse lung function decline. These findings confirm that *A. fumigatus*-related and ABPA occur frequently and are associated with worse lung function in adults with CF. They also suggest that *A.f.* colonization has no impact on lung function in adults with CF.

Keywords: *Aspergillus fumigatus*, Allergic bronchopulmonary aspergillosis, Cystic fibrosis, Galactomannan, Sensitization.

**Université Paris Descartes  
Faculté de Médecine Paris Descartes  
15, rue de l'Ecole de Médecine  
75270 Paris cedex 06**