



**Université Lille 2**  
**Droit et Santé**

UNIVERSITE LILLE 2 DROIT ET SANTE  
**FACULTE DE MEDECINE HENRI WAREMBOURG**

Année : **2014**

THESE POUR LE DIPLOME D'ETAT  
DE DOCTEUR EN MEDECINE

**Evaluation du risque fongique dans la mucoviscidose : étude internationale multicentrique prospective évaluant la prévalence des micromycètes et comparant les performances analytiques des milieux de culture- MucoFong International Project (MFIP)**

Présentée et soutenue publiquement le 30 Octobre à 18h  
au Pôle Formation  
**Par Kada TOUATI**

---

**JURY**

**Président :**

**Monsieur le Professeur Boualem SENDID**

**Assesseurs :**

**Monsieur le Professeur Alain DUHAMEL**

**Madame le Professeur Françoise BOTTEREL**

**Directeur de Thèse :**

**Madame le Docteur Laurence DELHAES**

---

## **Avertissement**

**La Faculté n'entend donner aucune approbation aux opinions émises dans les thèses : celles-ci sont propres à leurs auteurs.**

## Liste des abréviations

ABPA	Aspergillose broncho-pulmonaire allergique
ADN	Acide désoxyribonucléique
Ag	Antigène
AI	Aspergillose invasive
API	Aspergillose pulmonaire invasive
ARN	Acide ribonucléique
ATP	Adénosine triphosphate
BM	<i>B+ medium</i>
CHAID	<i>CHI-squared automatic interaction detector</i>
CF	<i>Cystic fibrosis</i>
CFF	<i>Cystic fibrosis foundation</i>
CFTR	<i>Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator</i>
CM	<i>Chromogenic medium</i>
CRCM	Centre de ressources et de compétences de la mucoviscidose
ECMM	<i>European confederation for medical mycology</i>
EORTC	<i>European organization for research and treatment of cancer</i>
ENac	<i>Epithelial sodium channel</i>
DRBBC	Dichloran-rose bengal bénomyl chloramphénicol
DIYPDA	Dilution 1/10 yeast peptone dextrose adenine
EM	<i>Erythritol medium</i>
IG	Immunoglobuline
IL	Interleukine
IMC	Indice de Masse Corporelle
IRM	Imagerie par résonance magnétique
ISET	<i>Isolation by size of epithelial tumor/trophoblastic cells</i>
ISHAM	<i>International society for human and animal mycology</i>
ITS	<i>Internal transcribed spacer</i>
Kb	Kilo-base
KDa	Kilo Dalton
MALDI-TOF	<i>Matrix Assisted Laser Desorption Ionization - Time of Flight</i>

MBPM	Mycose broncho-pulmonaire allergique
MFIP	<i>Mucofong international project</i>
MSG	<i>Mycoses study group</i>
LBA	Lavage broncho-alvéolaire
LCR	Liquide céphalo-rachidien
ORCC	<i>Outward rectifying chloride channel</i>
pH	Potentiel hydrogène
PHRC	Programme hospitalier de recherche clinique
Qsp	Quantité suffisante pour
ROMK	<i>Renal outer medullary potassium</i>
RT-PCR	<i>Real time polymerase chain reaction</i>
Sab	Sabouraud
SBPM	Scedosporiose broncho-pulmonaire allergique
Se	Sensibilité
SNC	Système nerveux central
SSM	<i>Scedosporium selectif medium</i>
TIR	Trypsine immuno-réactive
UI	Unité internationale
USA	<i>United states of American</i>
VEMS	Volume expiratoire maximal par seconde
VPN	Valeur prédictive négative
VS	Vitesse de sédimentation
YPDA	<i>Yeast peptone dextrose adenine</i>
YPDACC	<i>Yeast peptone dextrose adenine chloramphenicol cycloheximide</i>

## Table des matières

<b>Résumé .....</b>	<b>1</b>
<b>Introduction et synthèse bibliographique .....</b>	<b>2</b>
I. Généralités sur la mucoviscidose .....	3
A. Epidémiologie.....	3
B. Génétique.....	5
C. Physiopathologie .....	6
D. Manifestations cliniques .....	7
1. Atteinte pulmonaire .....	8
2. Atteinte digestive .....	8
3. Atteinte génitale.....	9
4. Autres atteintes .....	9
E. Diagnostic et dépistage .....	10
1. Dépistage prénatal .....	10
2. Dépistage néonatal .....	10
F. Prise en charge thérapeutique .....	11
II. Pathologie fongique et mucoviscidose.....	14
A. Espèce genre <i>Aspergillus</i> .....	14
1. Aspergillose Broncho-pulmonaire allergique (ABPA) .....	18
2. Bronchite aspergillaire.....	20
3. Maladie aspergillaire invasive .....	21
4. Aspergillome .....	22
B. <i>Scedosporium sp.</i> .....	24
1. Le complexe <i>Pseudallescheria boydii</i> / <i>Scedosporium apiospermum</i> ..	24
2. <i>Lomentospora prolificans</i> ( <i>Scedosporium prolificans</i> ) .....	26
C. <i>Exophiala dermatitidis</i> .....	27
D. <i>Rasamsonia argillacea</i> .....	28
E. <i>Acrophialophora fusicarpa</i> .....	29
F. <i>Candida</i> .....	29
III. Contexte général de notre étude .....	30
<b>Matériels et méthodes.....</b>	<b>32</b>
I. Population étudiée .....	33
II. Milieux de cultures utilisés .....	34
A. Milieu chromogène (CM) .....	34
B. Milieu Sabouraud ou YPDA.....	34
C. Milieu Dichloran-Rose Bengal Benomyl Chloramphénicol (DRBBC).....	35
D. Milieu sélectif pour <i>Scedosporium</i> (SSM).....	36
E. Milieu de Sabouraud ou milieu YPDA additionné de chloramphénicol et de cycloheximide (YPDACC) .....	36
F. Milieu B+ (BM).....	37
G. Milieu enrichi en érythritol (EM) .....	37
III. Protocole de l'étude MFIP .....	38
A. Examen macroscopique.....	40
B. Examen microscopique .....	41
IV. Analyses statistiques .....	42

A. Prévalences.....	42
B. Sensibilités et Valeurs prédictives négatives (VPN) des milieux de culture .....	43
<b>Résultats .....</b>	<b>44</b>
I. Données générales de l'étude .....	44
II. Prévalence des espèces fongiques .....	46
A. Prévalence globale.....	46
B. Prévalence en fonction de l'âge .....	48
C. Prévalence en fonction de la latitude.....	49
III. Evaluation des performances des milieux de culture.....	51
A. Détermination des sensibilités et valeurs prédictives négatives.....	51
B. Estimation des délais de positivité des milieux.....	55
C. Recherche de la combinaison optimale des milieux pour l'analyse mycologique des expectorations.....	56
<b>Discussion .....</b>	<b>61</b>
I. Epidémiologie fongique de notre population .....	61
II. Performances des milieux de culture étudiés .....	65
<b>Conclusion.....</b>	<b>70</b>
<b>Références bibliographiques .....</b>	<b>71</b>
<b>Annexes .....</b>	<b>82</b>
Annexe 1 : Feuille de paillasse MFIP .....	82
Annexe 2 : Abstract de la communication orale de 8 <sup>ème</sup> Colloque européen des jeunes chercheurs travaillant sur la mucoviscidose, Paris 19-21 février 2014 .....	85
Annexe 3: Abstract de communication orale du congrès français de la mycologie médicale Reims 22-23 mai 2014.....	86
Annexe 4: <i>The airway colonization by opportunistic filamentous fungi in patients with cystic fibrosis: Recent up-dates</i> .....	87

## RESUME

**Introduction et objectif :** La cause majeure de morbidité et de mortalité dans la mucoviscidose est l'atteinte pulmonaire et ses surinfections bactériennes et/ou fongiques. Le rôle des infections fongiques est de plus en plus reconnu dans la détérioration de la fonction respiratoire chez les patients atteints de mucoviscidose. L'étude internationale prospective « MFIP » (pour *MucoFong International Project*) avait pour objectif (i) de déterminer la fréquence des micromycètes dans les voies respiratoires des patients atteints de mucoviscidose, et (ii) d'évaluer et comparer différents milieux de culture utilisés dans la pratique mycologique avec pour but de proposer un protocole standardisé pour l'isolement des espèces fongiques chez ces patients.

**Méthode :** Nous avons étudié 469 expectorations de patients atteints de mucoviscidose âgés de 1 à 67 ans, suivis dans l'un des 19 centres participants (18 centres européens et un australien). Après un prétraitement par agent mucolytique, les expectorations ont été ensemencées sur 7 milieux : milieu chromogène (CM), milieu de Sabouraud ou milieu YPDA (YPDA), milieu Dichloran-Rose Bengal Benomyl Chloramphénicol (DRBBC), milieu Sélectif *Scedosporium* (SSM), milieu de Sabouraud (ou milieu YPDA) additionné de chloramphénicol et de cycloheximide (YPDACC), milieu B+ (BM), milieu enrichi en érythritol (EM), et une dilution de 1/10 de l'expectoration sur un milieu YPDA (DIYPDA) a été réalisée. Les milieux de culture ont été incubés en aérobie à 37°C sauf les milieux BM et EM (incubation < 30°C) pendant 15 jours, et examinés 2 fois par semaine. Les espèces fongiques ont été identifiées sur la base des caractéristiques macroscopiques et microscopiques. Les délais de positivité et la quantité de chaque espèce ont été relevés.

**Résultats :** 78% des expectorations avaient une culture positive pour au moins un micromycète, avec une différence significative ( $p < 0.001$ ) entre l'âge moyen des patients avec culture positive (25,8 ans) et celui des patients avec culture négative (17,5 ans). *Candida albicans* est le champignon le plus prévalent de notre étude avec un taux de 47.7% ; *Aspergillus fumigatus* est le champignon filamenteux le plus fréquemment isolé (34,5%) suivi par *Scedosporium apiospermum* (5,1%). La comparaison des différents milieux a montré que : le milieu YPDA était le plus sensible pour la détection d'*A. fumigatus*, le milieu SSM pour la détection de *Scedosporium spp*, et le milieu BM pour l'isolement d'*Exophiala spp*. Après analyse par méthode de CHAID, la combinaison des 4 milieux suivants : YPDA, BM, EM et YPDACC a permis de détecter 93,2% des espèces fongiques potentiellement pathogènes de notre étude.

**Conclusion :** MFIP est la première étude organisée au niveau international traitant cette problématique. La colonisation fongique chez les patients atteints de mucoviscidose était corrélée à l'âge. *A. fumigatus* était le champignon filamenteux le plus fréquemment isolé (34.5%). La meilleure association des milieux pour détecter une majorité des espèces fongiques potentiellement pathogènes dans notre étude est : YPDA, BM, EM plus YPDACC.

## INTRODUCTION ET SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE

La mucoviscidose est une maladie génétique autosomique récessive létale. La cause majeure de morbidité et de mortalité dans cette maladie est l'atteinte pulmonaire et ses surinfections. La gravité des lésions pulmonaires dépend de la colonisation des voies respiratoires par les microorganismes et de la réaction inflammatoire qu'ils entraînent, les conséquences étant une dégradation de la fonction respiratoire pouvant mettre en jeu le pronostic vital du patient. Bien que les bactéries soient de loin les principaux agents responsables de ces infections respiratoires, certaines espèces fongiques notamment les champignons filamenteux peuvent être à l'origine de colonisation voire d'infections respiratoires parfois graves.

Dans ce contexte, notre travail avait pour objectif d'une part de déterminer la fréquence des espèces fongiques dans les voies respiratoires des patients atteints de mucoviscidose, responsables soit de colonisations, soit d'infections. D'autre part, nous avons voulu évaluer et comparer différents milieux de culture conventionnels ou semi-sélectifs utilisés dans la pratique mycologique du laboratoire de diagnostic avec pour but de proposer un protocole consensuel et standardisé pour l'isolement des espèces fongiques chez ces patients qui prend en compte les prévalences des différentes espèces fongiques.

Notre projet correspond à une étude internationale multicentrique (19 centres) prospective incluant une large population de patients atteints de mucoviscidose de différentes régions (Europe et Australie). Il s'inscrit dans la continuité du PHRC « Mucofung » : une étude nationale multicentrique prospective centrée sur le suivi mycologique de patients atteints par la maladie, initiée en 2007.

## I. Généralités sur la mucoviscidose

La mucoviscidose est la plus fréquente des maladies génétiques mortelles dans les populations caucasiennes. Sa transmission est autosomique récessive, probablement connue depuis l'Antiquité et décrite déjà au Moyen- Âge « Malheur à l'enfant qui laisse un goût de sel lorsqu'on l'embrasse, on lui a jeté un sort et il mourra bientôt » (selon un dicton du nord de l'Europe). En 1936, Guido Fanconi fait l'association entre maladie coéliqua, fibrose kystique congénitale du pancréas, et bronchectasie. La maladie fut ainsi dénommée « fibrose kystique de pancréas » (« *Cystic Fibrosis* » CF en anglais) (1). En 1938, Dorothy Anderson donne la description anatomo-pathologique complète de la fibrose kystique (2) . En 1953, Paul Di Sant' Agnese met en évidence un excès de chlorure de sodium dans la sueur des enfants atteints de la mucoviscidose (3) ; le test à la sueur sera standardisé en 1959 (4). En 1989, le gène impliqué dans la mucoviscidose est isolé par les équipes de Lap-Chee-Tsui, Francis Collins et John Riordan (5–7).

Bien que le gène ait été mis en évidence il y a plus de 25 ans, la mucoviscidose reste une maladie quasi-incurable même si des récents progrès ont permis d'améliorer sa prise en charge et d'augmenter l'espérance de vie des patients. En effet, l'espérance de vie est passée de 31 ans en 2002 à 41 ans en 2012 (8).

### A. Epidémiologie

L'incidence de la mucoviscidose est variable en fonction des populations. Elle est entre 1/2500 à 1/4000 habitants pour les populations d'origine caucasienne, à l'inverse cette incidence est plus faible pour les populations asiatiques et africaines (9). Pas de sex-ratio, la mucoviscidose touche autant de femmes que d'hommes.

Selon les estimations de Cystic Fibrosis Foundation (CFF), le nombre des personnes atteintes de la mucoviscidose dans le monde était de 70000 en 2012 dont 30000 aux

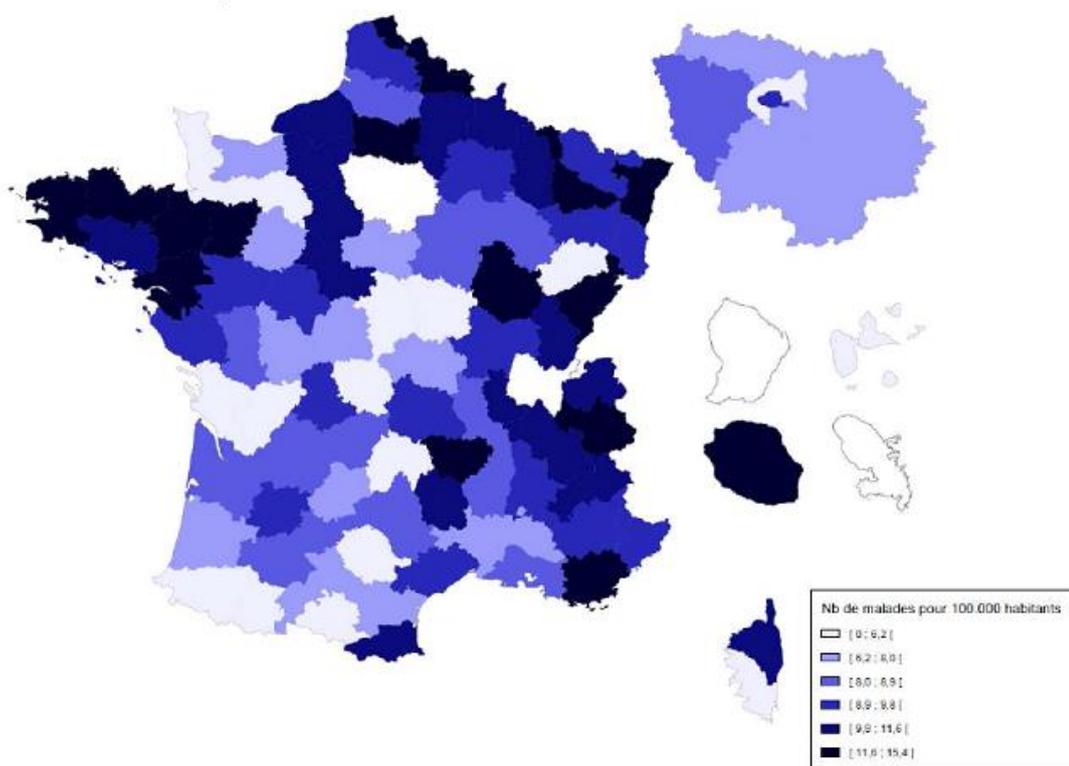
États-Unis (8).

En Europe (22 pays recensés), on estimait à 32248 le nombre des personnes atteintes de la mucoviscidose en 2010 (Tableau 1) (10). Quant à l'Australie, on évaluait les personnes atteintes à 3156 en 2012 (11).

**Tableau 1 : Nombre des personnes atteintes de la mucoviscidose en Europe en 2012, par pays (10).**

Pays	Nombre des patients	Couverture estimée
Allemagne	5003	95%
Autriche	352	39%
Belgique	1138	>90%
France	5759	90%
Danemark	450	100%
Espagne	918	30%
Grèce	96	20%
Hongrie	557	90%
Royaume-Uni	9348	100%
Italie	4119	70%
Pays-Bas	1306	97%
Portugal	138	48%
République Tchèque	523	100%
Suède	509	85%
Suisse	443	55%
Israël	427	72%
Moldavie	42	100%
Serbie	121	>90%
Slovaquie	333	>90%
Slovénie	80	75%
Lettonie	30	>90%
Russie	359	15-20%
<b>Total</b>	<b>32248</b>	

En France, ce nombre s'élevait à 6196 en 2012, avec des prévalences variables selon les régions (Figure 1) (12).



**Figure 1 : Carte de prévalence de la mucoviscidose par département (nombre de patients pour 100 000 habitants) (12).**

## B. Génétique

La mucoviscidose survient suite à une ou plusieurs mutations du gène *CFTR* pour « *Cystic Fibrosis Transmembrane conductance Regulator* ». Il est situé sur le bras long du chromosome 7 (7q31) et code pour une protéine impliquée dans la régulation du transport des ions chlorures au niveau de la membrane apicale des cellules épithéliales (5–7). Plus de 1900 mutations ont été identifiées à ce jour, la plus fréquente (rencontrée chez près de 80 % des malades en France) est la mutation F508del (13). Les mécanismes des mutations les plus fréquents sont : les mutations faux-sens (40%), suivies des mutations par décalage du cadre de lecture (*frameshift*-16%), des mutations sur le site d'épissage (12%), des mutations non-sens (8%) (14).

Le gène *CFTR* s'étend sur près de 250 kilo bases (kb) d'ADN et comprend 27 exons. Il est transcrit en un ARN messager de 6,5 kb et code pour une protéine transmembranaire de 1480 acides aminés, de poids moléculaire compris entre 140 et 180 kilo Daltons (kDa) (5–7).

L'ensemble des mutations identifiées au niveau du gène *CFTR* peut être réparti en six classes, leurs conséquences fonctionnelles (Figure 2) (15) entraînant des manifestations cliniques diverses et variées.

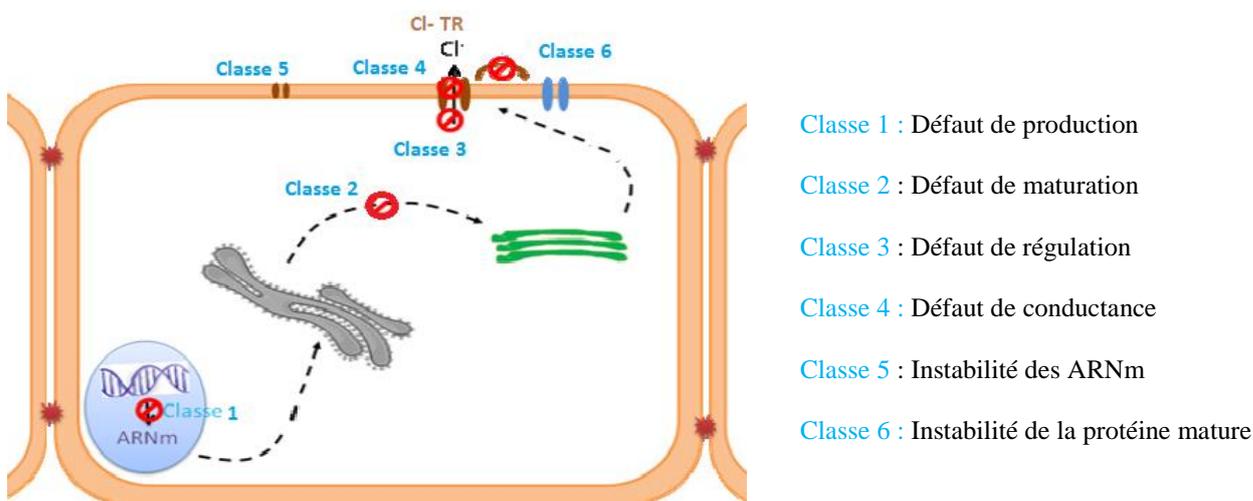
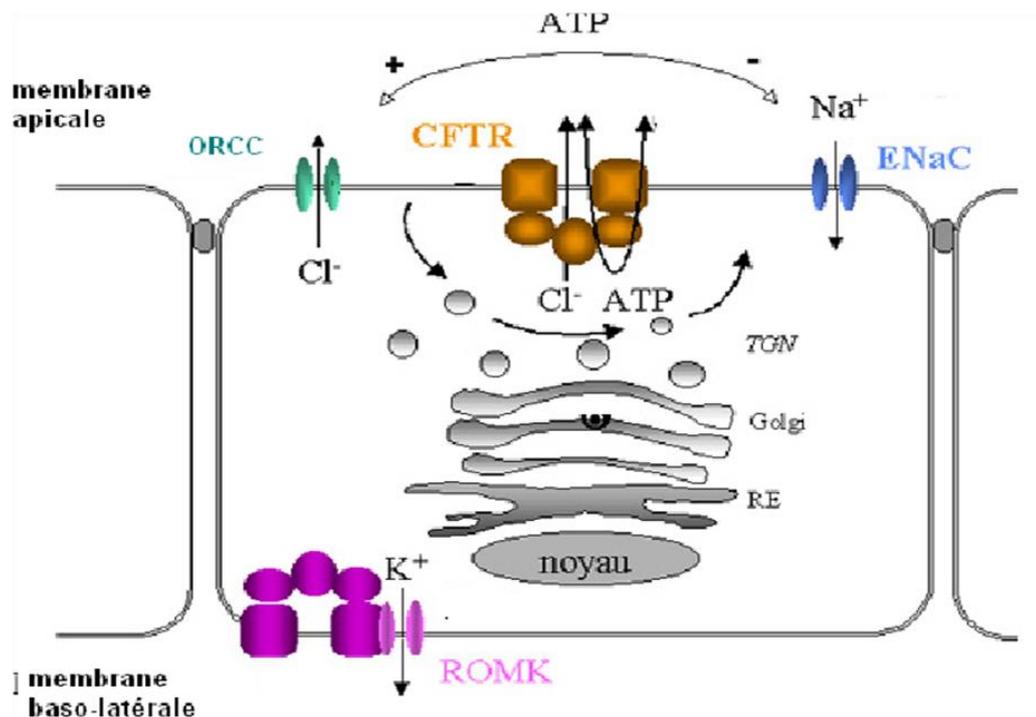


Figure 2 : Schéma des différentes classes de mutations du gène *CFTR* (15).

### C. Physiopathologie

La protéine CFTR est localisée sur la face apicale des cellules épithéliales ATP dépendante. Son expression tissulaire est large puisqu'on la retrouve dans les épithéliums sécréteurs de plusieurs organes : poumons, pancréas exocrine, intestin, tractus génital, glandes sudorales, foie, sinus, vésicule biliaire, glandes salivaires (16). C'est un canal chlorure qui régule les transports ioniques en générant des gradients osmotiques à travers la membrane épithéliale. Elle est également régulatrice d'autres canaux ioniques comme le canal ORCC (*Outward Rectifying Chloride Channel*), les canaux potassiques baso-latéraux ROMK (*Renal Outer Medullary potassium*) et ENaC (*Epithelial Sodium Channel*). La protéine CFTR joue donc un rôle fondamental dans la

régulation de l'hydratation de la surface épithéliale (Figure 3) (17).



**Figure 3 : représentation schématique des différents canaux régulés par la protéine CFTR (17).**

Dans le cas de la mucoviscidose, la protéine CFTR est altérée ou absente ce qui entraîne un défaut d'hydratation de la surface épithéliale et une augmentation de la viscosité du mucus qui va s'accumuler dans les voies respiratoires, digestives et d'autres organes. Cette accumulation de mucus visqueux favorise les phénomènes inflammatoires locaux et les infections. Inflammation et infection entretiennent alors un cercle vicieux et sont responsables des lésions irréversibles des tissus épithéliaux notamment au niveau pulmonaire (18).

#### **D. Manifestations cliniques**

La présentation clinique de la mucoviscidose est polymorphe. Les symptômes varient d'un patient à l'autre, soit dans leur mode d'apparition, soit dans la sévérité de leurs manifestations. La mucoviscidose peut se manifester dès la naissance ou au contraire, n'apparaître que plus tard dans la vie (19). Tous les organes peuvent être touchés avec

des degrés variables, mais les principaux viscères atteints sont l'appareil respiratoire, l'intestin, le pancréas, le foie et l'appareil génital (20).

### **1. Atteinte pulmonaire**

Les manifestations respiratoires peuvent apparaître dès la première année de vie. Le tableau clinique est dominé par une toux chronique, une expectoration purulente et visqueuse et des bronchites à répétition. L'évolution est émaillée d'exacerbations marquées par une majoration du syndrome obstructif, un déclin de la fonction pulmonaire et une perte de poids (21). Les infections pulmonaires chroniques sont responsables de ces exacerbations ; elles vont entraîner avec l'inflammation chronique locale une insuffisance respiratoire, qui est à l'origine du décès dans 80% des cas (19). Les bactéries initialement retrouvées sont *Haemophilus influenzae* et *Staphylococcus aureus* suivies par *Pseudomonas aeruginosa*, qui apparaît quelques mois à quelques années plus tard. L'évolution est également marquée par la colonisation des voies aériennes par d'autres agents bactériens (*Burkholderia cepacia*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Achromobacter xylosoxidans*, mycobactéries non tuberculeuses) et des pathogènes opportunistes fongiques (22). Le rôle des espèces fongiques dans la mucoviscidose sera abordé en détail dans la seconde partie de nos généralités.

### **2. Atteinte digestive**

À la naissance 15% des enfants atteints de mucoviscidose présentent un iléus méconial mais l'atteinte digestive se manifeste principalement par une atteinte pancréatique et hépatobiliaire, 85% des patients développent une insuffisance pancréatique exocrine qui se traduit par une stéatorrhée, une carence nutritionnelle malgré un appétit conservé, des ballonnements et plus rarement des douleurs abdominales (19). L'atteinte du pancréas endocrine par destruction des îlots de Langerhans et/ou dégénérescence graisseuse peut survenir dans 20% des cas. Chez les adolescents et jusqu'à 50% chez les adultes, on peut observer les deux types de

diabète : une insulino-pénie et une résistance à l'insuline qui est due aux fluctuations des sécrétions d'insuline (23).

L'atteinte hépatique se manifeste par une hépatomégalie et une cholestase biologique chez 50% des patients, mais seulement 5% des patients vont développer une cirrhose hépatique (24).

D'autres manifestations digestives spécifiques (syndrome d'obstruction intestinale distale) et non spécifiques (constipation, reflux gastro-œsophagien) peuvent se voir au cours de la mucoviscidose. Ils contribuent à la malnutrition et au retard de croissance staturo-pondérale généralement observé chez les patients (25).

### **3. Atteinte génitale**

L'infertilité touche plus de 95% des hommes atteints de mucoviscidose, ceci en raison d'une extrême sensibilité du tissu épithélial des canaux déférents à la diminution de quantité de protéines CFTR fonctionnelles. Cependant, la spermatogenèse reste active mais l'atrésie bilatérale des canaux déférents entraîne une azoospermie qui est responsable de cette infertilité (26). Chez les femmes, l'épaississement de la glaire cervicale est à l'origine de la diminution de la fertilité (27).

### **4. Autres atteintes**

Les affections rhino-sinusiennes sont constantes et la polypose nasale est très fréquente surtout chez les enfants de plus de 5 ans. Au niveau cutané, la perte de sel peut entraîner une déshydratation lors de grand effort ou de forte chaleur.

Enfin, d'autres signes plus rares sont parfois observés, comme des lésions de fibrose myocardique, des troubles de la perfusion myocardique, une cardiomyopathie non obstructive, une arthropathie ou une ostéoporose pouvant survenir dès l'enfance (28).

## E. Diagnostic et dépistage

### 1. Dépistage prénatal

Le dépistage prénatal est réalisé dans le cadre d'un conseil génétique. Il est proposé uniquement aux couples hétérozygotes pour la mutation du gène *CFTR*, en cas d'antécédents familiaux de mucoviscidose, ou en cas de découverte d'hyperéchogénicité intestinale à l'échographie de second trimestre.

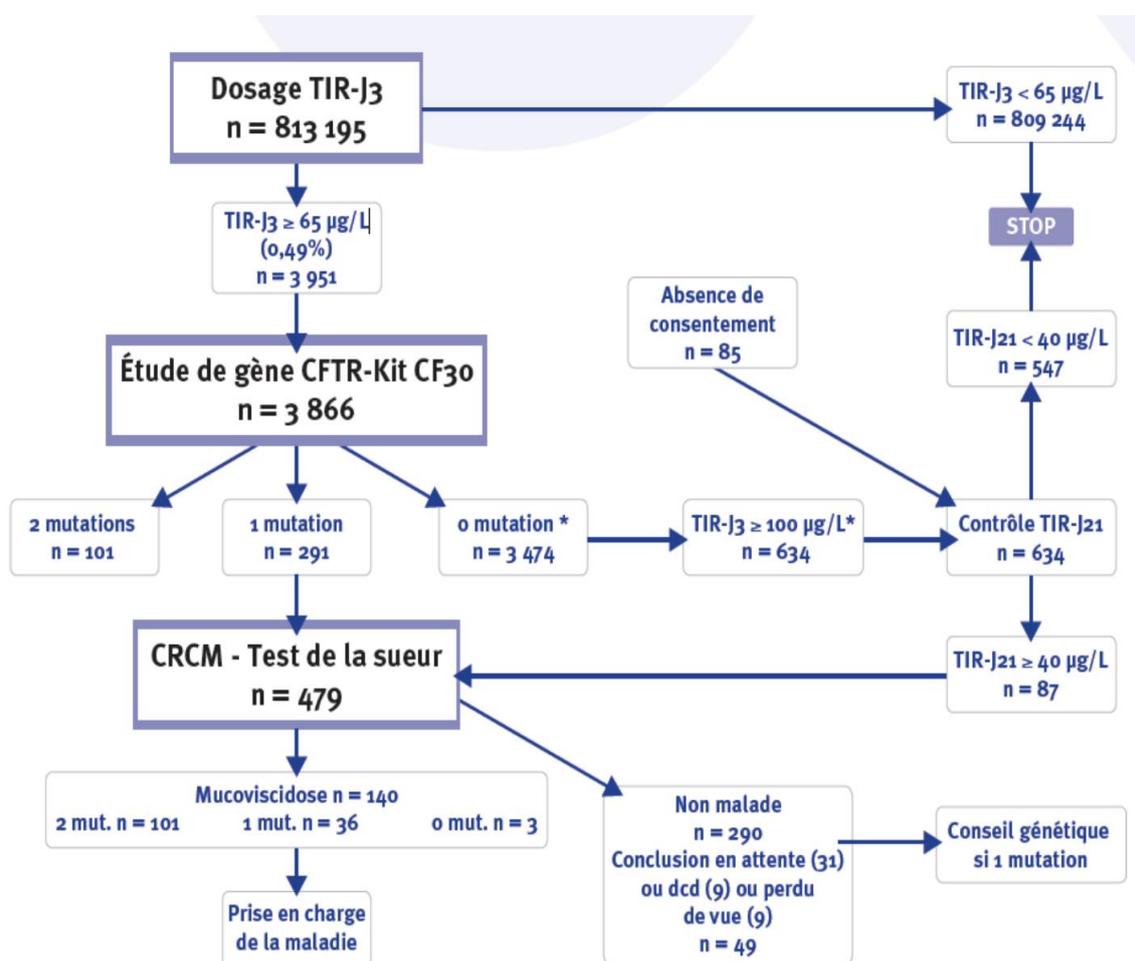
Il consiste à rechercher l'anomalie génétique sur les villosités chorales dès la douzième semaine d'aménorrhée par une biopsie trophoblastique. Le dosage des iso-enzymes de la phosphatase alcaline dans le liquide amniotique peut être réalisé à 18 semaines d'aménorrhée après une amniocentèse (29). Des techniques non invasives sont en cours de développement, notamment l'ISET pour « *isolation by size of epithelial tumor/trophoblastic cells* » qui permet de détecter des anomalies génétiques sur des trophoblastes circulants dans le sang maternel à partir de la cinquième semaine de gestation (30).

### 2. Dépistage néonatal

Le dépistage néonatal est systématique en France depuis 2002 pour l'ensemble de la population. Il fait partie du test de Guthrie (dépistage de cinq maladies : l'hyperplasie congénitale des surrénales, la phénylcétonurie, l'hypothyroïdie congénitale, la drépanocytose, et la mucoviscidose).

Ce dépistage consiste à doser au 3<sup>ème</sup> jour de vie la trypsine immuno-réactive (TIR) : une enzyme sécrétée par le pancréas et circulant dans le sang, un taux élevé reflète l'atteinte du pancréas mais n'est pas spécifique de la mucoviscidose. Si le taux de TIR est supérieur à 65 µg/L, une recherche des 30 mutations les plus fréquentes du gène *CFTR* est réalisée. Si les deux allèles du gène *CFTR* sont mutés, le diagnostic est alors confirmé par un test à la sueur (31). L'algorithme ci-dessous (Figure 4) résume les différentes étapes du dépistage et montre le nombre de dépistage néonataux

réalisés en France en 2012.



**Figure 4 : Algorithme du dépistage néonatal de la mucoviscidose en France, D'après l'association française pour le dépistage et la prévention des handicaps de l'enfant 2012 (31).**

Enfin, le diagnostic de mucoviscidose doit être évoqué devant tout signe sino-pulmonaire chronique, anomalies gastro-intestinales ou nutritionnelles, devant un syndrome de déplétion sodique, ou encore devant des anomalies uro-génitales masculines entraînant une azoospermie obstructive. Dans certaines situations, les signes cliniques ne sont pas spécifiques ce qui rend le diagnostic difficile.

## F. Prise en charge thérapeutique

La mise en place en France des centres de ressources et de compétences de la mucoviscidose, ou CRCM, a permis d'homogénéiser la prise en charge des patients atteints de mucoviscidose. L'objectif des CRCM est d'améliorer la qualité de vie et de

ralentir la dégradation de la fonction respiratoire qui est la principale cause de morbidité et de mortalité.

Dans les CRCM, la prise en charge est pluridisciplinaire. Tous les professionnels de la santé (pneumologue, gastro-entérologue, médecin traitant, interniste, médecin ORL, microbiologiste, infirmier(e), kinésithérapeute, diététicien(ne) et psychologue) sont impliqués et coordonnent leurs activités.

La kinésithérapie respiratoire fait partie du traitement de base de la mucoviscidose. Elle est systématique dès que le diagnostic est confirmé, même en l'absence de signes respiratoires, elle a pour but de suppléer au défaut de système mucociliaire (32).

En parallèle et pour fluidifier les sécrétions bronchiques, des mucolytiques peuvent être prescrits. Les molécules les plus efficaces sont les Dornase alfa (rhDNase ou Pulmozyme®). Dans le cas de la mucoviscidose, la désoxyribonucléase recombinante (rhDNase) est une enzyme d'origine humaine obtenue par génie génétique qui permet d'hydrolyser des grandes quantités d'ADN issues notamment des leucocytes et des microorganismes présents sur le site inflammatoire (33). En cas d'échec ou d'intolérance au rhDNase, l'inhalation de sérum salé pourrait être utilisée pour favoriser l'hydratation du mucus et améliorer la clairance mucociliaire (34).

Le recours aux  $\beta 2$  mimétiques (Salbutamol) n'est pas systématique, seulement utilisées en cas d'exacerbation pour une courte durée. En cas de gêne respiratoire, ils sont souvent associés aux corticoïdes inhalés pour une durée plus longue.

Les corticoïdes par voie orale sont également utilisés dans le traitement de la mucoviscidose pour atténuer les réactions inflammatoires et immunologiques de l'aspergillose broncho-pulmonaire allergique (ABPA). Leur utilisation n'est pas recommandée en dehors de l'ABPA. Les antifongiques (notamment les molécules azolées telle que l'itraconazole ou le posaconazole) trouvent aussi leur place dans cette indication. Ils permettent souvent de diminuer les doses de corticoïdes et surtout

d'améliorer la tolérance à l'effort (35).

L'antibiothérapie est un élément essentiel dans la prise en charge de la mucoviscidose. Elle doit être judicieuse, précoce, administrée à forte dose en raison du raccourcissement de la demi-vie et de l'augmentation de l'espace de distribution chez le patient atteint de mucoviscidose. Le choix des antibiotiques et leurs modalités d'utilisation (durée, rythme, posologie, voie d'administration, mono ou poly-thérapie) seront adaptés en fonction du ou des germes isolés, de leur sensibilité et de l'histoire clinique du patient (32).

Pour lutter contre le fléchissement de l'état nutritionnel, un régime riche et équilibré est recommandé dès le plus jeune âge. Les besoins énergétiques sont plus importants que ceux de la population générale en raison de la malabsorption et des dépenses énergétiques élevées associées à la mucoviscidose. L'apport en eau et chlorure de sodium doit être augmenté, notamment en cas de chaleur ou d'effort physique pour prévenir la déshydratation.

La compensation du déficit enzymatique du pancréas exocrine est assurée par les extraits pancréatiques gastro-protégés (Créon®) et l'administration de vitamines liposolubles.

En cas de dénutrition majeure l'alimentation par voie entérale (sonde nasogastrique, gastrostomie) pourra être envisagée, la voie parentérale restant exceptionnelle (36).

Les perspectives thérapeutiques visant à restaurer la fonction protéique de CFTR (thérapie protéinique) ou à remplacer le gène *CFTR* muté (thérapie génique) sont en plein développement. Les premiers résultats obtenus sont très prometteurs. A ce jour, il existe une seule molécule commercialisée : l'ivacaftor (Kalydeco®) qui est un potentiateur de la protéine CFTR efficace en présence de la mutation G551D (présente chez 5% des patients atteints de mucoviscidose). Un essai randomisé en double aveugle contre placebo chez des sujets porteurs de la mutation G551D (classe III,

Figure 2) a montré une amélioration rapide et significative du volume expiratoire maximal par seconde (VEMS) avec un profil de sécurité acceptable (37).

Enfin, au stade terminal de la maladie, face à l'installation d'une insuffisance respiratoire invalidante et irréversible, seule la transplantation pulmonaire reste la solution thérapeutique ultime, qui va permettre une amélioration de la survie et la qualité de vie du patient (38).

## II. Pathologie fongique et mucoviscidose

Le rôle des champignons est de plus en plus reconnu dans la dégradation de la fonction respiratoire chez les patients atteints de mucoviscidose (47). La colonisation des voies respiratoires au cours de la mucoviscidose est composée d'une flore fongique variée ; certaines espèces fongiques n'ont pas de pouvoir pathogène ou celui-ci n'a pas été clairement identifié à ce jour. En revanche, d'autres espèces telles qu'*Aspergillus fumigatus* sont à l'origine des manifestations cliniques entraînant des complications infectieuses et/ou immunologiques.

Dans ce contexte lésionnel et inflammatoire, les champignons filamenteux sont de loin les plus pathogènes, parmi eux : *A. fumigatus*, *Scedosporium* du complexe *apiospermum*, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus terreus*, *Scedosporium prolificans* [récemment renommé *Lomentospora prolificans* (39) ] et *Exophiala dermatitidis* sont fréquemment isolés et mis en cause.

### A. Espèce genre *Aspergillus*

Les *Aspergillus* sont des champignons filamenteux ubiquitaires, présents partout dans l'environnement : sol, terre, air, végétations, aliments, à l'intérieur et à l'extérieur des habitations... Plus de 200 espèces sont répertoriées dont une vingtaine ayant un réel pouvoir pathogène chez l'Homme (40). *Aspergillus fumigatus* est l'espèce la plus retrouvée dans l'arbre bronchique des patients atteints de mucoviscidose, sa

fréquence augmente significativement avec l'âge et la prise d'antibiotiques par inhalation (41). En France, la moyenne d'âge du premier isolement est estimée à 12.3 ans (42). Au Royaume-Uni cette moyenne est estimée à 9 ans (43). La prévalence varie de 5 à 78% (Tableau 2). Cette disparité est due probablement (i) aux milieux de culture utilisés, et/ou (ii) aux protocoles différents entre les laboratoires (prétraitement des échantillons, température et durée des cultures, méthodes d'identification des micromycètes...), et/ou (iii) aux populations étudiées (adultes, enfants, mode de recrutement) et/ou (iv) aux types de prélèvement utilisés (écouvillon nasal, expectoration, LBA), enfin (v) aux conditions climatiques spécifiques de chaque pays ou région (43–50).

**Tableau 2 : Prévalence d'*A. fumigatus* dans la population caucasienne.**

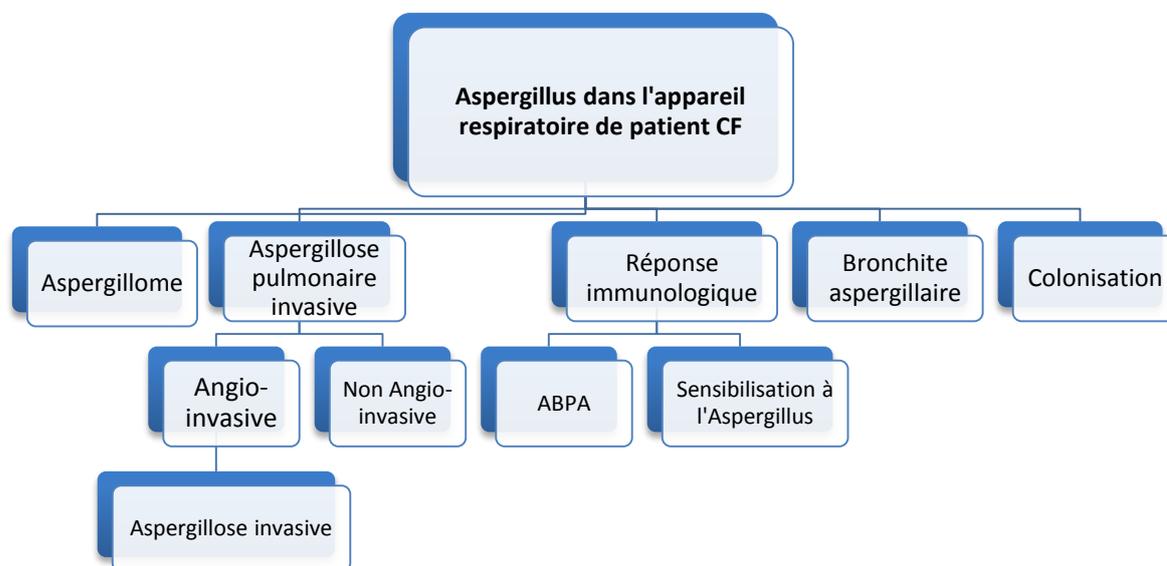
Pays (référence)	Nombre de patients	Prévalence
Sudfield et al. 2010 USA (51)	614	36.3 %
Nielson et al. 2014 Danemark (52)	148	13.6%
Mortensen et al. 2011 Danemark (53)	274	33.2%
Valenza et al. 2008 Allemagne (54)	60	35%
Gungor et al. 2012 Turquie (55)	48	10.4%
Paugam et al. 2010 France (56)	201	56.7%
Saunders et al. 2011 Royaume-Uni (43)	51	37%
Nagano et al. 2010 Irlande (57)	77	5.2%
Fischer et al. 2014 Allemagne (58)	221	53.8%
Kondori et al. 2014 Suède (59)	98	17%
Masoud-Landgraf et al. 2013 Autriche (45)	113	78.8%

Sur le plan physiopathologique, *A. fumigatus* possède une grande capacité de sporulation, ce qui explique la présence de spores (ou conidies) en grande quantité dans l'environnement. Grâce à leur petite taille (2-3.5µm), les spores peuvent pénétrer profondément dans les poumons jusqu'aux alvéoles ; la contamination se fait principalement par inhalation (40). Chez l'hôte immunocompétent, ces spores sont

généralement inoffensives et facilement éliminées par le système immunitaire inné qui met en œuvre toute une stratégie pour les neutraliser : comportant en plus des cellules épithéliales comme une barrière mécanique (ou tapis mucociliaire), des cellules à activité phagocytaire (macrophages, polynucléaires neutrophiles), des peptides antimicrobiens (lactoferrine,  $\beta$ -defensines, elastase, cathepsine G...) et des médiateurs chimiques (cytokines et chemokines,...) (60). Chez le patient atteint de mucoviscidose, il y a une modification du système immunitaire inné qui se manifeste par une augmentation des polynucléaires neutrophiles lors des infections mais avec une activité phagocytaire faible, une dérégulation du système de recrutement des macrophages et une altération de l'activité oxydative des cellules phagocytaires (61). En parallèle, *A. fumigatus* possède une grande capacité d'adhésion aux différentes molécules de l'organisme (fibrinogène, laminine, collagène de type I et IV) (62). De plus, il échappe aux mécanismes de défense immunitaire au niveau pulmonaire en inhibant l'activité ciliaire et partiellement l'activité phagocytaire grâce à ses enzymes (catalase, protéase ...) et ses toxines (la ribotoxine, la gliotoxine, la fumagilline...) (63). D'autres facteurs contribuent à sa virulence : sa capacité d'adaptation à son hôte, sa thermotolérance, sa croissance rapide à 37°C, ses métabolites secondaires, l'acquisition d'une grande tolérance vis-à-vis du stress et de l'hypoxie, ainsi que d'autres caractéristiques qui restent encore à ce jour mal élucidées (62).

*A. fumigatus* contient aussi de puissants allergènes qui sont à l'origine des manifestations immuno-allergiques : sinusite, bronchite allergique et ABPA (48).

Ainsi, tous ces facteurs favorisent la colonisation de l'arbre bronchique des patients atteints de mucoviscidose ; ce qui peut conduire à des manifestations infectieuses et/ou immunologiques (Figure 5).



**Figure 5 : Manifestations Cliniques d'*Aspergillus* sp. chez le patient atteint de mucoviscidose d'après Chotirmall (64).**

Sur le plan clinique, l'ensemble des micromycètes et en particulier *A. fumigatus* sont capables de coloniser puis d'infecter l'arbre respiratoire des patients atteints de mucoviscidose (Tableau 3). Dans ce contexte, l'étude génotypique de la colonisation des voies respiratoires par *A. fumigatus* a permis de mettre en évidence quatre types de colonisations : (i) une colonisation transitoire par un seul génotype, (ii) une colonisation chronique par plusieurs génotypes qui se succèdent, (iii) une colonisation chronique par un génotype prédominant et (iv) une colonisation continue par un seul génotype (65). Il semble qu'il existe une sélection génotypique de l'*A. fumigatus* au cours de sa colonisation des voies respiratoires (66).

**Tableau 3 : Définition de colonisation et infection Aspergillaire d'après Liu et al. (48).**

<b>Colonisation par <i>Aspergillus spp.</i></b>	<b>Infection par <i>Aspergillus spp.</i></b>
<p>Isolement de l'<i>Aspergillus spp.</i> à partir de plus de 50% des crachats sur une période de 6 à 12 mois</p> <p>Absence de détérioration de la fonction pulmonaire</p> <p>Absence de majoration des symptômes respiratoires comme la toux</p>	<p>Isolement de l'<i>Aspergillus spp.</i> à partir de plus de 50% des crachats sur une période de 6 à 12 mois</p> <p>Déclin de la fonction respiratoire.</p> <p>Exacerbation des symptômes respiratoires comme la toux.</p> <p><i>Aspergillus spp.</i> est le seul micro-organisme isolé à plusieurs reprises.</p> <p>Absence ou réponse partielle à un traitement antibiotique à spectre adapté d'une durée de 2 à 4 semaines.</p>

D'autres espèces d'*Aspergillus* peuvent coloniser les voies respiratoires soit transitoirement comme *Aspergillus flavus*, *Aspergillus niger* et *Aspergillus nidulans*, soit d'une façon chronique comme *Aspergillus terreus* ; elles peuvent alors être à l'origine des cas d'ABPA et d'aspergillose invasive (42).

### **1. Aspergillose Broncho-pulmonaire allergique (ABPA)**

L'APBA est la pathologie fongique la plus anciennement connue dans la mucoviscidose, elle a été décrite pour la première fois en 1952. C'est une affection respiratoire secondaire à une réaction immune complexe d'hypersensibilité vis-à-vis d'*Aspergillus* (67). *A. fumigatus* est de loin l'espèce la plus fréquemment incriminée dans cette pathologie mais d'autres espèces aspergillaires sont également mises en cause : *A. flavus*, *A. niger* et *A. terreus* (68). Les *Scedosporium* peuvent également donner des tableaux d'allergie de type MBPA (mycose broncho-pulmonaire allergique). Sa prévalence varie de 1 à 10% dans la mucoviscidose selon les études, elle est rare avant l'âge de 6 ans (64). Dans une étude épidémiologique récente le nombre de

patients atteints de mucoviscidose souffrants d'ABPA est estimé à 5506 à travers le monde (69).

Différents facteurs contribuent au développement d'une ABPA : l'altération de la clairance mucociliaire, le terrain atopique auxquels peut s'associer une colonisation bronchique par *Aspergillus*. Cette colonisation est à l'origine de sécrétions d'enzymes protéolytiques (responsables en partie de lésions épithéliales) et du relargage antigénique local responsable d'une réaction d'hypersensibilité de type I immédiate, entraînant la libération d'IgE puis de type III semi-retardée avec libération des IgG anti-Aspergillaires précipitantes (70).

Le tableau clinique comporte un asthme qui devient corticodépendant avec des symptômes atypiques tels que la fièvre, des expectorations purulentes, des moules bronchiques, des hémoptysies et une majoration de la toux ; parfois une condensation pulmonaire est retrouvée en l'absence d'infection bactérienne. Ce tableau clinique rend le diagnostic difficile et tardif car les signes cliniques sont souvent partagés et rencontrés au cours de la mucoviscidose (68) ; des critères cliniques, biologiques et radiologiques ont été proposés (Tableau 4) par la conférence de consensus de la Cystic Fibrosis Foundation afin de délimiter le flou diagnostique et permettre un diagnostic précoce de la maladie (71).

**Tableau 4 : Critères diagnostiques d'ABPA durant la mucoviscidose (71).**

<b>(i)</b>	<i>Détérioration clinique (toux, sibilants, intolérance à l'effort, expectorations) non attribuée à une autre étiologie.</i>
<b>(ii)</b>	<i>IgE totales ou sériques supérieures à 1000 UI</i>
<b>(iii)</b>	<i>Réactivité cutanée immédiate à <i>A. fumigatus</i> ou présence IgE spécifiques anti-<i>A. fumigatus</i></i>
<b>(iv)</b>	<i>Anticorps précipitants ou IgG sériques vis-à-vis d'<i>A. fumigatus</i></i>
<b>(v)</b>	<i>Anomalie radiologique récente (infiltrat, atélectasie, changement autre inexplicable)</i>

Ces critères ont été révisés à plusieurs reprises depuis 2002 par d'autres auteurs.

Une classification récente (Tableau 5) a permis de classer la maladie aspergillaire de nature immunologique en trois groupes (ABPA, bronchite aspergillaire et sensibilisation aspergillaire) en utilisant deux nouvelles méthodes diagnostiques : RT-PCR ( *Real time, polymerase chain reaction*) et le dosage de galactomannane (polysaccharide libéré par *Aspergillus* au cours de sa croissance) dans les expectorations, combinées à la sérologie (dosage IgE et IgG) (72).

**Tableau 5: Classification de Baxter et al. de la maladie immunologique aspergillaire (72).**

Classes	RT-PCR	Galactomannane	Taux d'IgE	Taux d'IgG
Absence de maladie aspergillaire	-/+	-	-	-
APBA	+	+	+	+
Bronchite aspergillaire	+	+	- /faibles	Elevés
Sensibilisation aspergillaire	+	+	Elevés	- /faibles

Cinq stades évolutifs ont été décrits au cours de l'ABPA: aiguë, rémission, exacerbation, corticodépendance et fibrose pulmonaire (73).

Le traitement doit être instauré précocement pour prévenir la destruction pulmonaire et contrôler les exacerbations. Il repose classiquement sur deux molécules : les corticoïdes et l'itraconazole. Récemment l'utilisation chez l'enfant et l'adulte de l'omalizumab (anticorps monoclonal recombinant anti-IgE) a donné des résultats encourageants quant au rétablissement de la fonction respiratoire tout en épargnant des corticoïdes (68).

## 2. Bronchite aspergillaire

Il s'agit d'une nouvelle entité clinique décrite dans la mucoviscidose. Sa fréquence est estimée à 30% chez les patients adultes (>18 ans) atteints de mucoviscidose (69). Le tableau clinique se traduit par un trouble ventilatoire obstructif dû à une inflammation

bronchique non spécifique, dans certains cas elle peut être asthmatiforme (74).

La biologie se caractérise par une sérologie positive à IgG anti-*Aspergillus* et sérologie IgE négative avec culture ou RT-PCR positive dans les expectorations (RT-PCR est plus spécifique et plus sensible que la culture) (72).

Le traitement n'est pas codifié, mais il semble que les patients répondent bien aux antifongiques de type azolés (75).

### 3. Maladie aspergillaire invasive

Deux entités de la maladie invasive ont été différenciées et proposées dans le cadre de la mucoviscidose : (i) l'aspergillose invasive (AI) se produisant dans le cadre des états immunosuppresseurs profonds lors de la transplantation et (ii) l'aspergillose pulmonaire invasive (API) chez les patients atteints de la mucoviscidose non-transplantés. API est la pathologie la plus fréquemment observée au cours de la mucoviscidose, bien que les maladies invasives restent exceptionnelles dans ce contexte. AI a été récemment associée à un risque quatre fois plus élevé de survenue lorsque les patients atteints de la mucoviscidose sont colonisés par *A. fumigatus* (76). Sur le plan clinique, c'est une pneumopathie fébrile sans amélioration après 48h d'antibiothérapie à large spectre, associée à des douleurs thoraciques, toux, hémoptysies, et dyspnée.

L'examen anatomopathologique d'une biopsie pulmonaire avec l'isolement d'*A.fumigatus* est le gold standard mais il reste un geste invasif, et rarement envisageable dans ce contexte (77), donc le diagnostic est basé sur un faisceau d'arguments cliniques, radiologiques et biologiques.

Le diagnostic est prouvé quand l'examen histologique est positif ou s'il y a association d'une culture positive d'un site normalement stérile à *Aspergillus* (hors LBA, urine, sinus) et à un critère clinique, le diagnostic est probable quand il y a présence d'un critère d'hôte, d'un critère clinique et d'une culture positive (LBA, crachat) ou d'une

antigénémie (Ag Galactomannane) positive. Enfin le diagnostic est possible s'il existe un critère d'hôte et un critère clinique (78).

Les critères d'EORTC/MSG (Tableau 6) permettent de hiérarchiser la démarche diagnostique (78).

**Tableau 6 : Critères diagnostiques d'infections fongiques invasives (critères EORTC/MSG révisés 2008).**

Critères d'hôte	Critères cliniques	Critères mycologiques
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Neutropénie &lt; 500/mm<sup>3</sup> (&gt; 10j)</li> <li>• Allogreffes de CSH</li> <li>• Corticoïdes &gt; 0.3 mg/kg/j (&gt; 3 semaines)</li> <li>• Immunosuppresseurs cellulaires T dans les 90 jours avant.</li> <li>• Déficit immunitaire constitutionnel</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Infection pulmonaire = 1 des 3 signes suivants au scanner:               <ul style="list-style-type: none"> <li>-Lésion dense, bien limitée, avec ou sans halo</li> <li>-Croissant gazeux</li> <li>-Cavité</li> </ul> </li> <li>• Trachéobronchite = 1 des signes suivants vu en fibroscopie bronchique :               <ul style="list-style-type: none"> <li>Ulcération, nodule, pseudomembrane, plaque, ou escarre</li> </ul> </li> <li>• Sinusite: = Imagerie de sinusite plus 1 des 3 signes suivants :               <ul style="list-style-type: none"> <li>-Douleur aiguë localisée</li> <li>-Ulcère nasal avec zone de nécrose</li> <li>-Extension osseuse, y compris orbitaire</li> </ul> </li> <li>• Infection du SNC = 1 des 2 signes suivants :               <ul style="list-style-type: none"> <li>-Lésions focales à l'imagerie</li> <li>-Prise de contraste méningé en scanner ou IRM</li> </ul> </li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Histologie</li> <li>• Culture positive d'un site stérile (hors LBA, sinus, urine).</li> <li>• Examen direct ou culture positive dans crachats, LBA, aspiration sinusienne.</li> <li>• Ag galactomannane positive dans sérum, LBA, LCR.</li> <li>• <i>Pas de place pour PCR en routine</i></li> </ul>

Le traitement doit être débuté dès la suspicion d'une API, en parallèle de l'évaluation diagnostique. Deux molécules sont classiquement indiquées en première intention : le Voriconazole et l'Amphotéricine B liposomale. Par contre la mortalité reste élevée malgré un traitement précoce (79).

#### 4. Aspergillome

C'est le développement des hyphes d'*Aspergillus* dans une cavité préexistante (secondaire à une tuberculose, tumeur, sarcoïdose, infection, emphysème bulleux, ou

encore spondylodiscite ankylosante). La forme est le plus souvent un grelot, mais peut aussi parfois évoluer vers la forme chronique cavitaire. L'Aspergillome est composé de filaments mycéliens, de cellules inflammatoires, de fibrine, mucus et débris cellulaires (77). C'est une affection rare au cours de la mucoviscidose (64). La lésion reste stable et elle peut se résorber spontanément sans traitement dans 10% des cas (80). En général, le tableau clinique est asymptomatique, mais dans certaines situations c'est l'hémoptysie qui est le symptôme révélateur de cette pathologie qui peut engager le pronostic vital si elle est massive (64). Le diagnostic repose sur la clinique, l'imagerie et la biologie. Le scanner reste l'outil radiologique le plus performant pour déceler les petites lésions, l'image en grelot est l'image typique de l'Aspergillome pulmonaire (Figure 6).

La culture mycologique des expectorations revient positive à l'*Aspergillus spp.* dans 50% des cas seulement. Par contre la sérologie (IgG anti-aspergillaire) est positive dans la plupart des cas. L'Ag galactomannane peut être détecté dans le LBA mais sa valeur diagnostique est variable (77).



**Figure 6 : Coupe tomodensitométrie d'un aspergillome du lobe supérieur gauche (aspect en « grelot »).**

L'abstention thérapeutique est la règle notamment chez les patients asymptomatiques. La résection chirurgicale de la cavité et de la truffe aspergillaire est habituellement indiquée en cas d'hémoptysie et chez les patients ayant une fonction respiratoire satisfaisante (81). En cas d'inopérabilité, l'instillation percutanée d'Amphotéricine B guidée par le scanner thoracique peut être utilisée (82).

## **B. *Scedosporium* sp.**

Le genre *Scedosporium* appartient à la famille des Microascacées, sept groupes ont été différenciés au sein de cette famille : *Petriella*, *Petriellopsis*, *Scedosporium prolificans* (*Lomentospora prolificans*), *Parascedosporium*, *Pseudallescheria*, *Lophotrichus* et *Graphium*, dans une large étude de taxonomie basée sur les séquences nucléotidiques des régions ITS (83).

Essentiellement les groupes *Pseudallescheria* (le complexe *Pseudallescheria boydii* / *Scedosporium apiospermum*) et *Lomentospora prolificans* ont été décrits en pathologie humaine. Ce sont des champignons filamenteux opportunistes, présents dans les sols, et les eaux polluées avec une répartition géographique limitée pour *S. prolificans* qui semble être localisé principalement en Australie, USA et la péninsule ibérique (84).

### **1. Le complexe *Pseudallescheria boydii* / *Scedosporium apiospermum***

Le complexe *Pseudallescheria boydii* / *Scedosporium apiospermum* est composé de 5 espèces : *Scedosporium apiospermum* stricto sensu, *Pseudallescheria boydii*, *Scedosporium aurantiacum*, *Pseudallescheria minutispora*, *Scedosporium dehoogii*. Cette classification a été établie récemment après les travaux de Gilgado qui comportaient la description des morphologies macroscopiques et microscopiques, des tests de croissance à différentes températures d'incubation (25, 37, 40, 42, 45 et 50°C), des tests d'assimilation de sucres (ribitol, L-arabinitol, sucrose, maltose et D-ribose) et une étude moléculaire (des locus : ITS 1 et 2 et de la sous-unité 5,8 S des ARN ribosomiaux, séquence TUB et BT2 du gène de la bêtatubuline et une partie du gène codant pour la calmoduline) (85,86). Ce complexe représente le deuxième champignon filamenteux isolé des prélèvements respiratoires chez les patients atteints de mucoviscidose après *A. fumigatus*, mais la prévalence varie d'une étude à l'autre

(Tableau 7). Cette variation est due aussi au manque de standardisation de l'examen mycologique des expectorations (44).

Une étude de 50 souches de complexe *P. boydii/S. apiospermum* isolées chez des patients atteints de mucoviscidose a été menée en France pour déterminer la fréquence de chaque espèce. Elle a montré que *P. boydii* prédominait largement (62%), suivi de *S. apiospermum* (24%), *Scedosporium aurantiacum* (10%) et *Pseudallescheria minutispora* (4%). *Scedosporium dehoogii* n'a pas été retrouvé dans cette étude clinique (87).

La prévalence de *S. apiospermum* reste élevée chez les patients atteints de mucoviscidose par rapport à sa fréquence dans l'environnement (88). Son adhérence à l'épithélium se fait entre autre par une lectine. Concernant ses facteurs de virulence, il possède une protéase extracellulaire comparable à celle d'*A. fumigatus* ainsi que des protéases alcalines et superoxydes desmutases (64).

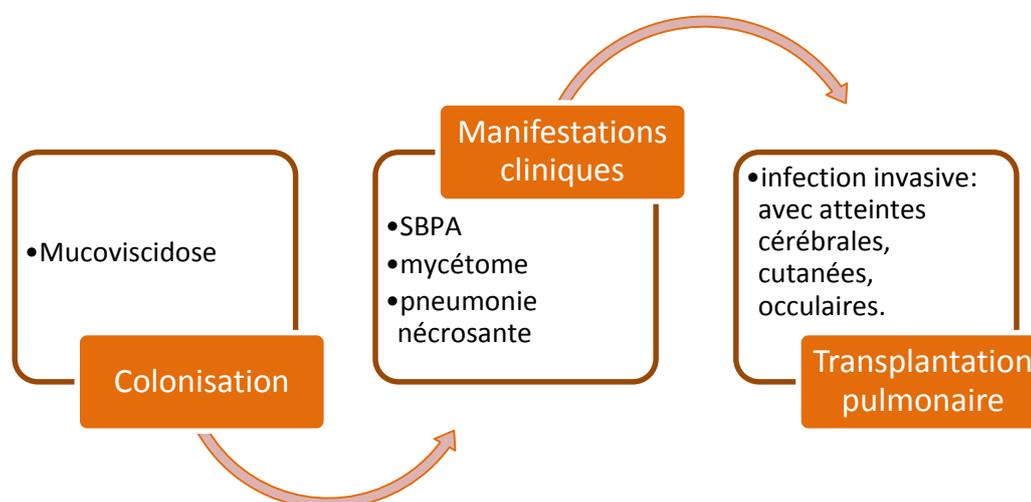
**Tableau 7 : Prévalence du Complexe *P. boydii/S. apiospermum*.**

Référence	Nombres de patients	Prévalence
Paugam et al.2010 France (56)	201	3.4%
Manso et al 2011 Italie (89)	1837	2%
Horré et al. 2009 Allemagne (90)	48	11.9%
Blyth et al 2010 Australie (91)	69	14.7% <sup>a</sup>
Sudfield et al.2010 USA (51)	614	2.3% <sup>a</sup>
Kondori et al. 2014 Suède (59)	98	1%
Gungor et al. 2012 Turquie (55)	48	0%
Masoud-Landgraf et al.2013 Autriche (45)	113	10.6%

<sup>a</sup> *Scedosporium spp.*

Sur le plan clinique, quand la contamination par *S. Apiospermum* se fait par voie respiratoire (inhalation des spores), il peut y avoir des manifestations respiratoires (Figure 7) à type de mycétomes pulmonaires (masse fongique intracavitaire), de

pneumonies nécrosantes et/ou de scédosporioses broncho-pulmonaires allergiques (SBPA) semblables aux ABPA (84). La dissémination hémotogène peut survenir en cas d'immunodépression ; elle est fatale dans 50% des cas malgré un traitement antifongique (92). Actuellement, la transplantation pulmonaire est discutée chez les patients atteints de mucoviscidose et colonisés par ce champignon (91). En cas d'effraction cutanée, *S. apiospermum* peut être responsable de mycétomes (pseudotumeur inflammatoire localisée au tissu sous-cutané), voire d'ostéomyélites si la plaie est profonde après une longue période (93).



**Figure 7 : Manifestations cliniques de *S. Apiospermum*.**

## **2. *Lomentospora prolificans* (*Scedosporium prolificans*)**

*L. prolificans* a été décrit pour la première fois en 1984 chez des enfants qui avaient une ostéomyélite d'où son ancien nom *Scedosporium inflatum* (94). *L. prolificans* peut être responsable d'infections cutanées et ostéo-articulaires chez les patients immunocompétents et d'infections disséminées chez les patients immunodéprimés, qui sont fatales dans 80% des cas (95). Cette grande mortalité s'explique par la résistance de *L. prolificans* à de nombreuses molécules antifongiques, comme l'amphotéricine B et les azolés (itraconazole, posaconazole et voriconazole). Seules les échinocandines (caspofungine, micafungine et anidulafungine) ont une activité modérée contre ce champignon *in vitro* (96). Dans le contexte de la mucoviscidose, *L.*

*prolificans* semble être un colonisateur des voies respiratoires dont la détection devra être prise en compte en cas de projet de transplantation. Cette colonisation peut être transitoire ou chronique et peut durer jusqu'à 4 ans (97).

### **C. *Exophiala dermatitidis***

C'est un champignon dématié qui peut être responsable de phaeohyphomycose à porte d'entrée cutanée post-traumatique (98). Ce champignon dimorphique se présente sous forme d'une levure noire à 37C° mais sous forme filamenteuse à température ambiante. Il est ubiquitaire, issu du sol mais très fréquent dans l'environnement intérieur. Il peut survivre longtemps dans un environnement humide et chaud par exemple : les salles de bain, cuisines, sauna et lave-vaisselle (46,99,100). Sa prévalence dans la population atteinte de mucoviscidose varie entre 1.1 et 19% (Tableau 8). Plusieurs raisons ont été avancées pour expliquer cette disparité, telles que : facteurs génétiques, mode de vie, et manque de standardisation de l'examen mycologique (notamment l'utilisation des milieux sélectifs et temps d'incubation prolongé) (42,44). Dans une étude de typage des souches isolées chez les patients, la colonisation par *E. dermatitidis* est typique de celle d'un champignon faiblement distribué dans l'environnement, ce champignon occupant des réservoirs particuliers qu'il est nécessaire de définir (101).

Sur le plan clinique, *E. dermatitidis* est responsable de cas d'infections cérébrales décrites exclusivement en Asie (99), dans d'autres régions du monde des cas d'onychomycose, kératite, otite externe et infections cutanées secondaires à un traumatisme ont été rapportés (102–104).

Au cours de la mucoviscidose, *E. dermatitidis* peut coloniser les voies respiratoires et induire une réponse sérologique qui peut s'accompagner d'un syndrome inflammatoire biologique non spécifique (hyperleucocytose et accélération de VS) (59). Son pouvoir pathogène n'est pas clairement élucidé dans ce contexte, mais des cas de

pneumonies et infections pulmonaires invasives ont été rapportés à *E. dermatitidis* (105–107).

La colonisation des voies aériennes par *A. fumigatus*, l'homozygotie pour la mutation F508del, l'insuffisance pancréatique et l'utilisation d'antibiotiques par voie intraveineuse au long cours seraient des facteurs de prédisposition à la colonisation de ces patients par *E. dermatitidis* (59,108).

**Tableau 8 : Prévalence d'*E. dermatitidis* en Europe.**

Référence	Nombre de patients	Prévalence
Kondori et al.2011 Suède (109)	97	19%
Horré et al.2004 Allemagne (110)	81	6.2%
Lebecque et al.2010 Belgique (108)	154	5.8%
Bakare et al.2004 Allemagne (47)	94	1.1%
Nagano et 2010 Irlande (57)	77	3.9%
Kondori et al.2014 (59) Suède	98	17%
Masoud et al.2013 Autriche (45)	113	8.8%

### ***D. Rasamsonia argillacea***

C'est un champignon filamenteux thermophile anciennement connu sous le nom de *Geosmithia argillacea*, morphologiquement très proche des *Penicilliums* et *Paecilomyces* avec lesquels ils ont été longtemps confondus ; cela contribue certainement à sa sous-estimation (111).

Des cas de colonisation chronique à *R. argillacea* chez les patients atteints de mucoviscidose ont été rapportés en France, Italie, Royaume-Uni et Autriche (45,89,112,113). Les lésions de l'épithélium bronchique causées par les infections bactériennes favorisent l'implantation de ce champignon, et la signification clinique de cette colonisation n'est pas encore clairement définie. Actuellement il n'y a pas assez

de données dans la littérature pour pouvoir conclure, mais la détection de ce champignon dans les voies respiratoires des patients ne doit pas être négligée puisque *R. argillacea* est un véritable pathogène opportuniste chez les patients immunodéprimés, tels que les patients atteints de granulomatose familiale chronique ou d'affections hématologiques (114).

### ***E. Acrophialophora fusicpora***

*Acrophialophora fusicpora* est un champignon thermorésistant, présent dans le sol. Il est rarement isolé en pathologie humaine (42). Ce champignon est aussi difficile à identifier que *R. argillacea* même dans les laboratoires spécialisés en mycologie. Son incidence est probablement sous-estimée, par conséquent sa pertinence clinique est mal documentée. Ce champignon a été rapporté comme responsable de kératite et d'infection pulmonaire chez les adultes immunocompétents et d'un abcès du cerveau chez un enfant atteint de leucémie lymphoblastique aiguë (115). *A. fusicpora* est également responsable d'infection disséminée chez le chien (116). Chez les patients atteints de mucoviscidose, une colonisation chronique par *A. fusicpora* pourrait contribuer à la dégradation progressive de la fonction respiratoire en entretenant notamment l'inflammation locale (115).

### ***F. Candida***

Les espèces *Candida* sont isolées très fréquemment dans les expectorations des patients atteints de mucoviscidose. *Candida albicans*, commensal des muqueuses, est la levure la plus retrouvée. Sa prévalence varie de 46 à 78% selon les études, alors que les autres espèces sont moins fréquentes (45,54,55,64,117). Le rôle pathogène de *C. albicans* a été étudié dans un modèle *in vitro* sur une muqueuse épithéliale porteuse du gène *CFTR* muté. Il a été démontré que *C. albicans* ne stimule pas la réponse pro-inflammatoire en comparaison avec *A. fumigatus* qui peut entraîner une

augmentation de l'IL6 et l'IL8 (118). Dans une étude prospective menée sur 11 ans, il a été montré que la colonisation par *C. albicans* est un meilleur prédicteur de l'insuffisance pancréatique, de l'ostéopénie et de la co-colonisation par *P. aeruginosa*. Cette colonisation présage de façon indépendante des exacerbations des patients hospitalisés et du déclin à la fois du VEMS et de l'IMC (119). Ces données intéressantes nécessitent d'être confirmées par d'autres études pour comprendre et éclaircir le vrai rôle de cette levure dans ce contexte. Aujourd'hui, la colonisation des patients atteints de mucoviscidose par *Candida* est considérée comme banale et sans rôle ou effet pathogène.

### **III. Contexte général de notre étude**

Les infections broncho-pulmonaires représentent donc un problème majeur auquel sont confrontés les patients atteints de la mucoviscidose. Les bactéries sont de loin les principaux microorganismes responsables de ces infections respiratoires. Ces dernières années l'amélioration de leur prévention et leur prise en charge a permis d'augmenter la survie de ces patients mais s'est accompagnée de l'émergence d'infections fongiques. Aujourd'hui, l'impact des champignons notamment filamenteux est de plus en plus reconnu dans le processus inflammatoire qui est responsable de la dégradation de la fonction respiratoire. Or, ces micromycètes sont capables aussi de disséminer, posant alors des problèmes d'ordres prophylactique et thérapeutique notamment en cas de greffe pulmonaire. La fréquence exacte de ces micromycètes dans la mucoviscidose commence à être étudiée mais reste mal/peu déterminée. De plus, le manque de standardisation des méthodes de culture d'isolement des espèces fongiques ne facilite ni les études ni les comparaisons inter-laboratoires.

Dans ce contexte, notre étude avait pour objectif d'une part de déterminer la fréquence des espèces fongiques dans les voies respiratoires des patients atteints de

mucoviscidose, responsables soit de colonisations, soit d'infections. D'autre part, nous avons voulu évaluer et comparer les différents milieux conventionnels et/ou semi-sélectifs utilisés dans la pratique mycologique du laboratoire de diagnostic avec pour but de proposer un protocole consensuel, standardisé pour l'isolement des espèces fongiques chez ces patients.

## MATERIELS ET METHODES

Notre travail fait suite au PHRC national « Mucofong » qui correspondait à une étude nationale multicentrique prospective centrée sur le suivi mycologique de patients atteints de mucoviscidose, initiée en 2007.

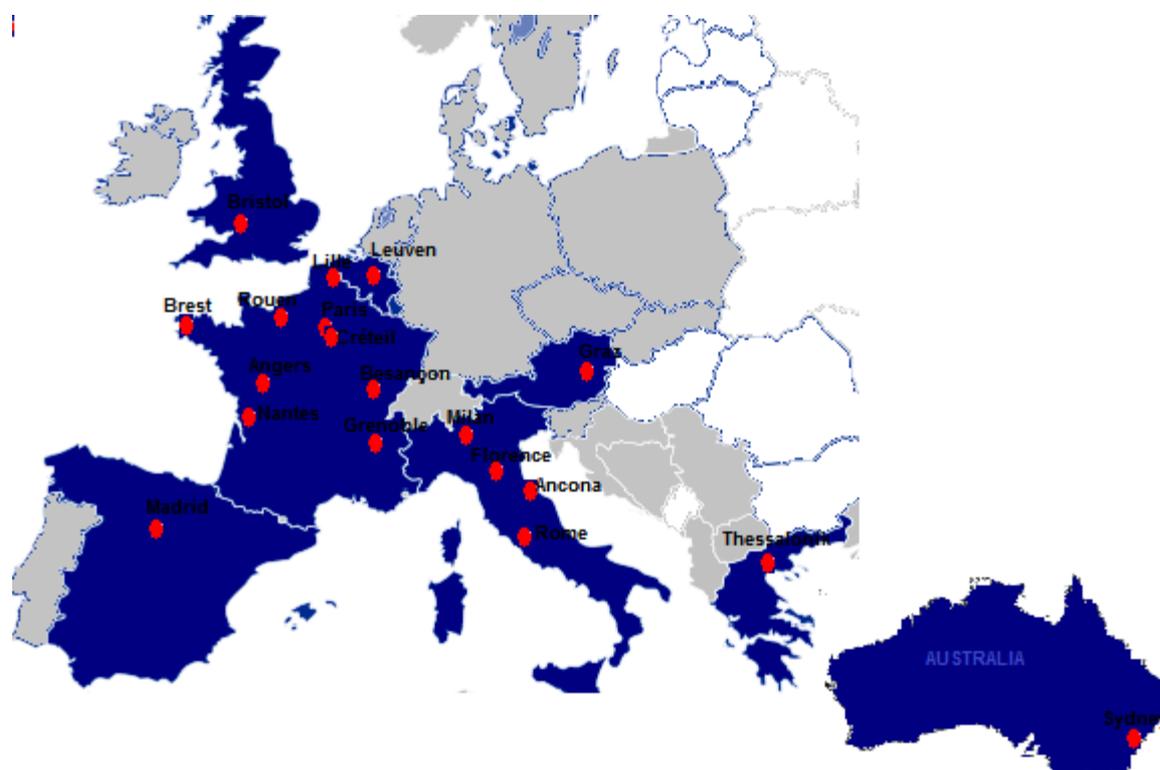
Notre étude est baptisée « MFIP » pour Mucofong International Project. Les grandes lignes de notre étude ont été définies au 2<sup>ème</sup> séminaire du groupe de travail ECMM/ISHAM (*European Confederation for Medical Mycology/ International Society for Human and Animal Mycology*) sur les infections respiratoires fongiques dans la mucoviscidose, en septembre 2011 à Angers. Cette étude a été conçue en 3 phases : (i) une enquête préliminaire basée sur le volontariat recensant à l'échelle internationale les différentes pratiques existantes, à partir de l'analyse de cette enquête et des données bibliographiques, (ii) l'élaboration du protocole unique utilisé par tous les centres participants MFIP pour déterminer la prévalence fongique dans la mucoviscidose et comparer l'efficacité des différents milieux, et enfin (iii) la réalisation de l'étude MFIP dans les laboratoires participants.

In fine, notre projet correspond à une étude internationale multicentrique (19 centres) prospective dont l'objectif principal est de déterminer la prévalence des espèces fongiques présentes dans l'arbre respiratoire des patients atteints de mucoviscidose. L'objectif secondaire est de comparer et d'évaluer les différents milieux de culture standards et/ou semi-sélectifs utilisés en mycologie dans le suivi des patients atteints de mucoviscidose, avec le but de proposer un protocole standardisé de cette analyse.

## I. Population étudiée

Entre avril et septembre 2013, 469 expectorations ont été recueillies auprès des patients enfants et adultes atteints de mucoviscidose. Dix-neuf centres ont participé : 9 centres en France, 4 centres en Italie et 1 centre dans chacun des pays suivants : Royaume-Uni, Espagne, Belgique, Autriche, Grèce et l'Australie (Figure 8).

Toutes les expectorations provenaient de patients dont le diagnostic de mucoviscidose avait été validé sur les critères actuellement en vigueur. Leur inclusion dans l'étude a été réalisée lors d'une visite médicale de routine ou pendant une hospitalisation.



**Figure 8 : Carte des centres participants.**

Les patients greffés pulmonaires et les patients incapables d'expectorer ont été exclus de cette étude. Nous avons exclu aussi les expectorations dont la quantité était insuffisante pour ensemercer tous les milieux testés.

## II. Milieux de cultures utilisés

Toutes les expectorations incluses dans notre étude ont étéensemencées sur les 8 milieux sélectionnés ou conditions sélectionnés. Le choix des milieux était basé sur l'expérience des centres participants. Chaque centre a proposé une sélection des milieux les plus performants pour isoler les espèces fongiques dans les expectorations des patients atteints de mucoviscidose. Le choix des différents milieux testés a été discuté lors du séminaire de 2011 à Angers, et s'est arrêté sur les 7 milieux suivants :

### A. Milieu chromogène (CM)

Il est destiné à la culture des levures et des champignons filamenteux. Il permet surtout d'identifier et de quantifier d'éventuelles levures par virage colorimétrique.

Ce milieu contient un substrat chromogène d'hexosaminidase qui est hydrolysé en présence des levures, notamment de *Candida*. Chaque espèce produit une couleur caractéristique de cette levure. Ce milieu est incubé à 37°C.

Sa composition est la suivante :

- Peptone 10g
- Glucose 20g
- Agar-agar 15g
- Chloramphénicol 0,5g
- Chromogène 2g
- Eau distillée qsp 1000 ml

### B. Milieu Sabouraud ou YPDA

Le milieu de Sabouraud ou le milieu YPDA sont des milieux polyvalents destinés initialement à la culture des dermatophytes. Actuellement, il est largement utilisé pour isoler et cultiver toutes sortes de micromycètes. L'azote des peptones qu'il contient est une source de facteurs de croissance. Il contient aussi le glucose en concentration élevée, qui favorise la croissance des champignons osmotiquement stables mais qui

n'est pas toléré par la plupart des bactéries. Son pH faible convient parfaitement aux champignons mais pas à de nombreuses bactéries. Pour les centres qui ne disposaient pas du milieu de Sabouraud, ils ont utilisé le milieu YPDA. Ce milieu est incubé à 37°C.

Il est composé pour le milieu de Sabouraud / pour le milieu YPDA de :

- Digestion pancréatique de caséine 5g/ Yeast extract 5g
- Peptone 5g/ 10g
- Glucose 40g/ 20g
- Agar 20g
- Eau distillée qsp 1000 ml

Un second milieu Sabouraud ou YPDA a également été ensemencé et incubé à 37°C avec l'expectoration diluée au 1/10.

### **C. Milieu Dichloran-Rose Bengal Benomyl Chloramphénicol (DRBBC)**

Ce milieu a été développé initialement pour l'isolement des moisissures présentes dans les aliments (120). C'est un milieu semi-sélectif qui est utilisé pour favoriser le développement des champignons à croissance lente. Le chloramphénicol inhibe la croissance bactérienne. L'addition de benomyl qui est un inhibiteur de microtubules, permet de diminuer le développement des colonies fongiques à croissance rapide, de type *Aspergillus*, *Rhizopus* et *Mucor*. L'inhibition de l'envahissement par ces moisissures et la diminution générale de la taille des colonies améliorent la numération et la détection de plusieurs espèces concomitantes. Le milieu est incubé à 37°C.

Il se compose de :

- Dichloran Rose-Bengale agar base 31,5g
- Chloramphénicol 0,5g
- Glucose 10g
- Benomyl (en fin de cuisson) 0,008g
- Eau distillée qsp 988 ml

### **D. Milieu sélectif pour *Scedosporium* (SSM)**

C'est un milieu semi-sélectif développé par Rainer et collaborateurs en 2008 spécifiquement pour faciliter l'isolement des espèces du complexe *P. boydii*/*S. apiospermum* (121). Il contient en plus du Dichloran agar et du Benomyl, 3 antibiotiques : le Chloramphénicol, la Ciprofloxacine et la Streptomycine. Le milieu est incubé à 37°C.

Il est composé de :

- Phosphate monopotassique 1.25 g
- MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O 0.625 g
- Maltose 6.25 g
- Extrait de malt 6.25 g
- Extrait de levure 1 g
- Peptone de soja 0.625 g
- Ciprofloxacine 0.1 g
- Streptomycine sulfate 0.1 g
- Chloramphénicol 0.1 g
- Dichloran 2 g
- Benomyl 6 g
- Agar 20 g
- Eau distillée qsp 983 ml

### **E. Milieu de Sabouraud ou milieu YPDA additionné de chloramphénicol et de cycloheximide (YPDACC)**

Ce milieu semi-sélectif est utilisé pour favoriser le développement des champignons à croissance lente. On ajoute au milieu Sabouraud (ou milieu YPDA) du Chloramphénicol (0.5g/litre) qui est un antibiotique bactériostatique à large spectre inhibant la croissance de la plupart des espèces bactériennes. L'ajout de cycloheximide (actidione 0.5g/litre) permet d'inhiber la synthèse protéique de certaines espèces fongiques comme *L. prolificans* et certains *Aspergillus spp.* Le complexe *S. apiospermum* est quant à lui résistant au cycloheximide. Ce milieu est incubé à 37°C.

## F. Milieu B+ (BM)

Le milieu B+ est un milieu semi-sélectif qui a été décrit et développé par Nagano et collaborateurs pour faciliter la culture fongique à partir des expectorations des patients atteints de mucoviscidose (122). Il contient les éléments de base nécessaires pour la croissance des micromycètes et 4 antibiotiques de large spectre pour supprimer un maximum des espèces bactériennes, ces dernières pouvant inhiber ou masquer le développement des champignons (123). Ce milieu est incubé à 27°C.

Il est composé de :

- Yeast extract 30g
- Glucose 16.7 g
- Agar: 20 g
- Peptone 6.8 g
- Cotrimethoxazole 0.128g
- Chloramphénicol 0.05 g
- Ceftazidime 0.032 g
- Colistine 0.024g
- Eau distillée qsp 1000 ml
- pH (6.3) à ajuster à la fin de préparation

## G. Milieu enrichi en érythritol (EM)

L'érythritol est un polyol (sucre alcoolisé) qui représente une source de carbone sélective pour *Exophiala dermatitidis* (124). Ce milieu semi-sélectif est incubé à 27°C.

Sa composition est la suivante :

- Yeast nitrogene base 6.7g
- Méso-érythritol 10g
- Chloramphénicol 0.5g
- Agar 25g
- Eau distillée qsp 1000 ml.

Les milieux : DRBBC, YPDACC, SMM, BM, EM ont été préparés au CHRU de Lille (Institut de Microbiologie, Centre Biologie Pathologie) et ont été envoyés dans chaque centre participant par le transporteur DHL.

### III. Protocole de l'étude MFIP

Tous les prélèvements provenaient de patients atteints de mucoviscidose suivis dans les centres participants. Ces prélèvements ont été recueillis au cours des visites systématiques annuelles ou lors d'exacerbations.

Tous les centres participants ont suivi le même protocole (Figure 9), à la réception de l'échantillon un prétraitement était réalisé pour homogénéiser l'expectoration. Cette homogénéisation a pour but d'augmenter la sensibilité de détection des différents micromycètes et éventuellement de semi-quantifier la culture fongique (45).

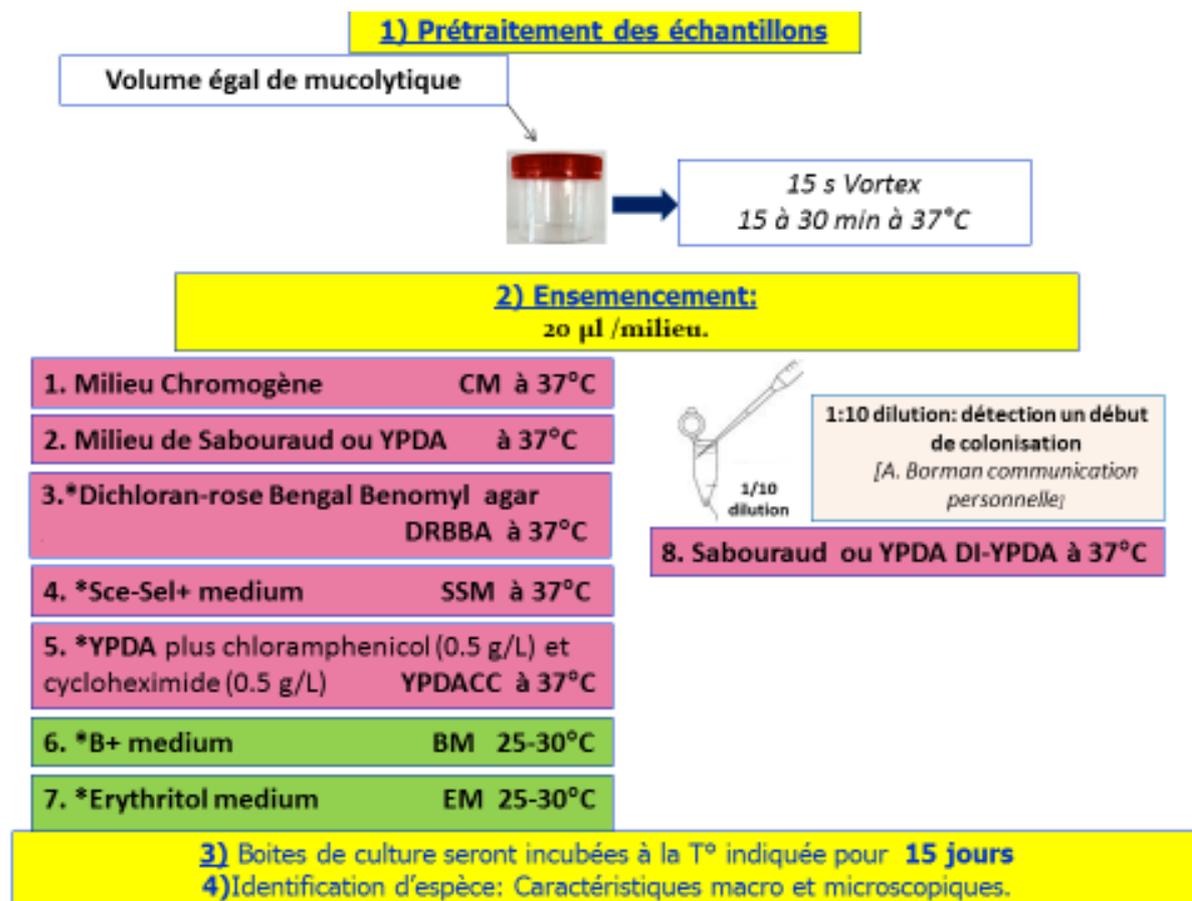
Le prétraitement consistait à ajouter un mucolytique de volume égal à l'échantillon, puis mélanger pendant au moins 15 secondes à l'aide d'un vortex et d'incuber cette préparation à une température de 37°C pendant 30 minutes.

Les expectorations prétraitées ont étéensemencées avec un volume défini de 20µL du culot sur les 7 milieux sélectionnés. En plus une dilution au 1/10 de l'échantillon a été réalisée etensemencée sur milieu Sabouraud ou YPDA (DIYPDA). Cette dilution permettrait de détecter un début de colonisation (communication orale d'A. Borman).

Les températures d'incubation sont de 37°C pour détecter les champignons thermotolérants et entre 25°C et 30°C pour la détection des champignons d'origine environnementale avec un potentiel pouvoir pathogène (125) (Figure 9). Les milieux de culture étaient observés 2 fois par semaine sur une durée de 15 jours.

Puisqu'un volume constant étaitensemencé dans tous les centres, le délai de positivité ainsi que le nombre de colonies (quantification semi-quantitative pour chaque espèce) étaient notifiés sur la feuille de travail présentée en annexe 1.

L'identification des micromycètes reposait sur des caractéristiques macroscopiques et microscopiques.



**Figure 9 : Protocole standardisé de l'étude MFIP.**

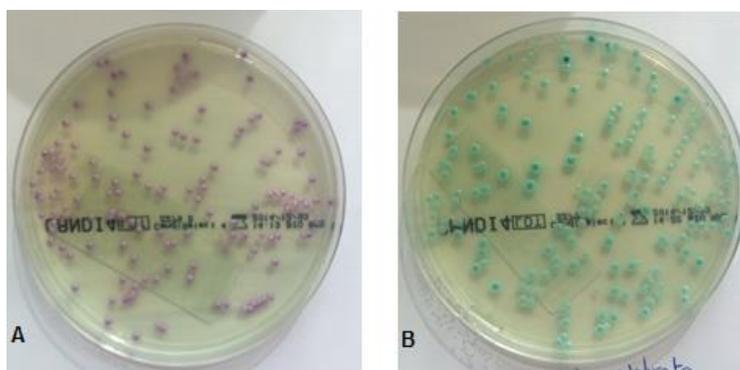
Pour les levures, l'identification se faisait par l'interprétation macroscopique des colonies ayant poussé sur le milieu chromogène. Par exemple l'identification de *Candida albicans* est aisée : les colonies sont de forme ronde, légèrement bombées, lisses, à bord net, de couleur rose à mauve (pour milieu chromogène CandiSelect™4 utilisé au CHU de Lille) (Figure 10). Quand l'examen macroscopique n'est pas assez contributif, une galerie d'identification (API ID 32C®) basée sur les caractères biochimiques de la levure, ou l'utilisation de MALDI-TOF (*Matrix Assisted Laser Desorption Ionization - Time of Flight*) pouvaient être réalisées dans les centres.

Pour les champignons filamenteux, l'identification d'espèce repose sur l'aspect macroscopique et microscopique (Figures 11 et 12). Certaines données (température, vitesse de pousse, sensibilité au cycloheximide) peuvent être des compléments utiles à l'identification.

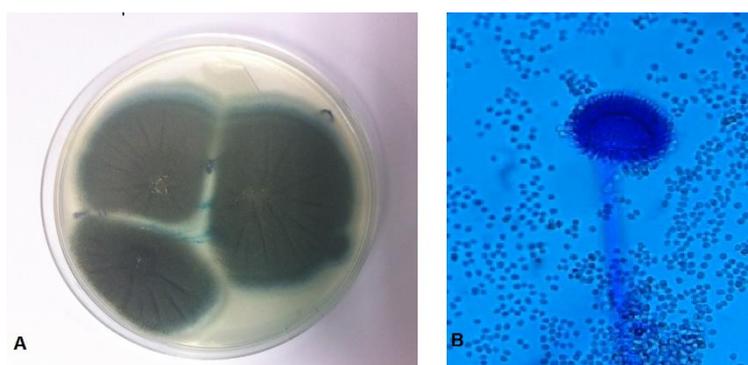
## A. Examen macroscopique

Sur un plan général, la température et la vitesse de croissance font partie de nos critères d'identification. Le délai de positivité de culture est court en cas d'*Aspergillus* et plus long pour d'autres genres tels que le genre *Scedosporium*.

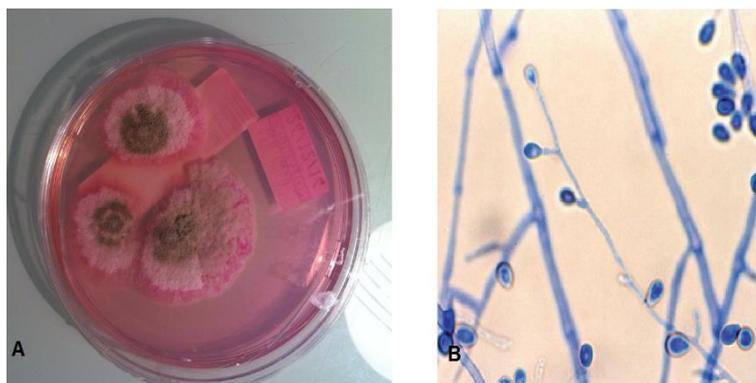
En fonction du type de mycélium aérien ou non, et du milieu de culture (Sabouraud ou YPDA), la texture des colonies peut être laineuse, duveteuse, poudreuse, granuleuse ou glabre. La topographie des colonies (plane, surélevée, cérébriforme, avec présence de stries) peut également orienter l'identification.



**Figure 10 : Aspect macroscopique de *C. albicans* (A) et *C. glabrata* (B) sur milieu CandiSelect™ 4 (Cultures du laboratoire de Parasito-Mycologie CHRU de Lille).**



**Figure 11 : Aspect d'*A. fumigatus* : (A) macroscopique sur milieu Sabouraud (B) microscopique coloré au bleu de lactophénol (Cultures du laboratoire de Parasito-Mycologie CHRU de Lille).**



**Figure 12 : Aspect de *S. apiospermum* : (A) macroscopique sur milieu DRBBC (B) microscopique coloration au bleu de lactophénol. A (Cultures du laboratoire de Parasito-Mycologie CHRU de Lille), B (126).**

La couleur des colonies et la présence des pigments diffusibles sont aussi des éléments d'orientation. Par exemple, les colonies de champignons dématiés sont de couleur brune, grise ou noire et celles des champignons hyalins sont blanches ou autres couleurs (rouge, vert, jaune, mauve, ...).

## B. Examen microscopique

Pour réaliser l'observation au microscope, on applique un morceau de Scotch® par sa face collante sur la colonie à identifier, puis on le dépose sur une lame avec une goutte de bleu au lactophénol. Le tout est recouvert d'une lamelle ; puis on observe au grossissement x40. On analyse successivement (127) :

- Les hyphes : septées, non septées, plutôt larges (> 4µm) ou étroites (<4µm)
- Les conidiophores : absents, simples, ou ramifiés.
- Les cellules conidiogènes : annellides, phialides...
- Les conidies : uni- ou pluricellulaires, en amas ou en chaînes, forme (ronde, ovale, en massue...).
- Les organes de fructification : périthèces, cléistothèces (sexué), pycnides (asexué).

L'ensemble de ces éléments est schématisé dans la figure 13 pour le genre *Aspergillus*.

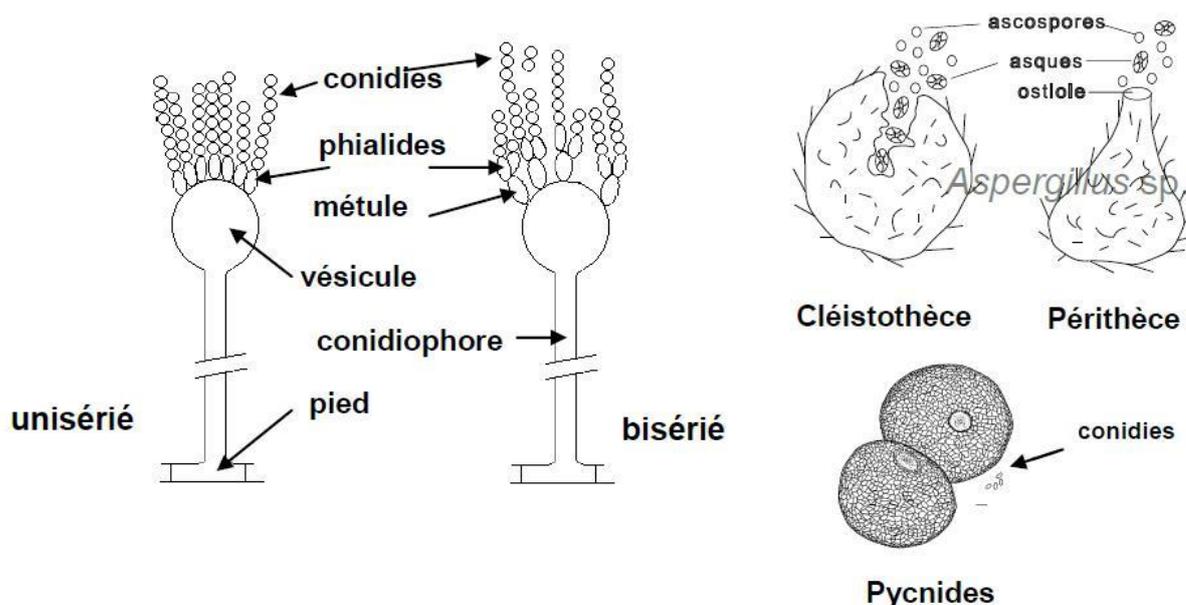


Figure 13 : Terminologie pour décrire la morphologie des champignons filamenteux du genre *Aspergillus* [issues de (119)].

#### IV. Analyses statistiques

L'analyse statistique a été effectuée en collaboration avec la Plate-Forme d'Aide Méthodologique du CHRU de Lille (Pr Alain Duhamel, et Mme Nassima Ramdane-Sebbane) avec l'aide du logiciel SAS version 9.3.

Nous avons étudié les prévalences de chaque espèce fongique, les sensibilités et les valeurs prédictives négatives des milieux de culture testés, et nous avons tenté de déterminer la meilleure association de milieux de culture à l'aide d'arbres décisionnels selon la méthode de CHAID.

Une valeur de  $p$  inférieure à 0,05 était considérée comme statistiquement significative pour toutes les analyses.

##### A. Prévalences

Une espèce a été considérée comme présente à partir du moment où elle a été détectée sur au moins 1 des 8 milieux ou conditions de culture testés suivants :

- Milieu chromogène (CM).

- Milieu de Sabouraud ou milieu YPDA (YPDA).
- Milieu Dichloran-Rose Bengal Benomyl Chloramphénicol (DRBBC).
- Milieu Sélectif Scedosporium (SSM).
- Milieu de Sabouraud (ou milieu YPDA) additionné de chloramphénicol et de cycloheximide (YPDACC).
- B+ Medium (BM).
- Milieu enrichi en érythritol (EM).
- Dilution 1/10 Milieu de Sabouraud ou YPDA (DIYPDA).

Les prévalences de chaque espèce fongique ont été calculées pour l'ensemble des malades, puis dans un second temps nous avons distingué les prévalences dans les populations d'âge inférieur à 15 ans (population pédiatrique) et population d'âge égal ou supérieur à 15 ans (population adulte).

## **B. Sensibilités et Valeurs prédictives négatives (VPN) des milieux de culture**

- La sensibilité du milieu est la probabilité que le champignon soit détecté par le milieu s'il est présent dans l'expectoration du patient.
- La valeur prédictive négative du milieu est la probabilité que le champignon soit absent de l'expectoration s'il n'est pas détecté par le milieu de culture.

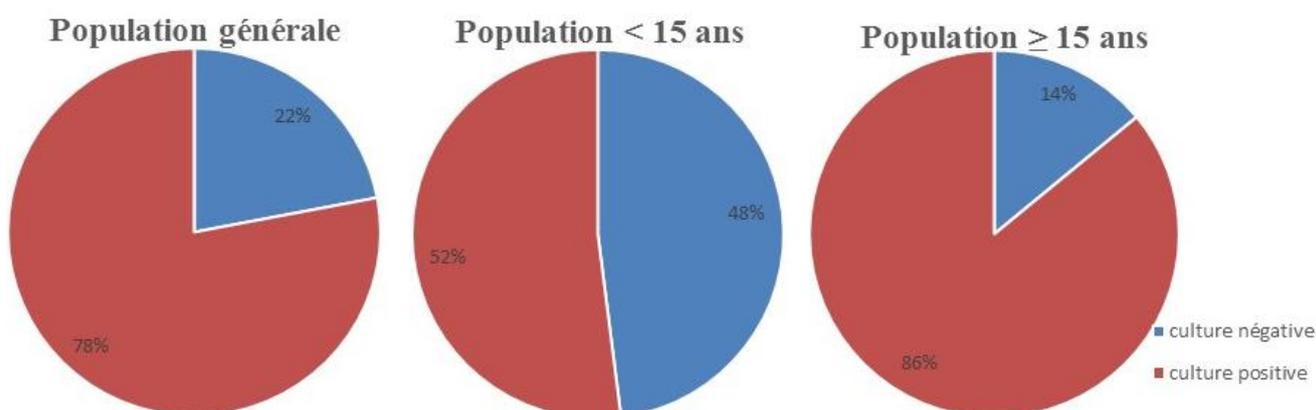
Ces grandeurs ont été estimées à partir des données individuelles de chaque milieu rapportées aux données générales de l'ensemble des milieux. Pour rester statistiquement significatif, ces données ont été établies pour les espèces isolées au moins 5 fois sur l'ensemble des expectorations.

## RESULTATS

### I. Données générales de l'étude

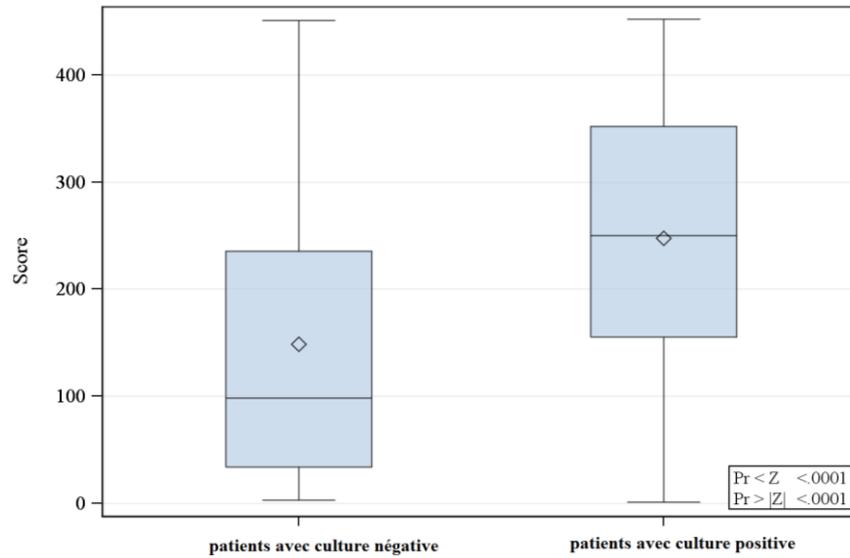
Au total 469 expectorations ont été recueillies auprès des patients atteints de mucoviscidose âgés entre 1 et 67 ans, avec un âge moyen estimé à 24 ans et un sex-ratio proche de 1 (252 masculins et 217 féminins).

Nous avons isolé au moins un micromycète dans 366 expectorations, ce qui correspond à 78% de l'ensemble des expectorations. Cette proportion chute à 52% chez les patients moins de 15 ans et elle est de 86% dans la population de 15 ans et plus (Figure 14).



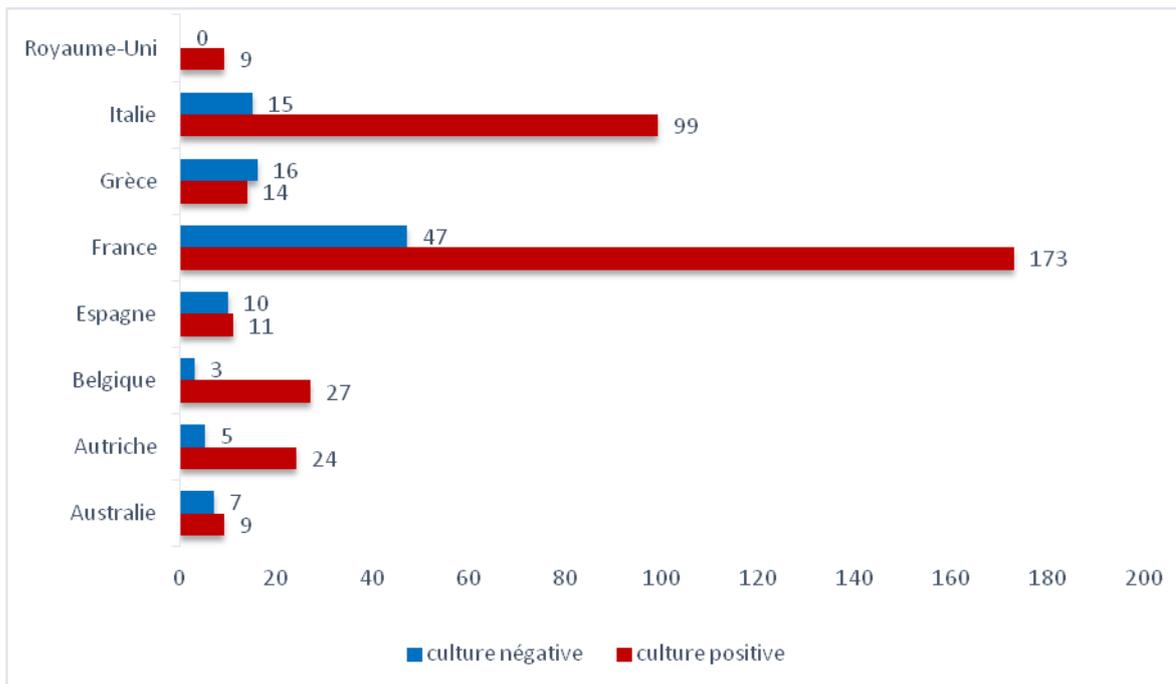
**Figure 14 : Proportions de cultures positives et négatives dans l'étude MFIP.**

L'âge moyen des patients avec une culture fongique positive était 25,8 ans et celui des patients avec culture négative était de 17,5 ans. La comparaison de ces âges moyens par le test des rangs signés de Wilcoxon nous a permis de montrer une différence significative d'un point de vue statistique ( $p$  calculé  $<0.0001$ ) (Figure 15).



**Figure 15 : Distribution de score de Wilcoxon pour l'âge (ans)**

Nous avons regroupé les centres participants par pays, et nous les avons représentés en fonction des cultures positives et négatives dans la figure 16.



**Figure 16 : répartition des cultures positives/négatives par pays.**

Si l'on regarde l'évolution du nombre d'espèces fongiques isolées par expectoration figure en fonction de l'âge (Tableau 9), la comparaison des moyennes d'âge des différents groupes des cultures positives pour 1, 2, 3, 4 ou 5 espèces avec le test de Kruskal-Wallis ne nous permet de mettre en évidence une différence d'âge

statistiquement significative ( $p$  calculée = 0,21).

**Tableau 9 : Nombre d'espèces fongiques isolées dans les 469 expectorations étudiées et âges moyens des différents groupes.**

Nombre d'espèces	Nombre d'observations	%	Déviations standard	Médiane (année)	Age moyen (année) des groupes	Age moyen (année) culture positive/négative
0	103	22%	11.81	14.50	17.5	17.5
1	163	34.7%	12.98	23	24.9	25.8
2	129	27.5%	10.25	25	26.7	
3	53	11.3%	9.05	23.5	26.5	
4	15	3.2%	9.52	27	27.6	
5	6	1.3%	3.43	22.5	22.8	

## II. Prévalence des espèces fongiques

### A. Prévalence globale

Nous avons calculé la fréquence des différentes espèces fongiques dans les expectorations de notre population. Les prévalences ont été calculées sur la base des 469 expectorations.

La prévalence estimée des 469 expectorations se répartit comme indiquée dans le tableau 10. Le *C.albicans* est de loin l'espèce fongique la plus fréquemment retrouvée dans notre population avec une prévalence de 47.7%, l'*A. fumigatus* est le champignon filamenteux le plus fréquemment isolé (34,5%).

Pour la suite de l'analyse des données, nous avons groupé certaines espèces isolées rarement ( $n < 5$ ). Pour rester significatifs dans les analyses statistiques qui suivront et pour faciliter la lecture et compréhension des résultats, nous avons regroupé les espèces fongiques de la façon suivante :

- La section *fumigati* comportant ici *A. fumigatus* et *Neosartorya pseudofischeri*.
- La section *Circumdati* comportant *Aspergillus flavus* et *Aspergillus niger*.
- La section *Nidulantes* contenant *Aspergillus nidulans*, *Aspergillus terreus*, *Aspergillus*

*versicolor*.

- Le groupe autres *Candida* qui regroupe *Candida famata*, *Candida kefyr*, *Candida guilliermondii*, *Candida kruzei*, *Candida lusitanae*, *Candida tropicalis* et *Candida sp.*

**Tableau 10 : Prévalence des différentes espèces fongiques retrouvées dans les expectorations des patients suivis dans l'ensemble des centres.**

Espèces fongiques	Prévalence		Espèces fongiques	Prévalence	
	Nombre de cas	%		Nombre de cas	%
<i>Acremonium sp.</i>	1	0.2%	<i>Chrysosporium sp.</i>	1	0.2%
<i>Arthrographis kalrae</i>	1	0.2%	<i>Cladosporium sp.</i>	9	1.9%
<i>Aspergillus flavus</i>	13	2.8%	<i>Exophiala dermatitidis</i>	10	2.1%
<i>Aspergillus fumigatus</i>	162	34.5%	<i>Exophiala lecanii-corni</i>	1	0.2%
<i>Aspergillus nidulans</i>	2	0.4%	<i>Exophiala phaeomuriformis</i>	1	0.2%
<i>Aspergillus niger</i>	3	0.6%	<i>Exophiala sp.</i>	4	0.8%
<i>Aspergillus sp.</i>	12	2.5%	<i>Fusarium oxysporum</i>	1	0.2%
<i>Aspergillus terreus</i>	10	2.1%	<i>Fusarium sp.</i>	2	0.4%
<i>Aspergillus versicolor</i>	1	0.2%	<i>Geotrichum capitatum</i>	1	0.2%
<i>Caesalpinia pulcherrima</i>	1	0.2%	<i>Geotrichum silvicola</i>	1	0.2%
<i>Candida albicans</i>	224	47.7%	<i>Geotrichum sp.</i>	4	0.8%
<i>Candida kefyr</i>	1	0.2%	<i>Geotrichum klebahnii</i>	1	0.2%
<i>Candida dubliniensis</i>	21	4.5%	<i>Neosartorya pseudofischeri</i>	1	0.2%
<i>Candida famata</i>	2	0.4%	<i>Paecilomyces variotii</i>	4	0.8%
<i>Candida glabrata</i>	22	4.7%	<i>Penicillium sp.</i>	44	9.4%
<i>Candida guilliermondii</i>	1	0.2%	<i>Rasamsonia argillacea</i>	5	1.1%
<i>Candida kruzei</i>	3	0.6%	<i>Rhizomucor sp.</i>	1	0.2%
<i>Candida lusitanae</i>	1	0.2%	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	1	0.2%
<i>Candida parapsilosis</i>	21	4.5%	<i>Rhodotorula sp.</i>	2	0.4%
<i>Candida sp.</i>	26	5.5%	Complexe <i>P. Boydii/S. apiospermum</i>	24	5.1%
<i>Candida tropicalis</i>	6	1.2%	<i>Lomentospora prolificans</i>	7	1.5%
<i>Champignons filamenteux non identifiable</i>	8	1.7%	<i>Scedosporium sp.</i>	13	2.8%

- Le groupe *Exophiala* sp. contient toutes les espèces du genre *Exophiala* (*Exophiala dermatitidis*, *Exophiala lecanii-corni*, *Exophiala phaeomuriformis* et *Exophiala* sp).
- Le groupe *P. boydii*/*S. apiospermum* regroupe toutes les espèces du complexe.
- Le groupe « autres *Scedosporium* » contient *Lomentospora prolificans*, *Scedosporium* sp.
- Le groupe « autres moisissures » : *Arthrographis kalrae*, *Chrysosporium* sp., *Fusarium oxysporum*, *Fusarium* sp., *Paecilomyces variotii*, *Rhizomucor* sp., *Acremonium* sp. et Champignons filamenteux non identifiés.

Les prévalences des entités regroupant les espèces sont représentées dans la figure 17.

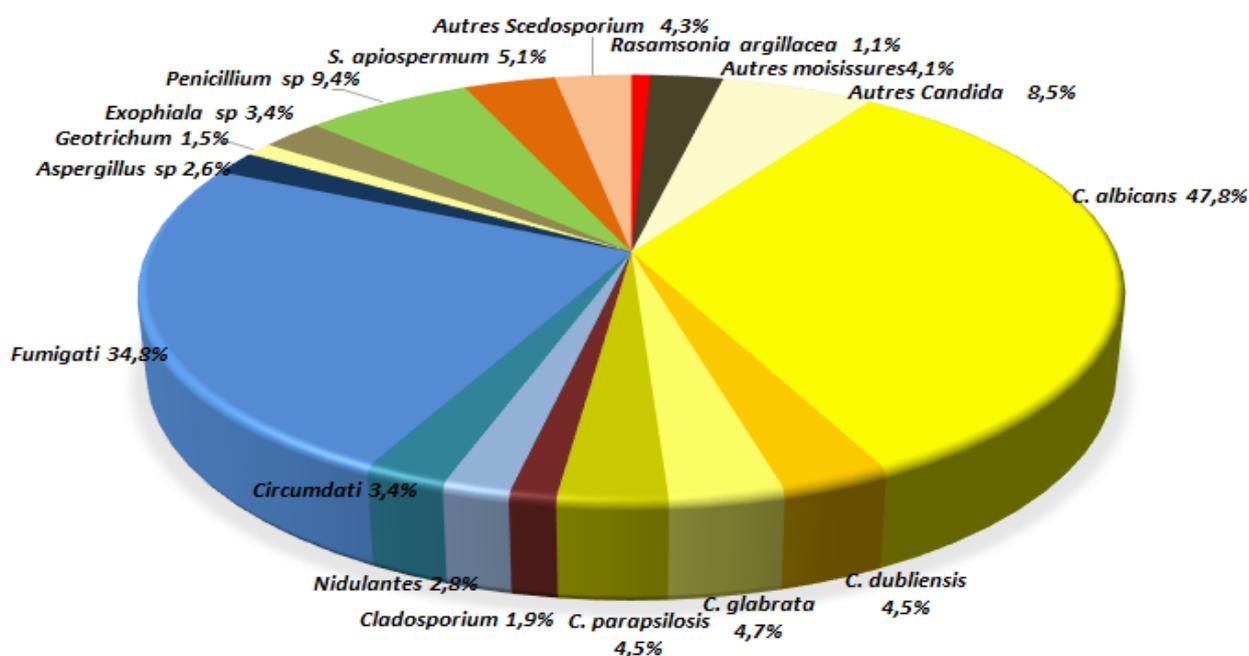


Figure 17 : Prévalence des différentes espèces fongiques dans l'étude MFIP.

## B. Prévalence en fonction de l'âge

Nous avons ensuite comparé la prévalence de chaque espèce ou groupe en fonction de l'âge (une population dont l'âge est inférieur à 15 ans et une population d'âge supérieur et/ou égal à 15 ans) et observé des différences significatives entre les deux populations pédiatrique et adulte concernant les prévalences des espèces fongiques

ou groupes suivants : *C. albicans*, section *fumigati* et *S. apiospermum* (Tableau 11).

**Tableau 11 : Prévalence des différentes espèces fongiques retrouvées dans les expectorations en fonction de l'âge (seuil 15 ans).**

Espèces	Age <15 ans n=100		Age >= 15 ans n=352		Valeur de p
	nombre	Prévalence	Nombre	Prévalence	
<i>Aspergillus sp.</i>	3	3%	9	2,5%	NC
<i>Candida autres</i>	6	6%	31	8,8%	NC
<i>Autres moisissures</i>	1	1%	18	5,1%	NC
<i>Autres Scedosporium</i>	3	3%	16	4,5%	NC
<i>C. albicans</i>	28	28%	195	55,4%	< 0,001
<i>Candida dubliniensis</i>	2	2%	19	5,4%	NC
<i>C. glabrata</i>	3	3%	19	5,4%	NC
<i>C. parapsilosis</i>	4	4%	17	4,8%	NC
Section <i>Circumdati</i>	1	1%	13	3,7%	NC
<i>Cladosporium sp.</i>	1	1%	8	2,3%	NC
<i>Exophiala sp.</i>	2	2%	14	4%	0.5407
Section <i>Fumigati</i>	16	16%	134	38%	< 0,001
<i>Rasamsonia argillacea</i>	0	0	5	1,4%	NC
<i>Geotrichum sp.</i>	1	1%	6	1,7%	NC
Section <i>Nidulantes</i>	1	1%	12	3,4%	NC
<i>Penicillium sp.</i>	4	4%	39	11,1%	NC
<i>S. apiospermum</i>	1	1%	22	6,2%	0.0371

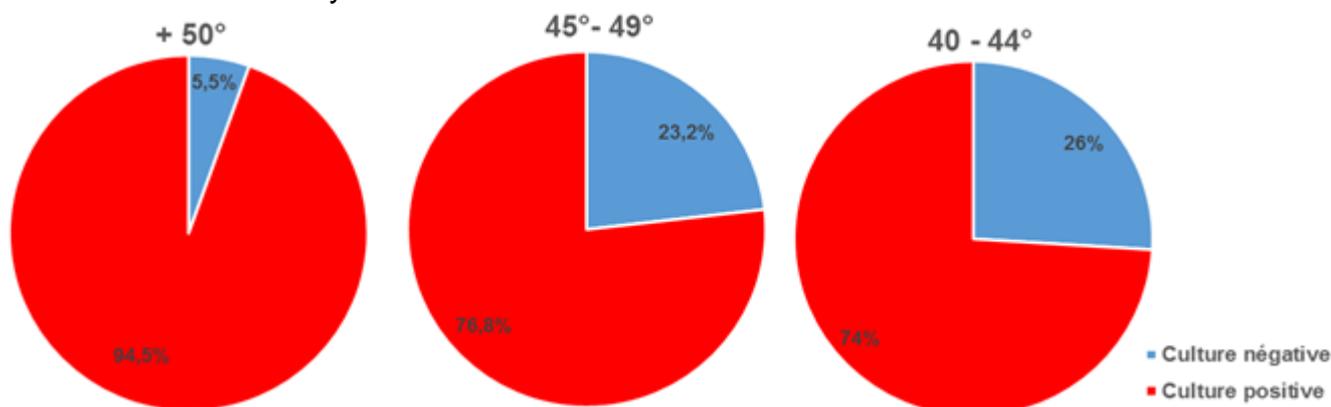
NC : non calculée

La prévalence des espèces fongiques dans la population pédiatrique est inférieure par rapport à celle de la population adulte sauf pour le groupe *Aspergillus sp.* Il n'existe pas de différence significative entre les deux populations concernant la prévalence du groupe *d'Exophiala sp.*

### C. Prévalence en fonction de la latitude

Comme l'impact du climat sur la présence de certaines espèces fongiques est connue (84,128–133). Nous avons calculé la fréquence des cultures positives et négatives, la

prévalence des espèces fongiques (Figure 19) en fonction des latitudes des centres européens participants. Nous avons déterminé trois groupes : (i) +50°, (ii) 45°- 49° et (iii) 40-44°. Devant le faible nombre de patients recrutés (N=16), le centre australien a été exclu de cette analyse.



**Figure 19: Répartition des cultures positives et négatives de l'étude MFIP en fonction de la latitude.**

En utilisant le test exact de Fisher, nous avons observé une différence significative entre les prévalences de chaque zone géographique définie par les latitudes +50°, 45°- 49° et 40-44° pour les champignons ou groupes suivants : *C. albicans*, *C. dubliniensis*, *C. glabrata*, autres *Candida*, *Geotrichum sp.*, section *Fumigati*, complexe *S. apiospermum*, *Cladosporium sp.*, et *Penicillium sp.* (Tableau 12).

**Tableau 12 : Prévalence des espèces fongiques en fonction des latitudes.**

Espèces	50°	45-49°	40-44°	Valeur p
<i>Aspergillus sp.</i>	1,4%	2%	4,6%	0.3628
Autres <i>Candida</i>	11,1%	3,6%	16%	<0,0001
Autres moisissures	11,1%	2,8%	3,1%	0.0126
Autres <i>Scedosporium</i>	1,4%	5,2%	3,8%	0.4045
<i>C. albicans</i>	55,6%	54,0%	37,4%	0.0024
<i>C. dubliniensis</i>	11,1%	4,4%	1,5%	0.0107
<i>C. glabrata</i>	8,3%	6,0%	0,7%	0.0101
<i>C. parapsilosis</i>	1,4%	4,8%	6,1%	0.3211
Section <i>Circumdati</i>	2,8%	1,6%	6,1%	0.0586
<i>Cladosporium sp.</i>	5,6%	2,0%	/	0.0202
<i>Exophiala sp.</i>	5,6%	4,4%	0,8%	0.0693
Section <i>Fumigati</i>	43,1%	34,0%	26,7%	0.0479
<i>Rasamsonia argillacea</i>	0%	0,8%	2,3%	0.4475
<i>Geotrichum sp.</i>	5,6%	0,8%	0,8%	0.0194
Section <i>Nidulantes</i>	0	3,6%	3,1%	0.3103
<i>Penicillium sp.</i>	19,4%	10,4%	2,3%	<0,0001
<i>S. apiospermum</i>	1,4%	2%	14%	<0,0001
<i>Scedosporium spp.</i>	2,8%	7,2%	16,8%	0.0019

Il n'existe pas de différence significative ( $p=0.4045$ ) pour le groupe «autre *Scedosporium*» mais si on regroupe toutes les espèces de *Scedosporium* en un seul groupe englobant les espèces du complexe *P. boydii*/*S. apiospermum* et *L. prolificans*, on obtient une différence statistique significative ( $p=0.0019$ , Tableau 12). Ceci est en accord avec les données de la littérature qui rapportent *L. prolificans* comme moins fréquemment isolé chez les patients et ayant une distribution géographique plus limitée que celle des espèces du complexe.

### **III. Evaluation des performances des milieux de culture**

#### **A. Détermination des sensibilités et valeurs prédictives négatives**

Notre objectif étant de déterminer l'apport de chaque milieu dans la mise en culture des expectorations issues des patients atteints de mucoviscidose, nous avons calculé les sensibilités et valeurs prédictives négatives des 8 milieux ou conditions testés pour chaque espèce fongique (Tableaux 13 et 14).

La sensibilité tient compte de la prévalence de l'espèce sur un milieu défini rapportée à la prévalence globale du champignon. Ces 2 grandeurs se définissent de la façon suivante :

- Sensibilité (Se) = Probabilité que le milieu soit positif si le champignon est présent sur au moins un des 8 milieux ou conditions testés.
- Valeur prédictive négative (VPN) = Probabilité que le champignon soit absent quand le milieu est négatif.

La spécificité et la valeur prédictive positive sont par définition de 100%, car ces paramètres ne sont pas calculables dans notre cas puisque nous ne comparons pas nos données à une méthode de référence.

Le milieu Sab/YPDA présente la meilleure sensibilité pour détecter les espèces de la section *Fumigati* avec une valeur de 69.4%. Le milieu le plus sensible pour isoler les *Scedosporium* est le milieu SSM avec une sensibilité à 90.4%. En effet, il a une sensibilité de 87% pour *S. apiospermum* et 95% pour le groupe «autres *Scedosporium*».

Le milieu BM est le milieu le plus sensible pour isoler l'*Exophiala sp.* avec une excellente sensibilité (87.5%) par rapport aux autres milieux, suivi par le milieu EM (68.7%).

Les milieux conventionnels (Sab/YPDA et CM) sont performants pour isoler les espèces *Candida* mais le milieu le plus sensible pour détecter *C. albicans* est le milieu DRBBC (88.4%), le milieu BM est le plus performant (80.9%) pour isoler *C. dubliniensis* et le milieu CM demeure le plus sensible pour la détection de *C. glabrata* et *C. parapsilosis* avec une sensibilité de 90.1% et 85.7% respectivement.

Pour les genres *Penicillium*, *Geotrichum* et *Cladosporium*, ce sont les milieux incubés à une température inférieure à 30°C (BM et EM) qui présentent les meilleures sensibilités et VPN. Ici, la température d'incubation semble jouer un rôle important pour le développement de ces moisissures.

Tableau 13 : Sensibilités en % des milieux de culture vis-à-vis de chaque espèce ou groupe d'espèces.

Espèces	CM	Sab/YPDA	DRBB	SMM	YPDACC	BM	EM	DIYPDA
<i>Aspergillus sp</i>	44,4	58,3	16,7	16,7	50	75	58,3	58,3
<i>Autres Candida</i>	60,7	72,5	75	70	62,5	77,5	65	52,5
<i>Autres moisissures</i>	12,5	31,9	10,5	21	31,6	36,9	52,6	15,8
<i>Autres Scedosporium</i>	45	55	80	95	40	70	50	45
<i>C. albicans</i>	81,7	79	88,4	79,5	77,2	75,5	63,8	40,5
<i>C. dubliensis</i>	66,7	71,4	61,9	61,9	61,9	80,9	71,4	38,1
<i>C. glabrata</i>	90,1	81,8	72,7	27,3	40,9	72,7	36,4	50
<i>C. parapsilosis</i>	85,7	66,7	71,4	71,4	42,9	71,4	52,4	52,4
<i>Circumdati</i>	53,3	53,3	0	0	33,3	26,7	26,7	26,7
<i>Cladosporium sp</i>	0	0	0	0	0	44,4	67,7	0
<i>Exophiala sp</i>	43,7	43,7	0	12,5	31,2	87,5	68,7	37,5
<i>Fumigati</i>	65,6	69,4	6,2	5	49,4	59,4	61,9	43,7
<i>Rasamsonia argillerae</i>	60	80	40	40	80	60	80	40
<i>Geotrichum sp</i>	14,3	28,6	28,6	28,6	28,6	85,7	57,1	28,6
<i>Nidulantes</i>	61,5	61,5	0	0	28,1	69,2	69,2	46,1
<i>Penicillium sp</i>	4,6	7	2,3	4,6	4,6	55,8	72,1	4,6
<i>S. apiospermum</i>	56,5	73,9	82,6	87	65,2	82,6	78,3	52,2
<i>Scedosporium spp</i>	51,2	65,1	81,4	90,7	53,5	76,7	65,1	48,8

Tableau 14 : Valeurs prédictives négatives des milieux de culture vis-à-vis de chaque espèce ou groupe d'espèces

Espèces	CM	Sab/YPDA	DRBB	SMM	YPDACC	BM	EM	DIYPDA
<i>Aspergillus sp</i>	98,9	98,9	97,8	97,9	98,7	99,3	98,9	98,9
<i>Autres Candida</i>	97,5	97,5	97,7	97,3	96,6	97,9	96,8	95,8
<i>Autres moisissures</i>	96,9	97,2	96,4	96,8	97,2	97,4	98	96,5
<i>Autres Scedosporium</i>	97,5	98	99,1	99,8	97,4	98,7	97,8	97,1
<i>C. albicans</i>	85	83,9	90,4	84,2	72,8	81,7	75,1	65,2
<i>C. dubliensis</i>	98,4	98,7	98,2	98,2	98,2	99,1	98,7	97,2
<i>C. glabrata</i>	99,5	99,1	98,7	98,9	97,2	98,7	97	97,6
<i>C. parapsilosis</i>	99,3	98,5	98,7	98,7	97,4	98,7	97,2	97,8
<i>Circumdati</i>	98,4	98,5	0	0	97,8	97,6	97,6	97,6
<i>Cladosporium sp</i>	0	0	0	0	0	98,9	99,3	0
<i>Exophiala sp</i>	98	98	0	97	97,6	99,6	98,9	97,8
<i>Fumigati</i>	84,3	86,3	67,3	67	79,2	82,6	83,5	77,4
<i>Rasamsonia argillerae</i>	99,6	99,8	99,4	99,4	99,8	99,6	99,8	99,4
<i>Geotrichum sp</i>	98,7	98,9	98,9	98,9	98,9	99,8	99,3	98,9
<i>Nidulantes</i>	98,9	98,9	0	0	97,8	99,1	99,1	98,5
<i>Penicillium sp</i>	91	91,4	91	91,2	91,2	95,4	97,3	91,2
<i>S. apiospermum</i>	97,7	98,7	99,1	99,3	98,2	99,1	98,9	97,6
<i>Scedosporium spp</i>	95,3	96,6	98,1	99,1	95,5	97,7	96,6	95,1

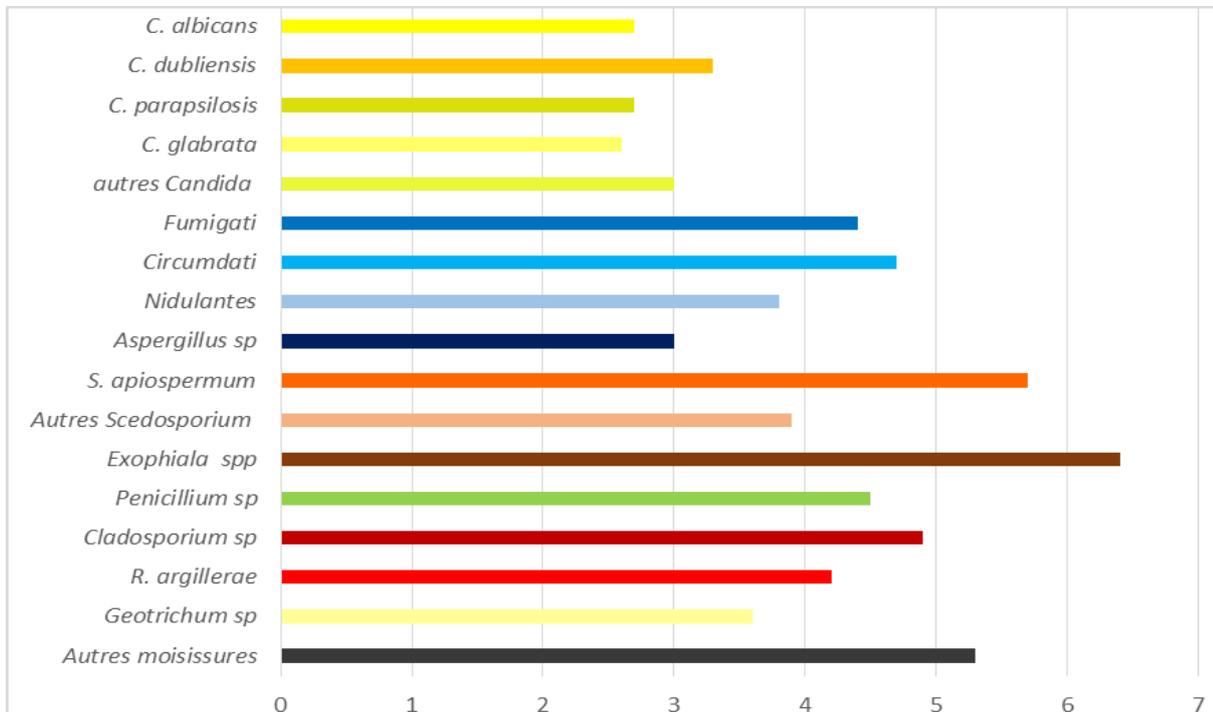
## B. Estimation des délais de positivité des milieux

Nous avons noté les délais de positivité des cultures des micromycètes pour proposer une durée d'incubation optimale permettant d'isoler l'ensemble des espèces fongiques notamment les espèces qui présentent un intérêt en clinique chez les patients atteints de mucoviscidose (Tableau 15).

Les délais moyen et médian de positivité de chaque espèce ou groupe d'espèces sont représentés dans la figure 20 et le tableau 15.

Le délai médian de positivité de nos cultures est inférieur ou égal à 4 jours, sauf pour les espèces ou groupes suivants : *S. apiospermum*, *Exophiala sp.*, *Cladosporium sp.* et autres moisissures.

Les espèces *Candida* ont un développement rapide, leur délai moyen de positivité ne dépasse pas 3 jours, et 95% des cultures à *candida* poussent avant le 6<sup>ème</sup> jour d'incubation.



**Figure 20 : Le délai moyen (en jours) de positivité des cultures de chaque espèce ou groupe d'espèces.**

Pour les espèces de la section *Fumigati*, le délai médian de positivité est de 3.4 jours et seulement 17.2% des cultures à *Aspergillus* de la section *Fumigati* poussent au-delà de 6<sup>ème</sup> jour.

**Tableau 15 : Délais de positivité des cultures de chaque espèce ou groupe d'espèces.**

Espèces	0-2 jours	2-4 jours	4-6 jours	> 6 jours	Médiane (en jours)
<i>Aspergillus sp.</i>	2 (16,7%)	7 (58,3%)	3 (25%)	/	3
Autres <i>Candida</i>	9 (23.7%)	21 (55.2%)	6 (15.8%)	2 (5.3%)	2,9
Autres moisissures	2 (10.5%)	4 (21%)	7 (36.8%)	6 (31.6%)	5
Autres <i>Scedosporium</i>	/	13 (68.4%)	5 (26.3)	5 (26.3%)	3,3
<i>C. albicans</i>	41 (18.3%)	150 (67%)	28 (12.5%)	5 (2.3%)	2,7
<i>C. dubliniensis</i>	2 (9.5%)	12 (57.1%)	7 (33.3%)	/	3
<i>C. glabrata</i>	5 (22.7%)	14 (63.6%)	3 (13.6%)	/	2.9
<i>C. parapsilosis</i>	4 (19%)	15 (71.4%)	1 (4.8%)	1 (4.8%)	2.6
<i>Circumdati</i>	/	8 (57.1%)	2 (14.3%)	4 (28.6%)	3.3
<i>Cladosporium</i>	/	1 (11.1%)	7 (77.8%)	1 (11.1%)	5
<i>Exophiala spp.</i>	/	3 (20%)	7 (46.7%)	5 (33.3%)	5
<i>Fumigati</i>	7 (4.6%)	76 (50.3%)	42 (27.8%)	26 (17.2%)	3.4
<i>R. argillacea</i>	0	3 (60%)	1 (20%)	1 (20%)	3
<i>Geotrichum sp.</i>	0	3 (42.9%)	4 (57.1%)	0	4
<i>Nidulantes</i>	1 (7.7%)	8 (61.5%)	2 (15.4%)	2 (15.4%)	3
<i>Penicillium sp.</i>	/	21 (48.8%)	15 (34.9%)	7 (16.3%)	4
<i>S. apiospermum</i>	/	8 (33.3%)	6 (25%)	10 (41.7%)	4.9

### C. Recherche de la combinaison optimale des milieux pour l'analyse mycologique des expectorations

Notre objectif étant de définir un protocole de mise en culture des expectorations dans la mucoviscidose le plus standardisé possible, nous avons tenté de déterminer l'association des milieux de culture permettant d'isoler un maximum d'espèces fongiques potentiellement pathogènes dans ce contexte d'après les données bibliographiques. Notre travail a été focalisé sur les espèces suivantes : *Aspergillus* de la section *Fumigati*, *Aspergillus* de la section *Nidulantes*, *Aspergillus* de la section

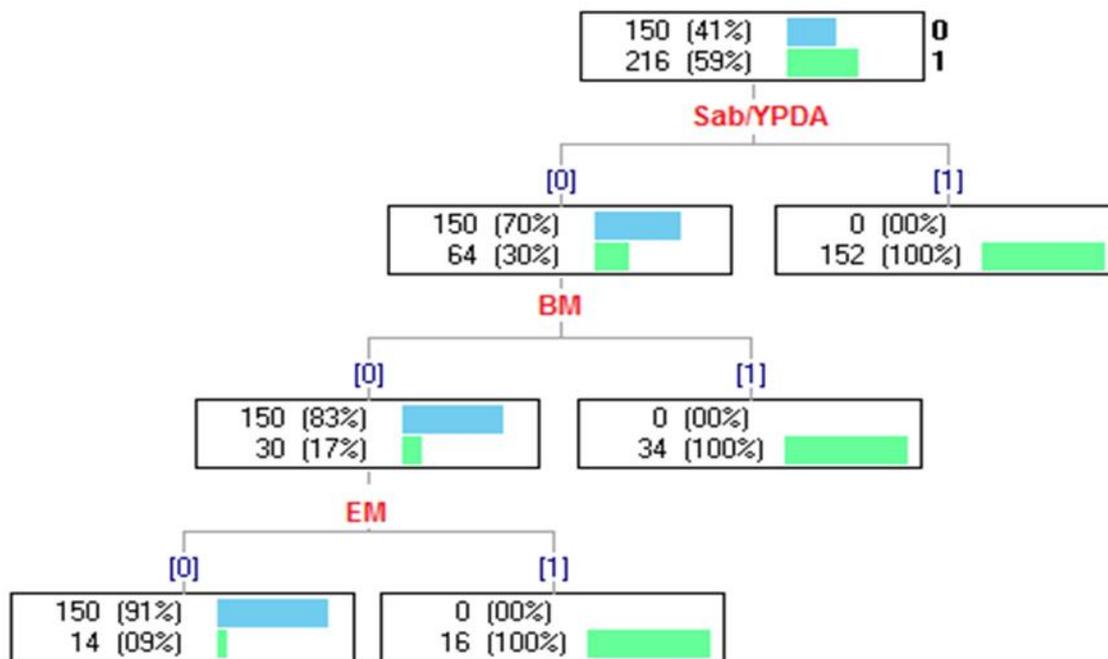
*Circumdati*, *Aspergillus sp.*, *Scedosporium spp.*, *Cladosporium sp.*, *Exophiala spp.*, et *R. argillacea*.

Nous avons utilisé la méthode de CHAID (*CHi-squared Automatic Interaction Detector*) pour définir la combinaison des milieux la plus optimale pour isoler ce groupe d'espèces. Le CHAID est une méthode statistique qui consiste à construire un arbre de décision à l'aide de divisions successives afin de classer un échantillon selon une variable (ici présence de l'espèce dans le milieu de culture étudié), il se sert du test de  $Chi^2$  pour déterminer la meilleure division à chaque étape (125,126). Huit milieux ou conditions de culture ont été testés, les variables explicatives sont la présence / absence d'un champignon dans chacun des 8 milieux, ce qui permet de déterminer les milieux de culture les plus performants pour isoler le groupe d'espèces que nous avons déterminé.

Nous avons procédé de 2 façons différentes : (i) en considérant la population patients et chaque expectoration comme positive/négative (Figure 21) et (ii) en prenant en compte chaque champignon (présence/absence) (Figure 22).

À partir des 469 expectorations de notre étude, *Aspergillus* de la section *Fumigati*, *Aspergillus* de la section *Nidulantes* *Aspergillus* de la section *Circumdati*, *Aspergillus sp.*, *Scedosporium spp.*, *Cladosporium sp.*, *Exophiala spp.*, et *R. argillacea*, ont détectés dans 216 expectorations positives (Figure 21).

Pour la première étape : c'est le milieu Sabouraud/YPDA qui est le plus sensible en mettant en évidence 152 expectorations positives. Pour les 64 expectorations restantes, le milieu BM affiche une meilleure performance avec détection de 34 échantillons (ou expectorations) positifs. Enfin, sur les 30 échantillons restants, meilleur milieu est le milieu EM qui permet de détecter 16 autres expectorations positives.



**Figure 21 : Arbre décisionnel obtenu à partir de l'étude des expectorations pour isoler : *Aspergillus* de la section *Fumigati*, *Aspergillus* de la section *Nidulantes*, *Aspergillus* de la section *Circumdati*, *Aspergillus* sp, *Scedosporium* spp, *Cladosporium* sp, *Exophiala* spp, et *R. argillacea*.**

Pour la 2<sup>ème</sup> approche, nous avons mis en évidence 278 espèces de champignons appartenant à notre groupe de micromycètes potentiellement pathogènes. Nous avons obtenu la même combinaison des milieux (Sab/YPDA, BM et EM) et dans le même ordre que la 1<sup>ère</sup> approche (Figure 22).

En ce qui concerne la 1<sup>ère</sup> approche nous avons «raté» 14 expectorations positives par cette combinaison. En utilisant la 2<sup>ème</sup> approche nous «ratons» 31 isolats de notre groupe de champignons. Afin d'augmenter la sensibilité de notre combinaison de milieux nous avons testé en rajoutant un 4<sup>ème</sup> milieu. C'est le milieu YPDACC qui permet de détecter 12 isolats supplémentaires parmi les 31 ratés (Figure 23).

L'association des 4 milieux suivants : Sab/YPDA, BM, EM et YPDACC apporte une sensibilité de 93,2% pour isoler : les *Aspergillus* de la section *Fumigati*, les *Aspergillus* de la section *Nidulantes*, les *Aspergillus* de la section *Circumdati*, les *Aspergillus* sp., les *Scedosporium* spp., les *Cladosporium* sp., les *Exophiala* spp., et *R. argillacea*.

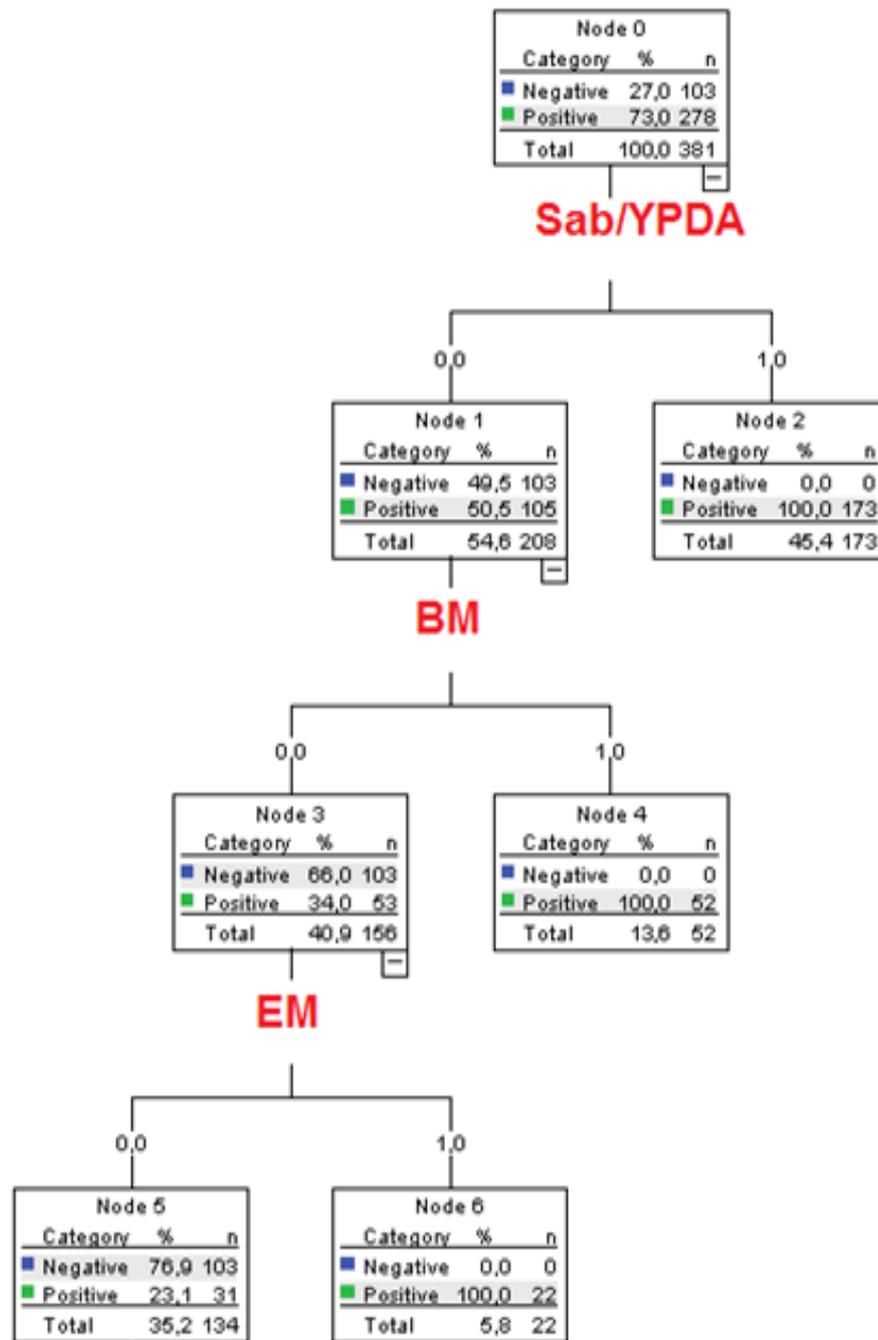


Figure 22 : Arbre décisionnel obtenu en prenant en compte chaque espèce pour isoler *Aspergillus* de la section *Fumigati*, *Aspergillus* de la section *Nidulantes*, *Aspergillus* de la section *Circumdati*, *Aspergillus* sp., *Scedosporium* spp., *Cladosporium* sp., *Exophiala* spp., et *R. argillacea*.

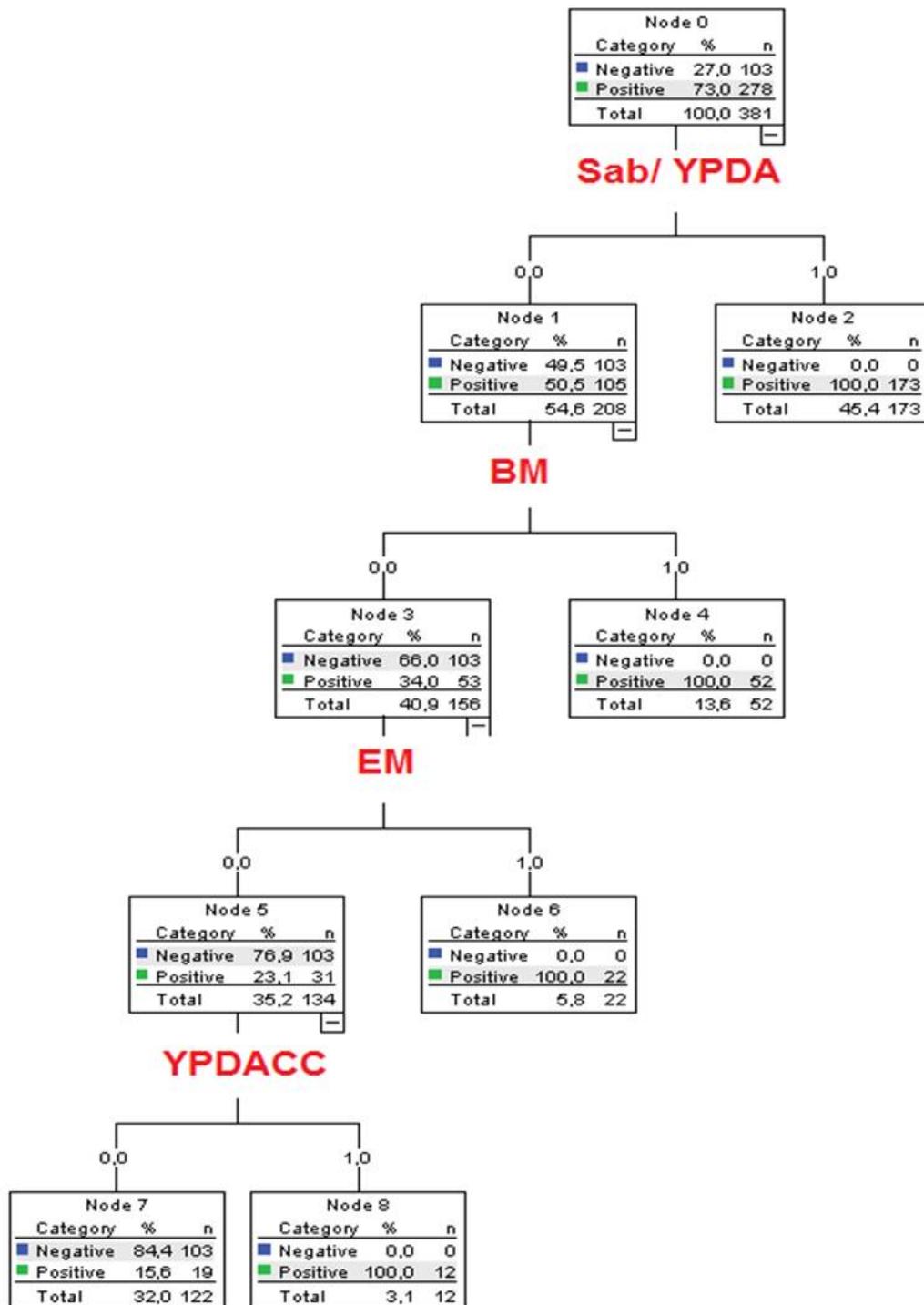


Figure 23 : arbre décisionnel de 4 milieux de culture pour isoler *Aspergillus* de la section *Fumigati*, *Aspergillus* de la section *Nidulantes*, *Aspergillus* de la section *Circumdati*, *Aspergillus* sp, *Scedosporium* spp, *Cladosporium* sp, *Exophiala* spp, et *R. argillacea*.

## DISCUSSION

### I. Epidémiologie fongique de notre population

Le pourcentage de cultures fongiques positives de notre étude est de 78% avec une différence significative ( $p < 0.0001$ ) entre l'âge moyen des patients avec culture positive (25,8 ans) et celui des patients avec culture négative (17,5 ans). Cette différence est due probablement à l'évolution naturelle de la maladie : le rôle délétère des infections bactériennes sur l'épithélium respiratoire et l'utilisation fréquente des antibiotiques et des corticoïdes sont des facteurs favorisant la colonisation fongique chez le patient atteint de mucoviscidose (42,51,57,134).

Pour *A. fumigatus* nous retrouvons une prévalence globale de 34,5% (34,8% pour la section *Fumigati*) avec différence significative ( $p < 0,0001$ ) entre les populations adultes et pédiatriques (seuil de 15 ans) qui présentent respectivement des prévalences de 38% et 16%. La prévalence d'*A. fumigatus* augmente donc avec l'âge. Dans notre étude, la moyenne d'âge des malades enfants colonisés par *A. fumigatus* est de 11,2 ans, ce qui se rapproche des données de Cimon et al. où l'âge moyen du premier isolement du champignon en France avait été établi à 12,3 ans (135). Au Royaume-Uni, Saunders et al. ont estimé la moyenne d'âge de premier isolement à 9 ans (42).

Nous avons retrouvé aussi un gradient de prévalence décroissant selon l'axe nord-sud qui pourrait être expliqué par : (i) une différence des âges dans ces zones, (ii) une différence des prises en charge et des pratiques professionnelles notamment le recours fréquent aux antibiotiques par inhalation pour maîtriser les infections bactériennes (41), et/ou par une différence de la charge en spores aspergillaires dans l'environnement (136).

La prévalence d'*A. fumigatus* chez les patients atteints de mucoviscidose varie considérablement selon les études de 5.8 à 78.8% (Tableau 2). Cette disparité est due probablement (i) aux milieux de culture utilisés, et/ou (ii) aux protocoles différents entre les laboratoires (prétraitement des échantillons, température et durée des cultures, méthodes d'identification des micromycètes...), et/ou (iii) aux populations étudiées (adultes, enfants, mode de recrutement), et/ou (iv) aux types de prélèvements utilisés (écouvillon nasal, expectoration, LBA), enfin (v) aux conditions climatiques spécifiques de chaque pays ou région (43–48,136,137).

La seconde espèce aspergillaire la plus fréquemment isolée dans notre étude est *A. flavus* avec une prévalence de 2,8%, principalement détectée chez les adultes. *A. flavus* peut être responsable des manifestations de type APBA (138), sa prévalence varie entre 2 à 7% (45,53,55,56).

Le taux retrouvé pour *A. terreus* est de 2,1%, avec également une prédominance chez les adultes, *A. terreus* peut être comme *A. flavus* à l'origine de cas d'APBA (53), son taux varie de 0,9 à 8% selon les études (45,53,56).

*S. apiospermum* a été isolé dans notre étude avec un taux de 5,1% ; on le retrouve principalement chez les adultes. Ce champignon n'ayant été isolé qu'une seule fois dans les prélèvements pédiatriques (prévalence estimée à 1%), il existe une différence significative ( $p= 0.0371$ ) entre la prévalence de *S. apiospermum* chez les adultes (6,2%) et chez les enfants (1%). En général la colonisation des voies aériennes par *S. apiospermum* survient après celle de l'*A. fumigatus*, et l'âge de la primo-colonisation par *S. apiospermum* a été estimé à 14,5 ans (88). Comme certains centres ont réalisé une identification de genre mais pas d'espèce (13 isolats identifiés comme *Scedosporium sp.*), notre estimation de prévalence pourrait être légèrement sous-estimée.

De plus nous avons mis en évidence un gradient croissant nord-sud de la prévalence de *S. apiospermum* en Europe, qui pourrait être expliqué plus particulièrement par les éléments suivants :

-(i) le climat : *S. apiospermum* est une espèce thermophile, avec une distribution ubiquitaire mais prédominante dans les zones tempérées, sa fréquence dans l'environnement est directement liée à la présence d'une pollution d'origine organique (82)

-(ii) la distribution des mutations *CFTR* qui pourrait être un facteur favorisant la colonisation par certaines espèces fongiques comme *S. apiospermum* : il existe un gradient décroissant de la mutation Delta F508 selon l'axe nord-ouest / sud-est pour la partie continentale de l'Europe (139,140), et un gradient croissant selon l'axe nord-sud de la mutation G542X avec une grande hétérogénéité des types de mutations dans les pays méditerranéens d'Europe (141,142).

La prévalence de *S. apiospermum* varie considérablement selon les études, de 0% à des taux avoisinants 14,7% (Tableau 7). Outre l'absence de standardisation de l'examen mycologique des expectorations (44), la distribution géographique de ce champignon (climat, pollution, zone industrielle), et la fréquence des différentes classes de mutation du gène *CFTR* pourraient expliquer cette variation de fréquence rapportée d'une étude à l'autre.

La prévalence de *S. apiospermum* reste élevée chez les patients atteints de la mucoviscidose par rapport à sa fréquence dans l'environnement (89). De plus, sa présence dans les voies respiratoires pourrait entretenir la réaction inflammatoire locale par la sécrétion de protéases et le relargage de polysaccharides, contribuant au déclin progressif de la fonction respiratoire (42). *S. apiospermum* peut être à l'origine des cas de scédosporioses broncho-pulmonaires allergiques (ou mycoses broncho-pulmonaires allergiques ou MBPA) avec des manifestations cliniques semblables à

celles d'une ABPA, mais surtout à l'origine des cas d'infections invasives disséminées en cas d'immunodépression dans la suite d'une greffe pulmonaire (56,92,143). Dans ce contexte, il semble préférable voire recommandé dans certains pays comme la France de rechercher systématiquement les micromycètes du genre *Scedosporium* face à une dégradation de la fonction respiratoire, à l'apparition de signes cliniques de MBPA, ou dans le cadre d'un bilan pré-greffe.

Le genre *Exophiala* est retrouvé dans 3,4% des expectorations, avec un taux de 2% dans la population pédiatrique et 4% chez les adultes. Nous avons détecté 16 isolats dont 10 appartenaient à l'espèce *E. dermatitidis*, 4 étaient identifiés comme *Exophiala* sp. et les deux derniers appartenaient aux espèces *E. lecanii-corni* et *E. phaeomuriformis*. La fréquence de ce genre dans la zone géographique au-delà de 50° de latitude est de 5,8% contre 0,8% en deçà de 44°, ce qui montre une tendance à un gradient décroissant nord-sud même si sur le plan statistique nous n'avons pas observé de différence statistiquement significative ( $p=0.0693$ ).

La prévalence d'*Exophiala* est toutefois très variable d'un pays à l'autre (Tableau 8).

La colonisation des voies aériennes par *A. fumigatus*, l'homozygotie F508del, l'insuffisance pancréatique et l'utilisation d'antibiotiques par voie intraveineuse au long cours seraient des facteurs de prédisposition à la colonisation des patients atteints de mucoviscidose par *E. dermatitidis* (59,108). Ce champignon peut être très fréquent dans l'environnement intérieur : il colonise les salles de bain, sauna public, hammam, cuisine (100,144,145). On le retrouve notamment à des taux élevés (60%) dans les joints des lave-vaisselles (99). Outre les facteurs cités ci-dessus (génétiques, environnementaux, de mode de vie), le manque de standardisation de l'examen mycologique pourrait également expliquer ces variations de fréquence.

Sur nos 469 prélèvements, *R. argillacea* a été mis en évidence 5 fois uniquement chez des patients adultes, ce qui correspond à une prévalence de 1,1%. Cette prévalence

pourrait être sous-estimée notamment à cause d'une mauvaise identification de l'espèce, souvent confondue avec les *Penicillium* et les *Paecilomyces*.

Des erreurs diagnostiques de ce champignon ont déjà été signalées dans plusieurs études (45,111,146). Des cas de colonisation chronique à *R. argillacea* chez les patients atteints de mucoviscidose ont été rapportés en France, en Italie, au Royaume-Uni et en Autriche (45,89,111,113). *R. argillacea* est un pathogène considéré aujourd'hui comme émergent. Il possède une thermophilie importante et une résistance au fluconazole et au voriconazole qui complique sa prise en charge thérapeutique (147). Actuellement il n'y a pas assez de données dans la littérature pour pouvoir conclure, mais la détection de ce champignon dans les voies respiratoires des patients atteints de mucoviscidose ne doit pas être négligée, puisque *R. argillacea* est un véritable pathogène opportuniste chez les patients immunodéprimés, tels que les patients atteints de granulomatose familiale chronique ou d'affections hématologiques (114).

*C. albicans* est le champignon le plus prévalent de notre étude avec un taux de prévalence à 47.7%. Il existe une différence significative ( $p < 0,001$ ) de cette prévalence entre les deux populations : enfants (28%) et adultes (55,4%). Dans la littérature, la prévalence de *C. albicans* est élevée et varie de 46 à 78%, alors que les autres espèces du genre *Candida* sont moins fréquentes (45,54,55,64,117). Dans un contexte de mucoviscidose, la colonisation chronique des voies respiratoires par *C. albicans* est bien documentée et admise, avec transmission au sein de la fratrie. En revanche sa contribution à la dégradation de la fonction respiratoire et à l'entretien de l'état inflammatoire reste encore incertaine (148).

## II. Performances des milieux de culture étudiés

Le milieu présentant la meilleure sensibilité pour la détection des espèces de la section

*Fumigati* est le milieu de Sabouraud ou YPDA (Sab/YPDA) avec une valeur de 69,4%. Il présente aussi la meilleure VPN à 86,3%. Ces résultats confirment qu'un milieu conventionnel largement utilisé (Sabouraud ou YPDA) est parfaitement approprié pour l'isolement d'*A. fumigatus*.

Les milieux Sab/YPDA et CM (pour milieu chromogénique) présentent la meilleure sensibilité pour la détection des espèces de la section *Circumdati*. Cette sensibilité pourtant médiocre (53,3%) est à mettre en perspective avec son excellente VPN (98,5%). Ces données viennent renforcer l'utilisation de ces milieux, couramment ensemencés dans les laboratoires de mycologie lors de la prise en charge des expectorations des patients atteints de mucoviscidose.

Pour les espèces de la section *Nidulantes* et les autres espèces d'*Aspergillus*, c'est le milieu BM (B+ medium) qui s'avère être le plus performant. Les sensibilités et VPN sont respectivement de 69,3% et 99,1% pour le groupe *Nidulantes*, de 75% et 99,3% pour les autres *Aspergillus*. De par son pH et sa composition en antibiotiques, ce milieu permet d'inhiber la croissance de la plupart des bactéries (122). Sa température d'incubation entre 25 et 30°C (selon les centres) est également un facteur pouvant favoriser la croissance de ces moisissures.

Pour l'isolement de genre *Scedosporium*, le milieu SMM (appelé aussi SceSel+) demeure le plus performant avec une sensibilité globale à 90,7% (87% pour *S. apiospermum* et 95% pour les autres *Scedosporium*). Ces données sont en accord avec les travaux de Blyth et al. (90,6%) (88). Le milieu SMM contient du bénomyl qui est un inhibiteur de microtubules permettant de diminuer le développement des moisissures à croissance rapide telles que le genre aspergillaire (seulement 8 souches d'*A. fumigatus* et 2 souches d'autre *Aspergillus* ont poussé sur ce milieu).

Nos travaux ont permis de confirmer la supériorité du milieu SMM par rapport aux autres pour isoler les espèces du genre *Scedosporium*.

Le milieu le plus sensible pour isoler le genre *Exophiala* est le milieu BM avec une sensibilité estimée à 87,5%, arrive ensuite le milieu EM avec une sensibilité de 68,7%. Ces deux milieux ont été incubés à une température inférieure à 30° (entre 25 et 30° selon les centres) qui pourrait favoriser le développement de ce champignon. De plus, le milieu BM contient 4 antibiotiques à large spectre qui inhibent la plupart des espèces bactériennes en particulier *Pseudomonas aeruginosa* (122). Cette dernière est capable de sécréter des métabolites secondaires inhibant la croissance fongique (149). Nos résultats sont en faveur d'une supériorité du milieu BM sur le milieu EM qui avait été proposé comme milieu spécifique pour isoler les espèces du genre *Exophiala* (50,109).

L'étude de la durée d'incubation des cultures a montré que la médiane de positivité de nos cultures est inférieure ou égale à 4 jours pour la majorité des espèces fongiques notamment les *Candida* et *Aspergillus*, sauf pour *S. apiospermum*, *Exophiala spp.*, *Cladosporium sp.* et autres moisissures (Tableau 15). Nos délais sont approximatifs puisque nous avons contrôlé les cultures deux fois par semaine et non pas quotidiennement, néanmoins nos résultats sont en accord avec les données de la littérature sur les croissances des espèces fongiques (45,91,108,109,150). Ainsi, les espèces de la section *Fumigati* ont une médiane de 3,4 jours et 82,8% des cultures poussent avant le 6<sup>ème</sup> jour d'incubation. La vitesse de croissance des *Candida* est la plus rapide avec des médianes qui ne dépassent pas 3 jours, et 95% des cultures à *Candida* poussent avant le 6<sup>ème</sup> jour. Ces champignons ont une croissance rapide et sont facilement détectés.

Nos résultats confirment que *S. apiospermum* et *Exophiala spp.* sont des champignons à développement plus lent. En effet, la médiane de délai de positivité de *S. apiospermum* est presque de 5 jours (4,9) ce qui se rapproche de la valeur (6 jours) publiée dans les travaux de Blyth et al. en 2010 (91). Pour *Exophiala spp.*, le délai

moyen de positivité est de 6,4 jours, avec une valeur médiane de 5 jours qui est en accord avec les travaux de Lebecque et al publiés en 2010 (108).

Pour répondre à notre second objectif qui était de déterminer la meilleure combinaison de milieux, nous avons utilisé la méthode de CHAID pour identifier les milieux capables d'isoler le plus grand nombre d'espèces fongiques potentiellement pathogènes. Nous avons donc axé notre analyse selon la méthode de CHAID sur les espèces suivantes : *Aspergillus* de la section *Fumigati*, *Aspergillus* de la section *Circumdati*, *Aspergillus* de la section *Nidulantes*, *Aspergillus* sp., *Scedosporium* spp., *Exophiala* spp., *R. argillacea* et *Cladosporium* sp.

L'association des 3 milieux : Sab/YPDA, BM et EM permet de détecter 93,5% (202/216) des expectorations positives à au moins un des champignons cités ci-dessus. Nous avons obtenu la même combinaison de milieux en prenant en compte non plus l'expectoration mais chaque espèce individuellement (Sensibilité de 88,8% ; 247 espèces sur 278). L'inclusion d'un 4<sup>ème</sup> milieu permet d'identifier le milieu YPDACC comme meilleur milieu pour augmenter la sensibilité (ici à 93,2%, isolement de 259 sur 278 espèces). Par cette combinaison, nous avons « raté » 19 isolats qui se composent de : 9 isolats d'*A. fumigatus*, 4 isolats d'*Aspergillus* de la section *Circumdati*, 2 isolats de *S. apiospermum*, 3 isolats d'autres *Scedosporium* et un isolat d'*Aspergillus* de la section *Nidulantes*.

Au total, nos travaux confirment l'intérêt de l'utilisation de milieux conventionnels (type Sabouraud), et semi-sélectifs (BM, EM et YPDACC) incubés à 2 températures différentes (37°C et entre 25-30°C) pour assurer l'isolement des espèces autres qu'*Aspergillus*. Ainsi, la combinaison proposée à l'issue de l'étude MFIP semble bien appropriée pour la détection des espèces fongiques potentiellement pathogènes dans la prise en charge des expectorations dans la mucoviscidose. Nous proposons donc l'association d'un milieu de Sabouraud (ou YPDA) au milieu B+ (BM), et

éventuellement soit au milieu de Sabouraud additionné de chloramphénicol et cycloheximide (YPDACC), soit au milieu enrichi à l'Erythritol (EM) pour détecter les espèces fongiques d'intérêt. Les milieux Sab/YPDA et YPDACC sont à incuber à 37°C, les milieux BM et EM sont à incuber à des températures comprises entre 25 et 30°C. Nous suggérons d'utiliser le milieu SceSel+ (SMM) si le patient est colonisé ou s'il a un antécédent de colonisation par *Scedosporium*.

## CONCLUSION

L'étude MFIP est la 1<sup>ère</sup> étude organisée au niveau international pour déterminer l'épidémiologie fongique chez les patients atteints de mucoviscidose, et pour proposer des éléments de recommandation pour l'examen mycologique des expectorations dans la mucoviscidose.

La détection des champignons dans les expectorations des patients atteints de mucoviscidose est importante en raison de l'émergence de ces microorganismes dans les contextes (i) soit de colonisation chronique/infection, (ii) soit d'ABPA, (iii) ou de fongémie post-transplantation.

Nos résultats montrent que la colonisation fongique est significativement corrélée à l'âge des patients. *A. fumigatus* est de loin le champignon filamenteux le plus fréquemment isolé (34,5%) suivi par *S. apiospermum* (5,1%). Ils nous permettent de proposer un protocole général pour l'examen mycologique des expectorations dans la mucoviscidose. Ce protocole se base sur le prétraitement des échantillons avec un agent mucolytique et l'ensemencement d'au moins les 2 milieux permettant l'isolement de la majorité des espèces dont *Aspergillus* (le milieu Sabouraud (ou YPDA) incubé à 37°C, le milieu B+ incubé entre 25°C et 30°C), l'ajout d'un 3<sup>ème</sup> milieu est fortement recommandé en fonction de l'état clinique du patient : (i) Devant une dégradation de la fonction respiratoire en l'absence d'étiologie bactérienne, ajouter le milieu Sabouraud ou YPDA additionné de chloramphénicol et cycloheximide incubé à 37°C, (ii) Chez un patient colonisé chronique à *Exophiala sp.*, ajouter le milieu enrichi à l'érythritol incubé à des températures entre 25-30 °C, (iii) Chez un patient colonisé chronique à *Scedosporium sp.*, ajouter le milieu SSM incubé à 37°C .

Tous les milieux sont incubés pour une durée de 15 jours.

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. Fanconi G, Uehlinger E, Knauer C. Das Coeliakie-syndrom bei angeborener zystischer Pankreasfibromatose und Bronchiektasi. *Wien Med Wchnschr* 1936; 86:753-756. (Celiac syndrome with congenital cystic fibromatosis of the pancreas and bronchiectasis).
2. Andersen DH, Cystic fibrosis of the pancreas and its relation to celiac disease: a clinical and pathological study. *Am J Dis Child* 1938; 56:344-399.
3. DI SANT'AGNESE PA, DARLING RC, PERERA GA, SHEA E. Sweat electrolyte disturbances associated with childhood pancreatic disease. *Am J Med.* 1953 Dec;15(6):777-84.
4. Gibson LE, Cooke RE. A test for concentration of electrolytes in sweat in cystic fibrosis of the pancreas utilising pilocarpine electrophoresis. *Pediatrics* 1959; 23:545-549.
5. Rommens JM, Iannuzzi MC, Kerem B, Drumm ML, Melmer G, Dean M, et al. Identification of the cystic fibrosis gene: chromosome walking and jumping. *Science.* 1989 Sep 8;245(4922):1059-65.
6. Riordan JR, Rommens JM, Kerem B, Alon N, Rozmahel R, Grzelczak Z, et al. Identification of the cystic fibrosis gene: cloning and characterization of complementary DNA. *Science.* 1989 Sep 8;245(4922):1066-73.
7. Kerem B, Rommens JM, Buchanan JA, Markiewicz D, Cox TK, Chakravarti A, et al. Identification of the cystic fibrosis gene: genetic analysis. *Science.* 1989 Sep 8;245(4922):1073-80.
8. Cystic Fibrosis Foundation Patient Registry 2012 Annual Data Report Bethesda, Maryland.
9. Monaghan KG, Feldman GL. The risk of cystic fibrosis with prenatally detected echogenic bowel in an ethnically and racially diverse North American population. *Prenat Diagn.* 1999 Jul 1;19(7):604-9.
10. European Cystic Fibrosis Society Patient Registry Annual Data Report 2010. Denmark 2014.
11. Cystic fibrosis Australia, 15th Annual Report from the Australian Cystic Fibrosis Data Registry, Baulkham Hills NSW 2153.
12. Vaincre la Mucoviscidose I. Registre Français de la Mucoviscidose-Bilan des données 2008. Paris Fr. 2011.

13. Cant N, Pollock N, Ford RC. CFTR structure and cystic fibrosis. *Int J Biochem Cell Biol.* 2014 Jul;52:15–25.
14. [www.genet.sickkids.on.ca](http://www.genet.sickkids.on.ca) description des mutations du gène CFTR.
15. Vankeerberghen A, Cuppens H, Cassiman J-J. The cystic fibrosis transmembrane conductance regulator: an intriguing protein with pleiotropic functions. *J Cyst Fibros.* 2002 Mar;1(1):13–29.
16. Crawford I, Maloney PC, Zeitlin PL, Guggino WB, Hyde SC, Turley H, et al. Immunocytochemical localization of the cystic fibrosis gene product CFTR. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1991 Oct 15;88(20):9262–6.
17. Schwiebert EM, Benos DJ, Egan ME, Stutts MJ, Guggino WB. CFTR is a conductance regulator as well as a chloride channel. *Physiol Rev.* 1999;79(1):S145–66.
18. Chinet T, Blouquit S. [Genetics and cellular biology of cystic fibrosis]. *Rev Prat.* 2003 Jan 15;53(2):130–4.
19. Brian P O’Sullivan, Steven D Freedman, Cystic fibrosis rev, *Lancet* 2009; 373: 1891–904
20. Hubert D. Mucoviscidose. *EMC - Médecine.* 2005 Feb;2(1):34–41.
21. Durieu I, Nove Josserand R. La mucoviscidose en 2008. *Rev Médecine Interne.* 2008 Nov;29(11):901–7.
22. Hauser AR, Jain M, Bar-Meir M, McColley SA. Clinical Significance of Microbial Infection and Adaptation in Cystic Fibrosis. *Clin Microbiol Rev.* 2011 Jan 1;24(1):29–70.
23. Moran A, Brunzell C, Cohen RC, Katz M, Marshall BC, Onady G, et al. Clinical Care Guidelines for Cystic Fibrosis-Related Diabetes: A position statement of the American Diabetes Association and a clinical practice guideline of the Cystic Fibrosis Foundation, endorsed by the Pediatric Endocrine Society. *Diabetes Care.* 2010 Dec 1;33(12):2697–708.
24. Wilschanski M, Durie PR. Patterns of GI disease in adulthood associated with mutations in the CFTR gene. *Gut.* 2007 Aug;56(8):1153–63.
25. Dray X, Hubert D, Munk A, Moreau J, Marteau P, Manifestations digestives de la mucoviscidose de l'adulte, *Gastroenterol Clin Bio* 2005;29:1279-1285
26. Cuppens H, Cassiman J-J. CFTR mutations and polymorphisms in male infertility. *Int J Androl.* 2004;27(5):251–6.
27. Radpour R, Gourabi H, Dizaj AV, Holzgreve W, Zhong XY. Genetic Investigations of CFTR Mutations in Congenital Absence of Vas Deferens, Uterus, and Vagina as a Cause of Infertility. *J Androl.* 2008 Sep 10;29(5):506–13.
28. Rapport de dépistage néonatal systématique de la mucoviscidose en France, HAS janvier 2009.pdf.

29. Paterlini Bréchet P, Mouawia H, Saker A. Diagnostic prénatal non invasif de la mucoviscidose. *Arch Pédiatrie*. 2011 Jan;18(1):111–8.
30. Mouawia H, Saker A, Jais J-P, Benachi A, Bussièrès L, Lacour B, et al. Circulating trophoblastic cells provide genetic diagnosis in 63 fetuses at risk for cystic fibrosis or spinal muscular atrophy. *Reprod Biomed Online*. 2012 Nov;25(5):508–20.
31. Bilan d'activité 2012 Association française pour le dépistage et la prévention des handicaps de l'enfant.pdf.
32. Mucoviscidose Protocole national de diagnostic et de soins pour une maladie rare, HAS Novembre 2006.pdf
33. Quan JM, Tiddens HA, Sy JP, McKenzie SG, Montgomery MD, Robinson PJ, et al. A two-year randomized, placebo-controlled trial of dornase alfa in young patients with cystic fibrosis with mild lung function abnormalities. *J Pediatr*. 2001 Dec;139(6):813–20.
34. Elkins MR, Robinson M, Rose BR, Harbour C, Moriarty CP, Marks GB, et al. A controlled trial of long-term inhaled hypertonic saline in patients with cystic fibrosis. *N Engl J Med*. 2006 Jan 19;354(3):229–40.
35. Knutsen AP, Slavin RG. Allergic Bronchopulmonary Aspergillosis in Asthma and Cystic Fibrosis. *Clin Dev Immunol*. 2011;2011:1–13.
36. Borowitz D., Baker R.D., Stallings V., Consensus report on nutrition for pediatric patients with cystic fibrosis, *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* 35 (2002) 246-259.
37. Ramsey BW, Davies J, McElvaney NG, Tullis E, Bell SC, Dřevínek P, et al. A CFTR potentiator in patients with cystic fibrosis and the G551D mutation. *N Engl J Med*. 2011 Nov 3;365(18):1663–72.
38. Philippe B, Dromer C, Mornex J-F, Velly J-F, Stern M. Quand le pneumologue doit-il envisager la greffe pulmonaire pour un de ses patients ? : Critères d'inscription en liste d'attente : mucoviscidose, HTAP et maladies systémiques (sarcoidose, histiocytose langerhansienne, lymphangioleiomyomatose et connectivites). *Rev Mal Respir*. 2009 Apr;26(4):423–35.
39. Lackner M, Hoog GS de, Yang L, Moreno LF, Ahmed SA, Andreas F, et al. Proposed nomenclature for *Pseudallescheria*, *Scedosporium* and related genera. *Fungal Divers*. 2014 Jul 1;67(1):1–10.
40. Chotirmall SH, Al-Alawi M, Mirkovic B, Lavelle G, Logan PM, Greene CM, et al. Aspergillus-Associated Airway Disease, Inflammation, and the Innate Immune Response. *BioMed Res Int*. 2013;2013:1–14.
41. De Vrankrijker AMM, van der Ent CK, van Berkhout FT, Stellato RK, Willems RJL, Bonten MJM, et al. Aspergillus fumigatus colonization in cystic fibrosis: implications for lung function?: Aspergillus fumigatus colonization in cystic fibrosis. *Clin Microbiol Infect*. 2010 Dec;17: 1381–1386
42. Pihet M, Carrere J, Cimon B, Chabasse D, Delhaes L, Symoens F, et al. Occurrence and relevance of filamentous fungi in respiratory secretions of patients with cystic fibrosis –

- a review. *Med Mycol.* 2009 Jan;47(4):387–97.
43. Saunders R, Modha D, Claydon A, Gaillard E. 146 Chronic *Aspergillus fumigatus* colonisation of the cystic fibrosis airway is common and may be associated with a more rapid decline in lung function. *J Cyst Fibros.* 2011 Jun;10, Supplement 1:S37.
  44. Borman AM, Palmer MD, Delhaes L, Carrère J, Favennec L, Ranque S, et al. 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. *Med Mycol.* 2010 Nov;48(O1):S88–97.
  45. Masoud-Landgraf L, Badura A, Eber E, Feierl G, Marth E, Buzina W. Modified culture method detects a high diversity of fungal species in cystic fibrosis patients. *Med Mycol.* 2013 May 8;1–8.
  46. LiPuma JJ. The Changing Microbial Epidemiology in Cystic Fibrosis. *Clin Microbiol Rev.* 2010 Apr 1;23(2):299–323.
  47. Bakare N, Rickerts V, Bargon J, Just-Nübling G. Prevalence of *Aspergillus fumigatus* and other fungal species in the sputum of adult patients with cystic fibrosis. *Mycoses.* 2003;46(1-2):19–23.
  48. Liu JC, Modha DE, Gaillard EA. What is the clinical significance of filamentous fungi positive sputum cultures in patients with cystic fibrosis? *J Cyst Fibros.* 2013 May;12(3):187–93.
  49. Horré R, Symoens F, Delhaes L, Bouchara J-P. Fungal respiratory infections in cystic fibrosis: a growing problem. *Med Mycol.* 2010 Nov;48(O1):S1–3.
  50. Horré R, Marklein G, Siekmeier R, Reiffert S-M. Detection of hyphomycetes in the upper respiratory tract of patients with cystic fibrosis. *Mycoses.* 2011 Nov 1;54(6):514–22.
  51. Sudfeld CR, Dasenbrook EC, Merz WG, Carroll KC, Boyle MP. Prevalence and risk factors for recovery of filamentous fungi in individuals with cystic fibrosis. *J Cyst Fibros.* 2010 Mar;9(2):110–6.
  52. Nielsen SM, Kristensen L, Søndergaard A, Handberg KJ, Stenderup J, Nørskov-Lauritsen N. Increased prevalence and altered species composition of filamentous fungi in respiratory specimens from cystic fibrosis patients. *APMIS.* 2014 Apr;n/a – n/a.
  53. Mortensen KL, Jensen RH, Johansen HK, Skov M, Pressler T, Howard SJ, et al. *Aspergillus* Species and Other Molds in Respiratory Samples from Patients with Cystic Fibrosis: a Laboratory-Based Study with Focus on *Aspergillus fumigatus* Azole Resistance. *J Clin Microbiol.* 2011 Jun 1;49(6):2243–51.
  54. Valenza G, Tappe D, Turnwald D, Frosch M, König C, Hebestreit H, et al. Prevalence and antimicrobial susceptibility of microorganisms isolated from sputa of patients with cystic fibrosis. *J Cyst Fibros.* 2008 Mar;7(2):123–7.
  55. Güngör Ö, Tamay Z, Güler N, Erturan Z. Frequency of fungi in respiratory samples from Turkish cystic fibrosis patients: Fungi in cystic fibrosis. *Mycoses.* 2013 Mar;56(2):123–9.

56. Paugam A, Baixench M-T, Demazes-Dufeu N, Burgel P-R, Sauter E, Kanaan R, et al. Characteristics and consequences of airway colonization by filamentous fungi in 201 adult patients with cystic fibrosis in France. *Med Mycol*. 2010 Nov;48(O1):S32–6.
57. Nagano Y, Elborn JS, Millar BC, Walker JM, Goldsmith CE, Rendall J, et al. Comparison of techniques to examine the diversity of fungi in adult patients with cystic fibrosis. *Med Mycol*. 2010 Feb;48(1):166–76.
58. Fischer J, van Koningsbruggen-Rietschel S, Rietschel E, Vehreschild MJGT, Wisplinghoff H, Kronke M, et al. Prevalence and molecular characterization of azole resistance in *Aspergillus* spp. isolates from German cystic fibrosis patients. *J Antimicrob Chemother* [Internet]. 2014 Jan 31 [cited 2014 Apr 20]; Available from: <http://www.jac.oxfordjournals.org/cgi/doi/10.1093/jac/dku009>
59. Kondori N, Lindblad A, Welinder-Olsson C, Wennerås C, Gilljam M. Development of IgG antibodies to *Exophiala dermatitidis* is associated with inflammatory responses in patients with cystic fibrosis. *J Cyst Fibros Off J Eur Cyst Fibros Soc*. 2014 Jan 14;
60. Balloy V, Chignard M. The innate immune response to *Aspergillus fumigatus*. *Microbes Infect*. 2009 Oct;11(12):919–27.
61. Brennan S. Innate immune activation and cystic fibrosis. *Paediatr Respir Rev*. 2008 Dec;9(4):271–9; quiz 279–80.
62. McCormick A, Loeffler J, Ebel F. *Aspergillus fumigatus*: contours of an opportunistic human pathogen. *Cell Microbiol*. 2010 Nov 1;12(11):1535–43.
63. Latgé J-P. The pathobiology of *Aspergillus fumigatus*. *Trends Microbiol*. 2001;9(8):382–9.
64. Chotirmall SH, McElvaney NG. Fungi in the cystic fibrosis lung: bystanders or pathogens? *Int J Biochem Cell Biol*. 2014 Jul;52:161–73.
65. De Valk HA, Klaassen CHW, Yntema J-B, Hebestreit A, Seidler M, Haase G, et al. Molecular typing and colonization patterns of *Aspergillus fumigatus* in patients with cystic fibrosis. *J Cyst Fibros*. 2009 Mar;8(2):110–4.
66. Cimon B, Symoens F, Zouhair R, Chabasse D, Nolard N, Defontaine A, et al. Molecular epidemiology of airway colonisation by *Aspergillus fumigatus* in cystic fibrosis patients. *J Med Microbiol*. 2001;50(4):367–74.
67. Knutsen AP. Immunopathology and Immunogenetics of Allergic Bronchopulmonary Aspergillosis. *J Allergy*. 2011;2011:1–9.
68. Tillie-Leblond I, le Rouzic O, Cortot A. Aspergillose bronchopulmonaire allergique. *Rev Fr Allergol*. 2012 Apr;52(3):134–7.
69. Armstead J, Morris J, Denning DW. Multi-Country Estimate of Different Manifestations of Aspergillosis in Cystic Fibrosis. Hartl D, editor. *PLoS ONE*. 2014 Jun 10;9(6):e98502.
70. Agarwal R, Chakrabarti A, Shah A, Gupta D, Meis JF, Guleria R, et al. Allergic bronchopulmonary aspergillosis: review of literature and proposal of new diagnostic

- and classification criteria. *Clin Exp Allergy*. 2013 Aug;43(8):850–73.
71. Stevens DA, Moss RB, Kurup VP, Knutsen AP, Greenberger P, Judson MA, et al. Allergic Bronchopulmonary Aspergillosis in Cystic Fibrosis—State of the Art: Cystic Fibrosis Foundation Consensus Conference. *Clin Infect Dis*. 2003 Oct;37(s3):S225–64.
  72. Baxter CG, Dunn G, Jones AM, Webb K, Gore R, Richardson MD, et al. Novel immunologic classification of aspergillosis in adult cystic fibrosis. *J Allergy Clin Immunol*. 2013 Sep;132(3):560–6.e10.
  73. Patterson R, Greenberger PA, Radin RC, Roberts M. Allergic bronchopulmonary aspergillosis: staging as an aid to management. *Ann Intern Med*. 1982 Mar;96(3):286–91.
  74. Philippe B, Germaud P. [Aspergillus in the immunocompetent patient. Towards a new classification?]. *Rev Mal Respir*. 2005 Nov;22(5 Pt 1):711–4.
  75. Shoseyov D, Brownlee KG, Conway SP, Kerem E. ASpergillus bronchitis in cystic fibrosis\*. *Chest*. 2006 Jul 1;130(1):222–6.
  76. Luong M-L, Chaparro C, Stephenson A, Rotstein C, Singer LG, Waters V, et al. Pretransplant Aspergillus Colonization of Cystic Fibrosis Patients and the Incidence of Post-Lung Transplant Invasive Aspergillosis: *Transplant J*. 2014 Feb;97(3):351–7.
  77. Kousha M, Tadi R, Soubani AO. Pulmonary aspergillosis: a clinical review. *Eur Respir Rev*. 2011 Sep 1;20(121):156–74.
  78. Pauw BD, Walsh TJ, Donnelly JP, Stevens DA, Edwards JE, Calandra T, et al. Revised Definitions of Invasive Fungal Disease from the European Organization for Research and Treatment of Cancer/Invasive Fungal Infections Cooperative Group and the National Institute of Allergy and Infectious Diseases Mycoses Study Group (EORTC/MSG) Consensus Group. *Clin Infect Dis*. 2008 Jun 15;46(12):1813–21.
  79. Gangneux JP, Camus C, Philippe B. Épidémiologie et facteurs de risque de l'aspergillose invasive du sujet non neutropénique. *Rev Mal Respir*. 2008 Feb;25(2):257.
  80. Geftter WB. The spectrum of pulmonary aspergillosis. *J Thorac Imaging* 1992; 7: 56–74.
  81. Zmeili OS, Soubani AO. Pulmonary aspergillosis: a clinical update. *QJM*. 2007 Jun 1;100(6):317–34.
  82. Giron J, Poey C, Fajadet P, Sans N, Fourcade D, Senac JP, et al. CT-guided percutaneous treatment of inoperable pulmonary aspergillomas: a study of 40 cases. *Eur J Radiol*. 1998 Oct;28(3):235–42.
  83. Lackner M, de Hoog GS. *Parascedosporium* and its relatives: phylogeny and ecological trends. *IMA Fungus*. 2011 Jun;2(1):39–48.
  84. Cortez KJ, Roilides E, Quiroz-Telles F, Meletiadiis J, Antachopoulos C, Knudsen T, et al. Infections Caused by *Scedosporium* spp. *Clin Microbiol Rev*. 2008 Jan;21(1):157–97.

85. Gilgado F, Cano J, Gené J, Guarro J. Molecular phylogeny of the *Pseudallescheria boydii* species complex: proposal of two new species. *J Clin Microbiol.* 2005 Oct;43(10):4930–42.
86. Gilgado F, Cano J, Gené J, Sutton DA, Guarro J. Molecular and Phenotypic Data Supporting Distinct Species Statuses for *Scedosporium apiospermum* and *Pseudallescheria boydii* and the Proposed New Species *Scedosporium dehoogii*. *J Clin Microbiol.* 2008 Feb 1;46(2):766–71.
87. Zouhair R, Rougeron A, Razafimandimby B, Kobi A, Bouchara J-P, Giraud S. Distribution of the different species of the *Pseudallescheria boydii/Scedosporium apiospermum* complex in French patients with cystic fibrosis. *Med Mycol.* 2013 Aug;51(6):603–13.
88. Cimon B, Carrère J, Vinatier JF, Chazalette JP, Chabasse D, Bouchara JP. Clinical Significance of *Scedosporium apiospermum* in Patients with Cystic Fibrosis. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2000 Feb 1;19(1):53–6.
89. Manso E, Cariani L, Fiscarelli E, Ravenni N, Iula VD, De Intinis G, Busetti M, Rapagnani S, Borio T (2011) Isolation of filamentous fungi in the sputum of cystic fibrosis patient sin Italy: state of the art and epidemiology. Second Meeting of the ECMM/ISHAM Working Group Fungal respiratory infections in Cystic Fibrosis. Angers, France.
90. Horré R, Marklein G, Siekmeier R, Nidermajer S, Reiffert SM. Selective Isolation of *Pseudallescheria* and *Scedosporium* Species from Respiratory tract Specimens of Cystic Fibrosis Patients. *Respiration.* 2009;77(3):320–4.
91. Blyth CC, Harun A, Middleton PG, Sleiman S, Lee O, Sorrell TC, et al. Detection of Occult *Scedosporium* Species in Respiratory Tract Specimens from Patients with Cystic Fibrosis by Use of Selective Media. *J Clin Microbiol.* 2010 Jan 1;48(1):314–6.
92. Borghi E, Iatta R, Manca A, Montagna MT, Morace G. Chronic airway colonization by *Scedosporium apiospermum* with a fatal outcome in a patient with cystic fibrosis. *Med Mycol.* 2010 Nov;48(O1):S108–13.
93. Guarro J, Kantarcioglu AS, Horré R, Rodriguez-Tudela JL, Cuenca Estrella M, Berenguer J, et al. *Scedosporium apiospermum*: changing clinical spectrum of a therapy-refractory opportunist. *Med Mycol.* 2006 Jun;44(4):295–327.
94. D M, I.r S. A new species of *Scedosporium* associated with osteomyelitis in humans [*Scedosporium inglatum*, isolated from a bone biopsy]. *Mycotaxon* [Internet]. 1984 [cited 2014 Aug 7]; Available from: <http://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=US19850078587>
95. Rodriguez-Tudela JL, Berenguer J, Guarro J, Kantarcioglu AS, Horre R, de Hoog GS, et al. Epidemiology and outcome of *Scedosporium prolificans* infection, a review of 162 cases. *Med Mycol.* 2009 Jun;47(4):359–70.
96. Lackner M, Hoog GS de, Verweij PE, Najafzadeh MJ, Curfs-Breuker I, Klaassen CH, et al. Species-Specific Antifungal Susceptibility Patterns of *Scedosporium* and *Pseudallescheria* Species. *Antimicrob Agents Chemother.* 2012 May 1;56(5):2635–42.

97. Tintelnot K, Just-Nübling G, Horré R, Graf B, Sobottka I, Seibold M, et al. A review of German *Scedosporium prolificans* cases from 1993 to 2007. *Med Mycol.* 2009 Jun;47(4):351–8.
98. Hohl, P. E., H. P. Holley, Jr., E. Prevost, L. Ajello, and A. A. Padhye. 1983. Infections due to *Wangiella dermatitidis* in humans: report of the first documented case from the United States and a review of the literature. *Rev Infect Dis.* 5:854–64.
99. Zalar P, Novak M, de Hoog GS, Gunde-Cimerman N. Dishwashers – A man-made ecological niche accommodating human opportunistic fungal pathogens. *Fungal Biol.* 2011 Oct;115(10):997–1007.
100. Hamada N, Abe N. Comparison of fungi found in bathrooms and sinks. *Biocontrol Sci.* 2010 Jun;15(2):51–6.
101. Packeu A, Lebecque P, Rodriguez-Villalobos H, Boeras A, Hendrickx M, Bouchara J-P, et al. Molecular typing and antifungal susceptibility of *Exophiala* isolates from patients with cystic fibrosis. *J Med Microbiol.* 2012 Sep 1;61(Pt\_9):1226–33.
102. Dong S K, Young M Y, Sang W K. Phaeohyphomycosis due to *exophiala dermatitis* successfully treated with itraconazole. *Kor J Med Mycol* 4(1), 1999
103. Benaoudia F, Assouline M, Pouliquen Y, Bouvet A, Guého E. *Exophiala* (*Wangiella*) *dermatitidis* keratitis after keratoplasty. *Med Mycol.* 1999 Feb;37(1):53–6.
104. Kerkmann ML, Piontek K, Mitze H, Haase G. Isolation of *Exophiala* (*Wangiella*) *dermatitidis* in a case of otitis externa. *Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am.* 1999 Oct;29(4):939–40.
105. Haase G, Skopnik H, Kusenbach G. *Exophiala dermatitidis* infection in cystic fibrosis. *Lancet.* 1990 Jul 21;336(8708):188–9.
106. Kusenbach G, Skopnik H, Haase G, Friedrichs F, Döhmen H. *Exophiala dermatitidis* pneumonia in cystic fibrosis. *Eur J Pediatr.* 1992 May 1;151(5):344–6.
107. Diemert D, Kunimoto D, Sand C, Rennie R. Sputum isolation of *Wangiella dermatitidis* in patients with cystic fibrosis. *Scand J Infect Dis.* 2001;33(10):777–9.
108. Lebecque P, Leonard A, Huang D, Reychler G, Boeras A, Leal T, et al. *Exophiala* (*Wangiella*) *dermatitidis* and cystic fibrosis - Prevalence and risk factors. *Med Mycol.* 2010 Nov;48 Suppl 1:S4–9.
109. Kondori N, Gilljam M, Lindblad A, Jonsson B, Moore ERB, Wenneras C. High Rate of *Exophiala dermatitidis* Recovery in the Airways of Patients with Cystic Fibrosis Is Associated with Pancreatic Insufficiency. *J Clin Microbiol.* 2011 Mar 1;49(3):1004–9.
110. Horré R, Schaal KP, Siekmeier R, Sterzik B, de Hoog GS, Schnitzler N. Isolation of Fungi, Especially *Exophiala dermatitidis*, in Patients Suffering from Cystic Fibrosis. *Respiration.* 2004;71(4):360–6.
111. Giraud S, Pihet M, Razafimandimby B, Carrere J, Degand N, Mely L, et al. *Geosmithia argillacea*: an Emerging Pathogen in Patients with Cystic Fibrosis. *J Clin Microbiol.* 2010 Jul 1;48(7):2381–6.

112. Marguet C, Favennec L, Matray O, Bertout S, Giraud S, Couderc L, et al. Clinical and microbiological efficacy of micafungin on *Geosmithia argillacea* infection in a cystic fibrosis patient. *Med Mycol Case Rep.* 2012 Jan;1(1):79–81.
113. Barton RC, Borman AM, Johnson EM, Houbraken J, Hobson RP, Denton M, et al. Isolation of the fungus *Geosmithia argillacea* in sputum of people with cystic fibrosis. *J Clin Microbiol.* 2010 Jul;48(7):2615–7.
114. Labbé F, Babchia S, Evreux F, Chenal P. Isolement de *Geosmithia argillacea* chez un enfant atteint de mucoviscidose. *J Mycol Médicale J Med Mycol.* 2013 Sep;23(3):176–8.
115. Cimon B, Challier S, Béguin H, Carrère J, Chabasse D, Bouchara J-P. Airway Colonization by *Acrophialophora fuispora* in Patients with Cystic Fibrosis. *J Clin Microbiol.* 2005 Mar 1;43(3):1484–7.
116. Welsh RD, Ely RW. *Scopulariopsis chartarum* systemic mycosis in a dog. *J Clin Microbiol.* 1999 Jun;37(6):2102–3.
117. Chotirmall SH, Greene CM, McElvaney NG. *Candida* species in cystic fibrosis: A road less travelled. *Med Mycol.* 2010 Nov;48(O1):S114–24.
118. Reihill JA, Moore JE, Elborn JS, Ennis M. Effect of *Aspergillus fumigatus* and *Candida albicans* on pro-inflammatory response in cystic fibrosis epithelium. *J Cyst Fibros.* 2011 Dec;10(6):401–6.
119. Chotirmall SH. Sputum *Candida albicans* Presages FEV 1 Decline and Hospital-Treated Exacerbations in Cystic Fibrosis. *CHEST J.* 2010 Nov 1;138(5):1186.
120. King AD, Hocking AD, Pitt JI. Dichloran-rose bengal medium for enumeration and isolation of molds from foods. *Appl Environ Microbiol.* 1979;37(5):959–64.
121. Rainer J, Kaltseis J, de Hoog SG, Summerbell RC. Efficacy of a selective isolation procedure for members of the *Pseudallescheria boydii* complex. *Antonie Van Leeuwenhoek.* 2008 Mar;93(3):315–22.
122. Nagano Y, Millar BC, Goldsmith CE, Walker JM, Elborn JS, Rendall J, et al. Development of selective media for the isolation of yeasts and filamentous fungi from the sputum of adult patients with cystic fibrosis (CF). *J Cyst Fibros.* 2008 Nov;7(6):566–72.
123. Kerr J. Inhibition of fungal growth by *Pseudomonas aeruginosa* and *Pseudomonas cepacia* isolated from patients with cystic fibrosis. *J Infect.* 1994 May;28(3):305–10.
124. De Hoog GS, Haase G. Nutritional physiology and selective isolation of *Exophiala dermatitidis*. *Antonie Van Leeuwenhoek.* 1993;64(1):17–26.
125. Parasitoses et mycose des régions tempérées et tropicales, ANOFEL, 3ème édition 2014, pages 275-290-295.
126. Bioforma, Les moisissures d'intérêt médical. Cahier de formation n°25, Mars 2002.
127. Identification des champignons d'importance médicale, stage de laboratoire Philippe

- Dufresne, Institut national de santé publique Québec, Mars 2014
128. Favero-Longo SE, Sandrone S, Matteucci E, Appolonia L, Piervittori R. Spores of lichen-forming fungi in the myco-aerosol and their relationships with climate factors. *Sci Total Environ*. 2014 Jan 1;466-467:26–33.
  129. Gümral R, Tümgör A, Saraçlı MA, Yıldırım ŞT, Ilkit M, de Hoog GS. Black Yeast Diversity on Creosoted Railway Sleepers Changes with Ambient Climatic Conditions. *Microb Ecol* [Internet]. 2014 Jul 16 [cited 2014 Oct 10]; Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s00248-014-0459-5>
  130. Panackal AA, Li H, Kontoyiannis DP, Mori M, Perego CA, Boeckh M, et al. Geoclimatic influences on invasive aspergillosis after hematopoietic stem cell transplantation. *Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am*. 2010 Jun 15;50(12):1588–97.
  131. Lin W-H, Li C-S. Associations of Fungal Aerosols, Air Pollutants, and Meteorological Factors. *Aerosol Sci Technol*. 2000 Apr;32(4):359–68.
  132. Shinn EA, Griffin DW, Seba DB. Atmospheric transport of mold spores in clouds of desert dust. *Arch Environ Health*. 2003;58(8):498–504.
  133. PEŠIĆ-MIKULEC D, Stojanović L, Jovanović L. Moulds associated with milk depending on Macroclimate and geographical location. *Appl Ecol Environ Res*. 2005;3(2):61–5.
  134. Ren CL, Pasta DJ, Rasouliyan L, Wagener JS, Konstan MW, Morgan WJ. Relationship between Inhaled Corticosteroid Therapy and Rate of Lung Function Decline in Children with Cystic Fibrosis. *J Pediatr*. 2008 Dec;153(6):746–51.e2.
  135. Cimon B, Carrere J, Chazalotte JP, Ginies JL, Six P, Vinatier JF, et al. Fungal colonization and immune response to fungi in cystic fibrosis. *J Mycol Médicale*. 1995;5(4):211–6.
  136. Jones AM, Harrison RM. The effects of meteorological factors on atmospheric bioaerosol concentrations—a review. *Sci Total Environ*. 2004 Jun;326(1-3):151–80.
  137. Horré R, Symoens F, Delhaes L, Bouchara J-P. Fungal respiratory infections in cystic fibrosis: a growing problem. *Med Mycol*. 2010 Nov;48(O1):S1–3.
  138. Hedayati MT, Pasqualotto AC, Warn PA, Bowyer P, Denning DW. *Aspergillus flavus*: human pathogen, allergen and mycotoxin producer. *Microbiology*. 2007 Jun 1;153(6):1677–92.
  139. Ct en Finlande S. DliS NOUVELLES. *Am J Phys Anthr*. 1989;80:267–94.
  140. European working group of CF genetics. Gradient of distribution in Europe of the major CF mutation and of its associated haplotype. *Hum Genet* 1990 ; 85 : 436-41
  141. Bobadilla JL, Macek M, Fine JP, Farrell PM. Cystic fibrosis: A worldwide analysis of CFTR mutations? correlation with incidence data and application to screening. *Hum Mutat*. 2002 Jun;19(6):575–606.

142. Estivill X, Bancells C, Ramos C, and the Biomed CF Mutation Analysis Consortium Geographic: Distribution and Regional Origin of 272 Cystic Fibrosis Mutations in European Populations, *Human mutation* (1997) 10:135–154.
143. Hirschi S, Letscher-Bru V, Pottecher J, Lannes B, Jeung MY, Degot T, et al. Disseminated *Trichosporon mycotoxinivorans*, *Aspergillus fumigatus*, and *Scedosporium apiospermum* coinfection after lung and liver transplantation in a cystic fibrosis patient. *J Clin Microbiol.* 2012 Dec;50(12):4168–70.
144. Matos T, de Hoog GS, de Boer AG, de Crom I, Haase G. High prevalence of the neurotropic *Exophiala dermatitidis* and related oligotrophic black yeasts in sauna facilities. *Mycoses.* 2002 Nov;45(9-10):373–7.
145. Nishimura K, Miyaji M. Studies on a saprophyte of *Exophiala dermatitidis* isolated from a humidifier. *Mycopathologia.* 1982 Mar 19;77(3):173–81.
146. Cimon, B., J. Carrere, J. P. Chazalotte, J. F. Vinatier, D. Chabasse, and J. P. Bouchara. 1999. Chronic airway colonization by *Penicillium emersonii* in a patient with cystic fibrosis. *Med. Mycol.* 37:291–293.
147. Valentin T, Neumeister P, Pichler M, Rohn A, Koidl C, Haas D, et al. Disseminated *Geosmithia argillacea* infection in a patient with gastrointestinal GvHD. *Bone Marrow Transplantation* 2012; 47: 734–6.
148. Muthig M, Hebestreit A, Ziegler U, Seidler M, Müller F-MC. Persistence of *Candida* species in the respiratory tract of cystic fibrosis patients. *Med Mycol.* 2010 Feb;48(1):56–63.
149. Kerr JR, Taylor GW, Rutman A, Høiby N, Cole PJ, Wilson R. *Pseudomonas aeruginosa* pyocyanin and 1-hydroxyphenazine inhibit fungal growth. *J Clin Pathol.* 1999 May;52(5):385–7.
150. Pashley CH, Fairs A, Morley JP, Taylor S, Agbetile J, Bafadhel M, et al. Routine processing procedures for isolating filamentous fungi from respiratory sputum samples may underestimate fungal prevalence. *Med Mycol.* 2012 May;50(4):433–8.

## ANNEXES

### Annexe 1 : Feuille de paillasse MFIP

**MFIP-MucoBac-Myco ; L Delhaes 2013-2015**

**Bilan Mycologique d'Expectoration**

Identité du patient :

**N° du patient :** |\_\_| - |\_\_|

**Examen direct :**    **Positif :**

**Négatif**   

**Préciser :**  éléments lévuriformes

filaments mycéliens ou pseudomycélium

<b>Milieu de culture en boîte de Pétri</b>	<i>Température d'incubation</i>	<p>Conservation : 15 jours avec au minimum 2 examens / semaine</p> <p><u>Date de mise en culture:</u> (jj/mm/aaaa)  __ __ ____ </p>
1. Milieu chromogène	<b>37°C</b>	<p>Culture positive <input type="checkbox"/>    <b>1<sup>er</sup> jour de positivité :</b> .....    Culture négative <input type="checkbox"/></p> <p>Nom(s) des espèces identifiées :</p> <p>1. .... Nbre de colonies à <b>J8</b> - + ++ +++ à <b>J15</b> - + ++ +++</p> <p>2. .... Nbre de colonies à <b>J8</b> - + ++ +++ à <b>J15</b> - + ++ +++</p> <p>3. .... Nbre de colonies à <b>J8</b> - + ++ +++ à <b>J15</b> - + ++ +++</p> <p>4. .... Nbre de colonies à <b>J8</b> - + ++ +++ à <b>J15</b> - + ++ +++</p> <p>5. .... Nbre de colonies à <b>J8</b> - + ++ +++ à <b>J15</b> - + ++ +++</p>
2. Sabouraud (ou YPDA)	<b>37°C</b>	<p>Culture positive <input type="checkbox"/>    <b>1<sup>er</sup> jour de positivité :</b> .....    Culture négative <input type="checkbox"/></p> <p>Nom(s) des espèces identifiées :</p> <p>1. .... Nbre de colonies à <b>J8</b> - + ++ +++ à <b>J15</b> - + ++ +++</p> <p>2. .... Nbre de colonies à <b>J8</b> - + ++ +++ à <b>J15</b> - + ++ +++</p> <p>3. .... Nbre de colonies à <b>J8</b> - + ++ +++ à <b>J15</b> - + ++ +++</p> <p>4. .... Nbre de colonies à <b>J8</b> - + ++ +++ à <b>J15</b> - + ++ +++</p> <p>5. .... Nbre de colonies à <b>J8</b> - + ++ +++ à <b>J15</b> - + ++ +++</p>

3. DRBC + Bénomyl + chloramphénicol <b>DRDC-BEN</b>	37°C	Culture positive <input type="checkbox"/> 1 <sup>er</sup> jour de positivité : ..... Culture négative <input type="checkbox"/>  Nom(s) des espèces identifiées : 1. .... Nbre de colonies à J8 - + ++ +++ à J15 - + ++ +++ 2. .... Nbre de colonies à J8 - + ++ +++ à J15 - + ++ +++ 3. .... Nbre de colonies à J8 - + ++ +++ à J15 - + ++ +++ 4. .... Nbre de colonies à J8 - + ++ +++ à J15 - + ++ +++ 5. .... Nbre de colonies à J8 - + ++ +++ à J15 - + ++ +++
4 Sce- Sel+ medium <b>SCE-SEL</b>	37°C	Culture positive <input type="checkbox"/> 1 <sup>er</sup> jour de positivité : ..... Culture négative <input type="checkbox"/>  Nom(s) des espèces identifiées : 1. .... Nbre de colonies à J8 - + ++ +++ à J15 - + ++ +++ 2. .... Nbre de colonies à J8 - + ++ +++ à J15 - + ++ +++ 3. .... Nbre de colonies à J8 - + ++ +++ à J15 - + ++ +++ 4. .... Nbre de colonies à J8 - + ++ +++ à J15 - + ++ +++ 5. .... Nbre de colonies à J8 - + ++ +++ à J15 - + ++ +++
6. B+ medium <b>B-MED</b>	37°C	Culture positive <input type="checkbox"/> 1 <sup>er</sup> jour de positivité : ..... Culture négative <input type="checkbox"/>  Nom(s) des espèces identifiées : 1. .... Nbre de colonies à J8 - + ++ +++ à J15 - + ++ +++ 2. .... Nbre de colonies à J8 - + ++ +++ à J15 - + ++ +++ 3. .... Nbre de colonies à J8 - + ++ +++ à J15 - + ++ +++ 4. .... Nbre de colonies à J8 - + ++ +++ à J15 - + ++ +++ 5. .... Nbre de colonies à J8 - + ++ +++ à J15 - + ++ +++
7. Gélose à l'érythritol + chloramphénicol <b>ERYTHROL</b>	<30°C	Culture positive <input type="checkbox"/> 1 <sup>er</sup> jour de positivité : ..... Culture négative <input type="checkbox"/>  Nom(s) des espèces identifiées : 1. .... Nbre de colonies à J8 - + ++ +++ à J15 - + ++ +++ 2. .... Nbre de colonies à J8 - + ++ +++ à J15 - + ++ +++ 3. .... Nbre de colonies à J8 - + ++ +++ à J15 - + ++ +++ 4. .... Nbre de colonies à J8 - + ++ +++ à J15 - + ++ +++ 5. .... Nbre de colonies à J8 - + ++ +++ à J15 - + ++ +++
8. Sabouraud + chloramphé nicol + cycloheximi de YEAST	<30°C	Culture positive <input type="checkbox"/> 1 <sup>er</sup> jour de positivité : ..... Culture négative <input type="checkbox"/>  Nom(s) des espèces identifiées : 1. .... Nbre de colonies à J8 - + ++ +++ à J15 - + ++ +++ 2. .... Nbre de colonies à J8 - + ++ +++ à J15 - + ++ +++ 3. .... Nbre de colonies à J8 - + ++ +++ à J15 - + ++ +++ 4. .... Nbre de colonies à J8 - + ++ +++ à J15 - + ++ +++ 5. .... Nbre de colonies à J8 - + ++ +++ à J15 - + ++ +++
8. DILUTION 1 :10 Sabouraud (ou YPDA)	37°C	Culture positive <input type="checkbox"/> 1 <sup>er</sup> jour de positivité : ..... Culture négative <input type="checkbox"/>  Nom(s) des espèces identifiées : 1. .... Nbre de colonies à J8 - + ++ +++ à J15 - + ++ +++ 2. .... Nbre de colonies à J8 - + ++ +++ à J15 - + ++ +++ 3. .... Nbre de colonies à J8 - + ++ +++ à J15 - + ++ +++ 4. .... Nbre de colonies à J8 - + ++ +++ à J15 - + ++

		+++ 5. .... Nbre de colonies à J8 - + ++ +++ à J15 - + ++ +++
--	--	--

**AU TOTAL :** 1. ATF-gramme  ITS  Mycothèque (N°)  (... ..)

Espèces identifiées : 2    (... ..)

3.    (... ..)

4.    (... ..)

5.    (... ..)

**Commentaires /remarques sur les cultures :**

**Rappel de l'échelle semi-quantitative (entourer l'estimation pour chaque espèce à J8 et J15) :**

- 1) 0 = Pas de colonies de micromycètes
- 2) + = Quelques colonies de micromycètes (1 à 10 colonies)
- 1) ++ = Colonies de micromycètes semi-confluentes (10 à 50 colonies)
- 1) +++ = Colonies de micromycètes confluentes (> 50 colonies).

## Annexe 2 : Abstract de la communication orale de 8<sup>ème</sup> Colloque européen des jeunes chercheurs travaillant sur la mucoviscidose, Paris 19-21 février 2014

**Evaluation of the risk of fungal infection in patients with cystic fibrosis: an international prospective study comparing the performances of mycological culture media, the MucoFong International Project-MFIP**

K. Touati, L. Delhaes

Mycology-Parasitology Laboratory Faculté de Médecine, Univ Nord de France (UDSL), CHRU de Lille, France

Cystic fibrosis (CF) is the most common hereditary lung disease in the Caucasian population. Prognostic of CF depends essentially on the lung impairments. In the lung, pathology is characterized by inflammation and airway obstruction, and recurrent or chronic infections with several bacterial. we observed emergence of fungi colonization in CF respiratory tract. Among filamentous fungi, *Aspergillus fumigatus* is the most common, but other species are reported increasingly, such as *Scedosporium apiospermum*, *Aspergillus terreus*, *Exophiala dermatitidis* and *Scedosporium prolificans*. Fungal prevalence rates from studies in CF patients vary widely, the aim of our study was firstly to improve our knowledge on the epidemiology of the colonization of the airways by filamentous fungi in patients with CF, secondly to compare and evaluate the different media used in mycological culture in order to propose a standardized protocol.

We conducted an international prospective study until April to September 2013, included a large CF population. We used conventional and selective media. All the media prepared in Angers and Lille and sent to the different laboratories involved in mfip study. Each mycological laboratory will use the same protocol to plate CF sputum, with respect of the patient anonymous.

Expected results: About 500 to 700 sputa might be included and analyzed during a short period of 3 months from November 2013 to January 2014 with the objective to get an exhaustive analysis of fungal prevalence in sputa from CF patients.

In conclusion, this concerted effort towards defining the optimal method for the mycological analysis of the fungal component of CF microbiology is becoming a major requirement, not only to analyze the role of some "rarer" filamentous species in CF exacerbation or the existence of geographic variations in the fungal species that colonize CF patients, but also to be able to study the complexity of CF lung microbial ecology as well as its dynamics.

---

Contact: Kada Touati  
Kada.touati@yahoo.fr

---



LIGA ITALIANA FIBROSI CISTICA - ONLUS  
www.fibrosicistica.it



**Cystic  
Fibrosis**

## Annexe 3: Abstract de communication orale du congrès français de la mycologie médicale Reims 22-23 mai 2014

112

Compte rendu de congrès/Proceeding of congress

[2] Cavailles. et al. PLOS Pathogens 2014.

[3] Rehaume. et al. Trends Immunol 2010.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.mycmed.2014.06.007>

7

### Evaluation of the risk of fungal colonization/infection in patients with cystic fibrosis: An international prospective study comparing the performance of media for mycological culturing MucoFong International Project (MFIP)

K. Touati<sup>a</sup>, C.O. Faure<sup>b</sup>, M. Comet<sup>b</sup>, F. Botterel<sup>c</sup>, E. Dannaoui<sup>d</sup>, F. Morio<sup>e</sup>, P. Lepape<sup>f</sup>, F. Grenouillet<sup>g</sup>, L. Favennec<sup>h</sup>, S. Le Gal<sup>h</sup>, G. Nevez<sup>h</sup>, A. Borman<sup>i</sup>, V. Saegeman<sup>j</sup>, K. Lagrou<sup>j</sup>, E. Gomez<sup>k</sup>, M. Caro-Luis<sup>k</sup>, R. Canton<sup>k</sup>, S. Campana<sup>l</sup>, W. Buzina<sup>m</sup>, S. Chen<sup>n</sup>, W. Meyer<sup>n</sup>, E. Roilides<sup>o</sup>, M. Simitsopoulou<sup>o</sup>, E. Manso<sup>p</sup>, L. Cariani<sup>q</sup>, A. Biffi<sup>q</sup>, E. Fiscarelli<sup>r</sup>, G. Ricciuti<sup>r</sup>, B. Sendid<sup>s</sup>, M. Pihet<sup>s</sup>, J.-P. Bouchara<sup>s</sup>, L. Delhaes<sup>s</sup>

<sup>a</sup> CHU Lille, service de parasitologie-mycologie, université Lille 2 Lille, France

<sup>b</sup> University of Grenoble, Grenoble, France

<sup>c</sup> University of Paris 12, Paris, France

<sup>d</sup> University of Paris 5, Paris, France

<sup>e</sup> University of Nantes, Nantes, France

<sup>f</sup> Besançon University Hospital, Besançon, France

<sup>g</sup> University of Rouen, Rouen, France

<sup>h</sup> University of Brest, Brest, France

<sup>i</sup> Health Protection Agency Bristol, UK

<sup>j</sup> University of Leuven, Leuven, Spain

<sup>k</sup> University of Madrid

<sup>l</sup> University of Florence, Italy

<sup>m</sup> University of Graz, Austria

<sup>n</sup> University of Sydney, Australia

<sup>o</sup> University of Thessaloniki, Greece

<sup>p</sup> Ancona Hospital, Italy

<sup>q</sup> Polyclinic Hospital of Milan, Italy

<sup>r</sup> Bambino Children's Hospital Rome, Italy

<sup>s</sup> University of Angers, France

\*Corresponding author.

**Background.**— The major cause of morbidity and mortality in Cystic Fibrosis (CF) is pulmonary disease; the role of fungal infection is increasingly recognized in this lung impairments.

**Objectives.**— The MFIP study aimed (i) to investigate the frequency of fungi isolated in sputum samples from a large CF population, and (ii) to evaluate as well as to compare the performance of different semi-selective media used for mycological culture, in order to propose a standardized protocol of this analysis suitable in conventional microbiological laboratories supporting CF units.

**Patients and Methods.**— We investigated a total of 469 sputum samples from patients with CF aged 1–67 years, followed-up in 19 centers: 18 Europeans and one Australian. Sputum samples were inoculated on 8 media: Chromogenic medium (CM), YPDA or Sabouraud medium (YPDAS), \*Dichloran-rose Bengal Benomyl agar (DRBBA), \*Sce-Sel+ medium (SSM), \*YPDA plus chloramphenicol at high concentration and cycloheximide (YPDACC), \*B+ medium (BM), Erythritol medium (EM). A 1:10 diluted sputum sample was also incubated at 37 °C on YPDA or Sabouraud medium (DIYPOA). Culture media were incubated aerobically at 37 °C excepted B+ medium and Erythritol media that were incubated at 30 °C for 15 days. Growth fungal species were identified on macroscopic and microscopic morphology.

**Results.**— In total, 78% of patients had a positive culture for fungi with a significant difference ( $P < 0.001$ ) between the age of patients with positive fungal culture and with negative culture. *Candida albicans* was detected with the highest frequency (47.7%); *Aspergillus fumigatus* was the most frequently isolated filamentous fungus (34.5%). A comparison of different culture media showed: The YPDA was the most sensitive medium for the detection of *Aspergillus* spp, SSM for the detection of *Scedosporium* spp and the B+ medium for the detection of *Exophiala* spp. In addition, B+ medium seems to be the most sensitive medium (global sensitivity was 67.4%), for the overall detection of fungi from CF sputa. A Chair analysis is under process to identify the best medium combination for following - up fungal pulmonary risk in CF.

**Conclusion.**— To our knowledge, MFIP study represents the first trial organized at the international level aiming at sharing and coalescing our experience to investigate fungal risk in CF. *Aspergillus fumigatus* was the most frequently isolated filamentous fungus (34.5%). This fungal frequency was significantly correlated to the patient age ( $P < 0.001$ ). According to our statistical analysis based on chair method, a medium combination will be proposed as the first standardized protocol for mycological analysis of CF sputum samples.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.mycmed.2014.06.008>

8

### Identification des réservoirs du Complexe *Scedosporium apiospermum* au Maroc

A. Mouhajir<sup>a</sup>, R. Zouhair<sup>b</sup>, C. Angebault<sup>c</sup>, S. Jacob<sup>c</sup>, S. Giraud<sup>a</sup>, R. Bouabid<sup>d</sup>,

M.-E. Bougnoux<sup>c</sup>, J.-P. Bouchara<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Groupe d'étude des interactions hôte–pathogène, EA 3142, université d'Angers, Angers, France

<sup>b</sup> Laboratoire de biotechnologie végétale et de biologie moléculaire, équipe mycologie, faculté des sciences université Moulay-Ismaïl-Meknès, Maroc

<sup>c</sup> Hôpital Necker–Enfants-Malades, unité de parasitologie-mycologie, Paris, France

<sup>d</sup> Département des sciences du Sol, école nationale de l'agriculture, Meknès, Maroc

\*Auteur correspondant.

Au cours de la mucoviscidose, le tableau clinique est dominé par les atteintes de l'appareil respiratoire qui conditionnent la qualité de vie des patients. Les altérations de la clairance muco-ciliaire et l'épaississement du mucus bronchique résultant de la mutation du gène CFTR (Cystic Fibrosis transmembrane Conductance Regulator) favorisent en effet le piégeage des bactéries et des spores fongiques inhalées et fournissent un environnement favorable à la croissance des microorganismes. Les voies respiratoires des patients sont donc fréquemment colonisées par des microorganismes, parfois à l'origine de véritables infections respiratoires qui constituent la principale cause de morbidité et de mortalité dans ce contexte. Les bactéries sont de loin les agents les plus fréquents de ces colonisations/infections, mais de nombreux champignons filamenteux peuvent aussi être rencontrés, notamment les espèces du complexe *Scedosporium apiospermum*/*Pseudallescheria boydii* qui se situent au deuxième rang parmi les champignons filamenteux colonisant l'arbre bronchique. Ces champignons présentent une très faible sensibilité intrinsèque aux antifongiques systémiques actuels, y compris le voriconazole, ce qui renforce l'intérêt de mesures prophylactiques visant à réduire l'exposition aux spores de ces champignons et ainsi le risque de contamination des patients. Cependant, leur écologie et les sources de contamination restent encore mal connues.

Afin d'améliorer les connaissances sur l'écologie des différentes espèces du complexe *S. apiospermum*/*P. boydii*, 180 prélèvements de terre ont été réalisés dans différents biotopes et différentes villes

## **Annexe 4: *The airway colonization by opportunistic filamentous fungi in patients with cystic fibrosis: Recent up-dates***

### **AUTHORS:**

Kada Touati (MD)<sup>1</sup>, Linh Nguyen Do Ngoc (MD)<sup>2</sup>, Laurence Delhaes (MD, PhD)<sup>1,2\*</sup>

### **ADDRESSES:**

<sup>1</sup>Department of Parasitology-Mycolology, Lille Hospital, Lille 2 University, Boulevard du Pr J. Leclercq, 59037 Lille Cedex, France. Tel.: + 33 320 445577; Fax: +33 320 444895; E-mail addresses: [laurence.delhaes@chru-lille.fr](mailto:laurence.delhaes@chru-lille.fr); [kada.touati@yahoo.fr](mailto:kada.touati@yahoo.fr)

<sup>2</sup>Institut Pasteur of Lille, Center for Infection and Immunity of Lille (CIIL), Inserm U1019, CNRS UMR 8204, University Lille-Nord de France, Biology and Diversity of Emerging Eukaryotic Pathogens, EA4547, 1 rue du Professeur Calmette, BP 245, 59019 Lille cedex, France. Tel.: +33 320 877961; fax: +33 320 877888; E-mail addresses: [laurence.delhaes@pasteur-lille.fr](mailto:laurence.delhaes@pasteur-lille.fr); [nguyendongoclinh@gmail.com](mailto:nguyendongoclinh@gmail.com)

**\*Corresponding author: L. Delhaes**

## Metadata of the article that will be visualized in OnlineFirst

1	Article Title	<b>The Airway Colonization by Opportunistic Filamentous Fungi in Patients with Cystic Fibrosis: Recent Updates</b>	
2	Article Sub- Title		
3	Article Copyright - Year	<b>Springer Science+Business Media New York 2014 (This will be the copyright line in the final PDF)</b>	
4	Journal Name	Current Fungal Infection Reports	
5		Family Name	<b>Delhaes</b>
6		Particle	
7		Given Name	<b>Laurence</b>
8		Suffix	
9		Organization	Lille 2 University
10		Division	Department of Parasitology-Mycology, Lille Hospital
11	Corresponding Author	Address	Boulevard du Pr J. Leclercq, Lille Cedex 59037, France
12		Organization	University of Lille-Nord de France
13		Division	Biology and Diversity of Emerging Eukaryotic Pathogens, Pasteur Institute of Lille, Center for Infection and Immunity of Lille (CIIL)
14		Address	Inserm U1019, CNRS UMR 8204, EA4547, 1 rue du Professeur Calmette, BP 245, Lille Cedex 59019, France
15		e-mail	laurence.delhaes@chru-lille.fr
16		Family Name	<b>Touati</b>
17		Particle	
18		Given Name	<b>Kada</b>
19		Suffix	
20	Author	Organization	Lille 2 University
21		Division	Department of Parasitology-Mycology, Lille Hospital
22		Address	Boulevard du Pr J. Leclercq, Lille Cedex 59037, France
23		e-mail	kada.touati@yahoo.fr
24	Author	Family Name	<b>Ngoc</b>

25		Particle
26		Given Name <b>Linh Nguyen Do</b>
27		Suffix
28		Organization University of Lille-Nord de France
29		Division Biology and Diversity of Emerging Eukaryotic Pathogens, Pasteur Institute of Lille, Center for Infection and Immunity of Lille (CIIL)
30		Address Inserm U1019, CNRS UMR 8204, EA4547, 1 rue du Professeur Calmette, BP 245, Lille Cedex 59019, France
31		e-mail nguyendongoclinh@gmail.com
32		Received
33	Schedule	Revised
34		Accepted
35	Abstract	<p>There has been a remarkable increase recently in the isolation of fungi such as <i>A. fumigatus</i>, species of the <i>Pseudallescheria boydii</i>/<i>Scedosporium apiospermum</i> complex, and <i>Exophiala</i> sp. from the respiratory tract of patients with cystic fibrosis (CF). This review describes the recent insights into the epidemiology, ecology, and physiopathology of the filamentous fungi able to colonize and/or to infect the airways of CF patients, and that may be responsible for accelerated lung function decline. We summarize salient features not only on highly prevalent species such as <i>Aspergillus</i> and <i>Scedosporium</i>, but also on more recently described fungi such as <i>Rasamsonia argillacea</i>. In addition, we discuss the challenges inherent in tracking and interpreting rates of fungal colonization/infection in the CF patient population, taking into consideration the polymicrobial composition of the CF lung environment, the corresponding cross-kingdom interactions, and the new concept of mycobiota. Further research is warranted to clarify the role of fungi in CF lung disease and its therapeutic management.</p>
36	Keywords separated by ' - '	Cystic fibrosis - Airway colonization - Respiratory infections - Opportunistic infection - Opportunistic fungus - Filamentous fungi - Mould - <i>Aspergillus</i> - <i>Scedosporium</i> - <i>Exophiala</i> - Fungal diagnosis - Mycobiota - Lung microbiome
37	Foot note information	

**AUTEUR : TOUATI Kada**

**Date de Soutenance : 30 Octobre 2014**

**Titre de la Thèse :** Evaluation du risque fongique dans la mucoviscidose : étude internationale multicentrique prospective évaluant la prévalence des micromycètes et comparant les performances analytiques des milieux de culture- MucoFong International Project (MFIP).

**Thèse - Médecine - Lille 2014**

**Cadre de classement :** Mycologie

**DES + spécialité :** Biologie médicale

**Mots-clés :** mucoviscidose, micromycète, colonisation fongique, *Aspergillus*, *Scedosporium*.

**Résumé :**

**Introduction et objectif :** La cause majeure de morbidité et de mortalité dans la mucoviscidose est l'atteinte pulmonaire et ses surinfections bactériennes et/ou fongiques. Le rôle des infections fongiques est de plus en plus reconnu dans la détérioration de la fonction respiratoire chez les patients atteints de mucoviscidose. L'étude internationale prospective « MFIP » avait pour objectif (i) de déterminer la fréquence des micromycètes dans les voies respiratoires des patients atteints de mucoviscidose, et (ii) d'évaluer et comparer différents milieux de culture utilisés dans la pratique mycologique avec pour but de proposer un protocole standardisé pour l'isolement des espèces fongiques chez ces patients.

**Méthode :** Nous avons étudié 469 expectorations de patients atteints de mucoviscidose âgés de 1 à 67 ans, suivis dans l'un des 19 centres participants (18 centres européens et un australien). Après un prétraitement par agent mucolytique, les expectorations ont été ensemencées sur 7 milieux : milieu chromogène (CM), milieu de Sabouraud ou milieu YPDA (YPDA), milieu Dichloran-Rose Bengal Benomyl Chloramphénicol (DRBBC), milieu Sélectif *Scedosporium* (SSM), milieu de Sabouraud (ou milieu YPDA) additionné de chloramphénicol et de cycloheximide (YPDACC), milieu B+ (BM), milieu enrichi en érythritol (EM), et une dilution de 1/10 de l'expectoration sur un milieu YPDA (DIYPDA) a été réalisée. Les milieux de culture ont été incubés en aérobie à 37°C sauf les milieux BM et EM (incubation < 30°C) pendant 15 jours, et examinés 2 fois par semaine. Les espèces fongiques ont été identifiées sur la base des caractéristiques macroscopiques et microscopiques. Les délais de positivité et la quantité de chaque espèce ont été relevés.

**Résultats :** 78% des expectorations avaient une culture positive pour au moins un micromycète, avec une différence significative ( $p < 0.001$ ) entre l'âge moyen des patients avec culture positive (25,8 ans) et celui des patients avec culture négative (17,5 ans). *Candida albicans* est le champignon le plus prévalent de notre étude avec un taux de 47.7% ; *Aspergillus fumigatus* est le champignon filamenteux le plus fréquemment isolé (34,5%) suivi par *Scedosporium apiospermum* (5,1%). La comparaison des différents milieux a montré que : le milieu YPDA était le plus sensible pour la détection d'*A. fumigatus*, le milieu SSM pour la détection de *Scedosporium spp*, et le milieu BM pour l'isolement d'*Exophiala spp*. Après analyse par méthode de CHAID, la combinaison des 4 milieux suivants : YPDA, BM, EM et YPDACC a permis de détecter 93,2% des espèces fongiques potentiellement pathogènes de notre étude.

**Conclusion :** MFIP est la première étude organisée au niveau international traitant cette problématique. La colonisation fongique chez les patients atteints de mucoviscidose était corrélée à l'âge. *A. fumigatus* était le champignon filamenteux le plus fréquemment isolé (34.5%). La meilleure association des milieux pour détecter une majorité des espèces fongiques potentiellement pathogènes dans notre étude est : YPDA, BM, EM plus YPDACC.

**Composition du Jury :**

**Président : Monsieur le Professeur Boualem SENDID**

**Assesseurs : Monsieur le Professeur Alain DUHAMEL**

**Madame le Professeur Françoise BOTTEREL**

**Madame le Docteur Laurence DELHAES (directrice de thèse)**