

**MEMOIRE
POUR LE DIPLOME D'ETUDES SPECIALISEES
DE BIOLOGIE MEDICALE**

**Soutenu publiquement le 21 avril 2015
Par Camille DAUCHY épouse DEFURNE**

**Conformément aux dispositions du Décret du 10 septembre 1990
tient lieu de**

THESE EN VUE DU DIPLOME D'ETAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE

**Caractérisation de la résistance aux azolés
d'*Aspergillus fumigatus* chez les patients atteints de
BPCO dans la région Nord-Pas de Calais :
circulation entre les réservoirs cliniques et
environnementaux**

Membres du jury :

Président : **Monsieur le Professeur El Moukhtar ALIOUAT**, Professeur des
Universités, Laboratoire de Parasitologie, Faculté des Sciences
Pharmaceutiques et Biologiques, Lille

Assesseurs: **Monsieur le Professeur Boualem SENDID**, Professeur des Universités-
Praticien Hospitalier, Laboratoire de Parasitologie-Mycologie, CHRU de Lille
Monsieur le Professeur Saad NSEIR, Professeur des Universités-
Praticien Hospitalier, Pôle de Réanimation Médicale, CHRU de Lille
Madame le Docteur Stéphanie FRY, Praticien Hospitalier, Clinique des
Maladies Respiratoires, CHRU de Lille

Directeur de thèse : **Madame le Docteur Emilie FREALLE**, Praticien Hospitalier, Laboratoire
de Parasitologie-Mycologie, CHRU de Lille



Faculté des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques de Lille

3, rue du Professeur Laguesse - B.P. 83 - 59006 LILLE CEDEX
☎ 03.20.96.40.40 - 📠 : 03.20.96.43.64
<http://pharmacie.univ-lille2.fr>



Université Lille 2 – Droit et Santé

Président :	Professeur Xavier VANDENDRIESSCHE
Vice- présidents :	Professeur Alain DUROCHER Professeur Régis BORDET Professeur Eric KERCKHOVE Professeur Eric BOULANGER Professeur Frédéric LOBEZ Professeur Damien CUNY Professeur Benoit DEPREZ Professeur Murielle GARCIN Monsieur Pierre RAVAUX Monsieur Larbi AIT-HENNANI Monsieur Antoine HENRY
Directeur Général des Services :	Monsieur Pierre-Marie ROBERT

Faculté des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques

Doyen :	Professeur Damien CUNY
Vice-Doyen, 1 ^{er} assesseur :	Professeur Bertrand DECAUDIN
Assesseur en charge de la pédagogie	Dr. Annie Standaert
Assesseur en charge de la recherche	Pr. Patricia Melnyk
Assesseur délégué à la scolarité	Dr. Christophe Bochu
Assesseur délégué en charge des relations internationales	Pr. Philippe Chavatte
Assesseur délégué en charge de la vie étudiante	M. Thomas Morgenroth
Chef des services administratifs :	Monsieur Cyrille PORTA

Liste des Professeurs des Universités - Praticiens Hospitaliers

Civ.	NOM	Prénom	Laboratoire
Mme	ALLORGE	Delphine	Toxicologie
M.	BROUSSEAU	Thierry	Biochimie
Mme	CAPRON	Monique	Immunologie
M.	DECAUDIN	Bertrand	Pharmacie Galénique
M.	DINE	Thierry	Pharmacie clinique
M.	DUBREUIL	Luc	Bactériologie
Mme	DUPONT-PRADO	Annabelle	Hématologie
M.	DUTHILLEUL	Patrick	Hématologie
M.	GRESSIER	Bernard	Pharmacologie
M.	LUYCKX	Michel	Pharmacie clinique
M.	ODOU	Pascal	Pharmacie Galénique
M.	DEPREUX	Patrick	Chimie Organique (ICPAL)

Liste des Professeurs des Universités

Civ.	NOM	Prénom	Laboratoire
M.	ALIOUAT	El Moukhtar	Parasitologie
Mme	AZAROUAL	Nathalie	Physique
M.	BERTHELOT	Pascal	Chimie Thérapeutique 1
M.	CAZIN	Jean-Louis	Pharmacologie – Pharmacie clinique
M.	CHAVATTE	Philippe	Chimie Thérapeutique 2
M.	COURTECUISSÉ	Régis	Sciences végétales et fongiques
M.	CUNY	Damien	Sciences végétales et fongiques
Mme	DELBAERE	Stéphanie	Physique
M.	DEPREZ	Benoît	Chimie Générale
Mme	DEPREZ	Rebecca	Chimie Générale
M.	DUPONT	Frédéric	Sciences végétales et fongiques
M.	DURIEZ	Patrick	Physiologie
M.	GARÇON	Guillaume	Toxicologie
Mme	GAYOT	Anne	Pharmacotechnie Industrielle
M.	GESQUIÈRE	Jean-Claude	Chimie Organique
M.	GOOSSENS	Jean François	Chimie Analytique
Mme	GRAS	Hélène	Chimie Thérapeutique 3
M.	HENNEBELLE	Thierry	Pharmacognosie
M.	LEMDANI	Mohamed	Biomathématiques
Mme	LESTAVEL	Sophie	Biologie Cellulaire
M.	LUC	Gerald	Physiologie
Mme	MELNYK	Patricia	Chimie thérapeutique 2
Mme	MUHR – TAILLEUX	Anne	Biochimie
Mme	PAUMELLE-LESTRELIN	Réjane	Biologie Cellulaire
Mme	PERROY – MAILLOLS	Anne Catherine	Droit et déontologie pharmaceutique
Mme	ROMOND	Marie Bénédicte	Bactériologie
Mme	SAHPAZ	Sevser	Pharmacognosie
M.	SERGHÉRAERT	Eric	Droit et déontologie pharmaceutique
M.	SIEPMANN	Juergen	Pharmacotechnie Industrielle
M.	STAELS	Bart	Biologie Cellulaire
M	TARTAR	André	Chimie Organique
M.	VACCHER	Claude	Chimie Analytique
M.	WILLAND	Nicolas	Chimie organique
M.	MILLET	Régis	Chimie Thérapeutique (ICPAL)

Liste des Maîtres de Conférences - Praticiens Hospitaliers

Civ.	NOM	Prénom	Laboratoire
Mme	BALDUYCK	Malika	Biochimie
Mme	GARAT	Anne	Toxicologie
Mme	GOFFARD	Anne	Bactériologie
M.	LANNOY	Damien	Pharmacie Galénique
Mme	ODOU	Marie Françoise	Bactériologie
M.	SIMON	Nicolas	Pharmacie Galénique

Liste des Maîtres de Conférences

Civ.	NOM	Prénom	Laboratoire
Mme	AGOURIDAS	Laurence	Chimie thérapeutique 2
Mme	ALIOUAT	Cécile Marie	Parasitologie (90%)
M.	ANTHERIEU	Sébastien	Toxicologie
Mme	AUMERCIER	Pierrette	Biochimie
Mme	BANTUBUNGI	Kadiombo	Biologie cellulaire

Mme	BARTHELEMY	Christine	Pharmacie Galénique
Mme	BEHRA	Josette	Bactériologie
M	BELARBI	Karim	Pharmacologie
M.	BERTHET	Jérôme	Physique
M.	BERTIN	Benjamin	Immunologie
M.	BLANCHEMAIN	Nicolas	Pharmacotechnie industrielle
M.	BOCHU	Christophe	Physique
M.	BRIAND	Olivier	Biochimie
Mme	CACHERA	Claude	Biochimie
M.	CARNOY	Christophe	Immunologie
Mme	CARON	Sandrine	Biologie cellulaire (80%)
Mme	CHABÉ	Magali	Parasitologie (80%)
Mme	CHARTON	Julie	Chimie Organique (80%)
M	CHEVALIER	Dany	Toxicologie
M.	COCHELARD	Dominique	Biomathématiques
Mme	DANEL	Cécile	Chimie Analytique
Mme	DEMANCHE	Christine	Parasitologie (80%)
Mme	DEMARQUILLY	Catherine	Biomathématiques
Mme	DUMONT	Julie	Biologie cellulaire
M.	FARCE	Amaury	Chimie Thérapeutique 2
Mme	FLIPO	Marion	Chimie Organique
Mme	FOULON	Catherine	Chimie Analytique
M.	GELEZ	Philippe	Biomathématiques
M.	GERVOIS	Philippe	Biochimie
Mme	GRAVE	Béatrice	Toxicologie
Mme	GROSS	Barbara	Biochimie
Mme	HAMOUDI	Chérifa Mounira	Pharmacotechnie industrielle
Mme	HANNOTHIAUX	Marie-Hélène	Toxicologie
Mme	HELLEBOID	Audrey	Physiologie
M.	HERMANN	Emmanuel	Immunologie
Mme	HOUSSIN-THUILLIER	Pascale	Hématologie
M.	KAMBIA	Kpakpaga Nicolas	Pharmacologie
M.	KARROUT	Youness	Pharmacotechnie Industrielle
Mme	LALLOYER	Fanny	Biochimie
M.	LEBEGUE	Nicolas	Chimie thérapeutique 1
Mme	LECOEUR	Marie	Chimie Analytique
Mme	LIPKA	Emmanuelle	Chimie Analytique
Mme	MARTIN	Françoise	Physiologie
M.	MOREAU	Pierre Arthur	Sciences végétales et fongiques
Mme	MUSCHERT	Susanne	Pharmacotechnie industrielle
Mme	NEUT	Christel	Bactériologie
Mme	NIKASINOVIC	Lydia	Toxicologie
Mme	PINÇON	Claire	Biomathématiques
M.	PIVA	Frank	Biochimie
Mme	PLATEL	Anne	Toxicologie
M.	RAVAUX	Pierre	Biomathématiques
Mme	RIVIERE	Céline	Pharmacognosie
Mme	ROGER	Nadine	Immunologie
M.	ROUMY	Vincent	Pharmacognosie
Mme	SEBTI	Yasmine	Biochimie
Mme	SIEPMANN	Florence	Pharmacotechnie Industrielle
Mme	SINGER	Elisabeth	Bactériologie
Mme	STANDAERT	Annie	Parasitologie
M.	TAGZIRT	Madjid	Hématologie
M.	WELTI	Stéphane	Sciences végétales et fongiques
M.	YOUS	Saïd	Chimie Thérapeutique 1
M.	ZITOUNI	Djamel	Biomathématiques

M.	FURMAN	Christophe	Pharmacobiochimie (ICPAL)
Mme	GOOSSENS	Laurence	Chimie Organique (ICPAL)

Professeurs Agrégés

Civ.	NOM	Prénom	Laboratoire
Mme	MAYES	Martine	Anglais
M.	MORGENROTH	Thomas	Droit et déontologie pharmaceutique

Professeurs Certifiés

Civ.	NOM	Prénom	Laboratoire
M.	HUGES	Dominique	Anglais
Mlle	FAUQUANT	Soline	Anglais
M.	OSTYN	Gaël	Anglais

Professeur Associé - mi-temps

Civ.	NOM	Prénom	Laboratoire
M.	DHANANI	Alban	Droit et déontologie pharmaceutique

Maîtres de Conférences ASSOCIES - mi-temps

Civ.	NOM	Prénom	Laboratoire
Mme	BERTOUX	Elisabeth	Pharmacie Clinique - Biomathématiques
M.	BRICOTEAU	Didier	Biomathématiques
M.	FIEVET	Pierre	Information Médicale
M.	FRIMAT	Bruno	Pharmacie Clinique
M.	MASCAUT	Daniel	Pharmacie Clinique
M.	WATRELOS	Michel	Droit et déontologie pharmaceutique
M.	ZANETTI	Sébastien	Biomathématiques

AHU

Civ.	NOM	Prénom	Laboratoire
Mme	DROUET	Maryline	Pharmacie Galénique
Mme	GENAY	Stéphanie	Pharmacie Galénique

Faculté des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques de Lille

3, rue du Professeur Laguesse - B.P. 83 - 59006 LILLE CEDEX
Tel. : 03.20.96.40.40 - Télécopie : 03.20.96.43.64
<http://pharmacie.univ-lille2.fr>

L'Université n'entend donner aucune approbation aux opinions émises dans les thèses ; celles-ci sont propres à leurs auteurs.

A mon président de jury,

Monsieur le Professeur El Moukhtar ALIOUAT

Professeur des Universités,
Laboratoire de Parasitologie - Biologie animale
Faculté des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques de Lille
Université de Lille II

Equipe Signalisation Moléculaire et Contrôle de la
Croissance et de la Différenciation des Parasites
Centre d'Infection et d'Immunité de Lille
Institut Pasteur de Lille

*Vous me faites l'honneur de présider ce jury de thèse et je vous en remercie.
J'ai su apprécier tout au long de mon cursus vos grandes qualités de pédagogue.
Veuillez trouver ici le témoignage de ma reconnaissance
et de mon profond respect.*

A mes juges,

Monsieur le Professeur Boualem SENDID

Professeur des Universités - Praticien Hospitalier

Chef de Service

Laboratoire de Parasitologie - Mycologie

Centre Hospitalier Régional Universitaire de Lille

Directeur

Equipe 2, UMR 995 Inserm-Lille2

Fungal Associated Invasive & Inflammatory Diseases

Faculté de Médecine, Pôle Recherche

Je vous remercie de me faire l'honneur d'accepter de juger ce travail.

*Veillez trouver ici l'expression de mes sentiments
les plus respectueux et de toute ma considération.*

Monsieur le Professeur Saad NSEIR

Professeur des Universités - Praticien Hospitalier
Service d'Urgence Respiratoire et Réanimation Médicale
Centre Hospitalier Régional Universitaire de Lille

*Merci d'avoir accepté de participer au jury de cette thèse.
Veuillez trouver ici l'expression de ma profonde reconnaissance.*

Madame le Docteur Stéphanie FRY

Praticien Hospitalier
Clinique des Maladies Respiratoires
Centre Hospitalier Régional Universitaire de Lille

Equipe Immunité Pulmonaire
Centre d'Infection et d'Immunité de Lille
Institut Pasteur de Lille

*Merci d'avoir collaboré à la réalisation de ce travail et
d'avoir accepté de faire partie de ce jury de thèse.
Veuillez trouver ici le témoignage de toute ma gratitude.*

A mon directeur de thèse,

Madame le Docteur Emilie FREALLE

Praticien Hospitalier
Laboratoire de Parasitologie – Mycologie
Centre Hospitalier Régional Universitaire de Lille

Equipe Infection Pulmonaire et Immunité Innée
Centre d'Infection et d'Immunité de Lille
Institut Pasteur de Lille

Tu m'as fait l'honneur de me confier ce travail.

*Je tiens à te remercier sincèrement de m'avoir parfaitement
encadrée tout au long de cette thèse.*

*J'ai pu apprécier à tes côtés ton implication, ton professionnalisme, ta réactivité,
ta grande disponibilité, ta rigueur et ta sympathie.*

J'ai été très heureuse de travailler avec toi.

A toutes les personnes qui ont collaboré à l'élaboration de ce travail,

**L'ensemble du personnel du Laboratoire de Parasitologie - Mycologie du
CHRU de Lille,**

*En particulier Michèle, Filo et Gaëlle, en biologie moléculaire et Dorothée, Sandrine
et Stéphanie en environnement. Merci pour votre aide précieuse, votre disponibilité
et votre investissement pour le projet FungiCOPD.*

A toutes les personnes qui m'ont accompagnées durant ces quatre années :

Mes co-internes,

Merci d'avoir rendu mes stages si agréables.

Les enseignants, biologistes et techniciens, avec qui j'ai travaillé,

Merci de m'avoir encadrée et formée tout au long de mon internat.

A mes parents,

Pour m'avoir donnée les moyens de réussir et m'avoir toujours encouragée. Merci pour votre éducation, les valeurs que vous m'avez transmises, votre présence et votre amour depuis toujours.

A mes sœurs,

*Tantôt modèles, confidentes ou complices,
Merci d'être toujours là pour moi.*

A mon mari,

*Merci pour ton soutien, ta patience et surtout ton amour.
Tu combles de bonheur chaque jour de ma vie.*

A mes amis,

Merci pour tous ces moments heureux partagés.

A ma famille et ma belle famille.

SOMMAIRE

LISTE DES ABREVIATIONS.....	17
TABLE DES ILLUSTRATIONS.....	19
Figures.....	19
Tableaux.....	20
INTRODUCTION.....	22
GENERALITES.....	24
I. La BPCO.....	24
A. Définition, étiologie et diagnostic.....	24
B. Classifications.....	25
C. Traitement.....	26
D. Épidémiologie.....	27
E. Les exacerbations de la BPCO.....	29
1. Physiopathologie et origine des exacerbations.....	29
2. Prise en charge.....	31
II. <i>Aspergillus</i> et infections aspergillaires au cours de la BPCO.....	32
A. Taxonomie des <i>Aspergillus</i>	32
B. Identification morphologique.....	34
1. Morphologie macroscopique : caractères culturels.....	34
2. Morphologie microscopique.....	36
C. Réservoirs environnementaux et mode de contamination.....	38
D. Pouvoir pathogène d' <i>A. fumigatus</i> dans la BPCO.....	39
1. Colonisation saprophyte bronchique.....	40
2. Aspergillose pulmonaire invasive.....	41
a) Facteurs de risque.....	41
b) Incidence chez les patients atteints de BPCO.....	41
c) Diagnostic chez les patients atteints de BPCO.....	42
III. Traitement des aspergilloses chez les patients atteints de BPCO : antifongiques utilisables et impact de l'émergence des résistances.....	43
A. Sensibilité des <i>Aspergillus</i> aux antifongiques.....	43
1. Antifongiques utilisables pour le traitement des aspergilloses.....	43
a) Les polyènes.....	43
b) Les échinocandines.....	44
c) Les antifongiques azolés.....	44
2. Recommandations pour la prise en charge des aspergilloses chez les patients atteints de BPCO.....	46
B. Mécanismes de résistance aux azolés.....	46
1. Mutations du gène <i>cyp51A</i>	47
2. Autres mécanismes de résistance.....	49
C. Détection de la résistance aux azolés au laboratoire.....	50
1. Détermination des CMI en milieu liquide : méthodes de référence.....	50
2. Détermination des CMI en milieu gélosé : méthode Etest®.....	51
3. Identification d'isolats résistants par ensemencement sur milieu Sabouraud additionné d'antifongiques azolés.....	51
4. Détection rapide de la résistance aux azolés par biologie moléculaire.....	51
D. Origine de la résistance.....	52
1. Acquisition de la résistance au cours d'un traitement par antifongique azolé	52
2. Émergence de la résistance par exposition à des isolats résistants d'origine environnementale.....	52
E. Prévalence des isolats résistants d' <i>A. fumigatus</i> aux azolés.....	53
OBJECTIFS.....	57

MATERIELS ET METHODES	58
I. Patients et définitions des statuts colonisés et sensibilisés	58
II. Obtention des isolats cliniques et environnementaux d' <i>Aspergillus fumigatus</i> par culture.....	59
A. Isolats cliniques.....	59
B. Isolats environnementaux	60
1. Capteurs à poussières	60
2. Autres prélèvements environnementaux.....	61
III. Quantification de l'exposition environnementale aux moisissures par qPCR.	61
A. Extraction de l'ADN des capteurs à poussières	61
B. Détection d'ADN fongique par qPCR panfongique	62
C. Détection d'ADN d' <i>Aspergillus</i> spp.....	63
D. Détection d'ADN d' <i>A. fumigatus</i>	64
E. Analyse statistique	65
IV. Caractérisation phénotypique des isolats cliniques et environnementaux d' <i>Aspergillus fumigatus</i>	66
A. Identification morphologique	66
B. Identification d'isolats résistants aux azolés par ensemencement sur milieu Sabouraud additionné d'itraconazole	66
C. Détermination de la sensibilité aux antifongiques par méthode Etest®	66
D. Détermination de la thermotolérance	67
V. Caractérisation génotypique des isolats cliniques et environnementaux d' <i>Aspergillus fumigatus</i>	67
A. Extraction de l'ADN.....	67
B. Réaction de polymérisation en chaîne (PCR)	68
1. PCR ciblant les régions ITS1 et ITS2	68
2. PCR ciblant le gène <i>β-tubuline</i>	69
3. PCR ciblant le gène <i>cyp51A</i>	69
C. Électrophorèse sur gel d'agarose des produits de PCR.....	70
D. Purification des produits de PCR	70
E. Séquençage des produits de PCR.....	70
F. Analyse et alignement de séquences.....	71
VI. Détection directe d'isolats mutés TR34/L98H d' <i>Aspergillus fumigatus</i> dans l'environnement	71
A. qPCR ciblant le motif TR34 situé dans le promoteur du gène <i>cyp51A</i> (qPCR TR34).....	71
B. qPCR ciblant la mutation L98H du gène <i>cyp51A</i> (qPCR L98H).....	73
RESULTATS	75
I. Caractéristiques des patients inclus et prévalence de la colonisation/sensibilisation par <i>A. fumigatus</i>	75
II. Prévalence de l'exposition environnementale à <i>A. fumigatus</i> et quantification du niveau d'exposition aux moisissures	76
A. Mesure de l'exposition environnementale par culture	76
B. Quantification du niveau d'exposition aux moisissures par qPCR	76
1. Détection d'ADN fongique par qPCR panfongique.....	76
2. Détection d'ADN d' <i>Aspergillus</i> spp.....	78
3. Détection d'ADN d' <i>A. fumigatus</i>	79
a) Mise au point : choix de la concentration en sonde	79
b) Analyse des capteurs à poussières	79
C. Comparaison de l'exposition fongique entre les groupes colonisés/sensibilisés et non colonisés/non sensibilisés par <i>A. fumigatus</i>	80
1. Culture.....	81
2. qPCR.....	81

III. Caractérisations phénotypique et génotypique des isolats cliniques et environnementaux d' <i>A. fumigatus</i>	82
A. Confirmation de l'identification des isolats par méthodes phénotypique et moléculaire.....	82
B. Identification des mutations du gène <i>cyp51A</i>	84
1. Mutations non silencieuses	84
2. Mutations silencieuses	86
3. Circulation des isolats mutés ou non au sein et entre les réservoirs cliniques et environnementaux.....	86
a) Circulation des isolats au sein des réservoirs cliniques et environnementaux	86
b) Circulation des isolats entre les réservoirs cliniques et environnementaux	86
c) Distribution géographique des isolats cliniques et environnementaux....	87
C. Sélection des isolats résistants aux azolés par ensemencement sur milieu ITZ 4 mg/l	87
D. Détermination des CMI par méthode Etest®.....	88
E. Prévalence de la résistance aux azolés	89
1. Prévalence de la résistance à l'ITZ	89
2. Prévalence de la mutation TR34/L98H.....	89
IV. Détection directe des isolats mutés TR34/L98H dans les capteurs à poussières.....	90
A. qPCR ciblant le motif TR34 situé dans le promoteur du gène <i>cyp51A</i> (qPCR TR34).....	90
1. Mise au point : choix de la concentration en amorces.....	90
2. Analyse des capteurs à poussières.....	91
B. qPCR ciblant la mutation L98H du gène <i>cyp51A</i> (qPCR L98H).....	93
1. Mise au point.....	93
a) Choix de la concentration en amorces.....	93
b) Choix de la concentration en sondes.....	94
2. Analyse des capteurs à poussières.....	94
DISCUSSION	96
CONCLUSION.....	104
ANNEXES	106
Annexe 1	106
Annexe 2	107
Annexe 3	108
Annexe 4	113
Annexe 5	115
BIBLIOGRAPHIE.....	116

LISTE DES ABREVIATIONS

- ADN** : Acide désoxyribonucléique
- AI** : Aspergillose invasive
- AMB** : Amphotéricine B
- APC** : Aspergillose pulmonaire chronique
- APCC** : Aspergillose pulmonaire chronique cavitaire
- APCN** : Aspergillose pulmonaire chronique nécrosante
- API** : Aspergillose pulmonaire invasive
- ARN** : Acide ribonucléique
- ARNr** : ARN ribosomique
- BC** : Bronchite chronique
- BET** : Bromure d'éthidium
- BPCO** : Bronchopneumopathie chronique obstructive
- CAS** : Caspofungine
- CAT** : *COPD assessment test*
- CME** : Concentration minimale efficace
- CMI** : Concentration minimale inhibitrice
- Cp** : *Crossing point*
- CYP51** : lanostérol 14 α déméthylase
- CVF** : Capacité vitale forcée
- dNTP** : Désoxyribonucléotide triphosphate où N = Adénine, Cytosine, Guanine, Thymine
- EABPCO** : Exacerbation aigüe de bronchopneumopathie chronique obstructive
- EORTC/MSG** : *European Organization for Research and Treatment of Cancer / Mycoses Study Group*
- Eq.** : Equivalent
- FRET** : *Fluorescent resonance energy transfert*
- GM** : Galactomannane
- GOLD** : *Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease*
- ITS** : *Internal Transcribed Spacer*
- ITZ** : Itraconazole
- LBA** : Lavage broncho-alvéolaire
- LROP** : Liquide de rinçage oro-pharyngé
- MEA** : *Malt Extract Agar*
- Milieu ITZ** : milieu Sabouraud additionné de 4 mg/l d'itraconazole

mMRC : *Modified medical research council*
OR : Odds Ratio
Pb : paires de base
PCR : *Polymerase chain reaction*
POS : Posaconazole
qPCR : *Quantitative polymerase chain reaction*
SK1/2 : milieu Sabouraud dilué au 1/2 additionné d'amikacine
Tm : *Melting temperature*
TVO : Trouble ventilatoire obstructif
UNG : Uracil ADN glycosylase
UFC : Unité formant colonie
VEMS : Volume expiratoire maximal à la première seconde
VOR : Voriconazole
WT : *Wild type*

TABLE DES ILLUSTRATIONS

Figures

Figure 1 : Classification ABCD d'après GOLD 2011

Figure 2 : Indice de surmortalité par région, France, 2000-2003

Figure 3 : Espèces de la section *Fumigati* du genre *Aspergillus* (arbre phylogénétique basé sur le gène de la β -tubuline)

Figure 4 : Aspect macroscopique de cultures d'*Aspergillus* sur milieu Sabouraud, recto (gauche) et verso droite)

Figure 5 : Schéma des têtes aspergillaires

Figure 6 : Morphologies macroscopique et microscopique d'*A. lentulus* et d'*A. fumigatus*

Figure 7a et 7b : Structure du POS(A), ITZ(B) et VOR(C) (7a) et représentation de leur enzyme cible CYP51A (7b)

Figure 8 : Cartographie des mutations trouvées dans le gène *cyp51A* dans le modèle d'homologie de la protéine CYP51A.

Figure 9 : Représentation des principales mutations décrites pour le gène *cyp51A* d'*A. fumigatus*

Figure 10 : Répartition géographique de la prévalence des isolats cliniques d'*A. fumigatus* résistants et de la mutation TR34/L98H dans les isolats cliniques et environnementaux en France et en Europe

Figure 11 : Courbes d'amplification et de fusion de la gamme étalon et des capteurs à poussières obtenues par qPCR panfongique

Figure 12 : Corrélation entre le nombre de colonies de moisissures obtenues par culture et les quantités d'ADN fongiques détectées par qPCR panfongique

Figure 13 : Corrélation entre le nombre de colonies d'*Aspergillus* obtenues par culture et la quantité d'ADN fongique détectée par qPCR *Aspergillus*

Figure 14 : Comparaison de 2 concentrations en sonde AfumiP1 (0,04 μ M en rouge et 0,08 μ M en vert) pour la détection d'*A. fumigatus* par qPCR

Figure 15 : Corrélation entre le nombre de colonies d'*A. fumigatus* obtenues par culture et la quantité d'ADN fongique détectée par qPCR *A. fumigatus*

Figure 16 : Alignement des 3 types de séquences des régions ITS1 et ITS2 obtenus pour les 116 isolats avec les séquences des souches *A. fumigatus* ATCC 1022 et UWFP 503

Figure 17 : Alignement des 3 types de séquences du gène β -tubuline obtenus pour les 116 isolats avec les séquences des souches *A. fumigatus* CBS 133.61 et *N. fischeri* CBS 544.65

Figure 18 : Distribution géographique au sein de la région Nord-Pas-de-Calais des isolats cliniques et environnementaux présentant une mutation non silencieuse ou non (WT) (C : isolats cliniques)

Figure 19 : Analyse en qPCR TR SYBR®Green des gammes WT et TR34/L98H à différentes concentrations en amorces TR-F et TR-R (0,1; 0,2; 0,4 et 1 μ M). La concentration optimale en amorces choisie pour l'analyse des capteurs est encadrée.

Figure 20 : Courbes de fusion obtenues pour les capteurs à poussières positifs en qPCR TR34 (SYBR®Green) (amplification WT pour les capteurs n° 1, 4, 12, 21, 24, 26, 29, 30, 33, absence d'amplification TR34).

Figure 21 : Analyse en qPCR L98H SYBR®Green des gammes WT et TR34/L98H en utilisant différentes concentrations en amorces L98F et L98R (0,1; 0,2; 0,4 et 1µM). La concentration optimale en amorces choisie est encadrée.

Figure 22 : Analyse en qPCR L98H Taqman des gammes WT et TR34/L98H à différentes concentrations en sondes L98 WT (FAM) et L98H (VIC) (0,1 et 0,2 µM). La concentration optimale en sondes choisie est encadrée.

Tableaux

Tableau 1 : Classification spirométrique de la BPCO d'après GOLD 2007

Tableau 2 : Schéma général du traitement de la BPCO

Tableau 3 : Critères d'hospitalisation des exacerbations d'après l'HAS

Tableau 4 : Classification infragénérique du genre *Aspergillus*

Tableau 5 : Caractères macroscopiques des *Aspergillus*

Tableau 6 : Principales caractéristiques microscopiques des espèces d'*Aspergillus*

Tableau 7 : Mutations du gène *cyp51A* identifiées chez les isolats d'*Aspergillus fumigatus* résistants aux azolés

Tableau 8 : Seuils d'interprétation des CMI établis par l'EUCAST pour *A. fumigatus*

Tableau 9 : Critères d'inclusion et d'exclusion des patients de l'étude FungiCOPD

Tableau 10 : Amorces utilisées pour la qPCR panfongique

Tableau 11 : Amorces et sondes utilisées pour la qPCR *Aspergillus* spp. (Flc: fluorescéine, LC640: Red 640)

Tableau 12 : Amorces et sondes utilisées pour la qPCR *A. fumigatus*

Tableau 13 : Composition des mix avec concentrations en sonde différentes

Tableau 14 : Amorces utilisées pour la PCR ciblant les régions ITS1 et ITS2

Tableau 15 : Amorces pour la PCR ciblant le gène codant pour la β-tubuline

Tableau 16 : 3 coupes d'amorces pour la PCR ciblant le gène *cyp51A*

Tableau 17 : Amorces designées pour la qPCR TR34 SYBR®Green

Tableau 18 : Composition des mix en fonction des concentrations en amorces

Tableau 19 : Amorces et sondes designées pour la qPCR L98H

Tableau 20 : Composition des mix pour la détermination de la concentration optimale en amorces pour la qPCR L98H SYBR®Green

Tableau 21 : Comparaison du nombre total de colonies, du nombre de colonies d'*A. fumigatus* et de la fréquence de positivité à *A. fumigatus* des capteurs positifs en culture entre les patients colonisés (C) versus patients non colonisés (NC) et entre les patients colonisés et/ou sensibilisés (C et/ou S) versus les patients non colonisés non sensibilisés (NC/NS)

Tableau 22 : Comparaison des quantités d'ADN fongique, d'*Aspergillus* et d'*A. fumigatus* dans les capteurs à poussières et de la fréquence de positivité à *A.*

fumigatus des capteurs positifs en qPCR *A.fumigatus* entre les patients colonisés (C) versus patients non colonisés (NC) et entre les patients colonisés et/ou sensibilisés (C et/ou S) versus les patients non colonisés non sensibilisés (NC/NS)

Tableau 23 : Caractérisation des isolats cliniques et environnementaux : origine, séquençage du gène *cyp51A* et résultat de la culture sur milieu ITZ

Tableau 24 : Aspect de la culture sur milieu ITZ pour les isolats ITZ+

Tableau 25 : CMI déterminées par méthode Etest® pour les isolats ITZ+ et/ou présentant des mutations du gène *cyp51A*

Tableau 26 : Prévalence de la résistance à l'ITZ et de la mutation TR34/L98H en fonction des isolats, des patients et des capteurs positifs à *A. fumigatus*

Tableau 27 : Composition des mix pour la qPCR L98H avec des concentrations en sondes L98 WT et L98H de 0,1, 0,2 et 0,4µM.

Tableau 28 : Comparaison des résultats de qPCR TR34, qPCR L98H, qPCR *A. fumigatus* et de culture pour les capteurs positifs en qPCR TR34 ou qPCR L98H

INTRODUCTION

La Bronchopneumopathie chronique obstructive (BPCO) est une pathologie respiratoire chronique caractérisée par une obstruction bronchique non complètement réversible associée à une réponse inflammatoire dont le principal facteur de risque est le tabagisme (1). Selon la *Global Burden of Disease Study*, elle pourrait devenir la troisième cause de mortalité dans le monde en 2020 (2).

L'évolution de la BPCO est marquée par des épisodes d'exacerbation qui ont un impact économique important : les hospitalisations pour exacerbation représentent la part la plus importante des coûts imputables aux patients atteints de BPCO (3).

Le rôle des bactéries et des virus respiratoires dans l'augmentation de l'inflammation bronchique et systémique au cours d'une exacerbation est bien documenté (4,5), ces micro-organismes étant considérés comme agents étiologiques dans 75% des exacerbations (6). Cependant, le rôle des agents fongiques tels qu'*Aspergillus* n'a pas encore été établi.

Aspergillus fumigatus est un champignon microscopique (micromycète) largement répandu dans l'environnement, aussi bien à l'extérieur qu'à l'intérieur des habitations. Il est responsable de manifestations cliniques variées allant de la colonisation saprophyte des voies respiratoires supérieures aux formes pulmonaires invasives (7). Les patients atteints de BPCO constituent un groupe à risque d'aspergillose pulmonaire invasive (API) de par l'antibiothérapie large spectre et les corticoïdes qu'ils reçoivent (8,9). L'importance de l'isolement d'*A. fumigatus* dans les expectorations des patients atteints de BPCO présentant une exacerbation n'est pas clairement établie, mais une culture positive à *A. fumigatus* au cours d'une exacerbation pourrait suggérer un rôle de ce micromycète dans l'aggravation de la fonction respiratoire.

Dans ce contexte, nous avons évalué la prévalence de colonisation et sensibilisation par *A. fumigatus* au sein de cette population de patients atteints de BPCO dans la région Nord-Pas de Calais, ainsi que le rôle de l'exposition environnementale domestique dans les phénomènes de colonisation et de sensibilisation par *A. fumigatus*.

Malgré la colonisation par *Aspergillus* et le risque d'API dans cette population, les patients BPCO bénéficient rarement d'un traitement par antifongiques azolés : on parle de patients « naïfs ». Cependant, l'émergence de la résistance aux azolés chez *A. fumigatus* ayant été rapportée aussi bien chez des patients traités pour une

aspergillose chronique (10–12) que chez des patients naïfs et dans l'environnement, où elle serait liée à l'utilisation de fongicides azolés en agriculture (13), le risque d'apparition d'isolats résistants aux azolés est réel chez les patients atteints de BPCO, le principal mécanisme de résistance aux azolés étant la mutation de la cible des azolés, l'enzyme lanostérol 14 α déméthylase codée par le gène *cyp51A* (14).

Nous avons donc secondairement caractérisé les isolats cliniques (obtenus à partir de prélèvements respiratoires) et environnementaux (obtenus à partir de prélèvements effectués au domicile de ces patients atteints de BPCO) afin de déterminer la prévalence des isolats d'*A. fumigatus* résistants aux azolés, d'identifier les mécanismes impliqués et de clarifier la circulation de ces isolats entre les réservoirs cliniques et environnementaux.

GENERALITES

I. La BPCO

A. Définition, étiologie et diagnostic

La BPCO est une maladie respiratoire chronique définie par une obstruction permanente, progressive et non complètement réversible des voies aériennes. Cette obstruction est causée par l'association, variable selon les patients, d'une diminution du calibre des bronchioles du fait de modifications anatomiques (remodelage) et d'une destruction des alvéoles pulmonaires (emphysème) qui, par le biais de la diminution de la force de rétractation élastique du poumon entraîne un collapsus des lumières bronchiques. Il s'y associe une réponse inflammatoire pulmonaire anormale à des toxiques inhalés, particules ou gaz nocifs (tabac, polluants, etc.). Le symptôme principal de la BPCO est la dyspnée (1).

On distingue les facteurs de risque de BPCO environnementaux et génétiques. Le tabac est de loin le principal facteur de risque environnemental de BPCO et les expositions professionnelles constituent au moins 15% de l'étiologie des BPCO. D'autres facteurs sont incriminés tels que les fumées domestiques de combustion des systèmes de chauffage ou de cuisine dans les pays émergents et la pollution atmosphérique, qui joue un rôle dans le déclenchement d'exacerbations, mais dont le rôle éventuel dans le développement de la BPCO est incertain. Parmi les facteurs de risques génétiques, le déficit en alpha 1-antitrypsine est le seul clairement identifié dans la BPCO (15).

Le diagnostic de la BPCO est basé sur l'exploration fonctionnelle respiratoire avec mesure du volume expiratoire maximal à la première seconde (VEMS) et de la capacité vitale forcée (CVF) par spirométrie. Le trouble ventilatoire obstructif (TVO) est défini par un rapport VEMS/CVF inférieur à 70% après administration d'un bronchodilatateur, quelque soit la valeur observée du VEMS (1). C'est la présence d'un TVO dans un contexte clinique compatible (tabagisme ancien, exposition professionnelle) en l'absence d'autre cause de TVO, en particulier un asthme ou des dilatations des bronches qui aboutit au diagnostic de BPCO.

Le terme BPCO inclut la bronchite chronique (BC) avec TVO et l'emphysème pan-lobulaire et/ou centro-lobulaire avec TVO. La BC se définit cliniquement par une hypersécrétion bronchique se manifestant par une toux productive quotidienne ou quasi-quotidienne durant au moins trois mois par an au cours d'au moins deux

années consécutives. Elle peut être simple (sans obstruction bronchique) ou obstructive (accompagnée d'un TVO). La BC reflète l'exposition à des facteurs de risque environnementaux. Elle ne conduit pas systématiquement à une obstruction bronchique. L'emphysème se définit anatomiquement par un élargissement anormal et permanent des espaces aériens distaux (c'est-à-dire situés au-delà des bronchioles terminales), avec destruction des parois alvéolaires, sans fibrose associée (15).

Des comorbidités associées sont fréquentes, elles doivent être recherchées et traitées : anxiété et dépression, cancers bronchiques, ostéoporose, affections cardiovasculaires, dénutrition et obésité. Elles aggravent les symptômes et le pronostic de la BPCO. L'évolution de la BPCO est marquée par un déclin accéléré du VEMS au cours du temps, un risque d'exacerbations pouvant mettre en jeu le pronostic vital, un risque de handicap avec réduction des activités quotidiennes voire l'apparition d'une insuffisance respiratoire chronique (1).

B. Classifications

La *Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease* (GOLD) définit 4 stades de sévérité de BPCO en fonction du VEMS, il s'agit de la classification spirométrique GOLD (Tableau 1) (1).

<u>Stades</u>	<u>Caractéristiques</u>	<u>Équivalence clinique</u> (+toux et expectoration)
Stade I : BPCO légère	VEMS/CVF < 70% VEMS ≥ 80% valeur prédite	Absence de dyspnée
Stade II : BPCO modérée	VEMS/CVF < 70% 50% ≤ VEMS < 80% valeur prédite	Dyspnée d'effort inconstante
Stade III: BPCO sévère	VEMS/CVF < 70% 30% ≤ VEMS < 50% valeur prédite	Dyspnée d'effort
Stade IV : BPCO très sévère	VEMS/CVF < 70% VEMS < 30% valeur prédite Ou VEMS < 50% valeur prédite avec insuffisance respiratoire chronique	Dyspnée au moindre effort ou dyspnée de repos

Tableau 1 : Classification spirométrique de la BPCO d'après GOLD 2007 (1)

D'après les récentes recommandations de la GOLD en 2011, l'évaluation du patient BPCO doit toujours inclure les symptômes, le degré d'obstruction, les antécédents d'exacerbations et les comorbidités. Une nouvelle classification des patients BPCO a donc été proposée par GOLD, intégrant les symptômes ressentis par le patient, qui sont quantifiés au moyen du *COPD Assessment Test* (CAT) et de l'échelle de

dyspnée modifiée «*Medical Research Council*» (mMRC) (cf. Annexe 1), la spirométrie et le nombre d'exacerbations au cours de l'année passée. Ces trois points permettent de diviser les patients en quatre catégories A, B, C et D (Figure 1). Ainsi, d'après cette classification ABCD, les groupes A et B sont considérés comme étant à risque faible, tandis que les groupes C et D sont considérés comme étant à risque élevé (16).

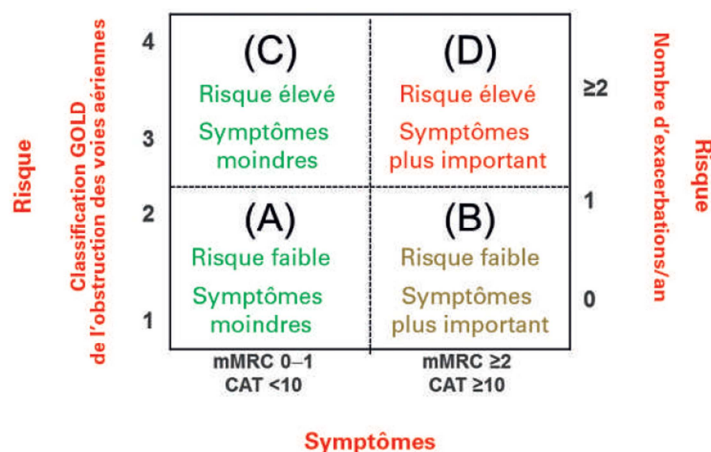


Figure 1 : Classification ABCD d'après GOLD 2011 (16)

Toutefois, l'intérêt de la classification ABCD reste discuté : une étude norvégienne basée sur des dossiers cliniques et spirométriques de patients atteints de BPCO a montré l'absence de preuve de l'intérêt de la nouvelle classification GOLD ABCD en termes de prédiction de la mortalité par rapport à la classification spirométrique GOLD (17). Une autre étude norvégienne montre que la classification ABCD semble être plus difficile à utiliser (18). Une étude danoise portant sur 6628 BPCO a montré que le groupe B pouvait avoir une survie significativement plus courte que le groupe C mais cela est sans doute dû à une comorbidité à l'origine de la dyspnée et souligne l'importance de rechercher les comorbidités cardiovasculaires dans les BPCO (19). Cette classification n'est pas encore recommandée par la société française de pneumologie à ce jour.

C. Traitement

Le traitement de la BPCO dépend du stade (Tableau 2) et repose sur le sevrage tabagique, les bronchodilatateurs inhalés (bêta₂-agonistes et anticholinergiques de courte ou de longue durée d'action), les associations fixes de bêta₂-agonistes de longue durée d'action et de corticostéroïdes inhalés dans les formes sévères à très sévères avec exacerbations fréquentes, la réhabilitation respiratoire qui fait partie intégrante du traitement et la vaccination (grippe, pneumocoque). La corticothérapie

orale au long cours n'est pas recommandée dans la BPCO stable. Il n'y a pas non plus de place pour la corticothérapie inhalée utilisée seule dans la BPCO (16).

I : Léger	II : Modéré	III : Sévère	IV : Très sévère
VEMS/CVF < 0,7			
VEMS ≥ 80% valeur prédite	50% ≤ VEMS < 80% valeurs prédite	30% ≤ VEMS < 50% valeur prédite	VEMS < 30% valeur prédite Ou VEMS < 50% valeur prédite avec insuffisance respiratoire chronique
Réduction des facteurs de risque ; vaccination antigrippale et antipneumococcique			
Bronchodilatateur de courte durée d'action (si besoin)			
Un ou plusieurs bronchodilatateurs de longue durée d'action Réhabilitation respiratoire			
Glucocorticoïdes inhalés sous forme d'association fixe si exacerbations répétées* (VEMS < 60 % pour salmétérol/fluticasone)			Oxygénothérapie longue durée si insuffisance respiratoire chronique Traitements chirurgicaux
* Les glucocorticoïdes inhalés seuls n'ont pas l'AMM en France			

Tableau 2 : Schéma général du traitement de la BPCO (15)

D. Épidémiologie

La prévalence de la BPCO en France est difficile à estimer en raison du sous-diagnostic et de la complexité à réaliser des épreuves fonctionnelles respiratoires dans le cadre d'études épidémiologiques. Elle est de l'ordre de 5 à 10 % des adultes de plus de 45 ans en France (20). Les données des certificats de décès ont mis en évidence une augmentation des taux de mortalité chez les femmes et une stabilisation chez les hommes entre 1979 et 2000. En 2006, la mortalité liée à la BPCO était évaluée à 16500 personnes (20).

Les enquêtes régionales montrent de fortes disparités entre le Nord-Pas de Calais et les autres régions. La carte suivante (Figure 2) extraite de la publication de l'InVS dans le Bulletin épidémiologique hebdomadaire de juillet 2007 (21), sur l'indice de surmortalité par région correspondant à la différence relative entre le taux moyen annuel régional et le taux moyen annuel national illustre les disparités de mortalité.

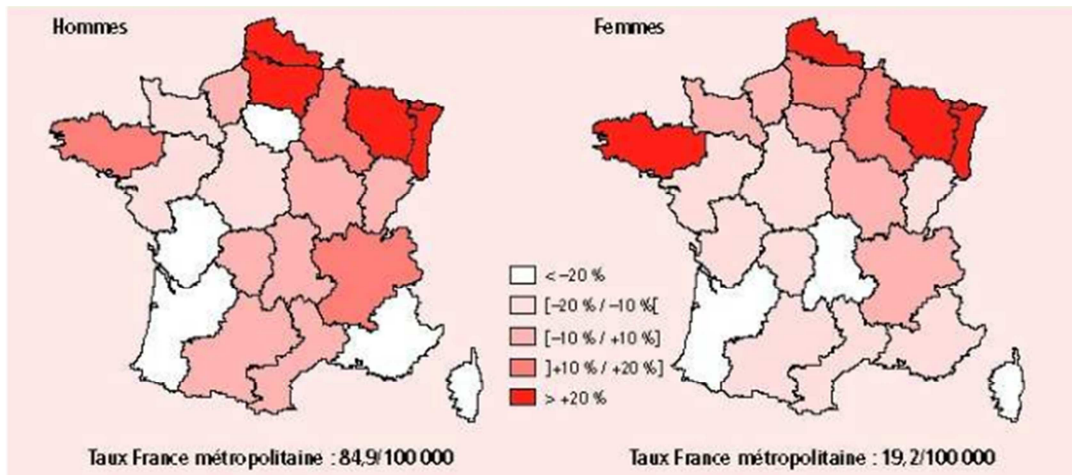


Figure 2 : Indice de surmortalité par région, France, 2000-2003 (21)

Le Nord et l'Est sont plus atteints que les autres régions, ainsi que la Bretagne chez les femmes. Le Nord-Pas de Calais cumule en fait les difficultés : tabagisme plus important, mauvaise qualité de l'air, fréquence de l'exposition professionnelle, niveau de vie plus bas, moindre consommation d'aliments riches en antioxydants, marquant un risque globalement plus élevé de développer une BPCO (22).

Dans l'étude européenne ECRHS (*European Community Respiratory Health Survey*), la prévalence des symptômes respiratoires (toux ou expectoration chronique) avec une spirométrie normale en France était parmi les plus faibles d'Europe de 9,2 % contre 8 % aux Pays-Bas, 9,8 % en Grande-Bretagne, 10,4 % en Italie, 23,7 % en Espagne. La prévalence de la BPCO au stade 1 ou plus de la classification GOLD dans cette classe d'âge était de 1,5 % variant de 0,9 % en Italie à 7,4 % pour la Suisse. Toutefois, il convient de souligner que cette étude concernait uniquement des adultes jeunes. Les résultats obtenus permettent d'illustrer les variations selon le pays, mais pas d'estimer la prévalence de la maladie (23). Dans l'étude *Confronting COPD International Survey*, la France était également le pays d'Europe ayant la plus faible prévalence (BC ou diagnostic connu de BPCO ou de BC) (24).

Dans le monde, Il existe de grandes variations de prévalence de la BPCO dans les études sur le sujet parues entre 1962 et 2001 qui s'expliquent d'une part par l'hétérogénéité des populations étudiées (tranches d'âge, groupes de fumeurs) et d'autre part par l'hétérogénéité des méthodes employées pour diagnostiquer la BPCO (symptômes, spirométrie) (21). L'étude internationale BOLD (*Burden Of Obstructive Lung Disease*) a toutefois utilisé une méthodologie standardisée rigoureuse en se basant sur les critères spirométriques et a porté sur 9 425 patients dans 12 pays. Ces données donnent des informations grossièrement comparables

entre les pays sur la prévalence de la BPCO avec toutefois une prévalence plus élevée dans certains pays du monde comme en Afrique du Sud. De même, si la prévalence est généralement plus élevée chez les hommes que chez les femmes, l'inverse est noté dans certains pays tels qu'aux États-Unis, en Australie et en Autriche (25). L'étude PLATINO (*Proyecto Latinoamericano de Investigación en Obstrucción Pulmonar*) s'est intéressée à la prévalence de la BPCO dans 5 villes d'Amérique latine situées dans des pays différents : Brésil, Chili, Mexique, Uruguay et Venezuela. Ces données indiquent que la prévalence de la BC était élevée dans cette population : de 20 à 30 % de la population (26).

LA BPCO constitue un problème de santé publique majeure par le nombre de personnes touchées, le handicap dont ces personnes sont affectées, leur mortalité et les dépenses de santé nécessaires pour leur prise en charge. Elle pourrait devenir la troisième cause de mortalité dans le monde d'ici 2020 d'après la *Global Burden of Disease Study* (2).

E. Les exacerbations de la BPCO

L'exacerbation de BPCO est un événement aigu caractérisé par une aggravation des symptômes respiratoires au-delà des variations quotidiennes et qui conduit à une modification thérapeutique. Le diagnostic des exacerbations aiguës de BPCO (EABPCO) repose exclusivement sur la clinique : augmentation de la dyspnée, de la toux, du volume de l'expectoration ou modification de l'expectoration (aspect purulent). L'exacerbation peut être un mode de découverte de la BPCO (1).

1. Physiopathologie et origine des exacerbations

D'un point de vue physiopathologique, les EABPCO sont associées à une augmentation de l'inflammation des voies respiratoires supérieures et inférieures et de l'inflammation systémique. La réponse inflammatoire des voies respiratoires pendant l'exacerbation provoque œdème, bronchospasme, augmentation de la production des expectorations, conduisant à une aggravation de la limitation du flux d'air et au développement d'une hyperinflation (6). Des études montrent qu'il y a un lien entre l'augmentation de l'inflammation des voies aériennes et la colonisation des voies aériennes des patients atteints de BPCO par des micro-organismes pathogènes potentiels en particulier des bactéries et des virus (27,28).

Les trois quarts des EABPCO sont d'origine infectieuse : bactérienne, virale ou mixte. La pollution de l'air est parfois à l'origine de l'exacerbation. L'étude APHEA

(*Air Pollution and Health: European Approach*) dans 6 villes européennes reporte un effet significatif du niveau de pollution de l'air sur les hospitalisations des patients BPCO (29). Dans un certain nombre de cas, la cause de l'exacerbation n'est pas identifiée.

Les exacerbations d'origine bactérienne sont évoquées en cas de purulence (coloration verdâtre) récente ou majorée de l'expectoration. Les bactéries sont retrouvées dans les expectorations des EABPCO dans 42% à 69,6% en fonction des études (30–32). Toutefois, le rôle précis des bactéries dans les EABPCO est difficile à évaluer car ce sont les mêmes bactéries qui colonisent les voies respiratoires des patients BPCO à l'état stable à savoir *Haemophilus influenzae*, *Streptococcus pneumoniae*, *Moraxella catarrhalis* et *Pseudomonas aeruginosa* (6). Dans l'étude de Wilkinson *et al.* menée chez des patients atteints de BPCO modérée à sévère, une colonisation bactérienne dans les expectorations a été observée chez 48,2% des patients en état stable. Pendant l'exacerbation, 69,6% des exacerbations étaient associées à des bactéries (30). La preuve de l'implication des bactéries dans les exacerbations provient de l'efficacité de l'antibiothérapie administrée en cas de purulence de l'exacerbation. La prévalence des bactéries responsables des exacerbations diffère en fonction des études et des moyens de détection utilisés (culture ou qPCR) (30,32,33). Globalement, la bactérie la plus fréquente est *Haemophilus influenzae* (19,7 à 37,5%), suivie de *Streptococcus pneumoniae* (14,3 à 25%) et *Moraxella catarrhalis* (14,3 à 19,2%). *Pseudomonas aeruginosa* est plus impliqué chez les patients atteints de BPCO sévère (33). Des bactéries atypiques comme *Chlamydia pneumoniae*, *Legionella pneumophila* et *Mycoplasma pneumoniae* ont également été retrouvées dans les expectorations de patients présentant une EABPCO, mais une étude n'a pas trouvé de rôle pour ces trois bactéries atypiques dans les exacerbations (34).

Les exacerbations d'origine virale sont souvent précédées de symptômes ORL (rhume, rhinorrhée) dans un contexte épidémique hivernal. Le taux de détection des virus respiratoires dans les expectorations des patients présentant une EABPCO varie de 22% à 57% (4,35–38,31). Une revue récente de 19 études de prévalence des virus respiratoires chez les patients atteints d'EABPCO regroupant 1728 patients a montré que les Rhino/Entérovirus (16,39%), le Virus Respiratoire Syncytial (VRS) (9,90%) et le virus de la grippe (7,83%) sont les virus les plus répandus. D'autres virus sont impliqués avec des taux inférieurs de détection : Coronavirus (4,08%) et *Para-influenza* (3,35%). Les Adénovirus (2,07%), le hMPV (2,78%) et Bocavirus

(0,56%) semblent être de rares agents responsables d'EABPCO. Cette même revue montre la plus grande prévalence des virus dans les voies respiratoires inférieures par rapport aux voies respiratoires supérieures (39). Les exacerbations déclenchées par des virus respiratoires sont plus sévères, associées à des temps de récupération longs, et à un risque plus élevé d'hospitalisations que les exacerbations pour lesquelles les virus respiratoires ne sont pas détectés (6).

Enfin, les co-infections bactériennes et virales dans les EABPCO existent et sont associées à un plus grand affaiblissement de la fonction pulmonaire et à plus d'hospitalisations (40).

2. Prise en charge

La prise en charge des EABPCO débute par la recherche des critères d'hospitalisation (Tableau 3) et de la cause de l'exacerbation, la purulence fait évoquer une origine bactérienne. Le traitement des EABPCO est celui de la cause (antibiotiques en cas d'infection bactérienne) et des symptômes (bronchodilatateurs). Il associera éventuellement une corticothérapie par voie orale en cas de signes de gravité ou une amélioration insuffisante après 48 heures, une oxygénothérapie éventuelle et une assistance ventilatoire mécanique en cas d'acidose respiratoire non compensée. La gravité des exacerbations est généralement considérée comme légère quand les exacerbations de symptômes respiratoires nécessitent un changement du traitement inhalé par le patient, modérée quand les exacerbations de symptômes respiratoires nécessitent une intervention médicale comprenant un traitement court par antibiotiques et/ou corticothérapie orale, et sévère quand les exacerbations des symptômes respiratoires nécessitent une hospitalisation (16). En cas d'exacerbation sévère, le pronostic vital peut être mis en jeu.

Critères d'hospitalisation des exacerbations de BPCO
Sujet âgé (> 70 ans)
Présence de comorbidités
BPCO sévère (stade III) ou très sévère (stade IV)
Signes cliniques ou gazométriques de gravité immédiate
Nécessité d'une oxygénothérapie
Dégradation rapide
Augmentation marquée des symptômes (dyspnée de repos) ou dégradation majeure par rapport à l'état de base (cyanose, œdèmes des membres inférieurs, troubles de la conscience)
Exacerbations fréquentes ou épisode récent d'évolution défavorable
Difficulté diagnostique
Patient isolé, aides à domicile insuffisantes

Tableau 3 : Critères d'hospitalisation des exacerbations d'après l'HAS (41)

Les épisodes d'exacerbation ont donc un impact économique important : les hospitalisations pour exacerbations représentent la part la plus importante des coûts imputables aux patients atteints de BPCO (3). De plus, elles sont associées à une mortalité et morbidité importantes (6).

S'il existe des preuves de l'implication des bactéries et des virus dans les EABPCO, le rôle potentiel de la colonisation et de l'infection fongique est cependant peu documenté.

II. *Aspergillus* et infections aspergillaires au cours de la BPCO

A. Taxonomie des *Aspergillus*

Le genre *Aspergillus* appartient au règne des *Fungi*, au phylum des *Ascomycota*, à la classe des Eurotiomycètes, à l'ordre des *Eurotiales* et à la famille des *Trichocomaceae* (42). Il s'agit de champignons microscopiques (micromycètes) filamenteux ou moisissures, au mycélium cloisonné (septomycètes) hyalins présentant une reproduction sexuée avec formation d'asques contenant chacun 8 ascospores (ascomycètes), et une reproduction asexuée avec formation de structures conidiogènes (cellules productrices des conidies) spécialisées appelées phialides. Ces dernières sont organisées en « têtes aspergillaires », qui caractérisent le genre *Aspergillus* (43). Raper et Fennell, en 1965, avaient recensé environ 150 espèces décrites sur des critères essentiellement morphologiques (macroscopie et microscopie des cultures). Parmi elles, *Aspergillus fumigatus* est l'espèce la plus fréquemment isolée en pathologie humaine, suivie d'*A. flavus*, *A. niger*, *A. terreus* et *A. nidulans* (44). Depuis, l'utilisation des techniques de biologie moléculaire, notamment le séquençage multilocus de gènes conservés (calmoduline, β -tubuline, actine, ARN polymérase 2 et ARN ribosomique) a permis de réviser totalement la classification des *Aspergillus* et de décrire de nouvelles espèces. Actuellement, plus de 300 espèces sont décrites (45). Des sous-genres et des sections ont été créés en lien avec leur correspondant téléomorphe (sexué) (46). Les dernières révisions de la nomenclature regroupent les *Aspergillus* en 4 sous-genres et 19 sections (Tableau 4) (47).

Sous-genre	Section	Téléomorphe
<i>Aspergillus</i>	<i>Aspergillus</i> *	<i>Eurotium</i>
	<i>Restricti</i>	<i>Eurotium</i>
<i>Circumdati</i>	<i>Candidi</i> *	
	<i>Circumdati</i> *	<i>Neopetromyces</i>
	<i>Flavi</i> *	<i>Petromyces</i>
	<i>Flavipedes</i>	<i>Fennellia</i>
	<i>Nigri</i> *	
	<i>Terrei</i> *	
<i>Fumigati</i>	<i>Cervini</i>	
	<i>Clavati</i>	<i>Neocarpenteles, Dichotomomyces</i>
	<i>Fumigati</i> *	<i>Neosartorya</i>
<i>Nidulantes</i>	<i>Aeni</i>	<i>Emericella</i>
	<i>Bispori</i>	
	<i>Cremei</i>	<i>Chaetosartorya</i>
	<i>Nidulantes</i> *	<i>Emericella</i>
	<i>Ochraceorosei</i>	
	<i>Silvati</i>	
	<i>Sparsi</i>	
	<i>Usti</i> *	<i>Emericella</i>

Tableau 4 : Classification infragénérique du genre *Aspergillus* (47)
 *Sections où l'on retrouve des espèces impliquées en pathologie humaine

La section *Fumigati* qui inclut *A. fumigatus* comprend 33 espèces (Figure 3) (48). De nombreuses espèces ont été récemment identifiées par séquençage multilocus des gènes conservés précédemment cités (49–51). Ainsi, *A. lentulus*, très proche morphologiquement d'*A. fumigatus*, apparaît naturellement résistant à de nombreux antifongiques contrairement à *A. fumigatus sensu stricto* qui est habituellement sensible à tous les antifongiques. D'autres espèces de la section *Fumigati* dont *A. viridinutans*, *A. fumigatiaffinis*, *Neosartorya pseudofischeri* et *N. udagawae* ont également été identifiées grâce au séquençage multilocus après avoir été considérées à tort comme *A. fumigatus* en se basant uniquement sur les critères morphologiques (50,52,53). De plus, des résistances *in vitro* aux antifongiques ont aussi été rapportées pour ces espèces (50,51).

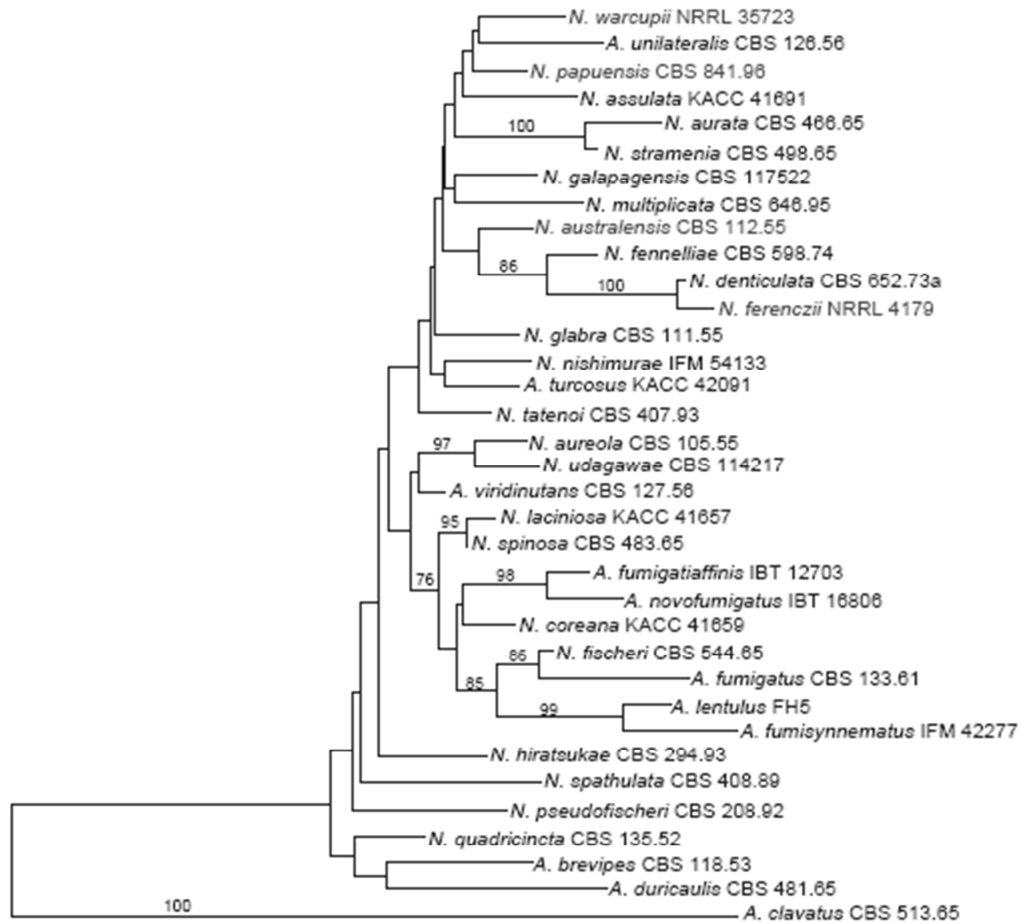


Figure 3 : Espèces de la section *Fumigati* du genre *Aspergillus* (arbre phylogénétique basé sur le gène de la β -tubuline) (48)

Le séquençage du génome d'*A. fumigatus* a été réalisé en 2005 (54), et la forme sexuée d'*A. fumigatus*, longtemps inconnue, a été récemment décrite : *Neosartorya fumigata* (55). À côté des stades asexués ou anamorphes, les *Aspergillus* peuvent aussi être nommés par leurs stades sexués (Tableau 4). À noter qu'un même genre téléomorphe peut avoir ses anamorphes dans différentes sections.

B. Identification morphologique

1. Morphologie macroscopique : caractères cultureux

Les critères macroscopiques pour l'identification d'espèce comprennent la vitesse de pousse, l'aspect et la couleur des colonies recto et verso (Tableau 5). L'optimum thermique de croissance est un critère utile pour certaines espèces thermophiles comme *A. fumigatus* (56).

Les *Aspergillus* ont une croissance plus ou moins rapide sur milieu de Sabouraud additionné d'antibiotiques. Leur pousse est inhibée par le cycloheximide (actidione). Si nécessaire, leur fructification peut être stimulée par repiquage de la colonie sur gélose à l'extrait de malt (*Malt Extract Agar* MEA) ou sur milieu de Czapek qui

constituent les milieux de référence pour ces champignons. Après 24 à 48 heures de culture, on observe des colonies plates, formées de courts filaments aériens blancs. Les colonies prennent leur couleur caractéristique après 48 à 96 heures avec la maturation des spores (Figure 4).

Caractères morphologiques	<i>A. fumigatus</i>	<i>A. flavus</i>	<i>A. nidulans</i>	<i>A. niger</i>	<i>A. terreus</i>	<i>A. versicolor</i>
Culture recto	Poudreuse Vert-bleuté à gris noirâtre	Duveteuse Vert jaune	Duveteuse à poudreuse Vert cresson	Granuleuse Noire	Duveteuse à poudreuse Blanc puis jaune ocre	Blanc puis de couleur varié : rosée, jaunâtre ou verte
Culture verso	Incolore, jaune, vert ou brun selon les souches	Incolore, rosé ou brun-rouge foncé	Pourpre, rougeâtre	Incolore à jaune pâle	Ocre à rouge	Incolore ou variant du jaune au brun
Conditions de croissance	Croissance très rapide en 24-48h Optimum thermique de 40-42°C (pousse jusqu'à 57°C)	Croissance rapide en 2-3 jours Optimum thermique à 37°C	Croissance rapide en 3-5 jours Optimum thermique à 25-30°C (pousse aussi à 37°C)	Croissance rapide en 2-3 jours Optimum thermique à 25-30°C (pousse jusqu'à 42°C)	Croissance rapide en 3-5 jours Optimum thermique à 25-30°C (pousse aussi à 37°C)	Croissance lente en 5-7 jours Optimum thermique à 25-30°C (pousse jusqu'à 40°C)

Tableau 5 : Caractères macroscopiques des *Aspergillus* (56)

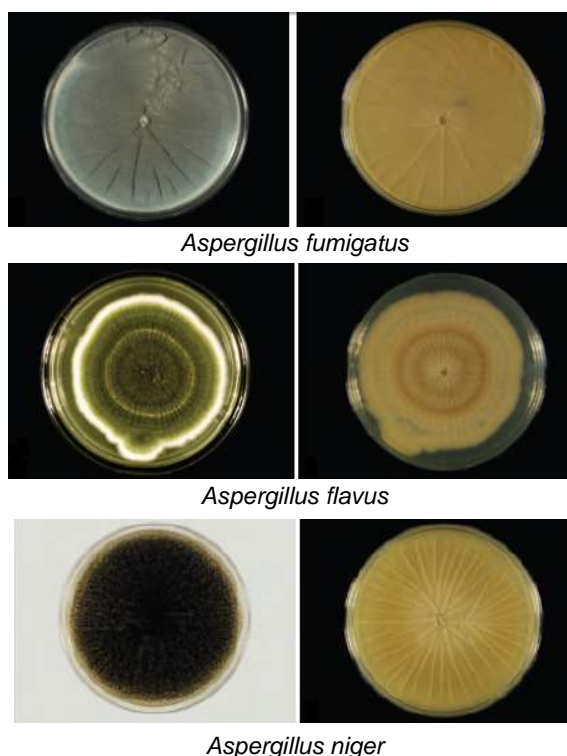


Figure 4 : Aspect macroscopique de cultures d'*Aspergillus* sur milieu Sabouraud, recto (gauche) et verso (droite) (56)

2. Morphologie microscopique

L'identification microscopique d'*Aspergillus* repose sur l'observation des formes asexuées des champignons au microscope à l'objectif 20x ou 40x. Les éléments sont observés en prélevant les colonies filamenteuses et poudreuses avec un scotch. Elles sont déposées ensuite dans une goutte de bleu de lactophénol entre lame et lamelle. Les filaments mycéliens, les organes de fructification et les spores sont ensuite analysés (56).

Le genre *Aspergillus* est caractérisé par un thalle végétatif formé de filaments mycéliens, ou hyphes. Les conidiophores sont produits à partir des hyphes végétatifs et se terminent par une vésicule portant les cellules de la conidiogenèse, les phialides. Ces phialides sont insérées soit directement sur la vésicule, soit sur les métules. Elles produisent les spores ou conidies nécessaires à la reproduction asexuée du champignon. L'ensemble vésicule, phialide, conidies forme la tête aspergillaire qui caractérise le genre *Aspergillus* (Figure 5). Les spores sont toujours unicellulaires, de forme variable, mesurant 2 à 5 μm de diamètre et sont plus ou moins pigmentées.

Le Tableau 6 résume les principaux critères d'identification microscopique d'espèce d'*Aspergillus*.

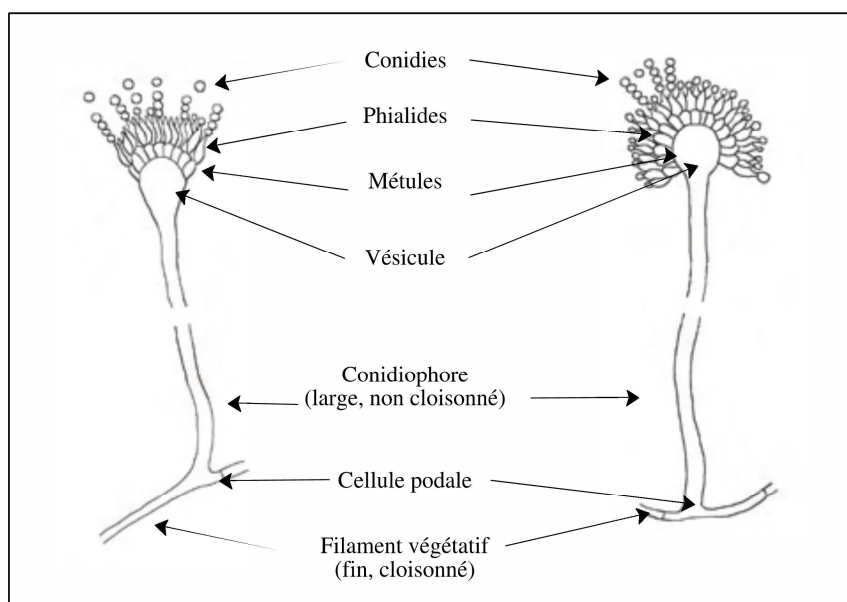


Figure 5 : Schéma des têtes aspergillaires (56)

Caractères morphologiques	<i>A. fumigatus</i>	<i>A. flavus</i>	<i>A. nidulans</i>	<i>A. niger</i>	<i>A. terreus</i>	<i>A. versicolor</i>
Conidiophore	Court, 300 µm, lisse et incolore, avec évasement progressif au sommet	Long, 1 mm à 2,5mm, verruqueux avec aspérités	Brun, lisse, sinueux, très petit (75 à 100 µm)	Lisse, hyalin ou brunâtre, très long (1.5 à 3 mm)	Lisse, incolore, court, 100 à 250 µm	Lisse, jaunâtre, long (500 à 700 µm)
Vésicule	Hémisphérique, 20 à 30 µm	Sphérique, 25 à 45 µm	Sphérique	Globuleuse, 30 à 100 µm	Globuleuse	Ovale, 12-16 µm
Phialides	Directement portées sur la vésicule, dressées, densément groupées	Directement sur la vésicule ou portées par des métules	Portées par des métules, sur la partie supérieure de la vésicule	Portées par des métules, disposées sur tout le pourtour de la vésicule	Portées par des métules, sur la partie supérieure de la vésicule	Portées par des métules, disposées sur tout le pourtour de la vésicule
Conidies	Globuleuses, vertes, échinulées, petites (2,5 à 3 µm)	Globuleuses à subglobuleuses, vert pale, échinulées, 3,5 à 4,5 µm	Rondes, vertes, échinulées. Souvent disposées en chaîne, 3-3,5 µm	Globuleuses, 3,5-5 µm, brunes, échinulées à très verruqueuses, souvent disposées en chaîne	Lisses, globuleuses à légèrement elliptiques, petites (1,5 à 2,5 µm)	Globuleuses, 2 à 3,5µm, échinulées
Tête aspergillaire	Unisériée, en colonne compacte assez grande (jusqu'à 100 µm)	Bisériée ou unisériée, (300-400 µm), radiée	Bisériée en colonne, courte et compacte	Bisériée ou radiée, noire à maturité	Bisériée, en colonne évasée (aspect d'éventail)	Bisériée, radiée N.B : Présence de pinceaux évoquant <i>Penicillium</i>

Tableau 6 : Principales caractéristiques microscopiques des espèces d'*Aspergillus* (56)

Certaines espèces de la section *Fumigati* dont *A. novofumigatus*, *A. fumigati*affinis, *A. fumisynnematus* et *A. lentulus* ont une morphologie très proche d'*A. fumigatus* (48), d'où l'importance des outils de biologie moléculaire pour les identifier. L'espèce la plus fréquemment retrouvée dans les prélèvements cliniques est *A. lentulus* (49,57–60). Au niveau macroscopique, *A. lentulus* est caractérisé par des colonies floconneuses de couleur blanche entrecoupées de colonies vertes au recto (Figure 6). Au verso, les colonies sont de couleur jaune. La sporulation pauvre et lente a donné le nom à l'espèce (*lentulus*). *A. lentulus* pousse faiblement à 45°C et ne pousse pas à 48°C, contrairement à *A. fumigatus*. Au niveau microscopique, le conidiophore est à paroi lisse, incolore, de 250 à 300 µm de long, les vésicules sont plus petites que *A. fumigatus*, de 8-10 µm de large, hyalines. Les phialides sont plus courtes, unisériées et les conidies sont similaires à *A. fumigatus* : bleues vertes, globuleuses et rugueuses, de 2,5 à 3 µm de diamètre (Figure 6) (49).

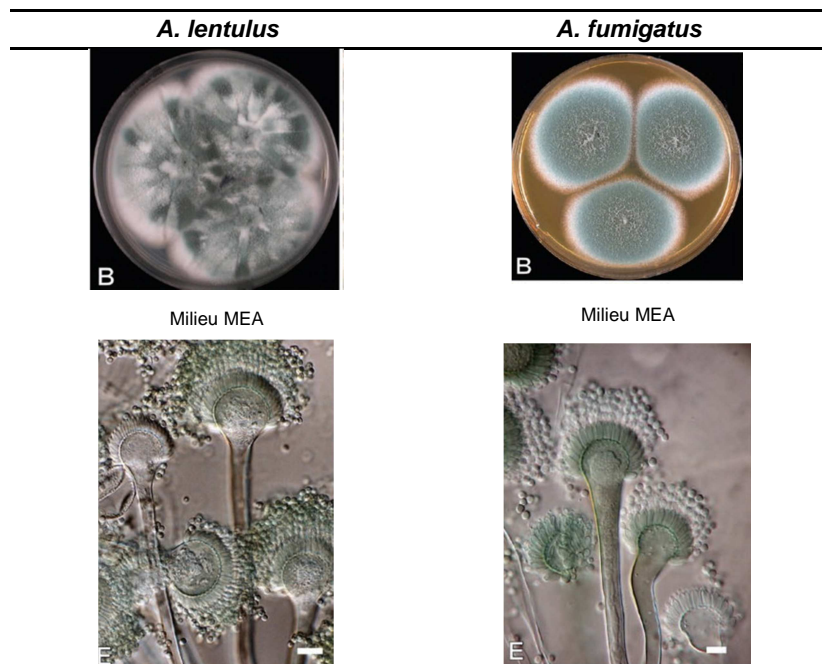


Figure 6 : Morphologies macroscopique et microscopique d'*A. lentulus* et d'*A.fumigatus* (48)

C. Réservoirs environnementaux et mode de contamination

Les *Aspergillus* sont des champignons cosmopolites très répandus dans l'environnement, où ils vivent en saprophytes colonisant de nombreux écosystèmes (43). Ubiquistes, on les rencontre aussi bien en milieu rural (dans les silos à grains, foin, paille tassée et humide, céréales ou fruits moisissés, matières organiques d'origine végétale en décomposition, compost, terreau, etc.) qu'en milieu urbain, et aussi bien à l'extérieur qu'à l'intérieur des habitations (poussières accumulées derrière les meubles, les réfrigérateurs, sur les cadres, dans les faux plafonds et les conduits d'aération, ou dans la terre des plantes en pot). Les *Aspergillus* sont également rencontrés sur certains fruits et légumes, dans le pain, le poivre, les épices, le thé et aliments lyophilisés. Ils sont aussi présents dans l'eau et l'air (61).

La recherche d'*Aspergillus* et plus largement des moisissures dans l'environnement intérieur peut se faire sur 3 types de prélèvements : les prélèvements d'air (par impaction sur gélose notamment), les prélèvements de surface (par des boîtes gélosées contacts ou des écouvillons) et les prélèvements de poussières (62). Ces dernières années, des collecteurs électrostatiques de poussières ont été proposés afin de combiner certains avantages des prélèvements d'air et de poussières (63–65). A partir de ces prélèvements environnementaux, la mesure des concentrations de spores fongiques s'effectue généralement par microscopie ou mise en culture.

Plus récemment, des techniques de qPCR, plus rapides et plus sensibles que la culture, se sont fortement développées dans les études environnementales (66,67). Les spores d'*Aspergillus* sont naturellement présentes dans l'air extérieur, à une concentration estimée entre 1 et 100 spores/m³ (68). Les enquêtes aéromycologiques montrent qu'*Aspergillus* représentent 1 à 5% des isollements des moisissures loin derrière *Cladosporium* (20 à 30%), *Alternaria* (9 à 18%) et *Penicillium* (6 à 8%) (69). Les spores aspergillaires pénètrent aussi facilement dans les locaux y compris les hôpitaux, par l'intermédiaire des occupants ou via les systèmes de ventilation dans lesquels elles peuvent exploiter des niches écologiques diverses. En milieu hospitalier, la réalisation de travaux présente un risque d'aérodispersion de spores fongiques, et par conséquent un facteur de risque de contamination pour les patients immunodéprimés hospitalisés (70). *Aspergillus* est présent dans 50% des habitations et arrive en troisième position après *Cladosporium* (83%) et *Penicillium* (75%) (71). L'humidité favorise leur survie et leur développement, notamment dans l'environnement intérieur. Une étude dans les logements insalubres dans l'est de la France a montré que les concentrations en moisissures étaient significativement plus élevées que dans les logements sains et que les moisissures les plus fréquemment isolées étaient *Penicillium*, *Cladosporium* et *Aspergillus versicolor* (72).

Les spores d'*Aspergillus* étant en suspension dans l'air, leur inhalation est obligatoire et quotidienne. On évalue de 2000 à 3000 le nombre de spores d'*A. fumigatus* inhalées chaque mois (73). La contamination se fait donc principalement par voie aérienne, c'est donc l'appareil broncho-pulmonaire qui est le plus fréquemment concerné par la maladie aspergillaire.

D. Pouvoir pathogène d'*A. fumigatus* dans la BPCO

L'infection aspergillaire est limitée dans la population générale en dépit d'une inhalation régulière de spores car elles sont éliminées par le tapis mucociliaire chez l'hôte immunocompétent. Les *Aspergillus* sont des pathogènes opportunistes et leur spectre clinique dépend de la réceptivité de l'hôte, de facteurs favorisants locaux (cavités résiduelles pulmonaires, lésions bronchiques et pulmonaires) et généraux (immunodépression, corticoïdes, immunosuppresseurs, neutropénie, allogreffe de moelle osseuse) de l'hôte et de l'exposition fongique dans l'environnement (quantité et virulence des spores inhalées) (74). Kosmidis et Denning (7) considèrent les différents tableaux cliniques comme un spectre continu de maladies, une forme

pouvant évoluer dans une autre selon le degré d'immunodépression. Ils distinguent :

- La colonisation saprophyte bronchique ;
- Les aspergilloses allergiques comprenant l'aspergillose broncho-pulmonaire allergique (ABPA) et l'alvéolite allergique extrinsèque ;
- Les aspergilloses trachéobronchiques ;
- Les aspergilloses pulmonaires chroniques (APC) comprenant l'aspergillome (cavité préformée), l'aspergillose pulmonaire chronique nécrosante (APCN) et l'aspergillose pulmonaire chronique cavitaire (APCC) ;
- L'aspergillose pulmonaire invasive (API).

Des études récentes ont montré que les patients atteints de BPCO étaient un groupe à risque de développer une aspergillose pulmonaire aiguë ou chronique (7,9). De plus, l'isolement d'*A. fumigatus* dans les prélèvements respiratoires de ces patients est fréquent (75), mais les données concernant sa signification sont limitées. La colonisation par *Aspergillus* pourrait être associée à une probabilité élevée d'avoir une API (76) et une mortalité plus élevée (77).

1. Colonisation saprophyte bronchique

La colonisation est définie par l'isolement répété d'*Aspergillus* à partir de prélèvements des voies respiratoires, sans preuve d'infection à *Aspergillus*. Elle correspond à une atteinte saprophyte sans invasion tissulaire (7). La distinction entre colonisation et infection repose sur la clinique, bien qu'un signal plus fort en qPCR peut indiquer une infection plutôt qu'une colonisation (7).

Les patients atteints de BPCO sont une population à risque de colonisation par *Aspergillus* (8,78). Dans une étude portant sur des patients hospitalisés en réanimation, l'isolement d'*Aspergillus* à partir de prélèvements respiratoires était associé à la fois au diagnostic sous-jacent de BPCO (Odds Ratio : OR=2.9) et au traitement par corticoïdes (OR=4.5) (79). La colonisation peut correspondre à un passage temporaire d'*Aspergillus* dans les voies respiratoires, à un portage bénin à long terme ou un signe précédent l'API. Il y a peu d'études prospectives sur la prévalence de la colonisation des voies respiratoires chez les patients présentant une EABPCO, il est donc difficile de définir l'influence d'*Aspergillus* comme agent causal d'exacerbation. Récemment, Huerta *et al.* ont étudié la prévalence de colonisation par *Aspergillus* dans les expectorations d'une cohorte prospective de patients BPCO hospitalisés pour une EABPCO entre janvier 2008 et décembre 2009 : elle était de 16,6% à l'admission et de 14,1% après une année de suivi (80).

2. Aspergillose pulmonaire invasive

L'API est définie par une invasion aspergillaire bronchique plus ou moins distale, un envahissement du parenchyme pulmonaire et/ou vasculaire occasionnant un risque de dissémination viscérale.

a) Facteurs de risque

Elle est fréquemment observée chez les patients présentant une hémopathie maligne, une greffe de moelle osseuse allogénique, en fin du stade de l'infection VIH, une transplantation d'organes solides et en cas de granulomatose chronique (81–83). En dehors de ces groupes à risque d'immunodéprimés, on décrit de plus en plus de cas chez des patients atteints de maladies broncho-pulmonaires chroniques, en particulier de BPCO (81,9,76). En effet, la BPCO provoque une altération de l'épithélium bronchique favorisant la colonisation fongique et une diminution de l'immunité locale, notamment des fonctions phagocytaires des macrophages (9). L'utilisation de la corticothérapie par voie inhalée associée aux bronchodilatateurs dans la BPCO sévère et très sévère ou par voie orale en cas d'exacerbation de BPCO chez ces patients augmente encore le risque d'API. Une antibiothérapie à large spectre est aussi un facteur de risque d'API chez ces patients, sélectionnant l'écologie fongique (8,84). D'autres facteurs de risque sont associés au développement de l'API chez le patient atteint de BPCO : la fumée de tabac, les comorbidités fréquemment associées dont la dénutrition, l'alcoolisme et le diabète (8). Des études ont montré que certaines infections, notamment les infections virales telles que la grippe ou l'infection à CMV, peuvent précéder l'API, ce qui suggère un rôle dans l'étiologie (9). L'API chez les patients atteints de BPCO serait associée à une augmentation de la durée d'hospitalisation (85) et à une mortalité élevée de 72 à 95% (9,76,86).

b) Incidence chez les patients atteints de BPCO

Bien qu'une incidence d'environ 2% ait été rapportée par quelques études (8,76), il est difficile d'évaluer la vraie incidence de l'API chez les patients atteints de BPCO en raison de l'absence de définition cohérente des cas et de l'absence de mesures de surveillance de l'infection (9). Dans une méta-analyse de 53 études de cas fatals d'API survenus entre 1995 et 1999, 46 patients sur 1941 (1,3%) étaient porteurs d'une BPCO (87). Une autre étude sur 1850 patients hospitalisés en réanimation entre 2000 et 2003 présentant une API en dehors du cadre d'une hémopathie ou d'une tumeur solide maligne a montré que 35 patients (1,89%) présentaient une

BPCO (81). Enfin, une étude espagnole a montré que l'incidence de l'API était plus élevée aux stades avancés de la BPCO (III et IV de GOLD) (76) .

c) Diagnostic chez les patients atteints de BPCO

Le diagnostic d'API chez les patients atteints de BPCO est souvent difficile. Le principal signe clinique est une pneumonie non spécifique d'évolution défavorable sous antibiothérapie avec exacerbation de la dyspnée. Les signes radiologiques peuvent montrer l'apparition de nodules, d'excavations ou de nouveaux infiltrats alors que les signes du halo ou du croissant gazeux, pathognomoniques dans les API chez les patients d'hématologie sont rares dans la BPCO (9).

Concernant les examens mycologiques, la référence est l'isolement en culture d'*Aspergillus* par prélèvement biopsique pulmonaire, pas toujours réalisable en raison de la fonction respiratoire médiocre à ce stade. Néanmoins, l'isolement de filaments aspergillaires dans les expectorations et/ou les aspirations trachéales de ces patients signifie le développement d'une maladie aspergillaire dans un cas sur deux. Bien que les patients BPCO puissent être colonisés par *Aspergillus*, il est essentiel de reconnaître à un stade précoce la possibilité d'une API dans la BPCO en particulier chez les patients de stade IV corticodépendants. De ce fait, la présence d'*Aspergillus* dans l'expectoration ne doit pas être banalisée et mérite une exploration complémentaire. Enfin, la réalisation d'une endoscopie bronchique avec lavage broncho-alvéolaire (LBA) s'avère très contributive chez les patients BPCO. L'identification de filaments aspergillaires sera un argument décisif pour poser un diagnostic toujours difficile et décider de la mise en route du traitement (8).

Bien que les méthodes standard de détection d'*Aspergillus* (examen direct microscopique avec mise en évidence de filaments mycéliens et mise en culture) restent des outils diagnostiques majeurs (88), la PCR quantitative en temps réel (qPCR) permet aussi de détecter *Aspergillus* avec une meilleure sensibilité et une plus grande rapidité que la culture. Par ailleurs, Fraczek *et al.* ont montré que le rendement de culture et le signal de qPCR étaient plus élevés sur les prélèvements des voies respiratoires supérieures, les expectorations et les aspirations bronchiques, que sur les prélèvements distaux et dilués comme le LBA, avec une meilleure sensibilité pour la qPCR (89).

La détection d'anticorps sériques et le dosage du galactomannane (GM) orientent le diagnostic. La recherche positive d'anticorps sériques anti-*A. fumigatus* demeure un des critères diagnostiques d'API chez le BPCO proposés par Bulpa *et al.* (9), même

si ces patients corticodépendants sur le long terme peuvent présenter une réponse en anticorps affaiblie, qui pourrait limiter l'utilité d'une telle recherche chez certains patients (8). Le GM sérique a une faible sensibilité chez les patients atteints de BPCO, de l'ordre de 40-55%, contrairement aux patients atteints d'hémopathie maligne où elle est beaucoup plus élevée (71% pour les API prouvées) (8).

Le pronostic des patients atteints de BPCO présentant une API est largement inférieur à celui des patients atteints d'hémopathie maligne. Le gain pronostique obtenu chez les patients d'hématologie est corrélé à la rapidité de mise en route du traitement antifongique après une procédure diagnostique bien validée avec les critères de l'EORTC/MSG (*European Organization for Research and Treatment of Cancer/Mycoses Study Group*), non applicables chez les patients BPCO (8). Bulpa *et al.* ont proposé une définition des API chez les patients BPCO, qui identifie 4 niveaux d'infections par analogie avec les critères de l'EORTC/MSG : l'API prouvée, l'API probable, l'API possible et la colonisation (9).

III. Traitement des aspergilloses chez les patients atteints de BPCO : antifongiques utilisables et impact de l'émergence des résistances

A. Sensibilité des *Aspergillus* aux antifongiques

1. Antifongiques utilisables pour le traitement des aspergilloses

Plusieurs classes d'antifongiques sont utilisables sur les *Aspergillus* : les polyènes, les échinocandines et les azolés.

a) Les polyènes

Le chef de file des polyènes est l'amphotéricine B (AMB). C'est un antifongique fongicide à large spectre qui cible la membrane fongique. L'AMB est utilisable par voie parentérale, est néphrotoxique et donne des réactions lors de l'injection (fièvre, myalgies, nausées). Ces effets indésirables sont atténués grâce aux formes vectorisées par des lipides (AMB liposomale ou complexe lipidique d'AMB) (90). L'AMB liposomale est indiquée dans le traitement des infections fongiques invasives à *Aspergillus* de seconde intention en alternative thérapeutique en cas d'échec ou d'intolérance au voriconazole (VOR). Dans les principales études, l'AMB est efficace sur la majorité des espèces, mais la résistance primaire est reconnue chez *A. terreus* et chez certains isolats d'*A. flavus* et *A. ustus* (91,92) et plus récemment, elle a été démontrée chez certaines espèces de la section *Fumigati* dont *A. lentulus* et *A.*

fumigatiaffinis (51). Chez *A. fumigatus*, les preuves du développement de résistance acquise manquent.

b) Les échinocandines

Les échinocandines constituent la classe la plus récente parmi les antifongiques et ciblent la paroi fongique. Trois molécules sont disponibles : la caspofungine (CAS), la micafungine et l'anidulafungine. Sur les *Aspergillus*, les échinocandines sont fongistatiques. Elles sont indiquées dans l'aspergillose invasive (AI) en seconde intention chez les patients réfractaires ou intolérants à l'AMB et/ou aux azolés. Les échinocandines sont utilisables par voie parentérale et ont un excellent profil, elles sont bien tolérées, présentent peu d'effets indésirables et d'interactions médicamenteuses, et la posologie est simple ne nécessitant pas d'adaptation particulière (93). On en sait beaucoup moins sur la résistance acquise aux échinocandines. Bien que des infections à *A. fumigatus* avec des CMI élevées aient été signalées de façon sporadique (94,95), elles peuvent être sous-diagnostiquées à cause du test de sensibilité de la CAS beaucoup moins simple d'interprétation que celui des azolés.

c) Les antifongiques azolés

Les antifongiques azolés actifs sur les *Aspergillus* sont les dérivés triazolés suivants : l'itraconazole (ITZ), le voriconazole (VOR) et le posaconazole (POS). D'autres azolés puissants sont en cours d'évaluation clinique (albaconazole, ravuconazole et isavuconazole) (96).

Mécanisme d'action

Les antifongiques azolés sont des antifongiques fongicides qui ciblent la membrane fongique. Ils bloquent la voie de biosynthèse de l'ergostérol, principal stérol constituant la membrane fongique, *via* l'inhibition d'une enzyme de la superfamille des cytochromes P450, la lanostérol 14 α déméthylase ou CYP51. Ils entraînent la diminution de la synthèse de l'ergostérol, l'accumulation de stérols toxiques et des lésions membranaires du champignon (97). L'enzyme CYP51 est codée par le gène *cyp51* chez les moisissures (*erg11* chez les levures) (98). *A. fumigatus* possède 2 gènes qui codent pour l'enzyme CYP51 : les gènes *cyp51A* et *cyp51B* qui sont étroitement liés et interviennent tous les deux dans la biosynthèse de l'ergostérol (99).

Sur le plan moléculaire, un des atomes d'azote de l'antifongique (N-4) se lie à l'atome de fer de l'hème situé dans le site actif de l'enzyme du cytochrome P450 (en vert sur la Figure 7b) bloquant ainsi l'accès du ligand naturel, le lanostérol dans le site actif et donc l'activation de ce cytochrome. La modélisation de la protéine CYP51A montre la présence de deux canaux d'accès au ligand pour le lanostérol et les antifongiques azolés (*channel 1* et *2*). Xiao *et al.* ont montré que le POS et l'ITZ, antifongiques à longue chaîne latérale, empruntaient préférentiellement le canal 2 pour accéder au site actif de l'enzyme alors que le VOR, plus petite molécule interagit de façon moindre avec le canal 2 (100) (Figure 7a).

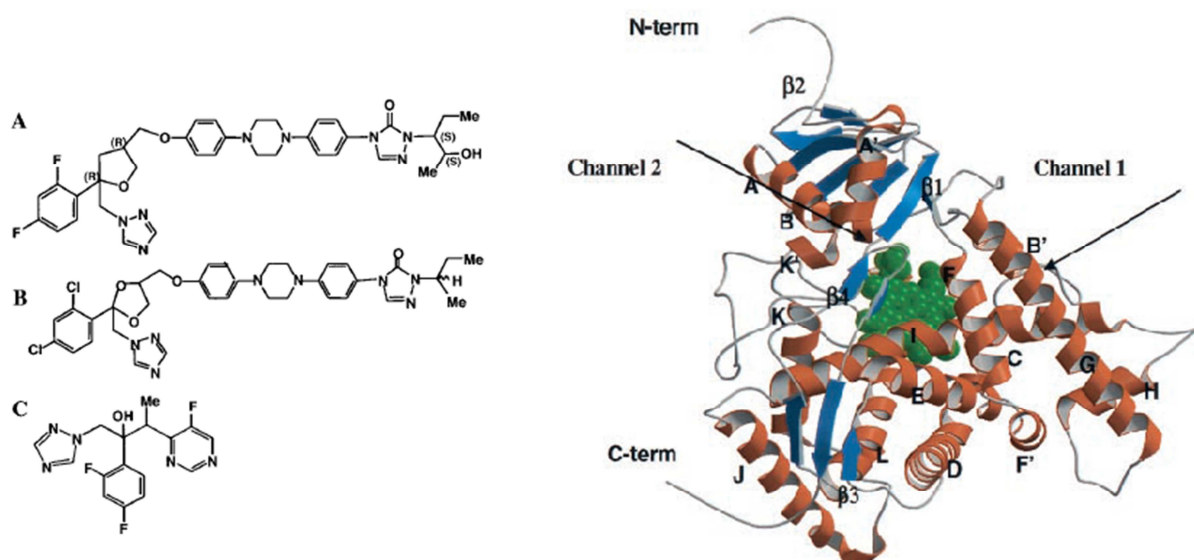


Figure 7a et 7b : Structure du POS(A), ITZ(B) et VOR(C) (7a) et représentation de leur enzyme cible CYP51A (7b) (100)

Formes disponibles et indications

L'ITZ est un triazolé disponible par voie orale et parentérale de première génération qui n'est plus utilisé en première intention dans le traitement ou la prophylaxie de l'AI. Il a été supplanté par le VOR et le POS sur des arguments d'efficacité, de biodisponibilité et de tolérance. Par contre, il reste indiqué dans l'aspergillome en traitement alternatif à la chirurgie d'exérèse, en cas d'APCC et en prophylaxie primaire chez les patients atteints de granulomatose septique chronique (101). Le VOR est un triazolé de deuxième génération à large spectre, actif sur *Aspergillus*, *Fusarium*, et certaines espèces de *Scedosporium*. Il est administrable par voie orale ou parentérale et constitue le traitement de première ligne de l'AI (102). Le POS est un triazolé de troisième génération à très large spectre avec une activité sur les levures, les moisissures incluant *Aspergillus*, *Fusarium*, et certains zygomycètes. Il est disponible uniquement par voie orale et est utilisé en traitement curatif de

deuxième intention en cas d'AI prouvées ou probables réfractaires (stabilité à J7) ou en cas d'intolérance au traitement de première intention. Le POS est également indiqué en prophylaxie chez les patients à haut risque d'AI : patients en neutropénie secondaire aux chimiothérapies pour leucémies aiguës myéloïdes et syndromes myélodysplasiques ou patients receveurs de greffe de cellules souches hématopoïétiques sous traitement immunosuppresseur à haute dose pour la maladie du greffon contre l'hôte (GVH).

2. Recommandations pour la prise en charge des aspergilloses chez les patients atteints de BPCO

Le traitement antifongique de l'API chez les patients BPCO ne fait pas l'objet de recommandations particulières, il est le même que celui des API des patients d'hématologie recommandé par la société américaine des maladies infectieuses (*Infectious Diseases Society of America*) en 2008. Le voriconazole (VOR) est le traitement de référence des API. L'amphotéricine B (AMB) liposomale est utilisé en alternative. Les traitements de seconde intention incluent les autres formulations de l'amphotéricine B (Abelcet®), la caspofungine (CAS) ou le posaconazole (POS) (103). Toutefois chez ces patients, la question de la décroissance ou de l'arrêt des corticoïdes doit être discutée (8).

Ainsi, les antifongiques triazolés tiennent une place majeure dans le traitement et la prévention des infections aspergillaires et représentent la seule classe d'antifongiques utilisable par voie orale. Bien qu'*A. fumigatus* soit naturellement sensible aux triazolés, l'émergence d'isolats d'*A. fumigatus* résistants aux azolés a été rapportée en France et dans le monde (104). Malgré la survenue de cas d'API causés par des isolats résistants chez des patients immunodéprimés et associés à une mortalité plus élevée (105), aucun cas d'aspergillose à *A. fumigatus* résistant aux azolés n'a été rapporté à ce jour chez un patient atteint de BPCO.

B. Mécanismes de résistance aux azolés

A. fumigatus est naturellement sensible aux antifongiques azolés, contrairement à des espèces de la section *Fumigati* de morphologie très voisine telles qu'*A. lentulus* et *Neosartorya udagawae* qui présentent une faible sensibilité aux azolés (106,107). Les mécanismes de résistance chez *A. fumigatus* sont donc des mécanismes de résistance acquise. Il existe un mécanisme principal de résistance acquise aux azolés : la modification de la cible des azolés, l'enzyme lanostérol 14 α déméthylase

par mutation et/ou surexpression du gène *cyp51A* (14). D'autres mécanismes de résistance comme les pompes à efflux sont décrits.

1. Mutations du gène *cyp51A*

Les mutations retrouvées le plus fréquemment sont localisées en position G54, M220 et L98 du gène *cyp51A* (Figure 9 **Erreur ! Source du renvoi introuvable.**). Elles sont responsables de substitutions induisant une modification structurale de la protéine inhibant sa liaison avec les azolés. Ces mutations sont les seules confirmées comme étant associées formellement à une résistance aux azolés par transformation d'une souche sensible avec le gène *cyp51A* muté (108). La première mutation correspond à une substitution de la glycine en position 54 (G54) du gène *cyp51A*. Les isolats cliniques présentant cette mutation montrent une résistance croisée à l'ITZ et au POS mais pas au VOR (109–111). Cela s'explique par la localisation de la mutation G54 à proximité de l'entrée du canal 2 (Figure 8), qui interagit avec les longues chaînes latérales de l'ITZ et du POS mais pas avec le VOR qui est une petite molécule et qui n'a pas besoin de cette interaction (112). La seconde mutation est localisée sur la méthionine en position 220 (M220) et est associée à une résistance à l'ITZ et une sensibilité diminuée au POS, VOR et ravuconazole (113). La troisième mutation L98H correspond à la substitution d'une leucine en histidine en position 98. Elle est associée à la répétition en tandem d'une séquence de 34 paires de base (pb) dans le promoteur du gène *cyp51A* (Tandem Repeat 34 ou TR34). Ce mécanisme moléculaire TR34/L98H, que l'on appellera mutation TR34/L98H, entraîne une augmentation jusqu'à huit fois du niveau d'expression du gène *cyp51A* et est associée à une résistance multiple à tous les antifongiques triazolés (114). La cause de la multirésistance est discutée : elle s'explique d'après Snelders *et al.* par la localisation de la leucine 98, sur une boucle structurale hautement conservée parmi les membres de la famille des protéines CYP51 (Figure 8). Ainsi, même si elle n'est pas située à proximité des canaux d'accès des ligands ou de l'hème, la substitution L98H entraînerait une augmentation de la flexibilité de cette boucle réduisant le diamètre d'entrée de tous les antifongiques au niveau des canaux d'accès (112). Cependant, en 2011, Fraczek *et al.* suggèrent comme Mellado *et al.* en 2007, que la multirésistance est uniquement due au promoteur dupliqué (région TR34) (114,115).

Génotype	Substitution Acide Aminé	Phénotype
<i>Hotspot</i>		
G54	E, K, R, V, W	R à ITZ et POS, S à VOR
M220	K, I, T, V, R	R à ITZ et POS, R ou S à VOR
L98	H	R à tous les azolés
<i>Autres mutations</i>		
N22	D	R à ITZ, autres non documentés
S52	T	R à tous les azolés
Y121	F	R VOR
G138	C, R	R à tous les azolés
Q141	H	R à tous les azolés
H147	Y	R à tous les azolés
P216	L	R à ITZ et POS, S à VOR
M236	K, T, V	R à ITZ
T289	A	R VOR
S297	T	R à ITZ et POS, S à VOR
P394	L	R à ITZ, autres non documentés
Y431	C	R à tous les azolés
G432	S	R à ITZ et POS, S à VOR
G434	C	R à tous les azolés
T440	A	R à ITZ, autres non documentés
G448	S	R à tous les azolés
Y491	H	R à ITZ, autres non documentés
F495	I	R à ITZ et POS, S à VOR
<i>Mutations trouvées dans des isolats sensibles et résistants</i>		
F46	Y	Variable
G89	G	Variable
E130	D	Variable
M172	V	Variable
N248	T	Variable
D255	E	Variable
L358	L	Variable
S400	I	Variable
E427	G, K	Variable
C454	C	Variable

Tableau 7 : Mutations du gène *cyp51A* identifiées chez les isolats d'*Aspergillus fumigatus* résistants aux azolés (104,108,116)

Les autres mutations non confirmées par transformation d'une souche sensible mais décrites comme associées à une résistance aux azolés chez des isolats d'*A. fumigatus* sont présentées dans le Tableau 7. Certaines mutations du gène *cyp51A* (E130, N248, D255, ...) ont été retrouvées dans des isolats sensibles et résistants, elles ne sont pas toujours associées à des résistances aux azolés car elles sont situées à des endroits moins stratégiques comme en périphérie de la protéine Figure 8) (112).

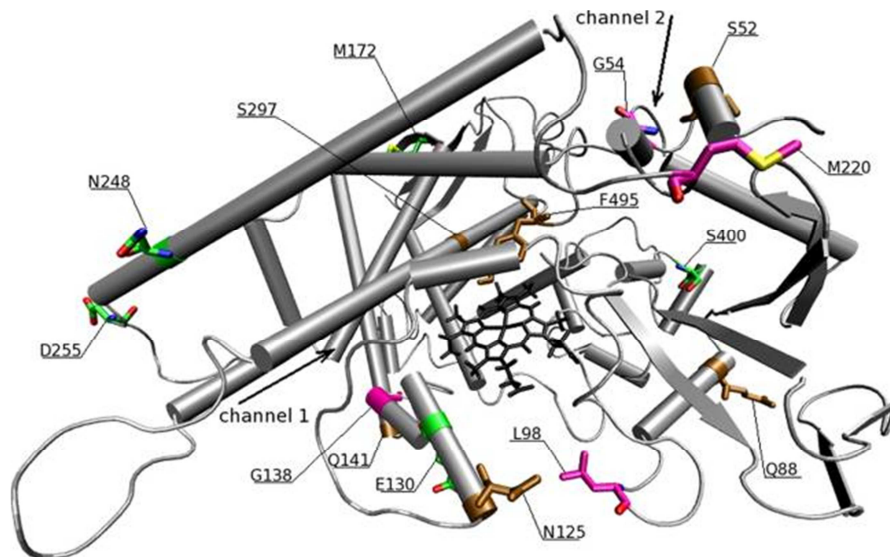


Figure 8 : Cartographie des mutations trouvées dans le gène *cyp51A* dans le modèle d'homologie de la protéine CYP51A. En pourpre: mutations corrélées à la résistance aux azolés ; en vert : mutations corrélées avec un profil sensible aux azolés ; en marron : mutations trouvées dans des isolats résistants aux azolés (112)

A noter que des mutations peuvent être associées au sein de mêmes isolats. C'est le cas du mécanisme de résistance émergent TR46/Y121F/T289A qui correspond à la répétition en tandem d'une séquence de 46 pb dans le promoteur du gène *cyp51A* associée aux 2 mutations Y121F et T289A, responsable d'une résistance élevée au VOR et associée à une augmentation des CMI de l'ITZ et du POS (Figure 9), décrit pour des isolats cliniques aux Pays-Bas, en Belgique et dans l'environnement en Inde (117–119).

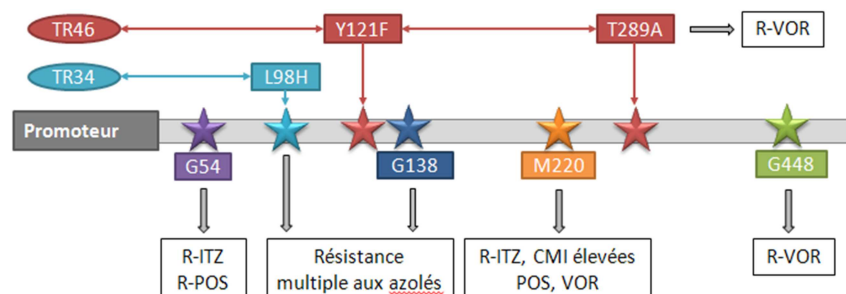


Figure 9 : Représentation des principales mutations décrites pour le gène *cyp51A* d'*A. fumigatus*

2. Autres mécanismes de résistance

Des isolats résistants d'*A. fumigatus* sans mutation du gène *cyp51A* ont été rapportés (112), suggérant d'autres mécanismes alternatifs de résistance comme la surexpression de pompes à efflux bien documentée chez *Candida albicans* (120). Deux types de pompes sont impliqués : la famille des transporteurs à *ATP Binding Cassette* (ABC transporteurs) et la famille des Super Major Facilitateurs (*Major facilitator superfamily* MFS). Les gènes codant pour ces pompes sont redondants chez *A. fumigatus* : il y a au moins 49 gènes codant pour les pompes de la famille

ABC et 278 codant pour ceux de la famille MFS. La surexpression de cinq de ces gènes a été incriminée dans la résistance aux triazolés chez *A. fumigatus* (AfuMDR1, AfuMDR2, AfuMDR3, AfuMDR4 et ATRF) (121). L'action de ces pompes à efflux a également été mentionnée dans la résistance fongique dans le biofilm, en particulier chez les patients atteints de mucoviscidose (122).

Plus récemment, l'étude de Buied *et al.* suggère la surexpression du gène *cyp51B* comme mécanisme possible de résistance aux azolés sur des isolats d'*A. fumigatus* résistants aux azolés sans mutations associées au niveau du gène *cyp51A* (123).

C. Détection de la résistance aux azolés au laboratoire

1. Détermination des CMI en milieu liquide : méthodes de référence

Les méthodes de référence américaine du *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI) et européenne de l'*European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing* (EUCAST) déterminent les concentrations minimales inhibitrices (CMI) par dilution en milieu liquide (milieu RPMI 1640 additionné de glucose à 2% pour l'EUCAST et 0.2% pour le CLSI) en microplaque pour les champignons filamenteux (taille de l'inoculum de $0,4-5 \times 10^4$ UFC/ml pour le CLSI et $2-5 \times 10^5$ UFC/ml pour l'EUCAST) (124,125).

Les CMI se déterminent par cette technique à 100% d'inhibition après 48 heures d'incubation sauf pour les échinocandines pour lesquelles le paramètre recommandé est la concentration minimale efficace (CME) car leur mode d'action sur les moisissures génère une croissance résiduelle *in vitro*. La CME correspond à la plus faible concentration conduisant à une croissance aberrante détectable par des altérations morphologiques des hyphes au microscope. Les seuils d'interprétation de l'EUCAST pour définir si une souche d'*A. fumigatus* est sensible ou résistante sont présentés dans le Tableau 8 .

CMI (mg/l)	S	R
Amphotéricine B	≤1	>2
Itraconazole	≤1	>2
Posaconazole	≤0.12	>0.25
Voriconazole	≤1	>2

Tableau 8 : Seuils d'interprétation des CMI établis par l'EUCAST pour *A. fumigatus* (126)

Ces techniques sont lourdes et mal adaptées aux tests de routine et sont donc réservées aux laboratoires spécialisés. Elles ont pour objectifs la standardisation

technique, l'établissement des seuils d'interprétation, la validation des techniques de routine, les études épidémiologiques et d'activité des nouveaux antifongiques (127).

2. Détermination des CMI en milieu gélosé : méthode Etest®

La méthode Etest® est une technique de détermination de CMI en milieu gélosé adaptée à la routine. Les Etests® (bioMérieux, Marcy l'Etoile, France) sont des bandelettes graduées imprégnées d'un gradient croissant d'antifongique. Ces bandelettes sont déposées sur une gélose préalablement ensemencée (en général un milieu RPMI) et la CMI est lue directement à l'intersection entre la base de l'ellipse d'inhibition et la bandelette graduée. La méthode Etest® présente une excellente corrélation avec la méthode de référence CLSI surtout pour l'itraconazole et le voriconazole avec une concordance comprise entre 80 et 100% quand les Etests® sont lus à 48 heures (128). Les seuils d'interprétation pour déterminer si une souche est sensible ou résistante sont les même que ceux établis par l'EUCAST (Tableau 8).

3. Identification d'isolats résistants par ensemencement sur milieu Sabouraud additionné d'antifongiques azolés

La détection *in vitro* de la sensibilité aux antifongiques au laboratoire peut prendre au moins 5 à 7 jours avec les méthodes décrites précédemment (méthodes de référence et Etests®). Les milieux additionnés d'antifongiques azolés (ITZ, POS ou VOR) sont de plus en plus utilisés comme technique de dépistage pour la résistance aux azolés (108). De nombreux travaux utilisent des milieux additionnés d'ITZ à concentrations variables de 4 mg/l (13,129,130) ou 8 mg/l (116) pour dépister la résistance aux azolés des isolats d'*A. fumigatus* car la résistance à l'ITZ apparaît commune à toutes ces souches résistantes aux azolés (14). Même si cette technique n'est pas encore utilisée en routine, elle pourrait être un outil de dépistage futur utile pour identifier les isolats nécessitant des investigations plus poussées (détermination des CMI des antifongiques azolés par exemple) (108).

4. Détection rapide de la résistance aux azolés par biologie moléculaire

Pour réduire encore plus le délai diagnostique de la résistance aux azolés, des auteurs ont utilisé la biologie moléculaire et notamment la qPCR pour détecter

rapidement la résistance aux azolés et déterminer directement le mécanisme de résistance responsable. Ainsi, Van Der Linden *et al.* ont développé 2 qPCR pour détecter le mécanisme de résistance TR34/L98H. La première qPCR cible la répétition en tandem de la séquence de 34 pb dans le promoteur du gène *cyp51A* et utilise comme système de détection l'hydrolyse de sonde (Taqman), la seconde qPCR cible la substitution L98H et utilise comme système de détection l'hybridation de 2 sondes (FRET) (131). Garcia-Effron *et al.* ont développé une qPCR multiplex utilisant des sondes *Molecular Beacons* ciblant les mutations les plus fréquentes (G54, L98, G138 et M220) (132).

D. Origine de la résistance

1. Acquisition de la résistance au cours d'un traitement par antifongique azolé

La résistance aux azolés d'isolats cliniques d'*A. fumigatus* (résistance clinique) apparaît classiquement pendant un traitement curatif ou préventif par antifongique azolé et fait intervenir une grande variété de mutations. De nombreux auteurs ont rapporté ce phénomène surtout chez les patients traités par azolés à long terme pour des aspergillomes ou des aspergilloses pulmonaires chroniques (10–12). Le mode de reproduction du champignon semble être important pour l'expression phénotypique de la résistance aux azolés. Chez les patients présentant un aspergillome ou des lésions cavitaires, le champignon se reproduit par sporulation, ce qui facilite le transfert de gènes de résistance aux spores et à leur descendance et par conséquent son adaptation à la pression de sélection exercée par les azolés. En effet, les mutations sont ou seront exprimées dans la conidie initiale mais aussi dans toutes les conidies filles. Mais chez les patients atteints d'aspergillose invasive, l'infection progresse par élongation des hyphes sans sporulation. Des mutations spontanées peuvent se produire dans les noyaux des hyphes mais étant donné le nombre total de noyaux par hyphe (jusqu'à un million), elles n'auront qu'un faible impact sur le phénotype du champignon, les gènes mutés étant moins fréquents que les gènes sauvages (133). Le développement de résistance au cours d'une AI est donc considéré comme peu probable par certains auteurs, sauf en cas d'évolution vers un aspergillome (104).

2. Émergence de la résistance par exposition à des isolats résistants d'origine environnementale

Une étude néerlandaise sur la prévalence de la résistance aux azolés chez des patients dont la plupart n'avait jamais bénéficié de traitement antifongique (« patients naïfs ») rapporte que la mutation TR34/L98H était impliquée dans 90% des isolats résistants (105). L'hypothèse d'une transmission interhumaine d'un clone résistant a été exclue à cause de la présence extrêmement rare de ce phénomène et parce que ces isolats résistants ont été isolés chez des patients sans aucun lien épidémiologique. De plus, près d'un tiers des patients infectés par un isolat muté TR34/L98H présentait une AI, pathologie dans laquelle le champignon croit par élongation des hyphes ; condition peu favorable à l'expression phénotypique des résistances comme vu précédemment. L'hypothèse d'une origine environnementale est donc apparue, notamment liée à l'utilisation de fongicides azolés en agriculture. Elle a été suggérée pour la première fois aux Pays-Bas (116). En plus d'avoir été retrouvée chez des patients naïfs, cette mutation a été rapportée dans de nombreuses niches environnementales (sol, compost, parterres de fleurs, feuilles, graines de plantes, prélèvement d'airs des hôpitaux) (13). Les pays européens utilisent couramment des fongicides azolés, le plus souvent des imidazolés et des triazolés qui ont le même mécanisme d'action que les antifongiques azolés utilisés en médecine humaine. La consommation des fongicides azolés a été stable dans la plupart des pays européens au cours de ces dernières années à l'exception des Pays-Bas où la consommation a doublé depuis le milieu des années 1990. Par exemple, on estime que près de la moitié de la surface agricole néerlandaise dédiée aux céréales et aux vignes est traitée avec des fongicides azolés (133). *A contrario*, aux États-Unis, ils sont utilisés dans moins de 5% des terres cultivées. L'utilisation de ces fongicides azolés dans l'environnement pourrait diminuer la population des isolats d'*A. fumigatus* sensibles aux azolés et sélectionner les isolats résistants (134).

E. Prévalence des isolats résistants d'*A. fumigatus* aux azolés

Les premiers cas d'*A. fumigatus* résistants à l'itraconazole ont été décrits en 1997 en Californie sur des isolats cliniques (135). Depuis, de nombreux cas ont été rapportés en France, Espagne, Belgique, Danemark, Suisse, Norvège, Pays-Bas, Royaume-Uni, Canada, Chine, Iran et États-Unis. Même s'il est difficile d'avoir une estimation fiable de la prévalence des isolats résistants (beaucoup de laboratoires ne testent pas systématiquement les isolats), celle-ci est en constante augmentation depuis 10 ans avec de grandes variations en fonction des pays. Le programme mondial de

surveillance des résistances fongiques ARTEMIS impliquant 62 centres entre 2008 et 2009 a rapporté un taux de résistance de 5,8% (136). Une autre étude prospective du réseau SCARE impliquant 22 centres médicaux dans 19 pays a identifié une prévalence globale de 3,4%. La résistance aux azolés chez *A. fumigatus* variait entre 0 et 26% entre les 22 centres et a été détectée dans 11 (57,9%) des 19 pays européens participants. Il est intéressant de souligner que près de la moitié des isolats d'*A. fumigatus* résistants (48,9%) présentait une résistance multiple aux azolés causée par la mutation TR34/L98H sur le gène *cyp51A* (137).

En France, la prévalence des isolats résistants cliniques est variable et dépend de la population étudiée. En 1999, la prévalence de résistance à l'ITZ étudiée sur 156 isolats d'*A. fumigatus* collectés entre 1996 et 1998 était de 2,5% (138). En 2011, celle-ci a été évaluée à 0,85% sur 118 isolats cliniques d'*A. fumigatus* collectés entre 2006 et 2009 issus de 89 patients d'hématologie de l'hôpital Henri Mondor à Créteil (1 isolat résistant sur 118) (139). Cette faible prévalence peut s'expliquer par le petit nombre de patients recevant un traitement à long terme par azolés dans cette population. Une autre étude en 2011 chez 131 patients adultes atteints de mucoviscidose de l'hôpital Cochin à Paris a montré une prévalence de 4,6% (140). Parmi ces 131 patients, 47 (35,9%) avaient déjà reçu un traitement par ITZ. Cette prévalence élevée de résistance aux azolés dans cette population de patients atteints de mucoviscidose a été confirmée par une autre étude française à l'hôpital de Nantes avec une fréquence de résistance élevée à 8% (130).

En Europe, la prévalence de la résistance est variable en fonction des pays (Figure 10) mais elle a augmenté significativement dans 2 pays d'Europe : les Pays-Bas et le Royaume-Uni. Au Pays-Bas, une étude prospective sur plus de 1900 isolats collectés entre 1994 et 2007 a rapporté une augmentation constante de la prévalence annuelle d'isolats résistants, de 1,7% à 6% en 2006. Il convient de noter que tous les isolats résistants ont été identifiés après 1999, et que 94% présentait la mutation TR34/L98H (116). En 2008, le taux de résistance aux azolés aux Pays-Bas a été estimé à 5,3% (de 0,8 à 9,5%) (105). Au Royaume-Uni, une étude sur 519 isolats cliniques d'*A. fumigatus* collectés entre 1992 et 2007 a rapporté une prévalence de résistance de 5%, avec une nette augmentation après 2004 (1% avant 2004 versus 8% après) (10). Depuis, la tendance à l'augmentation a été confirmée avec en 2008 et 2009 respectivement 14 et 20% d'isolats résistants (141). Néanmoins ces chiffres doivent être considérés avec prudence. En effet, il y avait probablement un biais d'inclusion dans cette étude : le laboratoire de mycologie

régional de Manchester est l'un des centres nationaux de référence pour les infections aspergillaires et l'augmentation du nombre de tests de sensibilité réalisés depuis 2003 a révélé un phénomène auparavant sous-évalué.

Dans les autres pays du monde, la prévalence de résistance des isolats cliniques était de 2% en Inde en 2012 (142), de 3,2% en Iran en 2013 (143), 7,1% au Japon en 2012 (144).

La Figure 10 résume les données disponibles concernant la fréquence de la résistance clinique aux azolés et la présence d'isolats cliniques ou environnementaux portant la mutation TR34/L98H en France et en Europe. Il est intéressant de souligner les isolats résistants portant la mutation TR34/L98H ont été retrouvés à la fois parmi les isolats cliniques et environnementaux mais aussi le potentiel de propagation important de cette mutation à travers le monde. En effet, elle n'est plus limitée aux isolats des Pays-Bas et a été de plus en plus fréquemment rapportée depuis 2007 dans d'autres pays européens dont l'Espagne, la Belgique et la Norvège en 2008 (116,145), le Royaume-Uni et la France en 2009 (130,11,140) et en 2014 (146), le Danemark en 2011 (129) et l'Allemagne en 2012 (147). L'étude prospective du réseau SCARE a indiqué que la mutation TR34/L98H avait été identifiée dans d'autres pays européens comme l'Italie et l'Autriche et que c'était le mécanisme de résistance principale (55%) dans six pays européens. Cette mutation a même été décrite en dehors de l'Europe, notamment en Inde (119) en Chine (148).

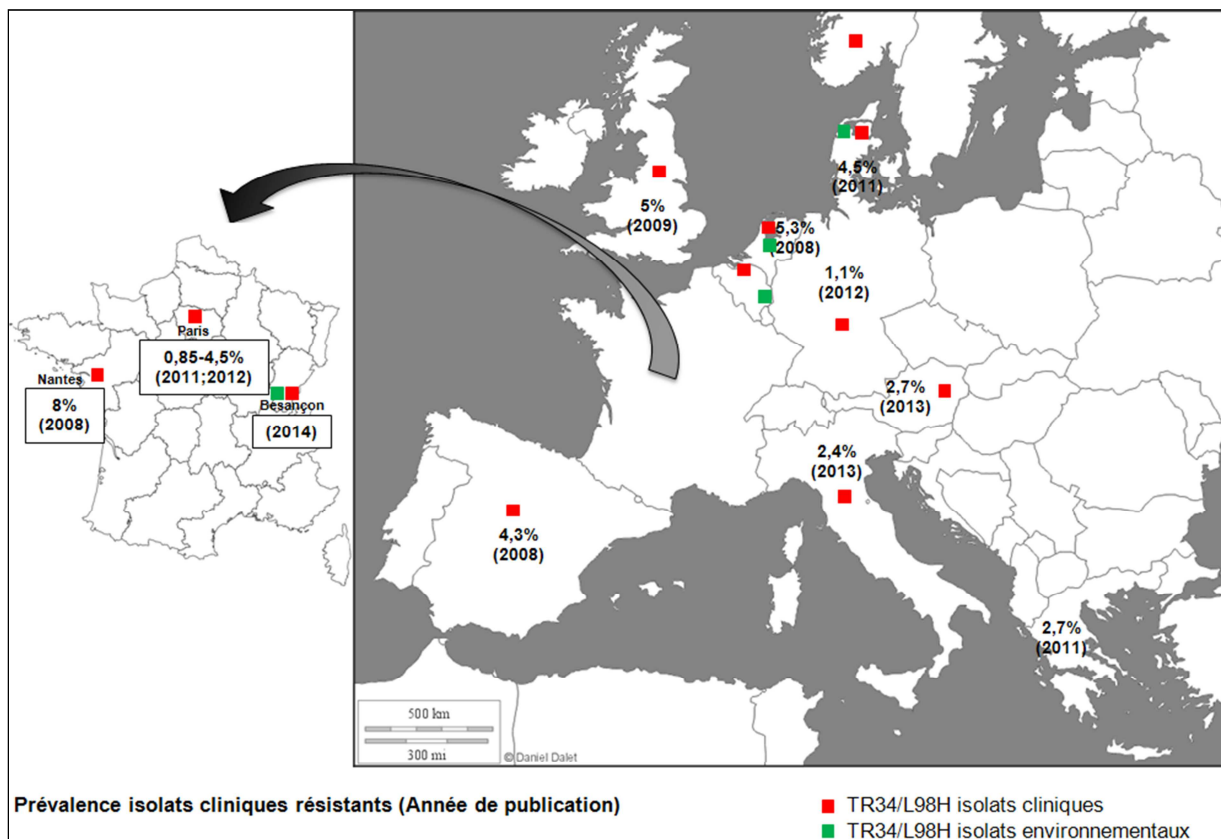


Figure 10 : Répartition géographique de la prévalence des isolats cliniques *d'A. fumigatus* résistants et de la mutation TR34/L98H dans les isolats cliniques et environnementaux en France et en Europe

OBJECTIFS

Ce travail de thèse entre dans le cadre de l'étude FungiCOPD intitulée « Circulation des pathogènes fongiques dans l'environnement domestique : impact clinique de l'exposition aux moisissures et à *Pneumocystis jirovecii* sur les patients atteints de BPCO ». Il s'agit d'une étude observationnelle de type cohorte prospective qui a comme objectif principal d'évaluer le lien entre l'exposition au risque fongique aux moisissures et les phénomènes de colonisation/sensibilisation fongiques au cours des exacerbations sévères chez les patients atteints de BPCO grâce à une approche bipolaire, ciblant d'une part le patient BPCO présentant une exacerbation sévère avec la recherche de colonisation et de sensibilisation par les moisissures, et d'autre part son environnement domestique avec la mesure de l'exposition domestique aux moisissures à l'aide de capteurs à poussières exposés 10 semaines à son domicile.

Plus spécifiquement, les objectifs de ce travail sont de déterminer la prévalence de colonisation par *A. fumigatus*, le niveau d'exposition aux moisissures et à *A. fumigatus* dans l'environnement domestique et de caractériser les phénomènes de résistance aux azolés dans les isolats cliniques et environnementaux d'*A. fumigatus* dans cette population de patients atteints de BPCO du Nord-Pas de Calais, non traités par antifongiques azolés (patients « naïfs »), afin d'étudier la circulation entre les réservoirs cliniques et environnementaux.

La colonisation par *A. fumigatus* a été recherchée par culture et qPCR *Aspergillus* sur les prélèvements respiratoires des patients inclus. Le niveau d'exposition environnementale fongique a été mesuré chez ces patients par culture et qPCR (panfongique, *Aspergillus* et *A. fumigatus*) directement sur les capteurs à poussières. Après identification morphologique des isolats cliniques et environnementaux d'*A. fumigatus* collectés chez ces patients, une caractérisation phénotypique incluant la recherche des isolats résistants aux azolés et la détermination de la thermotolérance a été effectuée dans un premier temps. Dans un second temps, une caractérisation génotypique incluant le séquençage des régions ITS1 et ITS2 des ARN ribosomiques, et du gène de la β -tubuline pour la confirmation de l'identification, et le séquençage du gène *cyp51A* pour la recherche éventuelle de mutations impliquées dans la résistance aux azolés a été réalisée, afin de clarifier la circulation d'*A. fumigatus* au sein et entre les différents réservoirs cliniques et environnementaux. Enfin, la détection directe d'isolats résistants présentant la mutation TR34/L98H dans l'environnement domestique de ces patients à partir des capteurs à poussières a été testée par qPCR.

MATERIELS ET METHODES

I. Patients et définitions des statuts colonisés et sensibilisés

Les patients atteints de BPCO inclus dans l'étude prospective FungiCOPD entre août 2011 et juillet 2014 sont issus des services de Pneumologie, de Réanimation et de Médecine Polyvalente Post-Urgence du CHRU de Lille. Les critères d'inclusion et d'exclusion de l'étude sont présentés dans le Tableau 9.

<u>Critères d'inclusion</u>
Homme ou femme de 35 à 90 ans Patient présentant une BPCO (stades I à IV) Patient présentant un épisode d'exacerbation sévère nécessitant une hospitalisation
<u>Critères d'exclusion</u>
Tuberculose active Cancer (ou traitement anticancéreux au cours des 3 années précédentes) Bronchectasies diffuses Mucoviscidose Asthme Toute autre pathologie pulmonaire diagnostiquée (sarcoïdose, fibrose pulmonaire, pneumoconiose) Traitement anti <i>P. jirovecii</i> ou antifongique de moins de 6 mois Femme enceinte ou allaitante Patient non assuré social Patient non consentant pour participer à l'étude Patient ne pouvant comprendre l'étude et ses objectifs Patient sous tutelle, curatelle

Tableau 9 : Critères d'inclusion et d'exclusion des patients de l'étude FungiCOPD

Au moment de cette inclusion et après information et recueil de consentement par un médecin du service, un examen bioclinique complet leur était soumis. Il comprenait notamment :

- 1) Des examens mycologiques réalisés spécifiquement dans le cadre du projet :
 - a. Une analyse des expectorations comprenant un examen microscopique, une mise en culture pour l'obtention des isolats cliniques d'*A. fumigatus* et une qPCR *Aspergillus* spp. (149) (cf. III.C), pour la recherche spécifique d'une colonisation par *A. fumigatus* ou d'autres moisissures,
 - b. Un sérodiagnostic pour rechercher une sensibilisation aux moisissures y compris à *A. fumigatus*,

Les résultats de ces examens mycologiques ont permis d'identifier :

- Les patients « colonisés » par *A. fumigatus* présentant un examen microscopique, une culture et/ou une qPCR *Aspergillus* spp. positif(s) sur expectoration

- Les patients « sensibilisés » par *A. fumigatus* présentant des anticorps anti-*A. fumigatus* (ELISA) ou des précipitines (Ouchterlony) à taux significatif.

2) Un bilan environnemental constitué :

- a. D'un questionnaire habitat complété avec le patient pendant son hospitalisation,
- b. D'un capteur à poussières à déposer à son domicile et à renvoyer au bout de 10 semaines au Laboratoire de Parasitologie-Mycologie du CHRU de Lille.

Un suivi téléphonique trimestriel des épisodes d'exacerbation a été réalisé pour ces patients inclus jusqu'à 18 mois après l'inclusion. A l'issue de ces 18 mois, un bilan bioclinique complet de fin d'étude était effectué au cours d'une nouvelle visite afin de suivre l'évolution des marqueurs mycologiques et de la fonction respiratoire.

II. Obtention des isolats cliniques et environnementaux d'*Aspergillus fumigatus* par culture

A. Isolats cliniques

Les isolats cliniques d'*A. fumigatus* proviennent de 2 types de prélèvements cliniques : les expectorations et les liquides de rinçage oro-pharyngé (LROP) effectués au moment de l'inclusion des patients BPCO et au moment de la visite de fin d'étude réalisée 18 mois après l'inclusion.

Les expectorations de chaque patient ont été traitées en mycologie conventionnelle avec un examen direct au bleu de lactophénol et une mise en culture sur 4 milieux : un milieu chromogénique incubé à 37°C, un milieu Sabouraud dilué au ½ additionné d'amikacine (SK1/2) incubé à 24°C et 2 milieux contenant de l'érythritol, l'un incubé à 24°C et l'autre à 37°C. Après 7 jours d'incubation, une identification morphologique macroscopique et microscopique des colonies de champignons filamenteux était effectuée. Puis chaque isolat, était repiqué sur SK1/2 afin d'obtenir une subculture pure, et un morceau de gélose recouverte de la moisissure était découpé au scalpel et placé dans un tube contenant de l'eau stérile à 4°C. Au total, toutes les colonies étaient conservées pour *A. fumigatus*, avec un minimum de 10 colonies et 1 colonie pour les autres espèces. Le prélèvement était ensemencé sur milieu Sabouraud additionné d'itraconazole à 4 mg/l (milieu ITZ, cf. Annexe 2) si plus de 10 colonies d'*A. fumigatus* étaient isolées. En cas de culture positive sur le milieu ITZ, les colonies supplémentaires étaient également conservées. Les LROP ont été traités en mycologie conventionnelle de la même manière que les expectorations à partir de mars 2014.

B. Isolats environnementaux

Les isolats environnementaux proviennent de prélèvements de poussières effectués à l'aide de capteurs à poussières, exposés 10 semaines au domicile du patient, dans sa chambre, ou d'échantillons environnementaux (écouvillon, air) prélevés au cours des visites à domicile effectuées pour les premiers patients.

1. Capteurs à poussières

Préparation

Les capteurs à poussières préparés au laboratoire étaient constitués de lingettes électrostatiques (20 x 30 cm) non-imprégnées d'antifongiques et d'antibactériens [« Apta Captizz® » (Intermarché)] et stérilisées à l'autoclave. Ensuite, elles étaient conditionnées en boîte CD puis soit déposées au domicile au moment de l'enquête environnementale (si celle-ci est réalisée), soit remises au patient pendant son hospitalisation.

Analyse mycologique

Après 10 semaines d'exposition, le capteur était envoyé par le patient au laboratoire puis pris en charge pour en extraire les spores fongiques de la façon suivante : la lingette était pliée en 8, une fois en deux dans le sens de la longueur face exposée vers l'extérieur, puis deux fois en deux dans l'autre sens. Elle était placée dans un sac stérile, où étaient ajoutés 20 ml de Tween 80 à 0,1 % en eau physiologique stérile. Ensuite, elle était brassée 10 minutes dans un broyeur homogénéiseur : le Stomacher®. On obtenait un liquide de rinçage de la lingette du capteur à poussières par essorage manuel.

Les liquides de rinçage de la lingette du capteur à poussières de chaque patient ont été traités en mycologie conventionnelle avec mise en culture de 100 µl (2 gouttes) sur 3 milieux : un milieu SK1/2 incubé à 30°C, un milieu contenant du bénomyl incubé 24°C et un milieu DG18 (Oxoid, Dardilly, France) incubé à 24°C. Les boîtes de culture ont été incubées pendant 7 jours avec observation régulière des boîtes, afin de déterminer s'il y avait croissance de micro-organismes et de pouvoir compter et identifier les colonies au fur et à mesure de leur croissance et avant envahissement de la boîte. Les isolats ont été conservés de la même manière que pour les expectorations (toutes les colonies pour *A. fumigatus*, jusqu'à 10 colonies, et 1 colonie pour les autres espèces). Un milieu ITZ était ensemencé s'il y avait plus de 10 colonies d'*A. fumigatus*. En cas de culture positive sur le milieu ITZ, les colonies

supplémentaires étaient également conservées. Des aliquots de liquide de rinçage étaient ensuite conservés à -80°C pour chaque capteur.

2. Autres prélèvements environnementaux

Des prélèvements d'air et d'écouvillonnages ont été réalisés dans certaines zones (humides, moisies, siphons de lavabos, plantes etc.) au domicile des patients lors des enquêtes environnementales réalisées au début de l'étude. La durée de recrutement ayant été plus longue que prévue, et en l'absence de personnel dédié après la 1^{ère} année de l'étude, ces enquêtes n'ont pas été réalisées pour les patients inclus à partir de septembre 2012 (patient n°8). Ces prélèvements ont été mis en culture selon le même protocole que les capteurs à poussières.

III. Quantification de l'exposition environnementale aux moisissures par qPCR

En parallèle de la mesure de l'exposition environnementale par mise en culture des prélèvements environnementaux précédemment décrite, une quantification par PCR quantitative en temps réel (qPCR) a été effectuée à partir des liquides de rinçage des capteurs à poussières conservés à -80°C. Après extraction de l'ADN des spores fongiques provenant des liquides de rinçage, 3 qPCR ont été effectuées pour quantifier l'exposition environnementale fongique dans un premier temps, aux *Aspergillus* spp. dans un second temps, et plus spécifiquement à *A. fumigatus* dans un troisième temps.

A. Extraction de l'ADN des capteurs à poussières

L'extraction de l'ADN des spores fongiques contenues potentiellement dans les capteurs à poussières a été effectuée avec le kit « QIAamp DNA Mini Kit » de Qiagen (Courtaboeuf, France). Ce kit extrait et purifie les acides nucléiques grâce à une micro colonne de silice qui adsorbe et retient les acides nucléiques lors des différents traitements et lavages et permet leur élution en phase finale. Le protocole utilisé était celui préconisé par la société Qiagen avec quelques modifications. Une pré-lyse mécanique dans le Magna Lyser® (Roche Diagnostics, Meylan, France) par agitation de 70 secondes à 7000 tours/minute des tubes contenant des microbilles de verre de 425-600 µm de diamètre (Sigma Aldrich, Saint Quentin-Fallavier, France) et 200 µl de liquide de rinçage ont été ajoutés au protocole. Ensuite, le surnageant a été récupéré pour réaliser la lyse en présence de 180 µl de tampon ATL et de 20 µl

de Protéinase K. A partir de cette étape, l'extraction a été effectuée en suivant précisément la procédure du fabricant : ajout de 200 µl de tampon AL suivi d'une incubation à 70°C pendant 10 minutes, puis ajout de 200 µl d'éthanol absolu. Le mélange obtenu était déposé sur la colonne de centrifugation et lavé avec 500 µl de tampon AW1 puis de 500 µl de tampon AW2. L'ADN était ensuite élué avec 200 µl de tampon AE.

B. Détection d'ADN fongique par qPCR panfongique

La quantification d'ADN fongique dans les capteurs à poussières a été réalisée par une qPCR utilisant le système de détection SYBR®Green sur un automate ABI 7500 (Applied Biosystems, Courtaboeuf, France). La PCR cible des régions conservées du gène de l'ARN ribosomique 18S des champignons (ARNr 18S), plus précisément une région d'environ 390 pb. Les amorces utilisées étaient le couple FR1/FF390 (Tableau 10), identifié par Chemidlin *et al.* comme optimal en terme de spécificité, couverture des espèces détectées et longueur d'amplicon en qPCR pour la cible ARNr 18S (150).

<u>Nom</u>	<u>Séquence</u>
FR1	5'-AICCATTCAATCGGTAIT-3'
FF390	5'-CGATAACGAACGAGACCT-3'

Tableau 10: Amorces utilisées pour la qPCR panfongique (150)

La réaction d'amplification a été réalisée dans un volume réactionnel de 20 µl contenant 1,25 µM de chaque amorce, 500 ng de T4 gene 32 protein (Affymetrix, Paris, France), 10µl de SYBR® Select Master Mix (Applied Biosystems) contenant l'AmpliTaq® DNA Polymerase, les dNTP, le SYBR®green I, le marqueur fluorescent de référence pour la normalisation du signal (ROX™) et 2 µl d'ADN.

L'amplification sur le ABI 7500 a été réalisée selon le protocole suivant : une phase d'activation de l'enzyme à 95°C pendant 10 minutes, 40 cycles de PCR composés d'une étape de dénaturation de l'ADN à 95°C pendant 15 secondes, une étape d'hybridation des amorces à 50°C pendant 30 secondes et une étape d'élongation à 70°C pendant 1 minute.

La fluorescence émise par le SYBR®Green lorsqu'il est incorporé à l'ADN a été mesurée à chaque cycle, à la fin de l'étape d'élongation (*acquisition data*). Une dernière étape a été ajoutée pour obtenir les courbes de fusion spécifique de 70°C à 95°C à 0,2°C/sec. Les courbes de fluorescence obtenues et les courbes de fusion ont été analysées par le logiciel ABI 7500 Software v2.0.6. Les résultats étaient

exprimés en déterminant le seuil de détection, ou « *crossing point* » (Cp) correspondant au cycle d'amplification où la fluorescence de l'échantillon devient significativement différente du signal de base. Le Cp étant inversement proportionnel à la quantité d'ADN contenue dans l'échantillon, plus la quantité d'ADN est élevée, plus le Cp est petit. Chaque extrait d'ADN a été amplifié une fois au pur, une autre fois au 1/10^{ème} pour la recherche d'inhibiteurs.

Dans chaque série d'ADN à tester, un témoin négatif d'amplification, contenant de l'eau stérile a été ajouté.

Pour la quantification en spores fongiques, une gamme étalon a été réalisée à partir d'une suspension calibrée contenant 10⁶ spores/ml d'*A. fumigatus* préparée de la façon suivante : des spores provenant d'une culture d'au moins 72h ont été prélevées à l'oese stérile et déposées dans une suspension Medium de NaCl à 0.9% (bioMérieux, Marcy l'Etoile, France). Une numération des spores en cyturine de la suspension a été effectuée et des dilutions ont été réalisées de façon à obtenir 50 spores par ligne horizontale (8 petits carrés) correspondant à un inoculum calibré à 10⁶ spores/ml. Ensuite, cette suspension a été diluée au 1/10^{ème}, au 1/100^{ème} et au 1/1000^{ème} pour obtenir 3 points de gamme à 10⁵, 10⁴ et 10³ spores/ml. L'extraction d'ADN était effectuée à l'aide du kit Qiagen comme décrit précédemment.

C. Détection d'ADN d'*Aspergillus* spp.

La détection d'ADN d'*Aspergillus* spp. dans les capteurs à poussières a été réalisée par qPCR sur l'automate LightCycler® 1.0 (Roche Diagnostics, Meylan, France), à l'aide de sondes d'hybridation de type FRET (*fluorescent resonance energy transfert*), comme décrit précédemment (149). Les amorces et les sondes utilisées sont décrites dans le Tableau 11. La qPCR cible un gène mitochondrial de 91 pb codant pour un ARN de transfert d'*Aspergillus* (Numéro GenBank L37095) (151). Le mélange réactionnel a été obtenu en utilisant le kit Fast DNA Master Hybridization Probes (Roche Diagnostics, Meylan, France) contenant une Taq polymérase Hot start. La réaction d'amplification a été réalisée dans un volume réactionnel final de 20 µl contenant 4,5 mM de MgCl₂, 0,25 U de Uracil ADN glycosylase (UNG) à 1 U/µl, chaque amorce sens et antisens en concentration finale 0,25 mM et 0,5 mM respectivement, 0,5 mM de chacune des deux sondes d'hybridation LC3 et LC4 marquées respectivement au Red 640 et à la fluorescéine et 2 µl de Mix Fast start contenant la Taq polymérase. Après introduction de ce mélange réactionnel dans chaque capillaire, 5 µl d'extrait d'ADN des capteurs à poussières a été ajouté.

Type d'oligonucléotide	Nom	Séquence
Amorces	Sens	5'-CTGTTAGTGCGGGAGTTCAAATCT-3'
	Antisens	5'-AACACCTGACCTTTCGCGTGTA-3'
Sondes FRET	LC4	5'-CTGAGCTAATTTCTTTCAACCCAAGGGA(FIc)-3'
	LC3	5'-CTGTTAGTGCGGGAGTTCAAA(LC640)TCT-3'

Tableau 11 : Amorces et sondes utilisées pour la qPCR *Aspergillus* spp. (FIc: fluorescéine, LC640: Red 640) (151)

L'amplification sur le Light Cycler® 1.0 a été réalisée selon le protocole suivant : une phase d'activation de l'UNG à 50°C pendant 2 minutes, une phase d'inactivation de l'UNG et de dénaturation initiale de l'ADN à 95°C pendant 8 minutes, 45 cycles composés d'une étape de dénaturation de l'ADN à 95°C pendant 10 secondes, une étape d'hybridation des sondes et amorces à 60°C pendant 10 secondes et une étape d'élongation à 72°C pendant 10 secondes. L'amplification s'est terminée par une étape de refroidissement à 40°C pendant 2 minutes.

La fluorescence a été mesurée à chaque cycle, juste après la phase d'hybridation. Les courbes de fluorescence obtenues ont été analysées par le logiciel LightCycler software version 3.5. Les résultats étaient exprimés en déterminant le seuil de détection ou Cp comme précédemment. Chaque extrait d'ADN a été amplifié deux fois.

Dans chaque série d'ADN à tester, un témoin négatif d'amplification, contenant de l'eau stérile et le témoin négatif d'extraction ont été ajoutés.

Pour la quantification en spores fongiques, la même gamme étalon préparée pour la qPCR panfongique a été utilisée : 3 points de gamme à 10^5 , 10^4 et 10^3 spores/ml.

D. Détection d'ADN d'*A. fumigatus*

La détection d'ADN d'*A. fumigatus* par qPCR a été réalisée sur l'automate ABI 7500 (Applied Biosystems) avec comme système de détection une sonde Taqman. Les amorces et la sonde utilisées sont décrites dans le Tableau 12. La concentration finale en amorces était de 1 μ M. La sonde a été testée à 2 concentrations différentes de 0,04 μ M et 0,08 μ M afin de déterminer la concentration optimale en terme de sensibilité et de spécificité sur une gamme standard d'ADN d'*A. fumigatus* (gamme Af) réalisée à partir de la souche de référence CBS144.89 à 1 ng/ μ l (Af1) diluée au $1/10^{\text{ème}}$ (Af2) au $1/100^{\text{ème}}$, $1/1000^{\text{ème}}$, $1/10000^{\text{ème}}$ et au $1/100000^{\text{ème}}$ pour obtenir 5 points de gamme à 10000 fg/ μ l (Af3), 1000 fg/ μ l (Af4), 100 fg/ μ l (Af5), 10 fg/ μ l (Af6)

et 1 fg/μl (Af7). La composition des mélanges réactionnels est indiquée dans le Tableau 13.

<u>Type d'oligonucléotide</u>	<u>Nom</u>	<u>Séquence</u>
Amorces	AfumiF1	5'- GCCCGCCGTTTCGAC-3'
	AfumiR1	5'- CCGTTGTTGAAAGTTTTAACTGATTAC -3'
Sonde Taqman	AfumiP1	5'-6-FAM-CCCGCCGAAGACCCCAACATG-MGB-3'

Tableau 12: Amorces et sondes utilisées pour la qPCR *A. fumigatus* (152)

<u>Concentration finale en sonde</u>	<u>0,04 μM</u>	<u>0,08 μM</u>
H2O	2,7 μl	1,9 μl
Mix sonde Applied	12,5 μl	12,5 μl
Amorce AfumiF1 (10 μM)	2 μl	2 μl
Amorce AfumiR1 (10 μM)	2 μl	2 μl
Amorce AfumiP1 (1 μM)	0,8 μl	1,6 μl
ADN	5 μl	5 μl

Tableau 13: Composition des mix avec concentrations en sonde différentes

L'amplification sur le ABI 7500 a été réalisée selon le protocole suivant : une phase de 2 min à 50°C, une phase de 10 min à 95°C suivie de 45 cycles de PCR composés d'une étape de dénaturation de l'ADN à 95°C pendant 15 sec et d'une étape d'hybridation des amorces et d'élongation à 60°C pendant 1 min.

Après détermination de la concentration optimale en sonde, les capteurs à poussières ont été analysés en duplicate.

Dans chaque série d'ADN à tester, un témoin négatif d'amplification, contenant de l'eau stérile et le témoin négatif d'extraction ont été ajoutés.

Pour la quantification, 3 points de la gamme standard Af3, Af4 et Af5 ont été utilisés.

E. Analyse statistique

L'analyse statistique des données a été effectuée à l'aide du logiciel SigmaPlot 12.0. Dans un premier temps, nous avons testé à l'aide du coefficient de Spearman la corrélation entre les résultats obtenus en culture et en qPCR panfongique, *Aspergillus* et *A. fumigatus* pour la mesure du niveau d'exposition environnementale. Dans un second temps, afin d'étudier le lien entre l'exposition fongique et les phénomènes de colonisation et de sensibilisation, les quantités fongiques, aspergillaires et d'*A. fumigatus* ont été comparées entre différents groupes de patients : les patients colonisés (C), les patients non colonisés (NC), les patients colonisés et/ou sensibilisés (C et/ou S) et les patients non colonisés non sensibilisés (NC/NS). Les quantités moyennes et médianes ont été calculées. La normalité a été

vérifiée par le test de Shapiro-Wilk. Pour les données paramétriques, les moyennes ont été comparées par le test de Student. Pour les données non paramétriques, les médianes ont été comparées par le test de Mann-Whitney. Pour la comparaison des fréquences de positivité à *A. fumigatus* des capteurs à poussières, le test de McNemar a été utilisé.

IV. Caractérisation phénotypique des isolats cliniques et environnementaux d'*Aspergillus fumigatus*

A. Identification morphologique

L'identification morphologique d'*A. fumigatus* était basée sur l'aspect macroscopique et l'aspect microscopique des colonies décrits dans les généralités (cf. II.B.).

B. Identification d'isolats résistants aux azolés par ensemencement sur milieu Sabouraud additionné d'itraconazole

La résistance aux azolés a été dépistée par ensemencement de chaque isolat sur milieu Sabouraud contenant 4mg/l d'itraconazole, préparé au laboratoire (milieu ITZ, cf. Annexe 2). Des conidies provenant d'une culture d'*A. fumigatus* de 5 à 7 jours ont été mises en suspension dans de l'eau stérile pour obtenir une turbidimétrie équivalente à 0,5 MacFarland (McF). Chaque suspension a été ensemencée par écouvillonnage sur milieu ITZ. Les milieux ont été incubés à 37°C pendant 72 heures. Un contrôle négatif constitué d'une suspension de conidies d'un isolat non résistant aux azolés et ne présentant pas de mutation du gène *cyp51A*, ainsi qu'un contrôle positif constitué d'une suspension de conidies d'un isolat présentant la mutation TR34/L98H ont également été ensemencés et incubés dans les mêmes conditions. Parallèlement, chaque suspension était ensemencée sur SK1/2 sans ITZ et incubée à 37°C pour vérifier la pousse de la suspension.

C. Détermination de la sensibilité aux antifongiques par méthode Etest®

La méthode Etest® (bioMérieux, Marcy l'Etoile, France) permet de déterminer la CMI pour un antifongique en milieu gélosé. En cas de culture positive sur le milieu ITZ (ITZ+) et/ou de détection d'une mutation non silencieuse du gène *cyp51A* (cf. V.B.3), les CMI ont été déterminées par cette méthode pour 5 antifongiques : itraconazole (ITZ), posaconazole (POS), voriconazole (VOR), amphotéricine B (AMB) et

caspofongine (CAS). Pour la réalisation des Etests®, une suspension calibrée de 10⁶ spores/ml dont la préparation est détaillée dans la partie III.B a été réalisée pour chaque isolat à tester. Les milieux RPMI (bioMérieux, Marcy l'Etoile, France) ont été ensemencés à l'aide d'un écouvillon stérile et les 5 bandelettes d'antifongiques contenant le gradient de concentration ont été déposées sur les milieux. La lecture des résultats des CMI s'est faite après incubation à 37°C à 24h, 48h et 72h, sur fond noir afin de faciliter la mise en évidence des zones d'intersection. L'interprétation des résultats S ou R a été effectuée à l'aide des seuils d'interprétation proposés par l'EUCAST, présentés dans les généralités (152).

D. Détermination de la thermotolérance

A. fumigatus est une espèce thermotolérante capable de se développer jusqu'à 50°C contrairement aux autres espèces du complexe *Fumigati* telle qu'*A. lentulus*, espèce récemment décrite très proche morphologiquement d'*A. fumigatus* mais incapable de se développer à 48°C (49). Pour confirmer l'identification de l'espèce, chaque suspension à 0,5 McF préparée pour l'ensemencement des milieux ITZ a été ensemencée en parallèle sur milieu SK1/2 et incubée à 50°C pendant 72h.

V. Caractérisation génotypique des isolats cliniques et environnementaux d'*Aspergillus fumigatus*

Après caractérisation phénotypique, l'ADN des isolats cliniques et environnementaux a été extrait en vue d'une caractérisation génotypique qui s'est effectuée en deux temps. Dans un premier temps, nous avons confirmé l'identification des isolats par séquençage après amplification de 2 gènes cibles : les régions ITS1 et ITS2 des ARN ribosomiques (ARNr) et le gène *β-tubuline*. Le séquençage de ces deux gènes nous a permis de valider par biologie moléculaire l'identification des isolats au sein de la section *Fumigati* conformément aux données publiées (154).

Dans un second temps, nous avons séquencé le gène *cyp51A*, cible des antifongiques azolés, pour la recherche éventuelle de mutations impliquées dans la résistance aux azolés.

A. Extraction de l'ADN

L'extraction de l'ADN des isolats cliniques et environnementaux d'*A. fumigatus* a été effectuée manuellement avec le kit « QIAamp DNA Mini Kit » (Qiagen).

Le protocole d'extraction qui a été utilisé est le protocole tissu préconisé par la société Qiagen. Des conidies issues de cultures âgées de 2 à 5 jours étaient mises en suspension dans environ 1 ml d'eau stérile contenue dans un tube eppendorf stérile. Ces suspensions étaient ensuite centrifugées à 11000 rpm pendant 7 minutes, l'eau était retirée à l'aide d'une pipette stérile en laissant un culot et de l'eau stérile était rajoutée pour effectuer un nouveau lavage. En tout, 3 lavages à l'eau stérile ont été effectués. A la fin des lavages, le culot contenant les spores était additionné de 180 µl de tampon ATL et 20 µl de Protéinase K et le tout était incubé une nuit à 56°C pour une lyse efficace de la paroi cellulaire solide et complexe des champignons. A partir de cette étape, l'extraction a été effectuée en suivant précisément la procédure du fabricant comme décrit précédemment (cf. III.A.).

B. Réaction de polymérisation en chaîne (PCR)

Les PCR ciblant les régions ITS1 et ITS2, les gènes *β-tubuline* et *cyp51A* ont été effectuées avec la même Taq polymérase, la GoTaq DNA polymerase à 5U/µl (Promega, Charbonnières-les-Bains, France) et son tampon 5X, du MgCl₂ (25 mM) et des dNTP (10 mM de chaque nucléotide). Seules la nature et la concentration des amorces ainsi que le programme d'amplification différaient en fonction des PCR, le principe étant le même : après activation des enzymes Taq et dénaturation initiale, le cycle d'amplification est répété n fois : dénaturation de l'ADN, hybridation des amorces et élongation. Les amplicons étaient conservés à 4°C.

1. PCR ciblant les régions ITS1 et ITS2

Les régions ITS (*Internal Transcribed Spacer*) sont localisées entre les sous unités 18S, 5,8S et 28S de l'ARNr. Ces régions sont très conservées, variables et spécifiques d'espèces, elles permettent donc de différencier les espèces fongiques à l'intérieur d'un genre (155). Les régions ITS1 et ITS2 de l'ARNr ont été amplifiées avec les amorces universelles ITS1 et ITS4 (Tableau 14).

<u>Nom</u>	<u>Séquence</u>
ITS1 (sens)	5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3'
ITS4 (antisens)	5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'

Tableau 14 : Amorces utilisées pour la PCR ciblant les régions ITS1 et ITS2 (155)

La réaction d'amplification a été réalisée dans un volume réactionnel de 50 µl contenant 10 µl de tampon 5X (Promega), 3 µl MgCl₂ à 25 mM (concentration finale de 1,5 mM), 1 µl dNTP à 10 mM (concentration finale de 0,2 mM), 1 µl de chacune

des amorces à 20 µM (concentration finale de 0,4 µM), 0,4 µl de GoTaq DNA polymerase (2U), 13,6 µl d'eau distillée stérile et 20 µl d'ADN. La réaction d'amplification a été réalisée dans un thermocycleur GenAmp 2700 (Applied Biosystems, Courtaboeuf, France). Le programme de la PCR incluait une pré-dénaturation à 94°C pendant 5 min suivie par 20 cycles consécutifs comprenant une dénaturation à 94°C pendant 35 sec, une hybridation spécifique des amorces à 54°C pendant 55 sec et une élongation à 72°C pendant 45 sec, avec un ajout de 4 sec par cycle. Quinze cycles supplémentaires incluaient une dénaturation à 94°C pendant 45 sec, une hybridation spécifique des amorces à 54°C pendant 55 sec et une élongation à 72°C pendant 2 min. Enfin une élongation finale à 72°C pendant 10 min a été effectuée.

2. PCR ciblant le gène *β-tubuline*

La PCR *β-tubuline* permet de distinguer *A. fumigatus* des autres espèces fongiques morphologiquement semblables de la section *Fumigati* telles qu'*A. lentulus*. Le mélange réactionnel et le programme d'amplification sont identiques à ceux de la PCR ciblant les régions ITS1 et ITS2. Seules les amorces (Tableau 15) utilisées diffèrent (même volume et même concentration).

<u>Nom</u>	<u>Séquence</u>
βtub1 (sens)	5'-AATTGGTGCCGCTTTCTGG-3'
βtub2 (antisens)	5'-AGTTGTCGGGACGGAATAG-3'

Tableau 15 : Amorces pour la PCR ciblant le gène codant pour la *β-tubuline* (49)

3. PCR ciblant le gène *cyp51A*

Nous avons créé 3 couples d'amorces (Tableau 16) qui permettent d'amplifier l'ensemble du gène *cyp51A* avec son promoteur. La position des 3 couples d'amorces sur le gène *cyp51A* est indiquée en Annexe 3.

	<u>Nom</u>	<u>Séquence</u>
Couple d'amorces n°1 (CYP51A-1)	CYP51AF-1 (sens)	5'-TAATCGCAGCACCCTCCAG-3'
	CYP51AR-1 (antisens)	5'-GACATCCTTGWGCTTGCCGTTGAG-3'
Couple d'amorces n°2 (CYP51A-2)	CYP51AF-2 (sens)	5'-TCTACCTGGGCGTTCAGGG-3'
	CYP51AR-2 (antisens)	5'-CTTCGAGGACTTTTGGCTGTGAG-3'
Couple d'amorces n°3 (CYP51A-3)	CYP51AF-3 (sens)	5'-AACCTGTTGATGGCTGGTC-3'
	CYP51AR-3 (antisens)	5'-GCAACAACACTTCAGGGCCA-3'

Tableau 16 : 3 couples d'amorces pour la PCR ciblant le gène *cyp51A*

La réaction d'amplification a été réalisée dans un volume réactionnel de 50 µl contenant 10 µl de tampon 5X, 3 µl MgCl₂ à 25 mM (concentration finale de 1,5 mM), 1 µl dNTP à 10 mM (concentration finale de 0,2 mM), 2 µl de chacune des amorces à 10 µM (concentration finale de 0,4 µM), 0,4 µl GoTaq DNA polymerase (2U) et 26,6 µl d'eau distillée stérile et 5 µl d'ADN. La réaction d'amplification a été réalisée dans un thermocycleur GenAmp 2700 (Applied Biosystems). Le programme de la PCR établi incluait une pré-dénaturation à 95°C pendant 10 min puis 45 cycles composés d'une étape de dénaturation à 95°C pendant 1 min, d'une étape d'hybridation spécifique des amorces à 55°C pendant 1 min et d'une étape d'élongation à 72°C pendant 1 min. Enfin une élona tion finale à 72°C pendant 10 min a été effectuée.

C. Électrophorèse sur gel d'agarose des produits de PCR

Pour la migration des produits de PCR, un gel d'agarose à 2% a été préparé avec un tampon standard Tris Borate EDTA (TBE) 1X (1g d'agarose pour 50 ml de TBE 1X) contenant du Bromure d'éthidium (BET). Cinq microlitres de l'échantillon de PCR ont été mélangés avec 5 µl d'un tampon de migration contenant du bleu de bromophénol, sur une feuille de parafilm. Les échantillons et 5 µl d'un marqueur de poids moléculaire le Smart Ladder MW-1700-02 (Eurogentec, Angers, France) ont été chargés séparément dans les puits du gel. L'électrophorèse a été effectuée à 90 Volts dans du tampon TBE 1X pendant 30 min. Les produits d'amplification ont été visualisés sous lumière UV, grâce au BET incorporé auparavant dans le gel. Chaque PCR doit donner un produit d'amplification spécifique du gène ciblé : une seule bande d'ADN à la taille attendue de 600bp pour les régions ITS1 et ITS2, 495bp pour le gène *β-tubuline* et 725bp, 705bp et 826bp pour les 3 fragments du gène *cyp51A*.

D. Purification des produits de PCR

L'électrophorèse des produits de PCR ayant révélé une bande unique correspondant au fragment d'intérêt pour chacune des PCR, la purification a été réalisée directement à partir de l'échantillon amplifié liquide à l'aide du kit NucleoSpin® (Macherey-Nagel, Hoerd, France) sur membrane de silice. Cette étape a été réalisée par la société GenoScreen en amont du séquençage.

E. Séquençage des produits de PCR

Le séquençage des produits de PCR a été réalisé par la société GenoScreen selon

la méthode de Sanger à l'aide du kit Big Dye Terminator Cycle Sequencing (Applied Biosystems). Le produit de la réaction a ensuite été analysé sur le séquenceur capillaire ABI3730 XL DNA Analyser (Applied Biosystems).

F. Analyse et alignement de séquences

Les séquences obtenues pour les 3 gènes ont été analysées grâce au logiciel Bioedit (<http://bioedit.com>) qui permet d'obtenir une séquence consensus, après analyse des électrophorogrammes correspondants pour chaque isolat et correction (si nécessaire) de la séquence sens et de la séquence antisens.

Pour les régions ITS1 et ITS2 et le gène *β-tubuline*, les séquences consensus obtenues pour chaque isolat d'*A. fumigatus* ont été comparées, à l'aide du programme en ligne BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>), aux séquences des bases de données des banques internationales accessibles en ligne (GenBank).

Pour le gène *cyp51A*, les 3 séquences consensus obtenues grâce aux 3 couples d'amorces ont été alignées grâce aux zones de chevauchements, afin de déterminer la séquence finale comportant le promoteur et la totalité du gène. La séquence protéique a ensuite été déterminée à partir de la séquence finale en nucléotides, après élimination des parties non-codantes de la séquence (promoteur et introns), de façon à mettre en évidence la présence ou non de mutations non silencieuses déjà décrites ou d'en mettre en évidence de nouvelles.

VI. Détection directe d'isolats mutés TR34/L98H d'*Aspergillus fumigatus* dans l'environnement

Pour détecter la présence d'isolat d'*A. fumigatus* muté TR34/L98H directement dans les capteurs à poussières, 2 qPCR en temps réel ont été testées à partir de l'ADN extrait des capteurs à poussières (cf.III.A), l'une ciblant la répétition en tandem d'une séquence de 34 pb dans le promoteur du gène *cyp51A* (TR34) et, l'autre, la substitution d'une leucine en histidine en position 98 (L98H) dans le gène *cyp51A*.

A. qPCR ciblant le motif TR34 situé dans le promoteur du gène *cyp51A* (qPCR TR34)

Cette première qPCR cible la séquence répétée de 34 pb dans le promoteur du gène *cyp51A* d'*A. fumigatus*. Elle a été réalisée sur l'automate ABI 7500 (Applied Biosystems) en utilisant le système de détection SYBR®Green. Avant de tester les capteurs à poussières, la mise au point a été effectuée sur 2 gammes étalons, l'une

constituée d'une suspension préparée à partir de l'isolat n°366 d' *A. fumigatus*, obtenu à partir du capteur à poussières du patient n°27, sensible aux azolés et ne présentant pas de mutation du gène *cyp51A* (isolat WT), et contenant 10^6 , 10^5 , 10^4 , 10^3 et 10^2 spores/ml (gamme WT), l'autre constituée d'une suspension préparée à partir de l'isolat n°240 d' *A. fumigatus*, obtenu à partir du capteur à poussières du patient n°7, présentant la mutation TR/L98H contenant 10^6 , 10^5 , 10^4 , 10^3 et 10^2 spores/ml (gamme TR34/L98H). Deux amorces permettant d'amplifier un fragment de 112 (WT) ou 146 (avec TR34) pb ont été designées pour notre étude (Tableau 17) et ont été testées aux concentrations de 0,1 μ M, 0,2 μ M, 0,4 μ M et 1 μ M (Tableau 18) afin de déterminer la concentration optimale en terme de sensibilité et spécificité. La position des amorces sur le gène *cyp51A* est indiquée en Annexe 3.

<u>Nom</u>	<u>Séquence</u>
TR-F (sens)	5'-AATAATCGCAGCACCCTCC-3'
TR-R (antisens)	5'-GGGTGTATGGTATGCTGGAA-3'

Tableau 17 : Amorces designées pour la qPCR TR34 SYBR®Green

<u>Concentration finale des amorces</u>	<u>0,1 μM</u>	<u>0,2 μM</u>	<u>0,4 μM</u>	<u>1 μM</u>
Amorce TR-F 10 μ M	0,2 μ L	0,4 μ L	0,8 μ L	2 μ L
Amorce TR-R 10 μ M	0,2 μ L	0,4 μ L	0,8 μ L	2 μ L
Mix SYBR®Green	10 μ L	10 μ L	10 μ L	10 μ L
ADN	2 μ L	2 μ L	2 μ L	2 μ L
Eau	7,6 μ L	7,2 μ L	6,4 μ L	4 μ L

Tableau 18 : Composition des mix en fonction des concentrations en amorces

L'amplification sur le ABI 7500 a été réalisée selon le protocole suivant : une phase d'activation de l'enzyme à 95°C pendant 10 min, 40 cycles de PCR composés d'une étape de dénaturation de l'ADN à 95°C pendant 15 se c, une étape d'hybridation des amorces et d'élongation à 60°C pendant 1 min. La fluorescence a été mesurée à chaque cycle, à la fin de l'étape d'élongation (*acquisition data*). Une dernière étape a été ajoutée pour obtenir les courbes de fusion spécifique de 70°C à 95°C à 0,2°C/sec. Les courbes de fluorescence obtenues et les courbes de fusion ont été analysées par le logiciel ABI 7500 Software v2.0.6.

Dans chaque série d'ADN à tester, un témoin négatif d'amplification, contenant de l'eau stérile a été ajouté.

Une fois les concentrations optimales déterminées, les capteurs à poussières ont été analysés au pur et au 1/10^{ème}.

B. qPCR ciblant la mutation L98H du gène *cyp51A* (qPCR L98H)

Cette deuxième qPCR cible la substitution d'une leucine en histidine en position 98 (L98H) dans le gène *cyp51A* d'*A. fumigatus*. Elle a été réalisée sur l'automate ABI 7500 (Applied Biosystems) en utilisant 2 amorces permettant d'amplifier un fragment de 91 pb et ciblant la zone contenant la mutation L98H, et 2 sondes Taqman, l'une permettant de détecter les isolats non mutés d'*A. fumigatus* présentant une leucine en position 98 (sonde L98 WT, marquée par le fluorophore FAM), l'autre permettant de détecter les isolats mutés en position 98 (histidine) en cas de présence de la mutation L98H chez les isolats mutés TR34/L98H (sonde L98H, marquée par le fluorophore VIC) (Tableau 19). La position des amorces et des sondes sur le gène *cyp51A* est indiquée en Annexe 3.

Type d'oligonucléotide	Nom	Séquence
Amorces	L98F (sens)	5'-GTTGGGTCAAAAACACAGTCTA-3'
	L98R (antisens)	5'-GACCTCTTCCGCATTGACATC-3'
Sondes Taqman	Sonde L98 WT	5'-6-FAM-AACGGCAAGCTCAA-MGB-BHQ-3'
	Sonde L98H	5'-VIC-ACGGCAAGCACAA-MBG-BHQ-3'

Tableau 19 : Amorces et sondes designées pour la qPCR L98H

Avant de tester les capteurs à poussières, une mise au point a été effectuée à partir des 2 gammes étalons WT et TR/L98H qui avait été utilisées pour la qPCR TR34. Tout d'abord, les amorces ont été testées en qPCR SYBR®Green (Applied Biosystems) aux concentrations 0,1 µM, 0,2 µM, 0,4 µM et 1 µM (Tableau 20) afin de déterminer la concentration optimale.

Concentration finale des amorces	0,1 µM	0,2 µM	0,4 µM	1 µM
Amorce L98F 10 µM	0,2 µL	0,4 µL	0,8 µL	2 µL
Amorce L98R 10 µM	0,2 µL	0,4 µL	0,8 µL	2 µL
Mix SYBR®Green	10 µL	10 µL	10 µL	10 µL
ADN	2 µL	2 µL	2 µL	2 µL
Eau	7,6 µL	7,2 µL	6,4 µL	4 µL

Tableau 20 : Composition des mix pour la détermination de la concentration optimale en amorces pour la qPCR L98H SYBR®Green

Le programme d'amplification sur le ABI 7500 était identique à celui utilisé pour la qPCR TR34. Les courbes de fluorescence obtenues et les courbes de fusion ont été analysées par le logiciel ABI 7500 Software v2.0.6.

Une fois la concentration optimale d'amorces déterminée, les sondes L98 WT et L98H ont été testées aux concentrations de 0,1 µM, 0,2 µM et 0,4 µM sur les

gamme étalons WT et TR/L98H afin de déterminer la concentration optimale en sondes.

Le programme d'amplification sur le ABI 7500 était le même que pour la qPCR *A. fumigatus*. Les courbes de fluorescence obtenues ont été analysées par le logiciel ABI 7500 Software v2.0.6.

Dans chaque série d'ADN à tester, un témoin négatif d'amplification, contenant de l'eau stérile a été ajouté.

Une fois les concentrations optimales d'amorces et de sondes déterminées, les capteurs à poussières ont été analysés au pur et au 1/10^{ème}.

RESULTATS

I. Caractéristiques des patients inclus et prévalence de la colonisation/sensibilisation par *A. fumigatus*

Quarante et un patients BPCO issus des services de Pneumologie, de Réanimation et de Médecine Polyvalente Post-Urgence du CHRU de Lille ont été inclus entre août 2011 et juillet 2014 dans le cadre de l'étude FungiCOPD. L'âge de ces patients à l'inclusion varient entre 46 et 86 ans, avec une moyenne de 63,8 ans (+/- 9,7). Le sex-ratio de la population est de 3,2. Le bilan bioclinique à l'inclusion a permis de collecter 39 expectorations pour la recherche de la colonisation et 41 sérums pour la recherche de la sensibilisation par *A. fumigatus*. A partir de mars 2014, la recherche de la colonisation a également été effectuée à partir des LROP (n=5). Le bilan bioclinique effectué lors de la visite de fin d'étude a permis de collecter 8 expectorations et 8 LROP chez 8 patients. L'ensemble des caractéristiques des patients à l'inclusion et les résultats des analyses mycologiques sont présentés dans l'Annexe 4.

A l'inclusion, une colonisation par *A. fumigatus* a été détectée chez 15 patients sur 39 (38,5%) : 1 colonisation a été détectée par culture et qPCR *Aspergillus* spp., 8 par culture seule (23,1%), et 6 par qPCR seule. Parmi les 8 patients ayant bénéficié d'une visite de fin d'étude avant juillet 2014, 4 sont colonisés. Seul 1 de ces 4 patients était colonisé à l'inclusion (patient n°9).

La mise en culture des expectorations et des LROP des 39 patients a permis d'obtenir 68 isolats cliniques d'*A. fumigatus*. Parmi ces 68 isolats cliniques, 56 proviennent des prélèvements cliniques à l'inclusion et 12 des prélèvements cliniques de la visite de fin d'étude. La répartition des isolats en fonction des patients est présentée dans le Tableau 23.

La présence d'anticorps anti-*A. fumigatus* a été détectée à l'inclusion chez 13 patients sur les 41 patients (31,7%). Notons que 7 patients (17,1%) étaient à la fois colonisés et sensibilisés par *A. fumigatus*.

II. Prévalence de l'exposition environnementale à *A. fumigatus* et quantification du niveau d'exposition aux moisissures

A. Mesure de l'exposition environnementale par culture

L'exposition environnementale aux moisissures a pu être mesurée pour 36 patients pour lesquels les capteurs à poussières ont été récupérés. Cinq capteurs n'ont pas été reçus au laboratoire pour diverses raisons : 1 capteur a été jeté par un patient, 2 patients sont décédés et 2 patients ont arrêté l'étude. A partir de ces 36 capteurs à poussières, 1 à 159 colonies de moisissures ont été isolées soit une concentration de 10 à 1590 colonies/ml et *A. fumigatus* a été détecté dans 15 capteurs (1 à 19 colonies soit 10 à 190 colonies/ml) soit une fréquence d'exposition domestique à *A. fumigatus* chez ces patients de 41,7%. Ces 15 capteurs proviennent des domiciles de 5 patients colonisés par *A. fumigatus* (3 ayant une culture positive et 2 une qPCR *Aspergillus* spp. positive) et 10 patients non colonisés. Au total, la mise en culture de ces 36 capteurs à poussières a permis d'obtenir 41 isolats environnementaux d'*A. fumigatus*. Sept isolats supplémentaires ont été obtenus à partir d'autres prélèvements environnementaux (écouvillons, prélèvements d'air) qui avaient été effectués au cours des enquêtes environnementales réalisées au début de l'étude pour les premiers patients.

B. Quantification du niveau d'exposition aux moisissures par qPCR

La quantification de l'ADN fongique, de l'ADN d'*Aspergillus* spp. et de l'ADN d'*A. fumigatus* par qPCR a été effectuée pour 35 capteurs à poussières.

1. Détection d'ADN fongique par qPCR panfongique

Les 35 capteurs à poussières étaient tous positifs en qPCR panfongique, ce qui signifie que tous les capteurs à poussières contenaient de l'ADN fongique et donc que tous les patients sont exposés au risque fongique dans leur environnement. Ces résultats sont cohérents avec la culture qui montrait la présence de colonies fongiques pour l'ensemble des capteurs à poussières. La Figure 11 présente les courbes d'amplification et de fusion de la gamme étalon et des capteurs à poussières. La très grande hétérogénéité des températures de fusion (*melting temperature* ou T_m) pour les capteurs à poussières est cohérente avec une détection probable de fragments de différentes tailles en fonction des espèces fongiques. Les

quantités d'ADN fongique variaient de $2,47.10^4$ à $1,31.10^6$ équivalent (Eq.) spores/ml dans les capteurs, soit un ratio de 108 à 10162 par rapport à la culture.

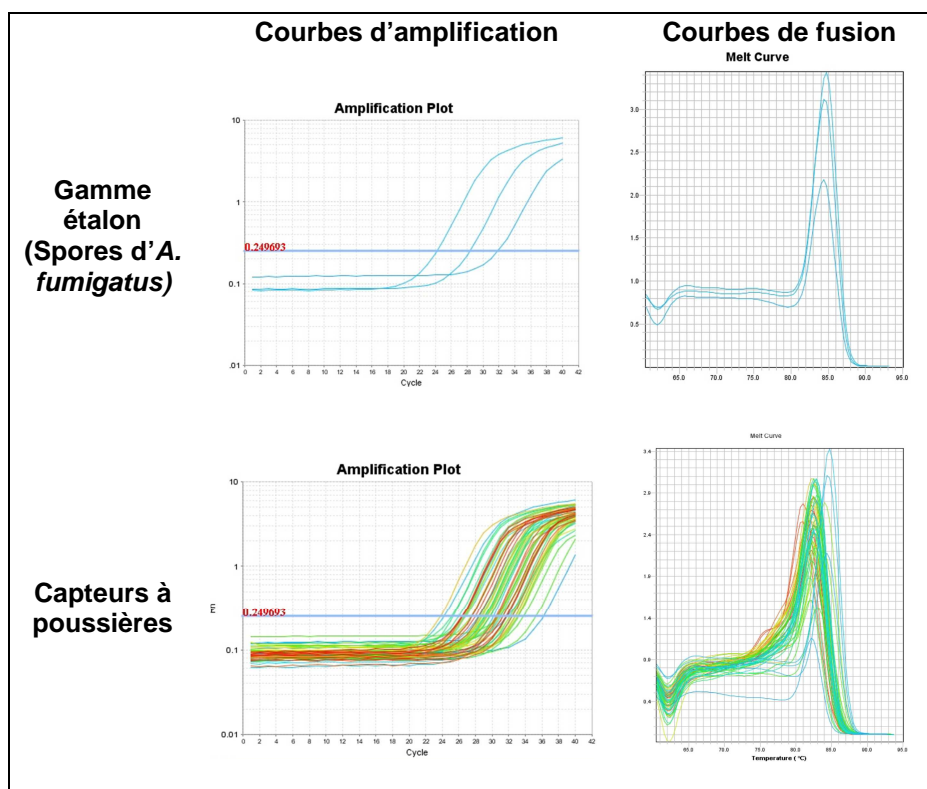


Figure 11 : Courbes d'amplification et de fusion de la gamme étalon et des capteurs à poussières obtenues par qPCR panfongique

La présence d'inhibiteurs a été détectée pour 2 patients, les patients n°23 (Cp à 33,8 au $1/10^{\text{ème}}$ et 32,4 au pur) et 34 (Cp à 23,8 au $1/10^{\text{ème}}$ et 24,6 au pur).

L'analyse de la corrélation entre le nombre de colonies de moisissures obtenues en culture et la quantité fongique exprimée en Eq. spores/ml par qPCR panfongique n'a pas permis de mettre en évidence une relation linéaire entre les résultats de ces 2 méthodes (Figure 12). Mais le calcul du coefficient de corrélation de rangs de Spearman montre l'existence d'une relation significative entre ces 2 méthodes ($p=0,0047$).

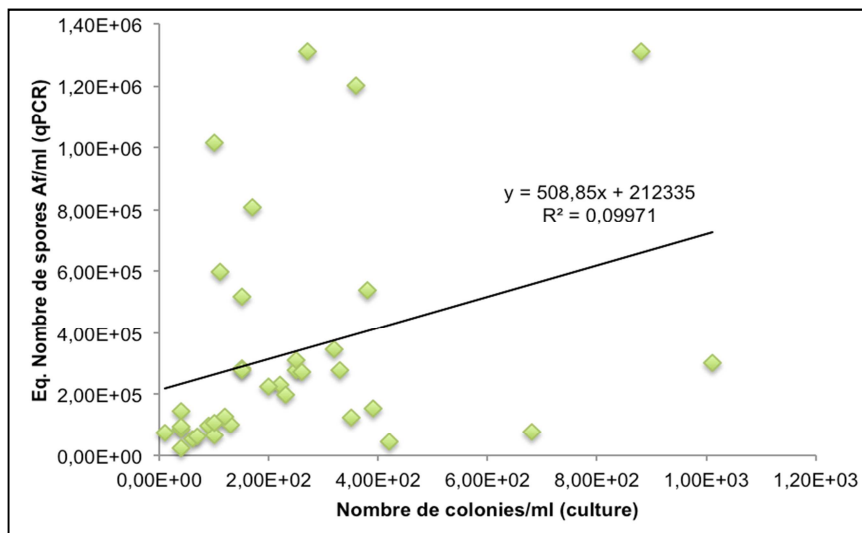


Figure 12 : Corrélation entre le nombre de colonies de moisissures obtenues par culture et les quantités d'ADN fongiques détectées par qPCR panfongique

2. Détection d'ADN d'*Aspergillus* spp.

Les 35 capteurs à poussières étaient tous positifs en qPCR *Aspergillus* spp., ce qui signifie que tous les capteurs à poussières contenaient de l'ADN aspergillaire et donc que tous les patients sont exposés à des *Aspergillus* dans leur environnement. En culture, sur ces 35 capteurs, 28 capteurs (80%) étaient positifs à *Aspergillus* (1 à 75 colonies soit 10 à 750 colonies/ml) soit 7 de moins qu'en qPCR. Dans les capteurs positifs en qPCR, les quantités d'ADN d'*Aspergillus* spp. variaient de $3,80 \cdot 10^2$ à $2,43 \cdot 10^4$ Eq. spores/ml, soit un ratio de 1 à 735 par rapport à la culture.

L'analyse de la corrélation entre le nombre de colonies d'*Aspergillus* obtenues en culture et la quantité d'*Aspergillus* exprimée en Eq. spores/ml obtenue par qPCR *Aspergillus* n'a pas permis de mettre en évidence une relation linéaire entre les résultats de ces 2 méthodes (Figure 13) et le calcul du coefficient de corrélation de rangs de Spearman n'a pas non plus montré l'existence d'une relation significative entre ces 2 méthodes ($p > 0,05$).

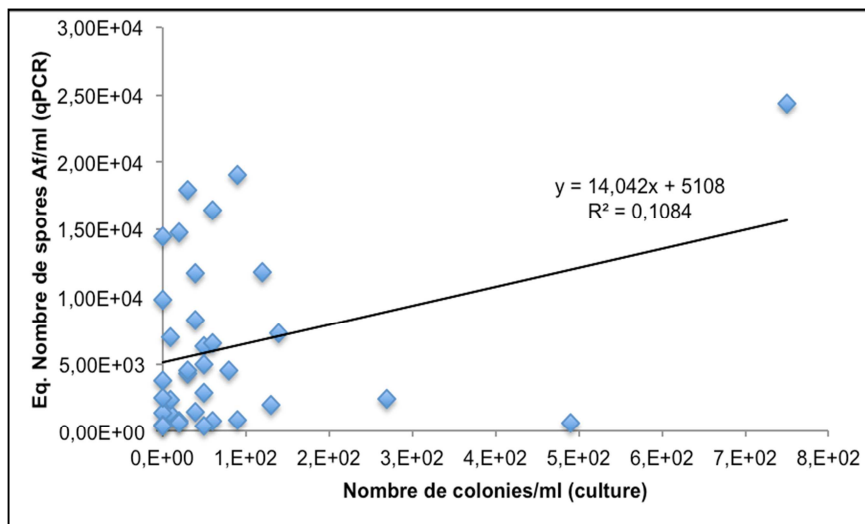


Figure 13 : Corrélation entre le nombre de colonies d'*Aspergillus* obtenues par culture et la quantité d'ADN fongique détectée par qPCR *Aspergillus*

3. Détection d'ADN d'*A. fumigatus*

a) Mise au point : choix de la concentration en sonde

La sonde AfumiP1 a été testée à 2 concentrations différentes de 0,04 μM et 0,08 μM sur une gamme standard d'ADN d'*A. fumigatus* (gamme Af) constituée de 5 points de gammes (de 10^4 à 1 fg/ μl) analysée en duplicate. La concentration optimale en sonde AfumiP1 choisie était de 0,08 μM (courbes vertes sur la Figure 14) car la fluorescence était plus intense et la limite de détection était de 1 fg/ μl contre 10 fg/ μl avec une concentration de 0,04 μM .

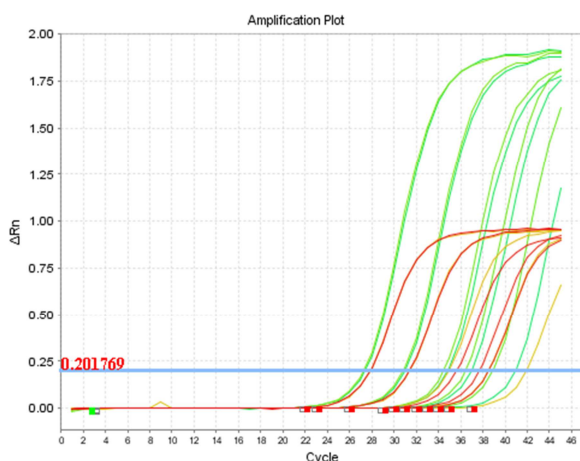


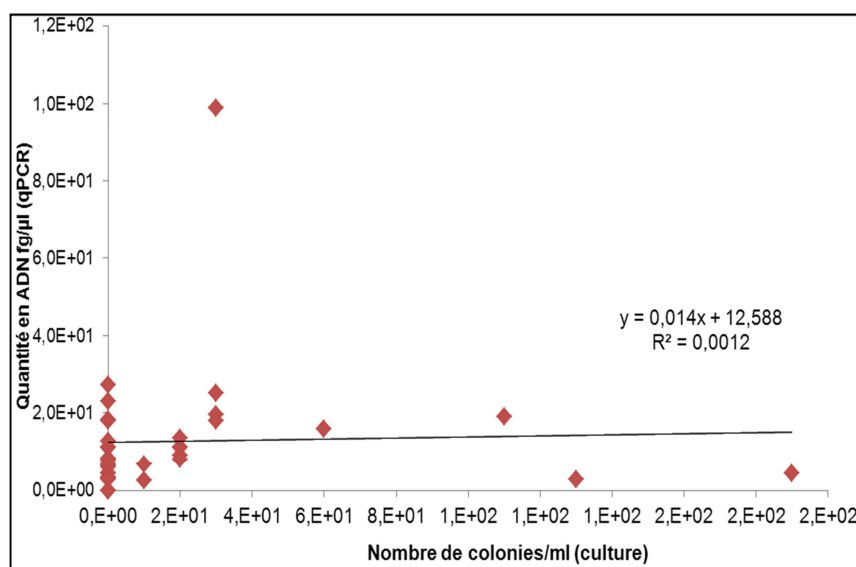
Figure 14 : Comparaison de 2 concentrations en sonde AfumiP1 (0,04 μM en rouge et 0,08 μM en vert) pour la détection d'*A. fumigatus* par qPCR

b) Analyse des capteurs à poussières

Parmi les 35 capteurs à poussières analysés en duplicate, 33 étaient positifs soit 18 capteurs supplémentaires par rapport à la culture. Les capteurs à poussières négatifs provenaient du domicile des patients n°15 et 23. Aucune colonie d'*A. fumigatus* n'avait été isolée en culture pour ces 2 capteurs.

Les quantités d'ADN d'*A. fumigatus* dans les capteurs positifs variaient de 2,6 à 98,9 fg/ μ l. Etant donné qu'un génome d'*A. fumigatus* correspond à environ 30 fg d'ADN (156), ces quantités étaient équivalentes à 87 à 3297 Eq. spores/ml, soit un ratio de 1 à 110 par rapport à la culture.

L'analyse de la corrélation entre les résultats obtenus par culture pour *A. fumigatus* et la qPCR *A. fumigatus* montre l'absence de relation linéaire et de corrélation entre culture et qPCR ($p > 0,05$), avec notamment des quantités élevées d'ADN d'*A. fumigatus* obtenues dans des capteurs pour lesquels peu de colonies avaient été obtenues en culture. Par exemple, le capteur du patient n°18 présentait 3 colonies en culture soit 30 colonies/ml et 98,9 fg/ μ l d'ADN d'*A. fumigatus* (Figure 15). Inversement, le capteur du patient n°22 présentait une quantité faible d'ADN d'*A. fumigatus* de 4,3 fg/ μ l avec un nombre élevé de 19 colonies d'*A. fumigatus* soit 190 colonies/ml.



1. Culture

Nous avons comparé le nombre de colonies obtenues en culture entre les patients C et les patients NC d'une part et entre les patients C et/ou S et les patients NC/NS d'autre part pour les 36 capteurs étudiés par culture pour évaluer le lien entre l'exposition aux moisissures dans un premier temps et l'exposition à *A. fumigatus* dans un second temps, et les phénomènes de colonisation et sensibilisation par *A. fumigatus*. Enfin, dans un troisième temps, nous avons comparé la fréquence de positivité à *A. fumigatus* des capteurs à poussières en culture en fonction des différents groupes.

Pour les colonies de moisissures et les colonies d'*A. fumigatus*, les médianes ont été comparées par le test de Mann-Whitney, qui n'a pas montré de différence significative entre les groupes de patients ($p > 0,05$). La comparaison des fréquences de positivité à *A. fumigatus* des capteurs en culture par le test de McNemar n'a pas non plus montré de différence significative entre les différents groupes (Tableau 21).

		Tous les patients (n=36)	C vs NC par <i>A. fumigatus</i>		C et/ou S vs NC/NS par <i>A. fumigatus</i>	
			C (n=14)	NC (n=22)	C et/ou S (n=20)	NC/NS (n=16)
Nombre total de colonies	Moyenne	27,9	29,9	26,7	30,7	24,5
	Médiane (Min-Max)	18,5 (1-159)	11 (1-159)	22,5 (4-101)	17,5 (1-159)	19,5 (4-101)
Nombre de colonies d' <i>A. fumigatus</i>	Moyenne	2	1,9	2,1	3	0,9
	Médiane (Min-Max)	4,1 (0-19)	0,5 (0-11)	0 (0-19)	0 (0-19)	0 (0-3)
% de capteurs positifs à <i>A. fumigatus</i> (n=15)		41,7	50	36,4	45	37,5

Tableau 21 : Comparaison du nombre total de colonies, du nombre de colonies d'*A. fumigatus* et de la fréquence de positivité à *A. fumigatus* des capteurs positifs en culture entre les patients colonisés (C) versus patients non colonisés (NC) et entre les patients colonisés et/ou sensibilisés (C et/ou S) versus les patients non colonisés non sensibilisés (NC/NS)

2. qPCR

Nous avons comparé les quantités d'ADN obtenues pour les qPCR panfongique, *Aspergillus* et *A. fumigatus* entre les patients C et les patients NC d'une part et entre les patients C et/ou S et les patients NC/NS d'autre part pour les 35 capteurs étudiés par qPCR.

Les médianes des quantités d'ADN fongique et d'ADN d'*Aspergillus* ont été comparées par le test de Mann-Whitney, qui n'a pas montré de différence significative entre les groupes de patients ($p > 0,05$). Pour la qPCR *A. fumigatus*, malgré des quantités d'ADN plus élevés pour les groupes « C » et « C et/ou S »,

nous n'avons pas non plus retrouvé de différence significative, mais avec un « p » plus faible que pour les autres qPCR ($p=0,142$ pour C vs NC et $p=0,180$ pour C et/ou S vs NC/NS). Enfin, les fréquences de positivité à *A. fumigatus* des capteurs en qPCR n'étaient pas non plus significativement différentes entre les différents groupes (Tableau 22).

		Tous les patients (n=35)	C vs NC par <i>A. fumigatus</i>		C et/ou S vs NC/NS par <i>A. fumigatus</i>	
			C (n=13)	NC (n=22)	C et/ou S (n=19)	NC/NS (n=16)
qPCR panfongique (Eq. spore/ml)	Moyenne	3,4E+05	4,2E+05	2,9E+05	4,1E+05	2,4E+05
	Médiane (Min-Max)	2,3E+05 (2,5E+04-1,3E+06)	1,5E+05 (2,5E+04-1,3E+06)	2,5E+05 (4,5E+04-1,2E+06)	2,3E+05 (2,5E+04-1,3E+06)	2,1E+05 (4,5E+04-8,1E+05)
qPCR <i>Aspergillus</i> (Eq. spore/ml)	Moyenne	6,2E+03	6,4E+03	6,2E+03	5,8E+03	6,7E+03
	Médiane (Min-Max)	4,3E+03 (3,8E+02-1,3E+06)	2,5E+03 (3,9E+02-2,4E+04)	4,4E+03 (3,8E+02-1,9E+04)	2,5E+03 (3,9E+02-2,4E+04)	5,7E+03 (3,8E+02-1,9E+04)
qPCR <i>A. fumigatus</i> (fg/μl)	Moyenne	12,9	18,8	9,4	16,7	8,4
	Médiane (Min-Max)	9 (0-98,9)	12,8 (0-98,9)	8,1 (0-27,1)	12,8 (0-98,9)	8,1 (0-23,1)
% de capteurs positifs (n=33)		94,3	92,3	95,4	94,7	93,8

Tableau 22 : Comparaison des quantités d'ADN fongique, d'*Aspergillus* et d'*A. fumigatus* dans les capteurs à poussières et de la fréquence de positivité à *A. fumigatus* des capteurs positifs en qPCR *A. fumigatus* entre les patients colonisés (C) versus patients non colonisés (NC) et entre les patients colonisés et/ou sensibilisés (C et/ou S) versus les patients non colonisés non sensibilisés (NC/NS)

III. Caractérisations phénotypique et génotypique des isolats cliniques et environnementaux d'*A. fumigatus*

Au total, 68 isolats cliniques et 48 isolats environnementaux ont été obtenus et étudiés, soit 116 isolats d'*A. fumigatus*.

A. Confirmation de l'identification des isolats par méthodes phénotypique et moléculaire

La culture à 50°C était positive pour la totalité des 116 isolats d'*A. fumigatus*.

Pour le séquençage ITS, 92 séquences comportaient un pourcentage de similarité de 100% avec la séquence de la souche *A. fumigatus* ATCC 1022 (séquence GenBank KF314727). Vingt-deux séquences possédaient la mutation en position T126C retrouvée dans les bases de données, avec un pourcentage de similarité de 100% avec la souche *A. fumigatus* UWFP 503 (séquence GenBank AY214448). Il s'agit de 12 isolats environnementaux provenant de 5 patients différents (patients n°1, 2, 22, 29 et 39) et de 10 isolats cliniques provenant du même patient (patient n°42). Deux séquences présentaient la mutation C46G, non retrouvée dans les

bases de données, correspondant à 2 isolats cliniques provenant du même patient (patient n°24) (Figure 16).

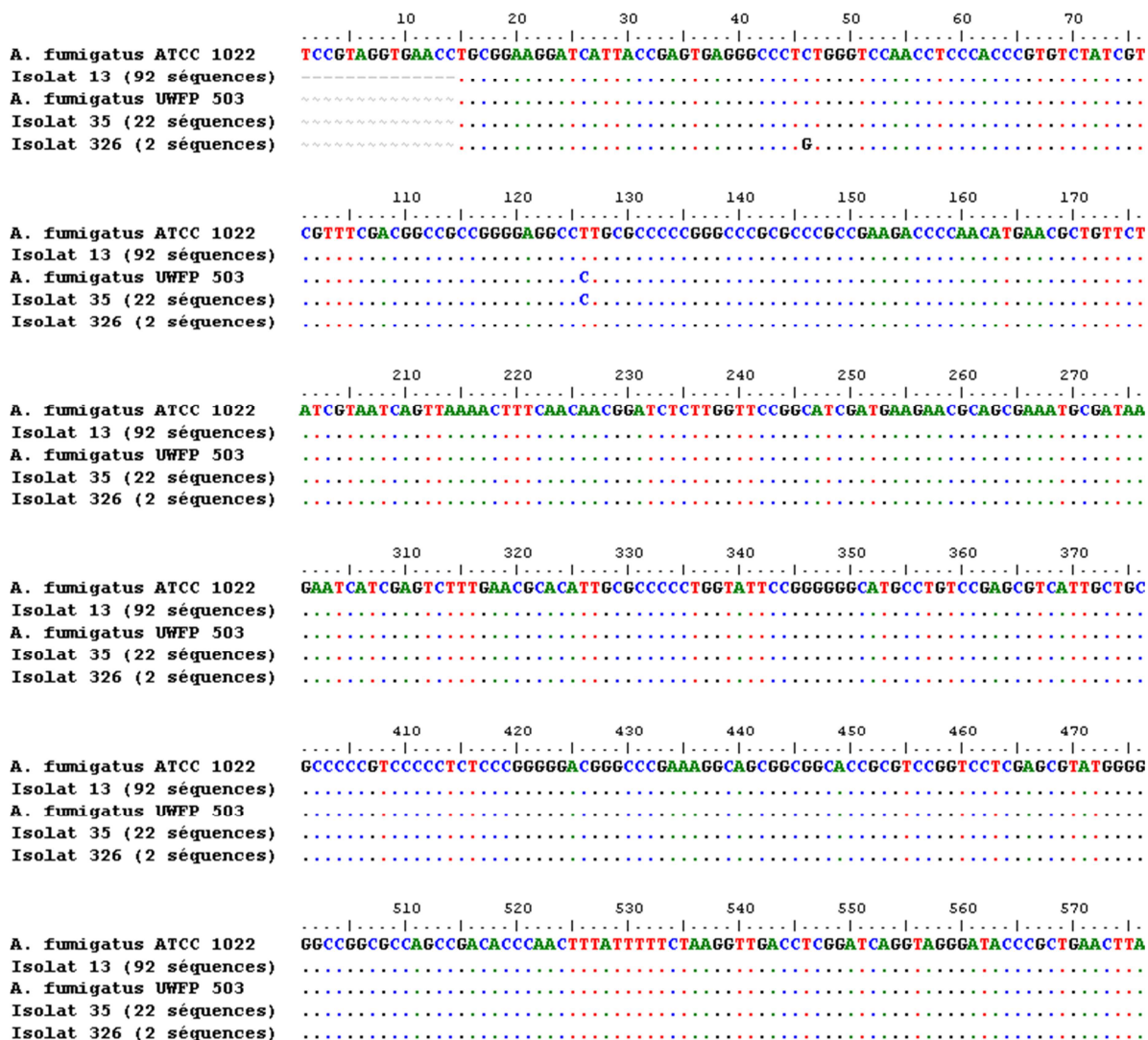


Figure 16 : Aligement des 3 types de séquences des régions ITS1 et ITS2 obtenus pour les 116 isolats avec les séquences des souches *A. fumigatus* ATCC 1022 et UWFP 503

Pour le séquençage β -tubuline, 114 séquences comportaient un pourcentage de similarité de 100% avec la séquence de la souche *A. fumigatus* CBS 133.61 (séquence GenBank KF314730). Une séquence présentait la mutation silencieuse située sur un intron en position G12A non retrouvée dans les bases de données. Elle correspond à un isolat environnemental du patient n°9 (isolat 59). Une séquence présentait la mutation non silencieuse G360A qui entraîne dans la séquence protéique la substitution d'une valine par une isoleucine en position 45 (V45I) non retrouvée dans les bases de données. Cette séquence correspond à un isolat environnemental du patient n°2 (isolat 287). Malgré la présence de cette mutation ponctuelle, le séquençage des régions ITS1 et ITS2 et les nombreuses différences entre les gènes β -tubuline d'espèces même proche phylogénétiquement, telle que *Neosartorya fischeri* (souche CBS 544.65, séquence GenBank KJ175519)

(Figure 17) ont permis de confirmer l'identification de l'espèce *A. fumigatus* pour cet isolat.

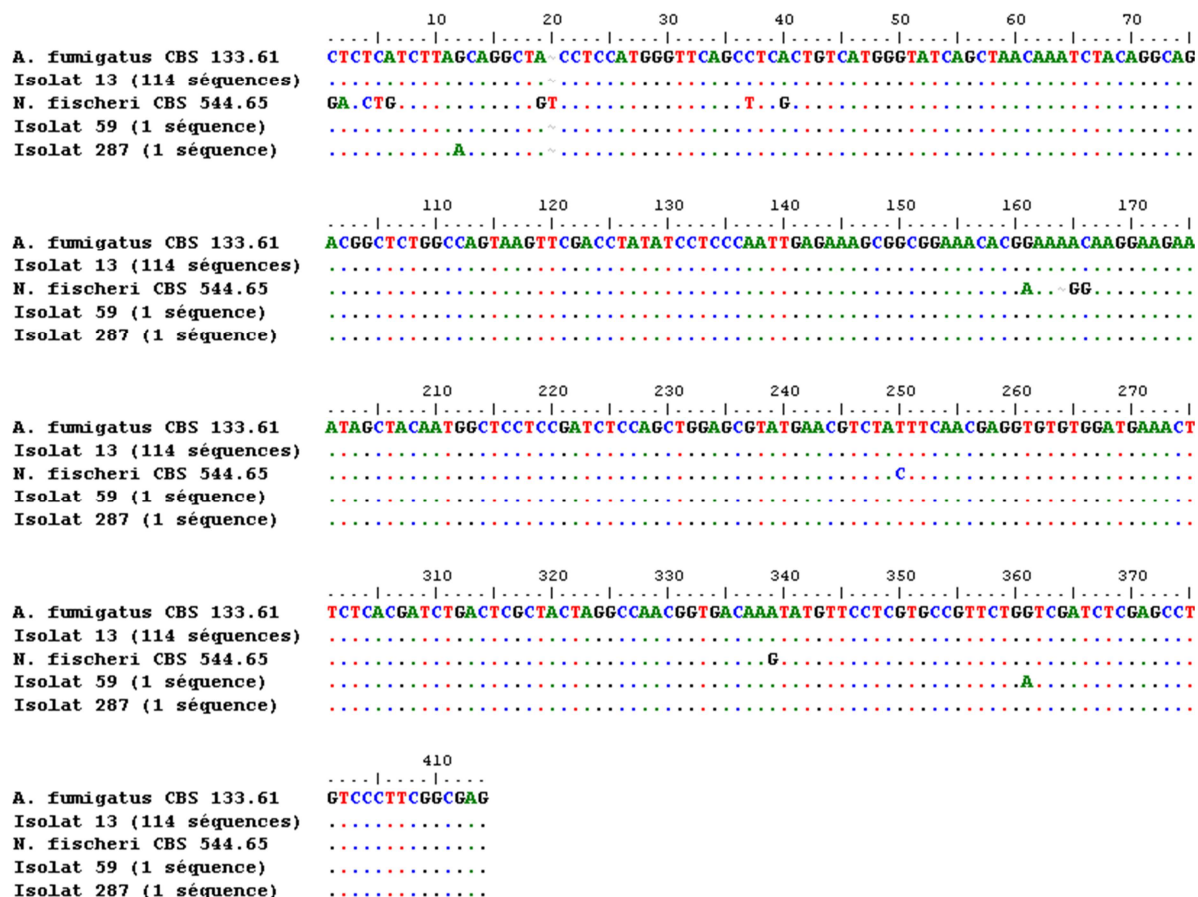


Figure 17 : Alignement des 3 types de séquences du gène β -tubuline obtenus pour les 116 isolats avec les séquences des souches *A. fumigatus* CBS 133.61 et *N. fischeri* CBS 544.65

Les données ont donc permis de confirmer l'identification morphologique (macroscopique et microscopique) de la totalité des 116 isolats d'*A. fumigatus*. Aucune autre espèce de la section *Fumigati* n'a été isolée dans notre population.

B. Identification des mutations du gène *cyp51A*

1. Mutations non silencieuses

Le séquençage du gène *cyp51A* et de son promoteur effectué sur les 116 isolats d'*A. fumigatus* a permis de mettre en évidence 5 profils de mutation différents dans 10 isolats dont 5 cliniques et 5 environnementaux chez 6 patients différents. La mutation TR34/L98H a été détectée dans 2 isolats environnementaux provenant de 2 patients différents (patients n°7 et n°22). Les mutations associées F46Y, M172V, N248T, D255E, E427K ont été détectées dans 2 isolats cliniques provenant du même patient (patient n°24) et dans 1 isolat environnemental (patient n°7). Un autre isolat environnemental provenant du capteur du patient n°9 a présenté l'association des 3

mutations F46Y, M172V, E427K. La mutation A284T a été détectée dans 3 isolats cliniques issus du même patient (patient n°41). Enfin, la mutation H285Y a été détectée dans un isolat environnemental provenant du patient n°22. Les caractéristiques des isolats et les résultats du séquençage *cyp51A* sont résumés dans le Tableau 23.

N° Patient	Statut à l'inclusion	Origine des isolats		Nombre d'isolats	Séquençage du gène <i>cyp51A</i>		
					WT	Mutation non silencieuse	Mutation silencieuse
1	NC/NS	Environnement	Air	3	3		
			Capteur	2	2		
2	C/S	Clinique	Expectoration	3	3		
			Environnement	Air	1	1	
		Écouvillon		1	1		
		Capteur	4	3		1 G1696A	
7	NC/NS	Environnement	Air	1			1 G1696A
			Capteur	2		1 TR34/L98H 1 F46Y, M172V, N248T, D255E, E427K	
8	NC/NS	Environnement	Écouvillon	1	1		
9	C	Environnement	Capteur	1		1 F46Y, M172V, E427K	
			Clinique	Expectoration	1	1	
10	S	Clinique	Expectoration	10	10		
12	NC/NS	Environnement	Capteur	1	1		
18	C/S	Clinique	Expectoration	1	1		
			Environnement	Capteur	4	4	
19	S	Environnement	Capteur	4	4		
			Clinique	LROP	1	1	
21	C/S	Clinique	Expectoration	5			5 G1696A
22	NC/NS	Environnement	Capteur	12	10	1 TR34/L98H* 1 H285Y	
24	NC/NS	Clinique	Expectoration	6	4	2 F46Y, M172V, N248T, D255E, E427K	
27	S	Environnement	Capteur	1	1		
29	NC/NS	Environnement	Capteur	1	1		
30	NC/NS	Environnement	Capteur	2	1		1 G1696A
31	S	Environnement	Capteur	1	1		
34	C	Clinique	Expectoration	12	6+1*		5 G1696A
39	C	Clinique	LROP	11	11		
			Environnement	Capteur	3	3	
40	C	Environnement	Capteur	3	3		
41	C/S	Clinique	Expectoration	8	5	3 A284T	
42	C	Clinique	Expectoration	9			9 C1562T
			LROP	1	1		
TOTAL				116	77	10	21

Tableau 23 : Caractérisation des isolats cliniques et environnementaux : origine, séquençage du gène *cyp51A* et résultat de la culture sur milieu ITZ

C : colonisé, S : sensibilisé, C/S : colonisé et sensibilisé, NC/NS : non colonisé et non sensibilisé par *A. fumigatus* ; WT : Wild type (Absence de mutation) ;

*Isolats obtenus par sélection après ensemencement direct du prélèvement sur milieu ITZ si >10 colonies d'*A. fumigatus* ;

Rouge : isolats avec culture positive sur milieu ITZ ;

Jaune : patients colonisés pour lesquels des isolats cliniques et environnementaux ont été obtenus en culture ;

Bleu : prélèvement de la visite de fin d'étude

2. Mutations silencieuses

Sur les 116 isolats étudiés, 13 isolats présentaient la mutation silencieuse G1696A dont 3 isolats environnementaux chez 3 patients différents (patients n°2, 7 et 30) et 10 isolats cliniques chez 2 patients différents (patients n°21 et 34). Neuf isolats cliniques provenant du même patient (n°42) présentaient la mutation silencieuse C1562T.

3. Circulation des isolats mutés ou non au sein et entre les réservoirs cliniques et environnementaux

a) Circulation des isolats au sein des réservoirs cliniques et environnementaux

La coexistence dans un même prélèvement d'isolats présentant ou non des mutations du gène *cyp51A* a été mise en évidence aussi bien dans les prélèvements cliniques (réservoirs cliniques) que dans les capteurs à poussières (réservoirs environnementaux).

Dans les prélèvements cliniques, des isolats mutés ou non coexistent chez les patients n°24, 34 et 41. L'expectoration du patient n°24 présente 4 isolats non mutés et 2 isolats présentant le profil F46Y, M172V, N248T, D255E, E427K. L'expectoration du patient n°34 présente 7 isolats non mutés et 5 isolats présentant la même mutation silencieuse G1696A. L'expectoration du patient n°41 présente 5 isolats non mutés et 3 isolats présentant la même mutation non silencieuse A284T.

Dans les capteurs à poussières et donc dans l'environnement domestique des patients, des isolats mutés ou non coexistent chez les patients n°2, 7, 22 et 30.

Les capteurs des patients n°2 et 30 présentent un isolat non muté et un isolat présentant la mutation silencieuse G1696A. Les capteurs des patients n°7 et 22 présentent 2 isolats mutés avec 2 profils de mutation différents dont 1 présentant la mutation TR34/L98H associée pour le patient n°7 à 1 isolat présentant le profil F46Y, M172V, N248T, D255E, E427K et pour le patient n°22 à 1 isolat présentant la mutation H285Y.

b) Circulation des isolats entre les réservoirs cliniques et environnementaux

La circulation des isolats entre les réservoirs cliniques et environnementaux a pu être étudiée pour seulement 3 patients pour lesquels à la fois des isolats cliniques et environnementaux d'*A. fumigatus* avaient été obtenus en culture : les patients n°2, 18 et 39 (en jaune dans le Tableau 23). Notons que le patient n°19 possède

également un isolat clinique et des isolats environnementaux mais l'isolat clinique provient d'un LROP effectué en visite de fin d'étude, le patient n'était donc pas considéré comme colonisé à l'inclusion.

Un des isolats environnementaux du patient n°2 présente une mutation silencieuse (G1696A), non retrouvée dans les isolats cliniques de ce patient.

Les isolats cliniques et environnementaux des patients n°18 et 39 ne présentent pas de mutations du gène *cyp51A*.

c) Distribution géographique des isolats cliniques et environnementaux

Les isolats environnementaux mutés TR34/L98H ont été retrouvés dans 2 villes distinctes : Marcq-en-Barœul et Faches-Thumesnil (Figure 18). L'isolat environnemental muté H285Y provient de Marcq-en-Barœul et, les isolats cliniques mutés A284T, de Marquillies. Les isolats mutés F46Y, M172V, N248T, D255E, E427K et F46Y, M172V, E427K sont localisés à Lille et à Faches-Thumesnil. La plupart des isolats provenaient de domiciles situés en région lilloise, en raison du recrutement des patients au CHRU de Lille.

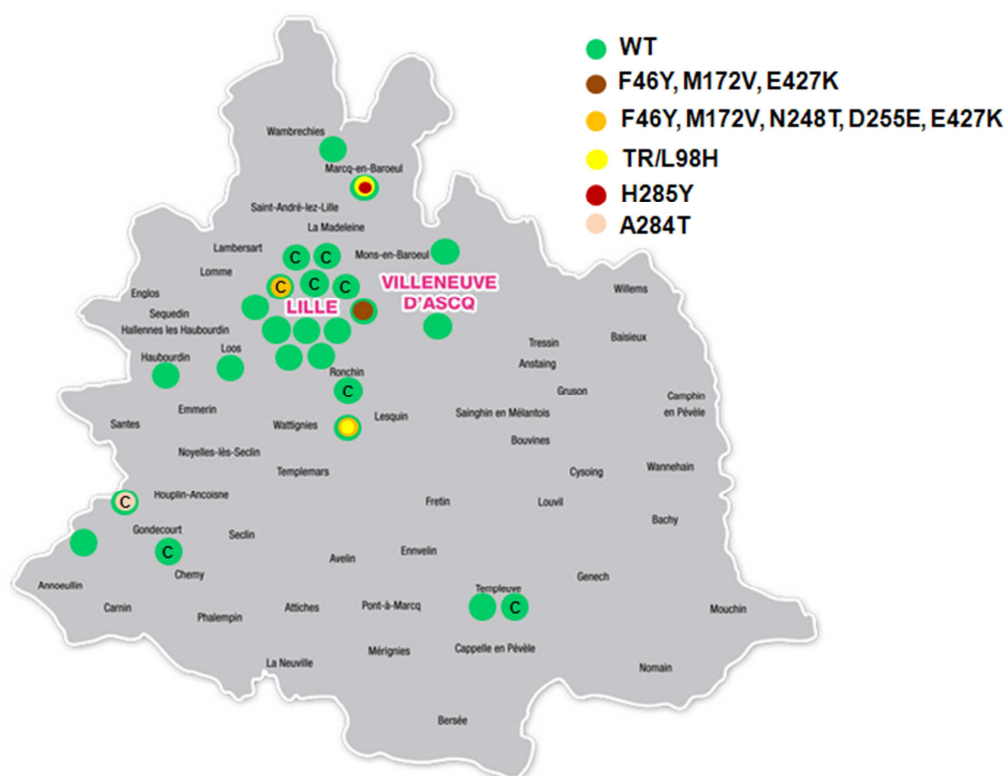


Figure 18 : Distribution géographique au sein de la région Nord-Pas-de-Calais des isolats cliniques et environnementaux présentant une mutation non silencieuse ou non (WT) (C : isolats cliniques)

C. Sélection des isolats résistants aux azolés par ensemencement sur milieu ITZ 4 mg/l

Sur les 116 isolats étudiés, 7 sont ITZ+ (culture positive sur milieu Sabouraud additionné d'ITZ à 4mg/l) et 109 ITZ- (culture négative sur milieu Sabouraud

additionné d'ITZ 4mg/l). Parmi les 7 isolats ITZ+, on retrouve les 2 isolats environnementaux mutés TR34/L98H des patients n°7 et n°22, l'isolat environnemental muté H285Y du patient n°22 et les 3 isolats cliniques mutés A284T du patient n°41. Un isolat clinique provenant du patient n°34, obtenu par ensemencement direct de l'expectoration sur milieu ITZ est ITZ+ et ne présente pas de mutation du gène *cyp51A*. Notons que la croissance sur ITZ est plus ou moins dense pour les 7 isolats ITZ+ (Tableau 24). Aucune croissance n'a été observée sur milieu ITZ pour les isolats mutés F46Y, M172V, N248T, D255E, E427K et F46Y, M172V, E427K ni pour les isolats présentant des mutations silencieuses.


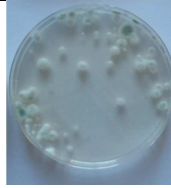

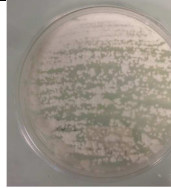
Aspect de la culture sur milieu ITZ				
Mutation	TR/L98H	H285Y	A284T	WT
Nombre d'isolats	2	1	3	1
Origine des isolats	Environnement	Environnement	Clinique	Clinique
N° Patient	7 et 22	22	41	34

Tableau 24 : Aspect de la culture sur milieu ITZ pour les isolats ITZ+

D. Détermination des CMI par méthode Etest®

Les CMI ont été déterminées par méthode Etest® sur les 10 isolats présentant des mutations non silencieuses et l'isolat ITZ+ ne présentant pas de mutation du gène *cyp51A*. Les résultats sont récapitulés dans le Tableau 25.

Mutations <i>cyp51A</i>	CMI (mg/l)			Origine des isolats	Patient
	ITZ	VOR	POS		
ITZ+					
TR34/L98H	24	0.75	0.38	Environnement	7
TR34/L98H	>32	1	0.5	Environnement	22
H285Y	8	1	0.25	Environnement	22
Non	>32	2	1	Clinique	34
A284T	1.5	0.19	0.19	Clinique	41
A284T	1.5	0.19	0.19	Clinique	41
A284T	2	0,38	0,125	Clinique	41
ITZ-					
F46Y, M172V, E427K	0,38	0,125	0,064	Environnement	9
F46Y, M172V, N248T, D255E, E427K	1.5	0.125	0.125	Environnement	7
F46Y, M172V, N248T, D255E, E427K	1.5	0.125	0.094	Clinique	24
F46Y, M172V, N248T, D255E, E427K	3	0.38	0.125	Clinique	24

Tableau 25 : CMI déterminées par méthode Etest® pour les isolats ITZ+ et/ou présentant des mutations du gène *cyp51A*

Rouge : Résistant, Orange : Intermédiaire, Vert: Sensible selon les seuils déterminés par l'EUCAST (126)

Les 7 isolats ITZ+ présentent tous des CMI élevées pour l'ITZ : 4 isolats ITZ+ sont résistants à l'ITZ avec une CMI strictement supérieure à 2 mg/l et 3 isolats ITZ+ sont de sensibilité intermédiaire (CMI supérieure à 1 mg/l mais inférieure ou égale à 2 mg/l). Les isolats environnementaux mutés TR34/L98H sont résistants à l'ITZ et au POS mais pas au VOR, bien qu'ils présentent tout de même des CMI plus élevées pour ce dernier. L'isolat clinique ITZ+ du patient 34 est résistant à tous les antifongiques azolés et ne présente pas de mutations sur le gène *cyp51A*.

Concernant les isolats ITZ-, 2 isolats mutés F46Y, M172V, N248T, D255E, E427K des patients n°7 et 24 sont intermédiaires à l'ITZ, 1 isolat clinique muté F46Y, M172V, N248T, D255E, E427K est résistant à l'ITZ et l'isolat environnemental muté F46Y, M172V, E427K est sensible à l'ITZ.

E. Prévalence de la résistance aux azolés

1. Prévalence de la résistance à l'ITZ

Sur les 116 isolats cliniques et environnementaux étudiés, 5 isolats sont résistants à l'ITZ (CMI ITZ > 2 mg) soit une prévalence de résistance globale à l'ITZ en fonction du nombre d'isolats d'*A. fumigatus* de 4,3% (5/116). Sur les 5 isolats R à l'ITZ, 2 sont d'origine clinique et 3 d'origine environnementale, soit une prévalence de résistance clinique à l'ITZ de 2,9% (2/68) et une prévalence de résistance environnementale à l'ITZ de 6,3% (3/48).

La résistance à l'ITZ a été détectée dans l'environnement de 2 patients (n°7 et 22) soit une prévalence en fonction des patients de 5,6% (2/36) et dans les prélèvements cliniques de 2 patients (n°24 et 34), soit une prévalence de 4,9% (2/41).

Deux capteurs (n°7 et 22) parmi les 15 capteurs positifs en culture à *A. fumigatus* présentent des isolats résistants à l'ITZ soit une prévalence de résistance à l'ITZ en fonction des capteurs positifs à *A. fumigatus* de 13,3% (2/15) (Tableau 26).

2. Prévalence de la mutation TR34/L98H

La mutation TR34/L98H a été détectée dans 2 isolats sur 48 isolats environnementaux (4,2%) chez 2 patients différents, la prévalence de la mutation TR34/L98H dans l'environnement domestique de notre population est donc de 5,6% (2/36). En fonction des capteurs positifs à *A. fumigatus*, la prévalence de la mutation TR34/L98H s'élève à 13,3% (2/15) (Tableau 26). Aucun isolat clinique présentant la mutation TR34/L98H n'a été détecté.

	Prévalence de la résistance à l'ITZ			Prévalence de la mutation TR34/L98H		
	Isolats cliniques	Isolats environnementaux	Total	Isolats cliniques	Isolats environnementaux	Total
En fonction des isolats (n=116)	2,9 % (2/68)	6,3 % (3/48)	4,3 % (5/116)	0 (0/68)	4,2 % (2/48)	1,7% (2/116)
En fonction des patients (n=41)	4,9 % (2/41)	5,6 % (2/36)		0 (0/68)	5,6 % (2/36)	
En fonction des capteurs positifs à <i>A. fumigatus</i> (n=15)		13,3 % (2/15)			13,3 % (2/15)	

Tableau 26 : Prévalence de la résistance à l'ITZ et de la mutation TR34/L98H en fonction des isolats, des patients et des capteurs positifs à *A. fumigatus*

IV. Détection directe des isolats mutés TR34/L98H dans les capteurs à poussières

La détection des isolats mutés TR34/L98H a été effectuée à l'aide de 2 qPCR, l'une ciblant le motif TR34 situé dans le promoteur et l'autre la mutation L98H du gène *cyp51A*.

A. qPCR ciblant le motif TR34 situé dans le promoteur du gène *cyp51A* (qPCR TR34)

1. Mise au point : choix de la concentration en amorces

Les amorces TR-F et TR-R ont été testées à 4 concentrations différentes : 0,1 µM, 0,2 µM, 0,4 µM et 1 µM sur 5 points des 2 gammes WT et TR34/L98H décrites précédemment (10^6 , 10^5 , 10^4 , 10^3 et 10^2 spores/ml). Les courbes de fusion montrent la présence de 2 pics : le premier pic correspond au Tm de l'isolat WT et le second correspond au Tm de l'isolat muté car le promoteur est plus long pour l'isolat muté (34 pb en plus soit un fragment de 146 pb versus 112 pb pour l'isolat WT) (Figure 19).

Les essais réalisés ont permis de montrer que la concentration optimale en amorces TR-F et TR-R était de 0,4 µM car, malgré l'apparition de dimères d'amorces, la limite de détection est la plus faible, de 10^2 spores/ml, pour les 2 gammes WT et TR34/L98H (Figure 19).

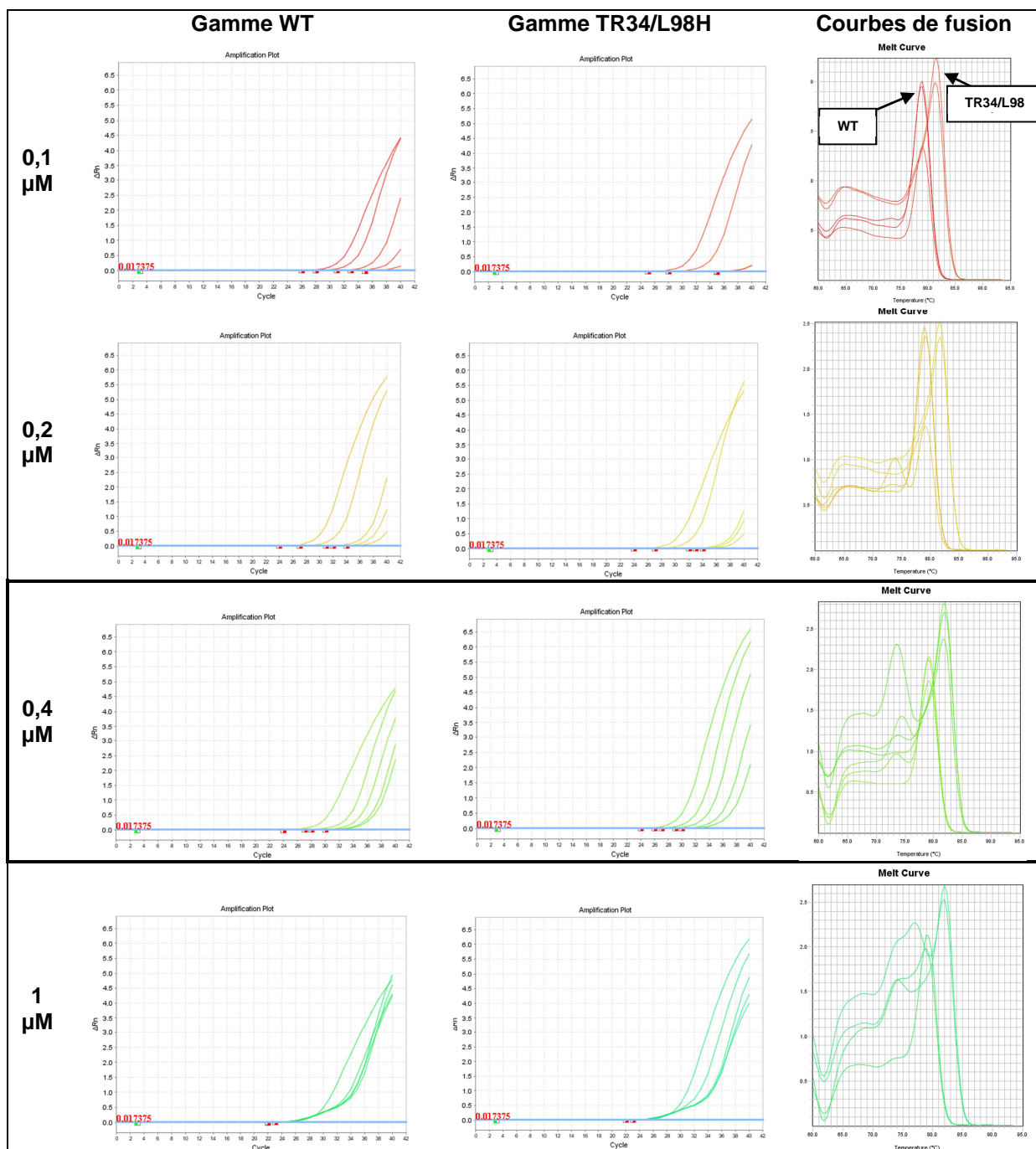


Figure 19 : Analyse en qPCR TR SYBR®Green des gammes WT et TR34/L98H à différentes concentrations en amorces TR-F et TR-R (0,1; 0,2; 0,4 et 1µM). La concentration optimale en amorces choisie pour l'analyse des capteurs est encadrée.

2. Analyse des capteurs à poussières

Les capteurs à poussières ont ensuite été analysés au pur et au 1/10^{ème}. Dans chaque série, 5 points des 2 gammes WT et TR34/L98H (10⁶, 10⁵, 10⁴, 10³ et 10² spores/ml) étaient ajoutés pour la quantification en Eq. spores/ml.

Sur les 35 capteurs à poussières analysés, aucun isolat présentant une mutation TR34 n'a été mis en évidence, y compris pour les capteurs n°7 et 22 pour lesquels 1 isolat muté TR34/L98H avait été détecté par culture.

Par contre, la détection d'*A. fumigatus* WT était positive pour 9 capteurs, qui présentaient un signal d'amplification avec un T_m de l'amplicon situé au même endroit que le T_m de la gamme WT (Figure 20).

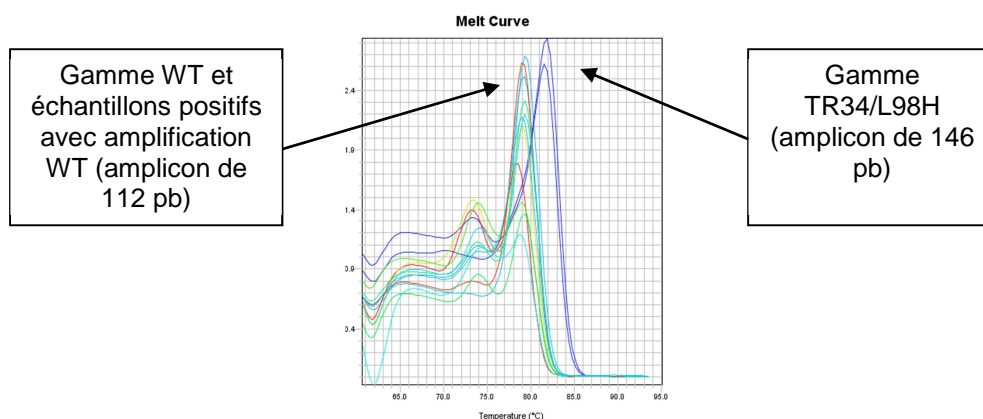


Figure 20: Courbes de fusion obtenues pour les capteurs à poussières positifs en qPCR TR34 (SYBR®Green) (amplification WT pour les capteurs n° 1, 4, 12, 21, 24, 26, 29, 30, 33, absence d'amplification TR34).

Les quantités en qPCR TR34 dans ces 9 capteurs variaient de $2,2 \cdot 10^3$ à $2,6 \cdot 10^5$ Eq. spores/ml (Tableau 28). Une faible concordance entre le nombre de colonies d'*A. fumigatus* et la qPCR TR34 était observée puisque, la présence de colonies d'*A. fumigatus* n'avait été détectée en culture que pour 4 des 9 capteurs positifs en qPCR TR34, avec un ratio de 4205 à 13000 par rapport à la culture pour ces 4 capteurs. De même, 11 capteurs positifs en culture à *A. fumigatus* étaient négatifs en qPCR TR34. De la même façon, si nous étudions la concordance entre la qPCR *A. fumigatus* et la qPCR TR34, les 9 capteurs positifs en qPCR TR34 étaient également positifs en qPCR *A. fumigatus*, avec des quantités variant de 2,8 à 13,5 fg/ μ l, soit 93 à 450 Eq. spores/ml (Tableau 28), avec un ratio qPCR TR34/qPCR *A. fumigatus* variant de 10 à 1359. Par contre, parmi les 26 capteurs négatifs en qPCR TR34, 24 étaient positifs et 2 seulement étaient négatifs en qPCR *A. fumigatus*. Ces résultats s'expliquent par la sensibilité plus faible de la qPCR TR34 par rapport à la qPCR *A. fumigatus* car elle cible le gène *cyp51A* présent en une seule copie dans le génome d'*A. fumigatus* (157) alors que la qPCR *A. fumigatus* cible les régions ITS des ARNr, dont le gène est présent en multicopie.

B. qPCR ciblant la mutation L98H du gène *cyp51A* (qPCR L98H)

1. Mise au point

a) Choix de la concentration en amorces

Les amorces L98F et L98R ont été testées préalablement en qPCR SYBR®Green à 4 concentrations différentes : 0,1 μM , 0,2 μM , 0,4 μM et 1 μM sur les 2 gammes WT et TR34/L98H décrites précédemment. Ces essais nous ont permis de sélectionner la concentration de 0,2 μM , qui permettait d'obtenir une limite de détection de 10^4 spores/ml, identique pour les 2 gammes WT et TR34/L98H (Figure 21).

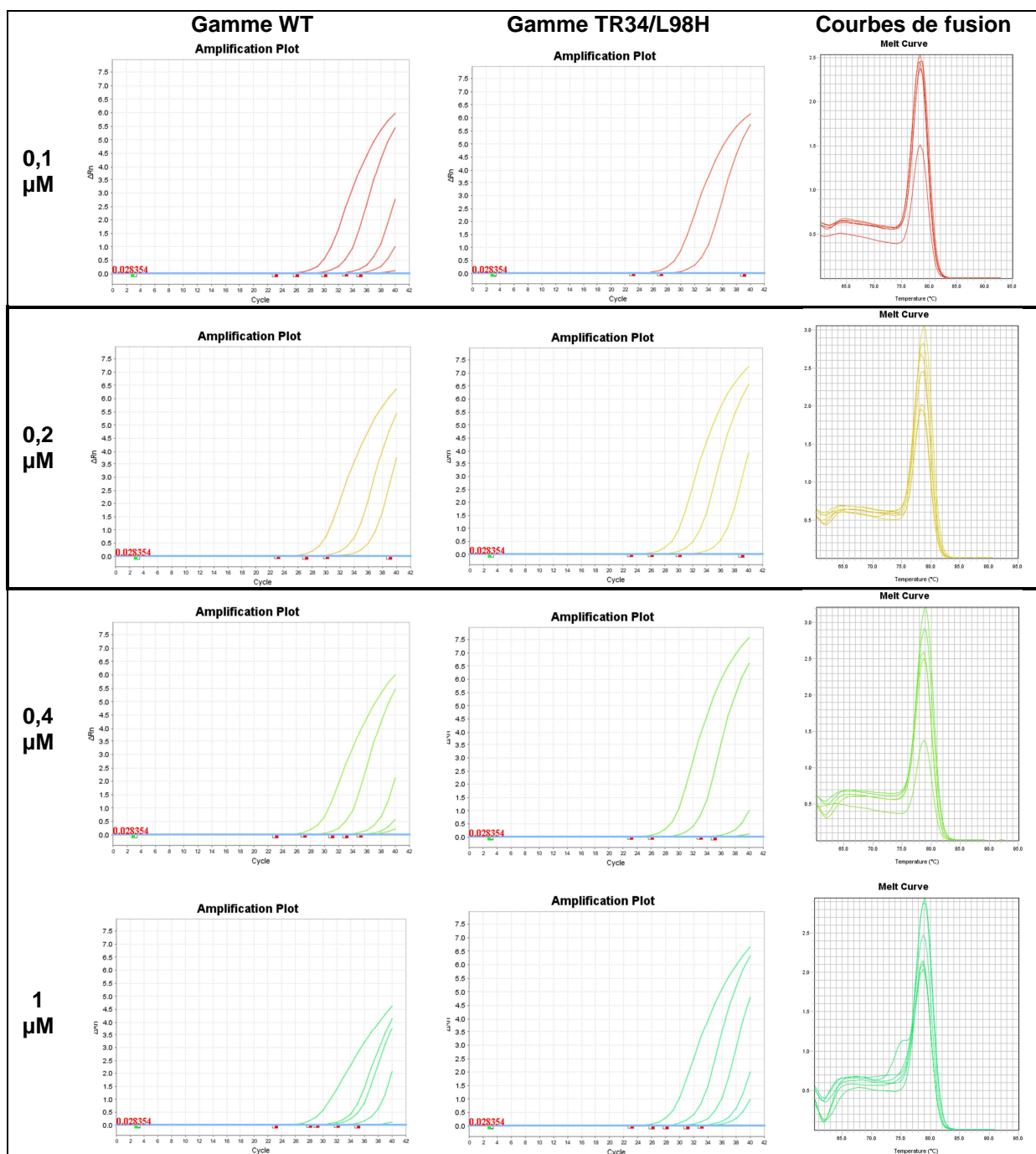


Figure 21 : Analyse en qPCR L98H SYBR®Green des gammes WT et TR34/L98H en utilisant différentes concentrations en amorces L98F et L98R (0,1; 0,2; 0,4 et 1 μM). La concentration optimale en amorces choisie est encadrée.

b) Choix de la concentration en sondes

Avec la concentration optimale en amorces L98F et L98R de 0,2 μM , les sondes L98 WT et L98H ont été testées aux concentrations de 0,1 μM , 0,2 μM et 0,4 μM sur les gammes WT et TR/L98H afin de déterminer la concentration optimale en sondes (Figure 22). La composition des mélanges réactionnels est indiquée dans le Tableau 27.

Concentration finale en sonde	Sonde 0,1 μM	Sonde 0,2 μM	Sonde 0,4 μM
Amorce L98F 10 μM	0,4 μL	0,4 μL	0,4 μL
Amorce L98R 10 μM	0,4 μL	0,4 μL	0,4 μL
Sonde L98 WT	0,2 μL	0,4 μL	0,8 μL
Sonde L98H	0,2 μL	0,4 μL	0,8 μL
Mix sonde Applied	10 μL	10 μL	10 μL
ADN	2 μL	2 μL	2 μL
Eau	6,8 μL	6,4 μL	5,6 μL

Tableau 27 : Composition des mix pour la qPCR L98H avec des concentrations en sondes L98 WT et L98H de 0,1, 0,2 et 0,4 μM .

La concentration optimale en sonde choisie était de 0,1 μM car pour les 2 sondes, la limite de détection était la plus faible à cette concentration : 10^4 spores/ml et il n'y a eu aucun signal avec la concentration en sonde de 0,4 μM (Figure 22).

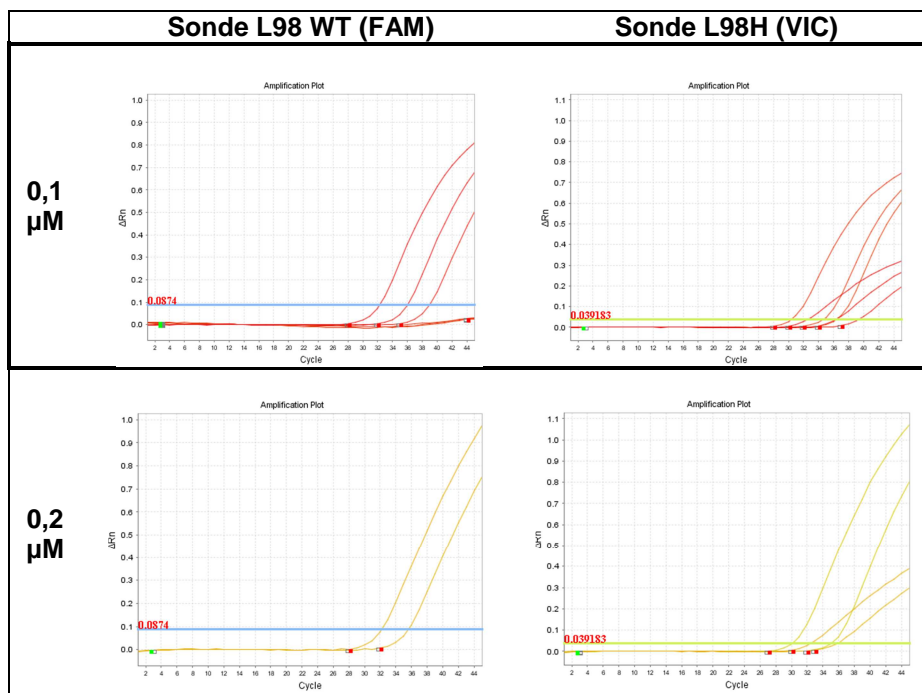


Figure 22 : Analyse en qPCR L98H Taqman des gammes WT et TR34/L98H à différentes concentrations en sondes L98 WT (FAM) et L98H (VIC) (0,1 et 0,2 μM). La concentration optimale en sondes choisie est encadrée.

2. Analyse des capteurs à poussières

Les capteurs à poussières ont ensuite été analysés au pur et au $1/10^{\text{ème}}$. Dans chaque série, 3 points des 2 gammes WT et TR34/L98H (10^6 , 10^5 et 10^4 spores/ml)

étaient ajoutés pour la quantification en Eq. spores/ml.

Seul le capteur n°18 est sorti positif en WT en qPCR L98H. Ce capteur était positif à *A. fumigatus* en culture, avec 3 colonies, soit une concentration de 30 colonies/ml, positif en qPCR *A. fumigatus* (98,9 fg/μl), mais négatif en qPCR TR34 (Tableau 28). Les 14, 33 et 9 autres capteurs positifs en culture à *A. fumigatus*, en qPCR *A. fumigatus* et en qPCR TR34 respectivement étaient négatifs en qPCR L98H. On remarque que, même pour les capteurs n°7 et 22, pour lesquels des isolats TR34/L98H avaient été identifiés en culture, aucun signal correspondant à la présence d'isolats portant la mutation L98H n'a été détecté en qPCR L98H.

Capteur	qPCR TR34 (Eq. spores/ml)	qPCR L98H (Eq. spores/ml)	qPCR <i>A. fumigatus</i> (fg/μl) (Eq. spores/ml)	Nombre de colonies d' <i>A. fumigatus</i> obtenues en culture (colonies/ml)
Capteurs positifs en qPCR TR34				
1	8,4E+04	Négatif	11,2 (373)	20
4	1,4E+05	Négatif	3,1 (103)	0
12	1,9E+05	Négatif	11,1 (370)	20
21	2,2E+03	Négatif	4,3 (143)	0
24	2,3E+03	Négatif	6,7 (223)	0
26	2,0E+05	Négatif	11,1 (370)	0
29	4,9E+03	Négatif	2,8 (93)	0
30	2,2E+05	Négatif	7,9 (263)	20
33	2,6E+05	Négatif	13,5 (450)	20
Capteurs positifs en qPCR L98H				
18	Négatif	Positif	98,9 (3297)	30

Tableau 28 : Comparaison des résultats de qPCR TR34, qPCR L98H, qPCR *A. fumigatus* et de culture pour les capteurs positifs en qPCR TR34 ou qPCR L98H

DISCUSSION

Colonisation et sensibilisation par *A. fumigatus*

Dans notre étude prospective, nous rapportons une prévalence élevée de colonisation par *A. fumigatus* au cours d'une exacerbation aiguë de BPCO (EABPCO), de 23,1% par culture et de 38,5% par culture et qPCR. Les études de prévalence de colonisation par *A. fumigatus* chez les patients BPCO présentant une EABPCO sont peu nombreuses, rétrospectives et souvent hétérogènes de par la définition utilisée pour la colonisation (76,80,158). Une étude prospective récente espagnole (80) similaire à la notre sur la prévalence d'isolement d'*A. fumigatus* par culture sur des expectorations de 240 patients hospitalisés pour une EABPCO, a rapporté une prévalence de 16,6% à l'inclusion et de 14,1% après un an de suivi. Une autre étude anglaise, qui n'a pas non plus utilisée la qPCR pour détecter la présence d'*Aspergillus* dans les expectorations, rapporte une fréquence d'isolement d'*A. fumigatus* lors des EABPCO de 28% (158), soit des données similaires aux notre si on tient compte de la prévalence de 23,1% obtenue par culture.

La prévalence de 38,5% que nous obtenons en combinant culture et qPCR peut toutefois être surestimée car nous détectons une colonisation par *Aspergillus* en qPCR et non spécifiquement par *A. fumigatus*. Notre étude utilise pour la première fois la qPCR *Aspergillus* pour la détection de la colonisation par *A. fumigatus* chez les patients BPCO, alors que ce moyen de détection est très utilisé pour les patients atteints de mucoviscidose et permet d'améliorer la sensibilité de la détection (159).

L'analyse des données épidémiologiques, biologiques et cliniques collectées est prévue à l'issue de l'étude. Elle devrait permettre d'identifier les facteurs de risque ou de gravité associés à cette colonisation, tels que la corticothérapie, la fréquence des EABPCO, ou l'isolement d'autres pathogènes (bactéries ou virus).

La présence d'anticorps anti-*A. fumigatus* a été détectée chez 13 patients (31,7%), soit une sensibilisation plus fréquente dans notre cohorte que dans celle de Bafadhel *et al.* qui ont rapporté une fréquence de sensibilisation par *A. fumigatus* de 13% dans d'une cohorte de 128 patients BPCO (158). Ces données ne sont cependant pas directement comparables car la sensibilisation était détectée par dosage des IgE dans leur étude, alors que nous avons recherché les IgG anti-*Aspergillus* et les précipitines dans notre étude. Parmi ces patients sensibilisés, seuls 7 patients étaient également colonisés (17,1%).

Quantification de l'exposition environnementale aux moisissures

Dans notre étude, la fréquence d'exposition environnementale à *A. fumigatus* déterminée par culture est de 41,7% (15/36 capteurs), ce qui confirme l'abondance d'*A. fumigatus* dans l'environnement domestique intérieur (les capteurs à poussières étant exposés dans la chambre des patients). Par contre, étant donné que sur les 15 capteurs positifs en culture à *A. fumigatus*, seuls 5 provenaient de domicile de patients colonisés par *A. fumigatus*, nous n'avons pas pu mettre en évidence de corrélation entre l'exposition et la colonisation par *A. fumigatus*. Ces résultats pourraient être liés d'une part à l'existence de facteurs de risque de colonisation spécifiques tels qu'une corticothérapie ou des antibiotiques au long cours, et d'autre part à l'existence d'autres sources d'exposition aux moisissures liées par exemple à l'alimentation (poivre, thé, etc.) ou à des activités professionnelles ou de loisirs.

L'étude de la quantification du niveau d'exposition environnementale fongique par qPCR n'a pas permis de mettre en évidence une relation linéaire entre la qPCR panfongique et les résultats de la culture, mais le calcul du coefficient de Spearman montre une corrélation significative entre ces 2 méthodes. Etant donné que la qPCR panfongique cible une région conservée de l'ARNr 18S de tous les champignons, moisissures et levures (150), Les différences observées pourraient être due à la présence de levures, quantifiées par la qPCR mais non prises en compte pour la culture. Ainsi, la qPCR refléterait l'exposition globale fongique et la culture, l'exposition aux moisissures.

A l'inverse, les qPCR *Aspergillus* et *A. fumigatus* n'ont pas montré de corrélation significative avec les résultats de culture. Ce type de résultats (absence de corrélation) a déjà été retrouvé dans d'autres études, notamment celle de Roussel *et al.* où l'absence de corrélation entre culture et qPCR d'espèces fongiques dans des capteurs à poussières exposés dans des locaux d'archives avait été prouvée (160). L'absence de corrélation pourrait s'expliquer par la présence dans les capteurs à poussières de spores non viables incapables de former du mycélium, mais qui sont détectées en qPCR (66). On pourrait envisager de déterminer pour ces qPCR un Cp seuil comme l'ont fait Bellanger *et al.* pour la qPCR *A. fumigatus*, qui permettrait de différencier les spores viables des spores non viables. Une autre possibilité serait de traiter les liquides de rinçage des capteurs à poussières avec du propidium monoazide (PMA), agent compatible avec les techniques de qPCR et capable de distinguer les cellules vivantes et mortes (161).

La comparaison des niveaux d'exposition fongique, aux *Aspergillus* et à *A. fumigatus* en culture et en qPCR entre les patients colonisés et sensibilisés et les patients non colonisés et non sensibilisés n'a pas permis de mettre en évidence de lien significatif entre l'exposition environnementale domestique fongique et les phénomènes de colonisation et de sensibilisation chez les patients atteints de BPCO. L'absence de lien entre les concentrations d'*A. fumigatus* dans les poussières (mesurées par qPCR) et la colonisation par *A. fumigatus* chez des patients atteints d'asthme, autre pathologie respiratoire chronique, a été récemment rapportée par Fairs *et al.* qui, par contre, ont retrouvé un lien entre les concentrations aériennes d'ADN d'*A. fumigatus* et la colonisation (162). Dans notre étude, bien que les différences observées ne soient pas significatives, l'analyse d'un plus grand nombre de patients pourrait permettre de confirmer les premières tendances, notamment les quantités d'ADN d'*A. fumigatus* plus élevées retrouvées dans les domiciles de patients colonisés et/ou sensibilisés. Par ailleurs, une association entre la mesure de contaminants fongiques dans les poussières et l'apparition de symptômes cliniques a été rapportée dans de nombreuses études (163,164). Dans notre étude, l'impact de l'exposition fongique domestique sur l'évolution de la fonction respiratoire (VEMS, fréquence et gravité des exacerbation) sera analysé en fin d'étude afin d'identifier les paramètres associés à une évolution péjorative (ex : charge fongique élevée ou présence d'espèces spécifiques).

Identification des isolats d'*A. fumigatus*

La caractérisation des 68 et 48 isolats d'*A. fumigatus* d'origine clinique et environnementale respectivement, nous a permis de confirmer l'identification d'*A. fumigatus* pour l'ensemble des 116 isolats de notre étude. Aucune autre espèce de la section *Fumigati*, aussi bien dans les prélèvements cliniques que dans l'environnement domestique des patients atteints de BPCO, n'a été identifiée.

Bien qu'*A. lentulus* ait été isolé dans plusieurs pays au cours d'infections invasives chez des patients immunodéprimés (transplantés ou patients d'hématologie) (49,58–60), son isolement reste rare dans les prélèvements cliniques et aucune donnée de prévalence n'est disponible. Chez les patients BPCO, l'isolement d'*A. lentulus* a été rapporté en Espagne chez un patient admis en réanimation pour une EABPCO. Mais *A. fumigatus* a été isolé dans 2 aspirations bronchiques et dans une troisième, il était associé à *A. lentulus*. Le rôle d'*A. lentulus* comme agent étiologique de l'infection n'a donc pas pu être établi (57). Dans les prélèvements environnementaux, *A. lentulus* a

été isolé dans plusieurs études dans des échantillons de sols en Corée (7/17) et en Espagne (1/31), suggérant que la niche écologique d'*A. lentulus* pourrait être le sol (165,166).

Notre étude confirme donc la faible fréquence d'isolement d'autres espèces de la section *Fumigati* dans les prélèvements cliniques et dans l'environnement domestique, mais l'identification de telles espèces peut être suspectée devant un isolat d'*A. fumigatus* présentant une sensibilité diminuée aux antifongiques ou ayant une sporulation pauvre ou lente. La mise en place d'une identification plus poussée pour ces isolats par biologie moléculaire basée sur le séquençage des régions ITS et du gène β -tubuline est donc à envisager en routine, quelque soit l'origine du prélèvement et le type de patients.

Mutations du gène *cyp51A* et résistance aux azolés : circulation entre les réservoirs cliniques et environnementaux

Au total, nous décrivons dans cette étude portant sur 116 isolats d'*A. fumigatus* :

- La mutation TR34/L98H associée à la résistance aux azolés pour la première fois dans le Nord-Pas de Calais, dans 2 isolats environnementaux provenant du domicile de 2 patients différents,
- La mutation H285Y associée à la résistance à l'ITZ dans un isolat environnemental, jamais décrite à ce jour,
- La mutation A284T avec une CMI à l'ITZ élevée mais inférieure à 2 mg/l, donc non considérée comme résistante d'après l'EUCAST, dans 3 isolats cliniques provenant du même patient, déjà décrite par Bueid *et al.* (141),
- Les profils de mutations F46Y, M172V, N248T, D255E, E427K et F46Y, M172V, E427K associées ou non à la résistance aux azolés dans la littérature (145,10,112). Dans notre étude, un des isolats mutés F46Y, M172V, N248T, D255E, E427K présente une CMI>2mg/l pour l'ITZ et est donc associée à une résistance à cet antifongique,
- Un isolat clinique ne présentant pas de mutation du gène *cyp51A* très résistant à l'ITZ (CMI>32mg/l) et à tous les azolés ce qui suggère un mécanisme alternatif de résistance aux antifongiques azolés,
- Les mutations silencieuses G1696A et C1562T non associées à une résistance aux azolés et jamais décrites.

Nous rapportons la présence de la mutation TR34/L98H dans l'environnement domestique de 2 patients BPCO, soit une prévalence de 5,6%. Cette mutation est caractérisée par un potentiel de propagation important, qui a initialement été décrite au Pays-Bas (116) et qui est actuellement fréquemment rapportée dans d'autres pays d'Europe et dans le monde, aussi bien dans des isolats cliniques qu'environnementaux. Elle serait liée à l'utilisation de fongicides azolés en agriculture. Notre étude confirme l'origine environnementale de la résistance car elle a été détectée dans 2 isolats environnementaux. En France, cette mutation a déjà été décrite dans l'environnement d'un patient d'hématologie, à partir d'un échantillon de sol (146). En Europe, la présence de cette mutation dans des isolats environnementaux provenant d'échantillons de sols prélevés dans l'environnement extérieur des hôpitaux a été rapportée en Belgique (116), en Italie (167) mais également aux Pays-Bas et au Danemark avec respectivement 12% (6/49) et 11% (4/38) d'échantillons de sols contenant des isolats d'*A. fumigatus* présentant cette mutation (13,166). En Inde, Chowdhary *et al.* rapportent une prévalence d'isolats environnementaux présentant la mutation TR34/L98H de 7% (44/630) à partir d'échantillons de sols prélevés dans l'environnement extérieur des hôpitaux (147). Dans notre étude, nous rapportons une prévalence de la mutation TR34/L98H en fonction des capteurs à poussières positifs en culture à *A. fumigatus* de 13,3%, comparable aux données européennes mais s'il s'agit de la première description d'isolats présentant cette mutation dans l'environnement domestique, et non en milieu extérieur. Les 2 patients présentant cet isolat muté dans leur environnement domestique habitent dans 2 villes distinctes de la métropole lilloise. Alors que Rocchi *et al.* avaient retrouvé cette mutation chez un patient agriculteur ayant bénéficié d'une allogreffe de moelle pour anémie aplasique sévère, qui utilisait des fongicides et dans un environnement agricole (le lien génétique entre les 2 isolats cliniques et environnementaux n'avait pas été établi) (146), nous détectons cette mutation dans un environnement urbain, ce qui suggère que l'exposition à la résistance aux azolés et à cette mutation TR34/L98H ne se limite pas à l'environnement rural où sont utilisés les fongicides, mais que les spores aspergillaires abondantes dans l'environnement étant capables de disséminer, tous les environnements sont donc concernés.

Aucun isolat clinique présentant la mutation TR34/L98H n'a été rapporté, ce qui peut s'expliquer par le faible nombre de patients ayant présenté des isolats cliniques d'*A. fumigatus* dans notre cohorte (11 patients). En France, cette mutation avait déjà été

décrite dans des isolats cliniques de patients atteints de mucoviscidose dans des cohortes de 50 et 131 patients (130,140). Par contre, d'autres mutations associées ou non à une résistance aux azolés (A284T et F46Y, M172V, N248T, D255E, E427K) et un isolat non muté, résistant aux azolés ont été rapportés dans les isolats cliniques de cette étude. Elles seront développées plus loin.

La détermination des CMI nous a permis de confirmer l'association entre la mutation TR34/L98H et une multirésistance aux azolés, avec une résistance à l'ITZ et au POS (CMI > 2 et 0,25 mg/l, respectivement), et une CMI élevée pour le VOR, qui reste cependant inférieure à la CMI limite de 2 mg/l définie par l'EUCAST. Les 2 patients pour lesquels les isolats TR34/L98H ont été retrouvés ne sont ni colonisés ni sensibilisés par *A. fumigatus*. Ainsi, aucun impact de l'exposition à des isolats environnementaux résistants aux azolés n'a pu être mis en évidence chez ces patients. Mais, alors que les cas d'API causés par un *A. fumigatus* résistant avec la mutation TR34/L98H rapportés à ce jour concernent uniquement des patients d'hématologie, transplantés ou atteint de cancers (105,168,169,146), nos données indiquent que l'émergence de pathologies aspergillaires causées par des isolats résistants pourrait concerner d'autres populations, notamment les patients atteints de BPCO.

Il est intéressant de noter que dans l'environnement des 2 patients pour lesquels des isolats TR34/L98H ont été identifiés, d'autres profils de mutations coexistent : la mutation TR34/L98H est associée aux 5 mutations F46Y, M172V, N248T, D255E, E427K dans l'environnement du patient n°7 et à la mutation H285Y dans l'environnement du patient n°22. De même, des génotypes *cyp51A* différents ont été retrouvés pour les capteurs d'autres patients (patients n°2 et 30) et dans des expectorations (exemple : présence d'isolats A284T et d'isolats non mutés pour le patient n°41). La présence d'isolats d'*A. fumigatus* génétiquement différents dans un même prélèvement a déjà été rapportée notamment chez des patients atteints de mucoviscidose fréquemment colonisés par *A. fumigatus* (170). Nos données, qui confirment la coexistence d'isolats sensibles et résistants aux azolés, indiquent que les méthodes habituellement utilisées en routine ne sont pas adaptées car la sensibilité d'*A. fumigatus* aux antifongiques est généralement déterminée à partir d'une colonie. Ainsi, la nécessité d'une détermination des CMI à partir de plusieurs colonies ou une recherche d'isolats résistants par ensemencement direct des prélèvements ou à partir de plusieurs colonies sur un milieu contenant de l'ITZ a récemment été suggérée par Denning et Bowyer (156). Cette dernière méthode a

montré son intérêt dans notre étude, au cours de laquelle 2 isolats résistants à l'ITZ ont été obtenus après ensemencement direct du capteur à poussières ou de l'expectoration sur milieu Sabouraud additionné d'ITZ à 4mg/l (milieu ITZ), car plus de 10 colonies avaient été obtenues en culture (isolat environnemental TR34/L98H du patient n°22 et isolat clinique WT du patient n° 34). Par ailleurs, des CMI élevés à l'ITZ pour les 7 isolats poussant sur milieu ITZ ont confirmé la validité de ce milieu pour la sélection d'isolats résistants.

Nous décrivons pour la première fois la mutation H285Y, associée à une résistance isolée à l'ITZ (CMI à 8 mg/l), qui semble être d'origine environnementale puisque l'isolat d'*A. fumigatus* provenaient d'un capteur à poussières. Une modélisation protéique est en cours, en collaboration avec le Dr R. Wintjens (Université Libre de Bruxelles) afin de localiser la mutation par rapport au site actif de l'enzyme CYP51A.

Dans les isolats cliniques, nous avons retrouvé des mutations déjà rapportées dans littérature : la mutation A284T et les mutations F46Y, M172V, N248T, D255E, E427K. La mutation A284T est associée à une CMI élevée à l'ITZ (1,5 à 2 mg/L), mais qui reste inférieure au seuil de 2 mg/L défini par l'EUCAST. Dans la littérature, elle a été rapportée par Bueid *et al.* et est associée à une réduction de la sensibilité à l'ITZ, au VOR et au POS, mais les CMI ne sont pas précisées (141). Malgré l'isolement de ces souches à partir de prélèvements cliniques, et bien qu'aucun isolat environnemental portant ces mutations n'ait été retrouvé dans notre étude, l'origine des mutations identifiées est probablement environnementale car les patients inclus dans notre étude sont « naïfs » (non exposés aux antifongiques azolés). Par ailleurs, le profil de mutations F46Y, M172V, N248T, D255E, E427K a déjà été retrouvé dans un isolat environnemental par Snelders *et al.* (112).

Nous décrivons également un isolat clinique ne présentant pas de mutation du gène *cyp51A* résistant aux antifongiques azolés avec des CMI très élevées. Ce type d'isolats a déjà été décrit dans de nombreuses études (10,112,141). La résistance serait alors liée à l'existence de mécanismes alternatifs tels que la surexpression des pompes à efflux (122) ou la surexpression du gène *cyp51B* (123). Des investigations supplémentaires sur cet isolat pourraient être envisagées afin d'identifier les mécanismes impliqués.

Dans notre cohorte de patients, la présence d'isolats cliniques et environnementaux n'a pu être mise en évidence que pour 3 patients, les patients n°2, 18 et 39. Une mutation silencieuse du gène *cyp51A* a été retrouvée dans un isolat environnemental

chez le patient n°2. Tous les autres isolats ne présentaient pas de mutation. L'absence d'isolats mutés dans le prélèvement clinique pour le patient n°2 est en faveur d'une absence de corrélation entre les isolats cliniques et environnementaux. Cependant, l'analyse de la relation entre exposition et colonisation nécessiterait une analyse génotypique plus fine par exemple par microsatellite (171).

Au total, nous décrivons de nombreux profils de mutations au sein d'isolats cliniques et environnementaux de patients atteints de BPCO, mais nous n'avons pas pu mettre en évidence de circulation entre les réservoirs cliniques et environnementaux car aucune mutation n'est retrouvée à la fois dans l'environnement et dans le prélèvement clinique du patient.

Détection directe de la mutation TR34/L98H

Dans notre étude, l'utilisation de qPCR pour détecter directement la mutation TR34/L98H a permis de valider cette approche pour la détection de cette mutation à partir d'isolats. Mais la détection directe à partir du liquide de rinçage des capteurs à poussières a montré un intérêt limité puisque les capteurs n°7 et 22 étaient négatifs alors qu'ils présentaient en culture chacun un isolat muté TR34/L98H. Comme mentionné précédemment, l'absence de corrélation culture/qPCR a déjà été rapportée par d'autres auteurs (160). Pourtant dans la littérature, la détection directe des mutations du gène *cyp51A* par qPCR a déjà montré son intérêt à partir de prélèvements cliniques tels qu'une biopsie de cerveau dont l'examen direct était positif avec présence de filaments mycéliens (détection par une qPCR ciblant la mutation TR34/L98H) (131), ou un LBA avec un index galactomannane supérieur à 1 (détection par une qPCR multiplex ciblant les mutations TR34/L98H, T289A et Y121F) (172).

Dans notre étude, l'absence de détection de l'ADN d'isolats TR34/L98H à partir des capteurs à poussières résulte probablement de charges fongiques faibles, et d'une sensibilité insuffisante de la qPCR liée notamment à la présence d'une seule copie du gène *cyp51A* dans le génome d'*A. fumigatus*, qui a déjà été rapportée précédemment (157). L'ajout d'une amplification préalable, qui a été utilisée par d'autres auteurs (173), pourrait être envisagé pour améliorer les performances de notre méthode, qui pourrait alors être appliquée à la détection de la mutation TR34/L98H à la fois à partir d'isolats d'*A. fumigatus* résistants aux azolés et de prélèvements cliniques ou environnementaux.

CONCLUSION

Cette étude prospective chez 41 patients atteints de BPCO hospitalisés pour une exacerbation montre une prévalence élevée de colonisation par *A. fumigatus*, de 38,5%, mais aucun lien avec l'exposition environnementale domestique aux moisissures ou à *A. fumigatus*, mesurée par culture ou par qPCR, n'a pu être mise en évidence. La caractérisation du gène *cyp51A* au sein des isolats cliniques et environnementaux d'*A. fumigatus* a permis de mettre en évidence des profils de mutations déjà décrits associés ou non à une résistance aux azolés, tels que le profil de mutations F46Y, M172V, N248T, D255E, E427K dans les réservoirs cliniques et environnementaux, la mutation TR34/L98H décrite pour la première fois dans l'environnement de patients BPCO du Nord-Pas de Calais, ce qui confirme son origine environnementale, et la mutation A284T dans un prélèvement clinique. La mutation H285Y associée à la résistance aux azolés jamais décrite à ce jour a été découverte dans l'environnement d'un patient. Bien que nous n'ayons pas mis en évidence de circulation de ces isolats mutés entre les réservoirs cliniques et environnementaux, notre étude qui montre pour la première fois la présence d'isolats mutés, résistants aux azolés, dans un environnement intérieur, indique que l'exposition domestique aux moisissures pourrait jouer un rôle dans l'émergence d'isolats résistants chez les patients susceptibles, tels que les patients atteints de pathologies respiratoires chroniques (BPCO, mucoviscidose, asthme, etc.), mais également les patients immunodéprimés à risque d'aspergillose invasive.

Par ailleurs, la coexistence d'isolats d'*A. fumigatus* sensibles et résistants aux azolés au sein des prélèvements cliniques ou environnementaux montre la nécessité d'une détermination de la sensibilité aux antifongiques sur plusieurs colonies en routine. L'utilisation d'outils simples de dépistage de la résistance aux azolés tels qu'une sélection sur milieu Sabouraud additionné d'itraconazole pourrait également être envisagée, soit à partir des colonies, soit directement à partir des prélèvements. Enfin, la caractérisation moléculaire des isolats pourrait être effectuée par détection directe de la mutation TR34/L98H par qPCR, qui a montré de bons résultats sur les isolats. La détection directe de cette mutation à partir de prélèvements cliniques ou environnementaux pourrait également être envisagée, mais les données préliminaires obtenues dans notre étude n'ont pas permis de valider cet outil pour le moment. De meilleures performances pourraient être obtenues par l'ajout d'une étape préliminaire d'amplification (avant la PCR en temps réel), qui permettrait

d'améliorer la sensibilité de la qPCR, et l'utilisation de prélèvements plus riches en ADN aspergillaire (tels que biopsies, LBA ou expectorations avec examen microscopique positif).

Une partie de ce travail a déjà été valorisée sous forme d'une communication orale à l'ECCMID (*European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*) en mai 2014 (cf. Annexe 5). L'objectif de recrutement étant de 90 patients, l'étude est toujours en cours. L'analyse finale des données cliniques, biologiques, épidémiologiques et environnementales collectées à l'inclusion et à la visite de fin d'étude chez ces patients devrait permettre d'identifier les facteurs de risques de colonisation par *A. fumigatus* liés au patient, mais également à l'habitat (humidité par exemple), et d'évaluer son impact sur l'évolution de la fonction respiratoire. La caractérisation phénotypique et génotypique des nouveaux isolats cliniques et environnementaux d'*A. fumigatus* pourrait permettre de mettre en évidence de nouvelles mutations et apporter de nouvelles données sur la circulation entre les réservoirs cliniques et environnementaux.

ANNEXES

Annexe 1

Évaluation des symptômes de la BPCO : Score CAT (COPD Assessment Test)

Nom: Date:



Quel est l'état de votre BPCO? Répondez au questionnaire CAT (COPD Assessment Test™) pour évaluer votre BPCO

Ce questionnaire vous aidera, ainsi que votre médecin, à mesurer l'impact de la BPCO (BronchoPneumopathie Chronique Obstructive) sur votre bien-être et votre vie au quotidien. Vous pourrez, ainsi que votre médecin, utiliser les réponses et les scores du questionnaire pour mieux prendre en charge votre BPCO et obtenir le meilleur bénéfice de votre traitement.

Pour chaque élément ci-dessous, veuillez indiquer d'une croix (x) la case qui correspond le mieux à votre état actuel. Prenez soin de ne sélectionner qu'une seule réponse par question.

Exemple: Je suis très heureux (heureuse) 0 1 2 3 4 5 Je suis très triste

	POINTS
Je ne tousse jamais <input type="radio"/> 0 <input type="radio"/> 1 <input type="radio"/> 2 <input type="radio"/> 3 <input type="radio"/> 4 <input type="radio"/> 5 Je tousse tout le temps	<input type="text"/>
Je n'ai pas du tout de glaires (mucus) dans les poumons <input type="radio"/> 0 <input type="radio"/> 1 <input type="radio"/> 2 <input type="radio"/> 3 <input type="radio"/> 4 <input type="radio"/> 5 J'ai les poumons entièrement encombrés de glaires (mucus)	<input type="text"/>
Je n'ai pas du tout la poitrine oppressée <input type="radio"/> 0 <input type="radio"/> 1 <input type="radio"/> 2 <input type="radio"/> 3 <input type="radio"/> 4 <input type="radio"/> 5 J'ai la poitrine très oppressée	<input type="text"/>
Quand je monte une côte ou une volée de marches, je ne suis pas essouffé(e) <input type="radio"/> 0 <input type="radio"/> 1 <input type="radio"/> 2 <input type="radio"/> 3 <input type="radio"/> 4 <input type="radio"/> 5 Quand je monte une côte ou une volée de marches, je suis très essouffé(e)	<input type="text"/>
Je ne suis pas limité(e) dans mes activités chez moi <input type="radio"/> 0 <input type="radio"/> 1 <input type="radio"/> 2 <input type="radio"/> 3 <input type="radio"/> 4 <input type="radio"/> 5 Je suis très limité(e) dans mes activités chez moi	<input type="text"/>
Je ne suis pas inquiet(e) quand je quitte la maison, en dépit de mes problèmes pulmonaires <input type="radio"/> 0 <input type="radio"/> 1 <input type="radio"/> 2 <input type="radio"/> 3 <input type="radio"/> 4 <input type="radio"/> 5 Je suis très inquiet(e) quand je quitte la maison, en raison de mes problèmes pulmonaires	<input type="text"/>
Je dors bien <input type="radio"/> 0 <input type="radio"/> 1 <input type="radio"/> 2 <input type="radio"/> 3 <input type="radio"/> 4 <input type="radio"/> 5 Je dors mal à cause de mes problèmes pulmonaires	<input type="text"/>
Je suis plein(e) d'énergie <input type="radio"/> 0 <input type="radio"/> 1 <input type="radio"/> 2 <input type="radio"/> 3 <input type="radio"/> 4 <input type="radio"/> 5 Je n'ai pas d'énergie du tout	<input type="text"/>
	SCORE TOTAL <input type="text"/>

COPD Assessment Test et le logo CAT est une marque commerciale du groupe de sociétés GlaxoSmithKline.
© 2009 groupe de sociétés GlaxoSmithKline. Tous droits réservés.
Last Updated: February 24, 2012

Echelle de dyspnée modifiée mMRC (modified Medical Research Council)

-
- Stade 0 : je suis essouffé uniquement pour un effort important
- Stade 1 : je suis essouffé quand je me dépêche à plat ou quand je monte une pente légère
- Stade 2 : je marche moins vite que les gens de mon âge à plat ou je dois m'arrêter quand je marche à mon pas à plat
- Stade 3 : je m'arrête pour respirer après 90 mètres ou après quelques minutes à plat
- Stade 4 : je suis trop essouffé pour quitter ma maison ou je suis essouffé rien qu'à m'habiller
-

Annexe 2

Préparation du milieu de Sabouraud additionné d'itraconazole à 4 mg/l (Milieu ITZ)

Pour 250 ml :

Solution d'itraconazole dans le DMSO :

Préparer une solution contenant 1 mg d'itraconazole dans 1 ml de DMSO

Milieu de Sabouraud :

Dans une bouteille en verre de 250 ml, mettre :

- Glucose : 5 g
- Peptone : 2,5 g
- Agar : 3,75 g
- Eau : 250 ml

pH final = 6

- Autoclaver 10 min à 110-120°C
- Laisser refroidir
- Ajouter dans le milieu tiède ou froid la solution d'itraconazole
- Agiter
- Distribuer dans des boîtes de Pétri (20 ml par boîte)

Annexe 3

Position des amorces pour la PCR CYP51A (3 couples CYP51A-1, CYP51A-2, CYP51A-3), la qPCR TR34 (TR-F et TR-R) et la qPCR L98H (L98-F et L98-R) et des sondes de la qPCR L98H (L98 WT et L98H) sur le gène *cyp51A*

	10	20	30	40	50	60	70	80
WT CYP51A	AGTGAATAATCGCAGCACCACTCCAGAGTTGCTAGAATCACGCGGTCCGGATGTGTGCTGAGCCGAAT							
TR34/L98H CYP51A	CACCACCTCCAGAGTTGCTAGAATCACGCGGTCCGGATGTGTGCTGAGCCGAATGAATCACGCGGTCCG							
Cyp51AF-1	taatogcagcaccactccag							
Cyp51AR-1								
Cyp51AF-2								
Cyp51AR-2								
Cyp51AF-3								
Cyp51AR-3								
TR-F	AATAATCGCAGCACCACTCC							
TR-R								
L98F								
L98R								
sonde L98 WT								
sonde L98H								
	110	120	130	140	150	160	170	180
WT CYP51A	GAaAGTTGCCAATTAATAAGGTGTAGTTCCAGCATACCATACACCCAACTCATACTACGGTAGGTAGATCTACTTACCT							
TR34/L98H CYP51A	AATGAAAGTTGCCAATTAATAAGGTGTAGTTCCAGCATACCATACACCCAACTCATACTACGGTAGGTAGATCTAcTTACCT							
Cyp51AF-1								
Cyp51AR-1								
Cyp51AF-2								
Cyp51AR-2								
Cyp51AF-3								
Cyp51AR-3								
TR-F								
TR-R	TTCCAGCATACCATACACCC							
L98F								
L98R								
sonde L98 WT								
sonde L98H								
	210	220	230	240	250	260	270	280
WT CYP51A	AGGTAGGTGAATAAAAAACAGCATGGAAACATGTTTTTCATTAGCTGGTCTCTCATTGCTCCTTGTCCTAGGCCTTAAGGAAT							
TR34/L98H CYP51A	AGGTAGGTGAATAAAAAACAGCATGGAAACATGTTTTTCATTAGCTGGTCTCTCATTGCTCCTTGTCCTAGGCCTTAAGGAAT							
Cyp51AF-1								
Cyp51AR-1								
Cyp51AF-2								
Cyp51AR-2								
Cyp51AF-3								
Cyp51AR-3								
TR-F								
TR-R								
L98F								
L98R								
sonde L98 WT								
sonde L98H								
	310	320	330	340	350	360	370	380
WT CYP51A	TCCCTCTTATCCATTTTCCTCTTATTCTTTTCATTTCCCTCATCACTGCAACTCTAATCCCTGGGCTCACCCCTCCCTGTGTCT							
TR34/L98H CYP51A	TCCCTCTTATCCATTTTCCTCCTATTCTTTTCATTTCCCTCATCACTGCAACTCTAATCCCTGGGCTCACCCCTCCCTGTGTCT							
Cyp51AF-1								
Cyp51AR-1								
Cyp51AF-2								
Cyp51AR-2								
Cyp51AF-3								
Cyp51AR-3								
TR-F								
TR-R								
L98F								
L98R								
sonde L98 WT								
sonde L98H								
	410	420	430	440	450	460	470	480
WT CYP51A	ATGCTATGGCTTACGGCCTACATGGCCGTTGCGGTGCTGACGGCAATCTTGCTCAATGTTGTTTATCAATTATCTTTCCGGCTT							
TR34/L98H CYP51A	ATGCTATGGCTTACGGCCTACATGGCCGTTGCGGTGCTGACGGCAATCTTGCTCAATGTTGTTTATCAATTATCTTTCCGGCTT							
Cyp51AF-1								
Cyp51AR-1								
Cyp51AF-2								

Cyp51AR-2 ~~~~~
 Cyp51AF-3 ~~~~~
 Cyp51AR-3 ~~~~~
 TR-F ~~~~~
 TR-R ~~~~~
 L98F ~~~~~
 L98R ~~~~~
 sonde L98 WT ~~~~~
 sonde L98H ~~~~~

510 520 530 540 550 560 570 580
 WT CYP51A CGCCAATGGTCTTTCAATTGGGTCCCATATCTGGGTAGTACCATCAGTTACGGGATTGATCCCTACAAGTTCTTCTTTGCGTGCA
 TR34/L98H CYP51A CGCCAATGGTCTTTCAATTGGGTCCCATTTCTGGGTAGTACCATCAGTTACGGGATTGATCCCTACAAGTTCTTCTTTGCGTGCA
 Cyp51AF-1 ~~~~~
 Cyp51AR-1 ~~~~~
 Cyp51AF-2 ~~~~~
 Cyp51AR-2 ~~~~~
 Cyp51AF-3 ~~~~~
 Cyp51AR-3 ~~~~~
 TR-F ~~~~~
 TR-R ~~~~~
 L98F ~~~~~
 L98R ~~~~~
 sonde L98 WT ~~~~~
 sonde L98H ~~~~~

610 620 630 640 650 660 670 680
 WT CYP51A CAAGATTGTAGTTTGACATTCACTTCTGGGCGATTGCTGAGTATTGCTTTCTTAACCTGGCAGTATGGCGATATCTTCACTTTT
 TR34/L98H CYP51A CAAGATTGTAGTTTGACATTCACTTCTGGGCGATTGCTGAGTATTGCTTTCTTAACCTGGCAGTATGGCGATATCTTCACTTTT
 Cyp51AF-1 ~~~~~
 Cyp51AR-1 ~~~~~
 Cyp51AF-2 ~~~~~
 Cyp51AR-2 ~~~~~
 Cyp51AF-3 ~~~~~
 Cyp51AR-3 ~~~~~
 TR-F ~~~~~
 TR-R ~~~~~
 L98F ~~~~~
 L98R ~~~~~
 sonde L98 WT ~~~~~
 sonde L98H ~~~~~

710 720 730 740 750 760 770 780
 WT CYP51A AAACCAAGTCTACCTGGGCGTTCAAGGGAACGAGTTTATTCTCAACGGCAAGCTCAAGGATGTCAATGCGGAAGAGGTCTATA
 TR34/L98H CYP51A AAACCAAGTCTACCTGGGCGTTCAAGGGAACGAGTTTATTCTCAACGGCAAGCTCAAGGATGTCAATGCGGAAGAGGTCTATA
 Cyp51AF-1 ~~~~~
 Cyp51AR-1 ~~~~~
 Cyp51AF-2 ~~~~~
 Cyp51AR-2 ~~~~~
 Cyp51AF-3 ~~~~~
 Cyp51AR-3 ~~~~~
 TR-F ~~~~~
 TR-R ~~~~~
 L98F ~~~~~
 L98R ~~~~~
 sonde L98 WT ~~~~~
 sonde L98H ~~~~~

810 820 830 840 850 860 870 880
 WT CYP51A CGTTTTGGATCGGACGTGGTGTATGATTGTCCCAATCCAAAGCTGATGGAGCAGAAAAAGTTTCATCAAGTACGGCTTGACTCA
 TR34/L98H CYP51A CGTTTTGGATCGGACGTGGTGTATGATTGTCCCAATCCAAAGCTGATGGAGCAGAAAAAGTTTCATCAAGTACGGCTTGACTCA
 Cyp51AF-1 ~~~~~
 Cyp51AR-1 ~~~~~
 Cyp51AF-2 ~~~~~
 Cyp51AR-2 ~~~~~
 Cyp51AF-3 ~~~~~
 Cyp51AR-3 ~~~~~
 TR-F ~~~~~
 TR-R ~~~~~
 L98F ~~~~~
 L98R ~~~~~

sonde L98 WT
sonde L98H

```
          910      920      930      940      950      960      970      980
WT CYP51A      CATGTGCCACTTATTGAGAAGGAGGTTTTGGACTATCTGCGCGATTCACCGAACTTTCAAGGCTCGTCCGGCCGGATGGACATC
TR34/L98H CYP51A CATGTGCCACTTATTGAGAAGGAGGTTTTGGACTATCTGCGCGATTCACCGAACTTTCAAGGCTCGTCCGGCCGGATGGACATC
Cyp51AF-1
Cyp51AR-1
Cyp51AF-2
Cyp51AR-2
Cyp51AF-3
Cyp51AR-3
TR-F
TR-R
L98F
L98R
sonde L98 WT
sonde L98H
```

```
          1010     1020     1030     1040     1050     1060     1070     1080
WT CYP51A      AGATTACCAATTTTACCCTGCTCGAGCCCTCCAAGGCCAGGAAGTTGGTTCCAAACTCACGGCTGAGTTCCGCTGACCTCTATC
TR34/L98H CYP51A AGATTACCAATTTTACCCTGCTCGAGCCCTCCAAGGCCAGGAAGTTGGTTCCAAACTCACGGCTGAGTTCCGCTGACCTCTATC
Cyp51AF-1
Cyp51AR-1
Cyp51AF-2
Cyp51AR-2
Cyp51AF-3
Cyp51AR-3
TR-F
TR-R
L98F
L98R
sonde L98 WT
sonde L98H
```

```
          1110     1120     1130     1140     1150     1160     1170     1180
WT CYP51A      CTTTACTCCCATCAATTTTATGCTACCGTGGGCCCATTTGCCGCATAAACAAGAAAGCGAGATGCTGCTCATGCGCGCATGAGGTC
TR34/L98H CYP51A CTTTACTCCCATCAATTTTATGCTACCGTGGGCCCATTTGCCGCATAAACAAGAAAGCGAGATGCTGCTCATGCGCGCATGAGGTC
Cyp51AF-1
Cyp51AR-1
Cyp51AF-2
Cyp51AR-2
Cyp51AF-3
Cyp51AR-3
TR-F
TR-R
L98F
L98R
sonde L98 WT
sonde L98H
```

```
          1210     1220     1230     1240     1250     1260     1270     1280
WT CYP51A      ATCAATCAGCGCCGCTTTGACGGTGACAAGGACTCTCAGAAATCAGACATGATATGGAACTGATGAACTGCACATACAAAAAC
TR34/L98H CYP51A ATCAATCAGCGCCGCTTTGACGGTGACAAGGACTCTCAGAAATCAGACATGATATGGAACTGATGAACTGCACATACAAAAAC
Cyp51AF-1
Cyp51AR-1
Cyp51AF-2
Cyp51AR-2
Cyp51AF-3
Cyp51AR-3
TR-F
TR-R
L98F
L98R
sonde L98 WT
sonde L98H
```

```
          1310     1320     1330     1340     1350     1360     1370     1380
WT CYP51A      ATAAAGAGATTGCGCACATGATGATAACCCTGTTGATGGCTGGTCAGCATTCTGCTTCGTCATCAGCGCCTGGATTATGCTGA
TR34/L98H CYP51A ATAAAGAGATTGCGCACATGATGATAACCCTGTTGATGGCTGGTCAGCATTCTGCTTCGTCATCAGCGCCTGGATTATGCTGA
```

Cyp51AF-1
Cyp51AR-1
Cyp51AF-2
Cyp51AR-2
Cyp51AF-3
Cyp51AR-3
TR-F
TR-R
L98F
L98R
sonde L98 WT
sonde L98H

gatggctggtc

```
          1410      1420      1430      1440      1450      1460      1470      1480
WT CYP51A      AAAAGTCCTCGAAGAGCTGTATCAGGAAcagCTGGCCAATCTTGGCCCCGCCGGCCAGACGGCAGTCTTCCTCCGCTCCAGTA
TR34/L98H CYP51A AAAAGTCCTCGAAGAGCTGTATCAGGAAcagCTGGCCAATCTTGGCCCCGCCGGCCAgACGGCAGTCTTCCTCCGCTCCAGTA
```

Cyp51AF-1
Cyp51AR-1
Cyp51AF-2
Cyp51AR-2
Cyp51AF-3
Cyp51AR-3
TR-F
TR-R
L98F
L98R
sonde L98 WT
sonde L98H

aaaagtcctogaag

```
          1510      1520      1530      1540      1550      1560      1570      1580
WT CYP51A      CTTCCCTTCCATCAACATGTTATTTCGTGAAACCTTACGGATTCACTCCTCTATTCACTCTATCATGCGCAAGGTGAAAAGCCCC
TR34/L98H CYP51A CTTCCCTTCCATCAACATGTTATTTCGTGAAACCTTACGGATTCACTCCTCTATTCACTCTATCATGCGCAAGGTGAAAAGCCCC
```

Cyp51AF-1
Cyp51AR-1
Cyp51AF-2
Cyp51AR-2
Cyp51AF-3
Cyp51AR-3
TR-F
TR-R
L98F
L98R
sonde L98 WT
sonde L98H

```
          1610      1620      1630      1640      1650      1660      1670      1680
WT CYP51A      CCCCTTACATGATTCCTCCCGGTCCGCTGCTCCTTGCTTACCTGGAGTGACAGCCCTCAGCGACGAAcATTCCCCAATGCTG
TR34/L98H CYP51A CCCCTTACATGATTCCTCCCGGTCCGCTGCTCCTTGCTTACCTGGAGTGACAGCCCTCAGCGACGAAcATTCCCCAATGCTG
```

Cyp51AF-1
Cyp51AR-1
Cyp51AF-2
Cyp51AR-2
Cyp51AF-3
Cyp51AR-3
TR-F
TR-R
L98F
L98R
sonde L98 WT
sonde L98H

```
          1710      1720      1730      1740      1750      1760      1770      1780
WT CYP51A      TCGCTGGGAGAAcCAGGCTACTAAGGAGCAGGAGAAcGACGAGGTTGTCCGACTACGGTTACGGCCCGCTCCTCCAAAGGGCAcGTC
TR34/L98H CYP51A TCGCTGGGAGAAcCAGGCTACTAAGGAGCAGGAGAAcGACGAGGTTGTCCGACTACGGTTACGGCCCGCTCCTCCAAAGGGCAcGTC
```

Cyp51AF-1
Cyp51AR-1
Cyp51AF-2
Cyp51AR-2
Cyp51AF-3
Cyp51AR-3
TR-F

TR-R
L98F
L98R
sonde L98 WT
sonde L98H

```
          1810      1820      1830      1840      1850      1860      1870      1880
WT CYP51A      TTTGGTGTGGCCGACACCGCTGTATCGGCGAGAAATTCGCTTATGTCAAACCTTGGTGTGATTCTGGCGACCATTGTGCGCCAC
TR34/L98H CYP51A TTTGGTGTGGCCGACACCGCTGTATCGGCGAGAAATTCGCTTATGTCAAACCTTGGTGTGATTCTGGCGACCATTGTGCGCCAC
Cyp51AF-1
Cyp51AR-1
Cyp51AF-2
Cyp51AR-2
Cyp51AF-3
Cyp51AR-3
```

TR-F
TR-R
L98F
L98R
sonde L98 WT
sonde L98H

```
          1910      1920      1930      1940      1950      1960      1970      1980
WT CYP51A      TGGATGGAAAGAAAGGAGTCCCTGAAACTGACTATTTCATCCCTCTTTTCGGGCCCATGAAGCCAAGCATCATCGGCTGGGAGA
TR34/L98H CYP51A TGGATGGAAAGAAAGGAGTCCCTGAAACTGACTATTTCATCCCTCTTTTCGGGCCCATGAAGCCAAGCATCATCGGCTGGGAGA
Cyp51AF-1
Cyp51AR-1
Cyp51AF-2
Cyp51AR-2
Cyp51AF-3
Cyp51AR-3
```

TR-F
TR-R
L98F
L98R
sonde L98 WT
sonde L98H

```
          2010      2020      2030      2040      2050      2060      2070      2080
WT CYP51A      ATCCAAGTGAGACTGTTGTAAACCATCGAGGACTTCAAAGGATTTGGTGTGATCGGAAATAGGTGTATTATACTTAATTAGCCCC
TR34/L98H CYP51A ATCCAAGTGAGACTGTTGTAAACCATCGAGGACTTCAAAGGATTTGGTGTGATCGGAAATAGGTGTATTATACTTAATTAGCCCC
Cyp51AF-1
Cyp51AR-1
Cyp51AF-2
Cyp51AR-2
Cyp51AF-3
Cyp51AR-3
```

TR-F
TR-R
L98F
L98R
sonde L98 WT
sonde L98H

```
          2110      2120      2130      2140      2150
WT CYP51A      TGACTGTATTGAACCCCTTATTGAGACCTTACTGGCCCTGAAGTGTGTTGCTTAT
TR34/L98H CYP51A
Cyp51AF-1
Cyp51AR-1
Cyp51AF-2
Cyp51AR-2
Cyp51AF-3
Cyp51AR-3
```

TR-F
TR-R
L98F
L98R
sonde L98 WT
sonde L98H

-----tggccctgaagtgtgttgc

Annexe 4

Caractéristiques des patients à l'inclusion

N° d'inclusion	Date d'inclusion	Sexe	Ville	Age	Recherche d'A. fumigatus dans les expectorations		Recherche d'anticorps anti-A. fumigatus		Statut	Capteur à poussières				
					Culture	qPCR	ELISA	Ouchterlony		Culture		qPCR		
										Nombre total de colonies	Nombre de colonies d'A. fumigatus	qPCR panfongique (Eq. spores/ml)	qPCR Aspergillus (Eq. spores/ml)	qPCR A. fumigatus (fg/µl)
1	24/08/11	M	Marquette lez Lille	63	Négative	Négative	0	0	NC/NS	25	2	2,77E+05	5,00E+03	11,19
2	06/09/11	M	Templeuve	68	Positive (3 colonies)	Négative	25	4	C/S	39	6	1,54E+05	1,94E+03	15,98
3	02/12/11	M	Hellemmes	65	Négative	Négative	0	0	NC/NS	35	0	1,23E+05	1,90E+04	6,36
4	06/12/11	M	Lille	47	Négative	Négative	2	2	S	25	0	3,11E+05	1,44E+04	3,13
5	30/12/11	F	Lille	48	Négative	Négative	0	0	NC/NS	9	1	9,66E+04	1,79E+04	6,61
6	18/06/12	M	Haubourdin	66	Négative	NR	0	0	NC/NS	Non reçu				
7	27/03/12	M	Faches-Thumesnil	73	Négative	Négative	1	0	NC/NS	101	2	3,02E+05	7,28E+03	9,02
8	27/04/12	F	Haubourdin	54	Négative	Négative	0	0	NC/NS	6	0	5,27E+04	3,79E+03	4,27
9	10/07/12	F	Lille	57	Négative	Positive	32	0	C	88	11	1,31E+06	2,43E+04	19,20
10	10/07/12	M	Ronchin	59	Négative	NR	37	1	S	68	0	7,65E+04	1,27E+03	27,12
11	28/08/12	M	Lille	62	Non expectorant		0	0	NC/NS	15	0	2,85E+05	7,00E+03	11,13
12	28/08/12	M	Mons-en-Baroeul	60	Négative	Négative	0	0	NC/NS	22	2	2,30E+05	1,17E+04	11,07
14	29/10/12	F	Ronchin	71	Négative	Négative	0	0	NC/NS	Non reçu				
15	26/11/12	M	Wattignies	72	Négative	Négative	0	0	NC/NS	17	0	8,07E+05	1,47E+04	0,00
16	27/11/12	M	Bachy	58	Négative	Négative	0	1	NC/NS	Non reçu				
17	10/12/12	M	Faches-Thumesnil	60	Négative	Positive	31	3	C/S	7	0	6,19E+04	2,35E+03	7,78
18	08/01/13	M	Lille	69	Positive (1 colonie)	Positive	1	1	C/S	4	3	8,59E+04	1,64E+04	98,89
19	16/01/13	F	Lille	52	Négative	Négative	35	4 (cat+)	S	20	13	2,26E+05	2,44E+03	2,77
20	29/01/13	M	Carvin	72	Négative	Positive	0	0	C	4	0	1,45E+05	9,77E+03	5,81
21	26/02/13	F	Allennes les marais	59	Positive (3 colonies)	Positive	>80	5	C/S	4	0	2,47E+04	1,35E+03	4,31

N° d'inclusion	Date d'inclusion	Sexe	Ville	Age	Recherche d' <i>A. fumigatus</i> dans les expectorations		Recherche d'anticorps anti- <i>A. fumigatus</i>		Statut	Capteur à poussières				
					Culture	qPCR	ELISA	Ouchterlony		Culture		qPCR		
										Nombre total de colonies	Nombre de colonies d' <i>A. fumigatus</i>	qPCR panfongique (Eq. spores/ml)	qPCR <i>Aspergillus</i> (Eq. spores/ml)	qPCR <i>A. fumigatus</i> (fg/µl)
22	25/03/13	M	Marcq-en-Barœul	58	Négative	Négative	0	0	NC/NS	42	19	4,52E+04	5,90E+02	4,26
23	27/03/13	M	Lille	63	Négative	Positive	9	1	C/S	1	0	7,44E+04	4,90E+02	0,00
24	03/04/13	M	Lille	67	Positive (6 colonies)	Négative	0	0	C	10	0	6,43E+04	2,53E+03	6,69
25	30/04/13	M	Villeneuve-d'Ascq	55	Négative	Négative	0	0	NC/NS	11	0	5,99E+05	8,30E+03	11,11
26	22/05/13	M	Wambrechies	64	Négative	Positive	22	8	C/S	38	0	5,38E+05	7,80E+02	11,12
27	22/05/13	M	Salome	69	Négative	Négative	16	1	S	32	3	3,47E+05	7,80E+02	19,60
28	22/05/13	M	Mons-en-Barœul	80	Négative	Négative	0	0	NC/NS	4	0	9,58E+04	3,80E+02	3,28
29	22/05/13	M	Lille	51	Négative	NR	0	0	NC/NS	26	0	2,71E+05	6,20E+02	2,77
30	28/05/13	M	Villeneuve-d'Ascq	56	Négative	Négative	0	0	NC/NS	23	2	1,99E+05	1,42E+03	7,93
31	28/05/13	M	Loos	67	Négative	Négative	73	2	S	15	1	2,77E+05	4,30E+03	2,56
32	28/05/13	M	Ronchin	63	Non expectorant		1	1	S	36	0	1,20E+06	4,53E+03	17,89
33	11/06/13	F	Lille	83	Négative	Négative	0	0	NC/NS	33	2	2,79E+05	2,89E+03	13,49
34	23/07/13	M	Lille	58	Positive (20 colonies)	Positive	0	0	C	27	0	1,31E+06	1,18E+04	12,81
35	29/01/14	F	Villeneuve-d'Ascq	77	Négative	Positive	0	0	C	Non reçu				
36	11/02/14	M	Wavrin	46	Négative	Négative	0	0	NC/NS	13	0	1,01E+05	8,75E+02	8,17
37	11/03/14	F	Haubourdin	55	Négative	Négative	0	0	NC/NS	10	0	1,07E+05	6,36E+03	23,12
38	17/03/14	M	Ronchin	78	Négative	Négative	0	1	NC/NS	Non reçu				
39	25/03/14	F	Lille	86	Négative	Positive	0	0	C	12	3	1,28E+05	3,85E+02	17,89
40	28/03/14	M	Lille	77	Négative	Positive	0	0	C	15	3	5,19E+05	4,51E+03	25,17
41	23/04/14	M	Marquillies	66	Positive (5 colonies)	Positive	13	0	C/S	10	0	1,02E+06	6,53E+03	18,36
42	29/07/14	M	Hellemmes	63	Positive (3 colonies)	Positive	0	0	C	159	0			

Statut : C : colonisé, S : sensibilisé, C/S : colonisé et sensibilisé, NC/NS : non colonisé et non sensibilisé

Annexe 5

Résumé de la communication orale présentée à l'ECCMID (mai 2014)

Circulation of moulds between clinical and environmental reservoirs in a COPD patient population: emergence of *Aspergillus fumigatus* azole-resistance in the North of France

Dauchy C¹, Standaert-Vitse A^{2,3}, Le Rouzic O^{4,5}, Nseir S⁶, Dei-Cas E^{1,2}, Aliouat EM^{2,3}, Fry S⁴, Fréalle E^{1,2}

1. Laboratoire de Parasitologie-Mycologie, CHRU de Lille & Faculté de Médecine de Lille, Univ. Lille Nord de France, Lille, France
2. Institut Pasteur de Lille, Centre d'Infection et d'Immunité de Lille (CIIL), INSERM U1019, CNRS UMR 8204, Univ. Lille Nord de France, Lille, France
3. Laboratoire de Parasitologie, Faculté de Pharmacie de Lille, France
4. Clinique des Maladies Respiratoires, CHRU de Lille, France
5. Institut Pasteur de Lille, Centre d'Infection et d'Immunité de Lille (CIIL), INSERM U1019, CNRS UMR 8024, Université Lille Nord de France, Lille, France
6. Pôle de Réanimation, CHRU de Lille, France

Background: The emergence of azole resistance in *Aspergillus fumigatus* has been reported in azole-exposed patients, but also in azole-naïve patients and in the environment, suggesting both long-term azole therapy and the use of azole fungicides in agriculture could be involved in drug resistance emergence. The main resistance mechanism implicates point mutations in the 14 α -sterol demethylase gene (*cyp51A*) and/or increased *cyp51A* expression due to a tandem repeat (TR) promoter alteration. In this study, *Aspergillus* colonization prevalence and domestic mould exposure level were determined in an azole-naïve COPD patient population. *A. fumigatus* clinical and environmental isolates were characterized by *cyp51A* sequencing in order to clarify the circulation of *A. fumigatus* mutated isolates between clinical and environmental reservoirs.

Methods: Sputa from 33 COPD patients that were admitted to the Pneumology Department of Lille University Hospital (France) were prospectively collected from August 2011 to July 2013 for fungal detection by culture and *Aspergillus* qPCR. For each patient, domestic mould exposure level was determined by culture (colony counting) using an electrostatic dust fall collector (EDC) that had been exposed for 10 weeks in the patient's bedroom. Clinical and environmental samples were further cultured on itraconazole-containing Sabouraud agar medium for azole-resistant isolates selection when more than 10 *A. fumigatus* isolates were detected. Detection of *cyp51A* alterations was performed by *cyp51A* sequencing for all *A. fumigatus* clinical and environmental isolates.

Results: The inclusion of 33 COPD patients yielded 31 sputa and 29 EDCs. *Aspergillus* colonization was detected in 10 patients (32.2%) by culture and/or qPCR. Mould level in EDCs varied from 1 to 101 colonies. *A. fumigatus* was detected in 12 EDCs (41.4%) (1 to 19 colonies) from 1 *A. fumigatus* colonized patient, 1 *Aspergillus* qPCR positive patient and 10 non-colonized patients. *Cyp51A* sequencing in 25 *A. fumigatus* clinical and 34 environmental isolates revealed the presence of F46Y/M172V/N248T/D255E/E427K mutated isolates in 3 clinical isolates from 2 patients. TR₃₄/L98H mutation was detected in 2 out of 34 environmental isolates (5.9%) from 2 different patients, yielding a 6.9% prevalence of TR₃₄/L98H *A. fumigatus* isolates in patient's homes and a 16.7% prevalence in *A. fumigatus* culture positive EDCs. In both TR₃₄/L98H *A. fumigatus* positive EDCs, another mutated isolate was detected, one exhibiting the F46Y/M172V/N248T/D255E/E427K mutation and the other one a H285Y mutation.

Conclusion: This is the first report of TR₃₄/L98H *A. fumigatus* isolates in the North of France. The detection of *cyp51A* mutated isolates in environmental samples supports the role of agricultural azoles in the emergence azole-resistance.

Keywords: COPD, mould environmental exposure, azole-resistance

BIBLIOGRAPHIE

1. Rabe KF, Hurd S, Anzueto A, Barnes PJ, Buist SA, Calverley P, et al. Global strategy for the diagnosis, management, and prevention of chronic obstructive pulmonary disease: GOLD executive summary. *Am J Respir Crit Care Med*. 2007;176(6):532-55.
2. Murray CJ, Lopez AD. Alternative projections of mortality and disability by cause 1990-2020: Global Burden of Disease Study. *Lancet*. 1997;349(9064):1498-504.
3. Miravittles M, Murio C, Guerrero T, Gisbert R. Costs of chronic bronchitis and COPD: a 1-year follow-up study. *Chest*. 2003;123(3):784-91.
4. Seemungal T, Harper-Owen R, Bhowmik A, Moric I, Sanderson G, Message S, et al. Respiratory viruses, symptoms, and inflammatory markers in acute exacerbations and stable chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med*. 2001;164(9):1618-23.
5. Rosell A, Monsó E, Soler N, Torres F, Angrill J, Riise G, et al. Microbiologic determinants of exacerbation in chronic obstructive pulmonary disease. *Arch Intern Med*. 2005;165(8):891-7.
6. Wedzicha JA, Seemungal TAR. COPD exacerbations: defining their cause and prevention. *Lancet*. 2007;370(9589):786-96.
7. Kosmidis C, Denning DW. The clinical spectrum of pulmonary aspergillosis. *Thorax*. 2015;70:270-277.
8. Ader F, Nseir S, Guery B, Tillie-Leblond I. Aspergillose pulmonaire aiguë invasive et pathologies pulmonaires chroniques. *Rev Mal Respir*. 2006;23(3 Suppl):6S11-6S20.
9. Bulpa P, Dive A, Sibille Y. Invasive pulmonary aspergillosis in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Eur Respir J*. 2007;30(4):782-800.
10. Howard SJ, Cerar D, Anderson MJ, Albarrag A, Fisher MC, Pasqualotto AC, et al. Frequency and evolution of Azole resistance in *Aspergillus fumigatus* associated with treatment failure. *Emerg Infect Dis*. 2009;15(7):1068-76.
11. Howard SJ, Pasqualotto AC, Denning DW. Azole resistance in allergic bronchopulmonary aspergillosis and *Aspergillus* bronchitis. *Clin Microbiol Infect*. 2010;16(6):683-8.
12. Tashiro M, Izumikawa K, Hirano K, Ide S, Mihara T, Hosogaya N, et al. Correlation between triazole treatment history and susceptibility in clinically isolated *Aspergillus fumigatus*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2012;56(9):4870-5.
13. Snelders E, Huis in 't Veld RAG, Rijs AJMM, Kema GHJ, Melchers WJG, Verweij PE. Possible Environmental Origin of Resistance of *Aspergillus fumigatus* to Medical Triazoles. *Appl Environ Microbiol*. 2009;75(12):4053-7.
14. Alcazar-Fuoli L, Mellado E. Current status of antifungal resistance and its impact on clinical practice. *Br J Haematol*. 2014;166(4):471-84.
15. Société de Pneumologie de Langue Française. Recommandations de la Société de Pneumologie de Langue Française sur la prise en charge de la BPCO (mise à jour 2009). Presse Médicale Paris Fr 1983. 2010;39(9):895-8.
16. Vestbo J, Hurd SS, Agustí AG, Jones PW, Vogelmeier C, Anzueto A, et al. Global strategy for the diagnosis, management, and prevention of chronic obstructive pulmonary disease: GOLD executive summary. *Am J Respir Crit Care Med*. 2013;187(4):347-65.
17. Leivseth L, Brumpton BM, Nilsen TIL, Mai X-M, Johnsen R, Langhammer A. GOLD classifications and mortality in chronic obstructive pulmonary disease: the HUNT Study, Norway. *Thorax*. 2013;68(10):914-21.
18. Johannessen A, Nilsen RM, Storebø M, Gulsvik A, Eagan T, Bakke P. Comparison of 2011 and 2007 Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease guidelines for predicting mortality and hospitalization. *Am J Respir Crit Care Med*. 2013;188(1):51-9.
19. Lange P, Marott JL, Vestbo J, Olsen KR, Ingebrigtsen TS, Dahl M, et al. Prediction of the clinical course of chronic obstructive pulmonary disease, using the new GOLD classification: a study of the general population. *Am J Respir Crit Care Med*. 2012;186(10):975-81.
20. Fuhrman C, Delmas M-C, pour le groupe épidémiologie et recherche clinique de la SPLF. Épidémiologie descriptive de la bronchopneumopathie chronique obstructive (BPCO) en France. *Rev*

Mal Respir. 2010;27(2):160-8.

21. Fuhrman C. Mortalité liée à la BPCO en France métropolitaine, 1979-2003. Bulletin épidémiologique hebdomadaire. 2007;27-28:242-5.
22. Etude Epidémiologique sur la broncho-pneumopathie chronique obstructive (BPCO) dans trois régions françaises ayant des taux de mortalité contrastés - Ministère des Affaires sociales, de la Santé et des Droits des femmes - www.sante.gouv.fr [Internet]. [cité 12 janv 2015]. Disponible sur: <http://www.sante.gouv.fr/etude-epidemiologique-sur-la-broncho-pneumopathie-chronique-obstructive-bpco-dans-trois-regions-francaises-ayant-des-taux-de-mortalite-contrastes.html>
23. De Marco R, Accordini S, Cerveri I, Corsico A, Sunyer J, Neukirch F, et al. An international survey of chronic obstructive pulmonary disease in young adults according to GOLD stages. *Thorax*. 2004;59(2):120-5.
24. Rennard S, Decramer M, Calverley PMA, Pride NB, Soriano JB, Vermeire PA, et al. Impact of COPD in North America and Europe in 2000: subjects' perspective of Confronting COPD International Survey. *Eur Respir J*. 2002;20(4):799-805.
25. Buist AS, McBurnie MA, Vollmer WM, Gillespie S, Burney P, Mannino DM, et al. International variation in the prevalence of COPD (the BOLD Study): a population-based prevalence study. *Lancet*. 2007;370(9589):741-50.
26. Menezes AMB, Perez-Padilla R, Jardim JRB, Muiño A, Lopez MV, Valdivia G, et al. Chronic obstructive pulmonary disease in five Latin American cities (the PLATINO study): a prevalence study. *Lancet*. 2005;366(9500):1875-81.
27. O'Donnell R, Breen D, Wilson S, Djukanovic R. Inflammatory cells in the airways in COPD. *Thorax*. 2006;61(5):448-54.
28. Sethi S, Murphy TF. Infection in the Pathogenesis and Course of Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *N Engl J Med*. 2008;359(22):2355-65.
29. Anderson HR, Spix C, Medina S, Schouten JP, Castellsague J, Rossi G, et al. Air pollution and daily admissions for chronic obstructive pulmonary disease in 6 European cities: results from the APHEA project. *Eur Respir J*. 1997;10(5):1064-71.
30. Wilkinson TMA, Hurst JR, Perera WR, Wilks M, Donaldson GC, Wedzicha JA. Effect of interactions between lower airway bacterial and rhinoviral infection in exacerbations of COPD. *Chest*. 2006;129(2):317-24.
31. Perotin J-M, Dury S, Renois F, Deslee G, Wolak A, Duval V, et al. Detection of multiple viral and bacterial infections in acute exacerbation of chronic obstructive pulmonary disease: a pilot prospective study. *J Med Virol*. 2013;85(5):866-73.
32. Garcha DS, Thurston SJ, Patel ARC, Mackay AJ, Goldring JJP, Donaldson GC, et al. Changes in prevalence and load of airway bacteria using quantitative PCR in stable and exacerbated COPD. *Thorax*. 2012;67(12):1075-80.
33. Domenech A, Puig C, Martí S, Santos S, Fernández A, Calatayud L, et al. Infectious etiology of acute exacerbations in severe COPD patients. *J Infect*. 2013;67(6):516-23.
34. Diederens BMW, van der Valk PDLPM, Kluytmans J a. WJ, Peeters MF, Hendrix R. The role of atypical respiratory pathogens in exacerbations of chronic obstructive pulmonary disease. *Eur Respir J*. 2007;30(2):240-4.
35. Rohde G, Wiethage A, Borg I, Kauth M, Bauer TT, Gillissen A, et al. Respiratory viruses in exacerbations of chronic obstructive pulmonary disease requiring hospitalisation: a case-control study. *Thorax*. 2003;58(1):37-42.
36. Beckham JD, Cadena A, Lin J, Piedra PA, Glezen WP, Greenberg SB, et al. Respiratory viral infections in patients with chronic, obstructive pulmonary disease. *J Infect*. 2005;50(4):322-30.
37. Ko FWS, Ip M, Chan PKS, Chan MCH, To K-W, Ng SSS, et al. Viral etiology of acute exacerbations of COPD in Hong Kong. *Chest*. 2007;132(3):900-8.
38. McManus TE, Marley A-M, Baxter N, Christie SN, O'Neill HJ, Elborn JS, et al. Respiratory viral infection in exacerbations of COPD. *Respir Med*. 2008;102(11):1575-80.
39. Zwaans W a. R, Mallia P, van Winden MEC, Rohde GGU. The relevance of respiratory viral infections in the exacerbations of chronic obstructive pulmonary disease—a systematic review. *J Clin Virol*. 2014;61(2):181-8.

40. Papi A, Bellettato CM, Braccioni F, Romagnoli M, Casolari P, Caramori G, et al. Infections and airway inflammation in chronic obstructive pulmonary disease severe exacerbations. *Am J Respir Crit Care Med*. 2006;173(10):1114-21.
41. Guide du parcours de soins BPCO [Internet]. [cité 23 mars 2015]. Disponible sur: http://www.has-sante.fr/portail/upload/docs/application/pdf/2012-04/guide_parours_de_soins_bpco_finale.pdf
42. Samson RA. *Taxonomy-current concepts of Aspergillus systematic*. Plenum Press. New York: Plenum Press; 1993. 1-22 p.
43. Bennett J. *An overview of the genus Aspergillus Aspergillus molecular biology and genomics*. Caister Academic Press. Norwich: Caister Academic Press; 2010. 238 p.
44. Raper KB, Fennel DI. *The genus Aspergillus*. Williams and Wilkins. Baltimore: Williams and Wilkins; 1965. 686 p.
45. Samson RA, Visagie CM, Houbraken J, Hong S-B, Hubka V, Klaassen CHW, et al. Phylogeny, identification and nomenclature of the genus *Aspergillus*. *Stud Mycol*. 2014;78:141-73.
46. Samson RA. List of names of Trichocomataceae published between 1992 and 1999 Integration of modern taxonomic methods for *Penicillium* et *Aspergillus* classification. Haewood Academic Publishers. Amsterdam: Haewood Academic Publishers; 2000. 73-79 p.
47. Houbraken J, de Vries RP, Samson RA. Modern taxonomy of biotechnologically important *Aspergillus* and *Penicillium* species. *Adv Appl Microbiol*. 2014;86:199-249.
48. Samson RA, Hong S, Peterson SW, Frisvad JC, Varga J. Polyphasic taxonomy of *Aspergillus* section *Fumigati* and its teleomorph *Neosartorya*. *Stud Mycol*. 2007;59:147-203.
49. Balajee SA, Gribskov JL, Hanley E, Nickle D, Marr KA. *Aspergillus lentulus* sp. nov., a New Sibling Species of *A. fumigatus*. *Eukaryot Cell*. 2005;4(3):625-32.
50. Balajee SA, Nickle D, Varga J, Marr KA. Molecular Studies Reveal Frequent Misidentification of *Aspergillus fumigatus* by Morphotyping. *Eukaryot Cell*. 2006;5(10):1705-12.
51. Alcazar-Fuoli L, Mellado E, Alastruey-Izquierdo A, Cuenca-Estrella M, Rodriguez-Tudela JL. *Aspergillus* section *Fumigati*: antifungal susceptibility patterns and sequence-based identification. *Antimicrob Agents Chemother*. 2008;52(4):1244-51.
52. Balajee SA, Gribskov J, Brandt M, Ito J, Fothergill A, Marr KA. Mistaken identity: *Neosartorya pseudofischeri* and its anamorph masquerading as *Aspergillus fumigatus*. *J Clin Microbiol*. 2005;43(12):5996-9.
53. Hong S-B, Shin H-D, Hong J, Frisvad JC, Nielsen PV, Varga J, et al. New taxa of *Neosartorya* and *Aspergillus* in *Aspergillus* section *Fumigati*. *Antonie Van Leeuwenhoek*. 2008;93(1-2):87-98.
54. Nierman WC, Pain A, Anderson MJ, Wortman JR, Kim HS, Arroyo J, et al. Genomic sequence of the pathogenic and allergenic filamentous fungus *Aspergillus fumigatus*. *Nature*. 2005;438(7071):1151-6.
55. O'Gorman CM, Fuller HT, Dyer PS. Discovery of a sexual cycle in the opportunistic fungal pathogen *Aspergillus fumigatus*. *Nature*. 2009;457(7228):471-4.
56. Chabasse D. Les moisissures d'intérêt médical. *Cahier de Formation BIOFORMA*. Cahier de formation BIOFORMA; 2002.
57. Alhambra A, Catalán M, Moragues MD, Brena S, Pontón J, Montejo JC, et al. Isolation of *Aspergillus lentulus* in Spain from a critically ill patient with chronic obstructive pulmonary disease. *Rev Iberoam Micol*. 2008;25(4):246-9.
58. Montenegro G, Sánchez Puch S, Jewtuchowicz VM, Pinoni MV, Relloso S, Temporitti E, et al. Phenotypic and genotypic characterization of *Aspergillus lentulus* and *Aspergillus fumigatus* isolates in a patient with probable invasive aspergillosis. *J Med Microbiol*. 2009;58(Pt 3):391-5.
59. Zbinden A, Imhof A, Wilhelm MJ, Ruschitzka F, Wild P, Bloemberg GV, et al. Fatal outcome after heart transplantation caused by *Aspergillus lentulus*. *Transpl Infect Dis* 2012;14(5):E60-3.
60. Gürcan Ş, Tikveşli M, Üstündağ S, Ener B. A Case Report on *Aspergillus lentulus* Pneumonia. *Balk Med J*. 2013;30(4):429-31.
61. Gangneux J-P, Bouchara J-P, Chabasse D. *Biologie et diagnostic des infections à Aspergillus*. Elsevier Masson. 2013;(8-600-A-10).

62. Méheust D, Le Cann P, Reboux G, Millon L, Gangneux J-P. Indoor fungal contamination: health risks and measurement methods in hospitals, homes and workplaces. *Crit Rev Microbiol*. 2014;40(3):248-60.
63. Noss I, Wouters IM, Visser M, Heederik DJJ, Thorne PS, Brunekreef B, et al. Evaluation of a low-cost electrostatic dust fall collector for indoor air endotoxin exposure assessment. *Appl Environ Microbiol*. 2008;74(18):5621-7.
64. Normand A-C, Vacheyrou M, Sudre B, Heederik DJJ, Piarroux R. Assessment of dust sampling methods for the study of cultivable-microorganism exposure in stables. *Appl Environ Microbiol*. 2009;75(24):7617-23.
65. Frankel M, Timm M, Hansen EW, Madsen AM. Comparison of sampling methods for the assessment of indoor microbial exposure. *Indoor Air*. 2012;22(5):405-14.
66. Bellanger A-P, Reboux G, Murat J-B, Bex V, Millon L. Detection of *Aspergillus fumigatus* by quantitative polymerase chain reaction in air samples impacted on low-melt agar. *Am J Infect Control*. 2010;38(3):195-8.
67. Lignell U, Meklin T, Rintala H, Hyvärinen A, Vepsäläinen A, Pekkanen J, et al. Evaluation of quantitative PCR and culture methods for detection of house dust fungi and streptomycetes in relation to moisture damage of the house. *Lett Appl Microbiol*. 2008;47(4):303-8.
68. Latgé JP. The pathobiology of *Aspergillus fumigatus*. *Trends Microbiol*. 2001;9(8):382-9.
69. Morin O. *Aspergillus* et aspergilloses: Biologie. [Httpwwwem-Premiumcomdoc-Distantuniv-Lille2frdatatraitescmc08-08438 \[Internet\]](http://www.em-premium.com/doc-distant.univ-lille2.fr/article/11908/resultatrecherche/3). [cité 13 déc 2014]; Disponible sur: [http://www.em-premium.com.doc-distant.univ-lille2.fr/article/11908/resultatrecherche/3](http://www.em-premium.com/doc-distant.univ-lille2.fr/article/11908/resultatrecherche/3)
70. Carter CD, Barr BA. Infection control issues in construction and renovation. *Infect Control Hosp Epidemiol*. 1997;18(8):587-96.
71. Mallea M, Renard M, Charpin J. Flore fongique dans les habitations. *Rev Fr Mal Respir*. 1982;10(2):121-30.
72. Reboux G, Bellanger AP, Roussel S, Grenouillet F, Sornin S, Piarroux R, et al. Indoor mold concentration in Eastern France. *Indoor Air*. 2009;19(6):446-53.
73. Latgé J-P. *Aspergillus fumigatus* and Aspergillosis. *Clin Microbiol Rev*. 1999;12(2):310-50.
74. Blandin S, David G. L'aspergillose en pratique pour le pneumologue. *Rev Pneumol Clin*. 2008;64(4):202-10.
75. Barberan J, Alcazar B, Malmierca E, Garcia de la Llana F, Dorca J, del Castillo D, et al. Repeated *Aspergillus* isolation in respiratory samples from non-immunocompromised patients not selected based on clinical diagnoses: colonisation or infection? *BMC Infect Dis*. 2012;12:295.
76. Guinea J, Torres-Narbona M, Gijón P, Muñoz P, Pozo F, Peláez T, et al. Pulmonary aspergillosis in patients with chronic obstructive pulmonary disease: incidence, risk factors, and outcome. *Clin Microbiol Infect*. 2010;16(7):870-7.
77. Khasawneh F, Mohamad T, Moughrabieh MK, Lai Z, Ager J, Soubani AO. Isolation of *Aspergillus* in critically ill patients: a potential marker of poor outcome. *J Crit Care*. 2006;21(4):322-7.
78. Barberán J, Mensa J. [Invasive pulmonary aspergillosis in patients with chronic obstructive pulmonary disease.]. *Rev Iberoam Micol*. 2014;12:295.
79. Garnacho-Montero J, Amaya-Villar R, Ortiz-Leyba C, León C, Alvarez-Lerma F, Nolla-Salas J, et al. Isolation of *Aspergillus* spp. from the respiratory tract in critically ill patients: risk factors, clinical presentation and outcome. *Crit Care Lond Engl*. 2005;9(3):R191-9.
80. Huerta A, Soler N, Esperatti M, Guerrero M, Menendez R, Gimeno A, et al. Importance of *Aspergillus* spp. isolation in Acute exacerbations of severe COPD: prevalence, factors and follow-up: the FUNGI-COPD study. *Respir Res*. 2014;15:17.
81. Meersseman W, Vandecasteele SJ, Wilmer A, Verbeken E, Peetermans WE, Van Wijngaerden E. Invasive aspergillosis in critically ill patients without malignancy. *Am J Respir Crit Care Med*. 2004;170(6):621-5.
82. Chakrabarti A, Chatterjee SS, Das A, Shivaprakash MR. Invasive aspergillosis in developing countries. *Med Mycol*. 2011;49 Suppl 1:S35-47.
83. Marchetti O, Lamoth F, Mikulska M, Viscoli C, Verweij P, Bretagne S, et al. ECIL

recommendations for the use of biological markers for the diagnosis of invasive fungal diseases in leukemic patients and hematopoietic SCT recipients. *Bone Marrow Transplant*. 2012;47(6):846-54.

84. Tutar N, Metan G, Koç AN, Yilmaz I, Bozkurt I, Simsek ZO, et al. Invasive pulmonary aspergillosis in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Multidiscip Respir Med*. 2013;8(1):59.

85. Menzin J, Meyers JL, Friedman M, Perfect JR, Langston AA, Danna RP, et al. Mortality, length of hospitalization, and costs associated with invasive fungal infections in high-risk patients. *Am J Health-Syst Pharm AJHP*. 2009;66(19):1711-7.

86. Samarakoon P, Soubani AO. Invasive pulmonary aspergillosis in patients with COPD: a report of five cases and systematic review of the literature. *Chron Respir Dis*. 2008;5(1):19-27.

87. Lin SJ, Schranz J, Teutsch SM. Aspergillosis case-fatality rate: systematic review of the literature. *Clin Infect Dis*. 2001;32(3):358-66.

88. Arendrup MC, Chrissyanthou E, Gaustad P, Koskela M, Sandven P, Fernandez V. Diagnostics of fungal infections in the Nordic countries: we still need to improve! *Scand J Infect Dis*. 2007;39(4):337-43.

89. Fraczek MG, Kirwan MB, Moore CB, Morris J, Denning DW, Richardson MD. Volume dependency for culture of fungi from respiratory secretions and increased sensitivity of *Aspergillus* quantitative PCR. *Mycoses*. 2014;57(2):69-78.

90. Thompson GR, Cadena J, Patterson TF. Overview of antifungal agents. *Clin Chest Med*. 2009;30(2):203-15.

91. Koss T, Bagheri B, Zeana C, Romagnoli MF, Grossman ME. Amphotericin B-resistant *Aspergillus flavus* infection successfully treated with caspofungin, a novel antifungal agent. *J Am Acad Dermatol*. juin 2002;46(6):945-7.

92. Azzola A, Passweg JR, Habicht JM, Bubendorf L, Tamm M, Gratwohl A, et al. Use of lung resection and voriconazole for successful treatment of invasive pulmonary *Aspergillus ustus* infection. *J Clin Microbiol*. 2004;42(10):4805-8.

93. Bal AM. The echinocandins: three useful choices or three too many? *Int J Antimicrob Agents*. 2010;35(1):13-8.

94. Arendrup MC, Perkhofer S, Howard SJ, Garcia-Effron G, Vishukumar A, Perlin D, et al. Establishing in vitro-in vivo correlations for *Aspergillus fumigatus*: the challenge of azoles versus echinocandins. *Antimicrob Agents Chemother*. 2008;52(10):3504-11.

95. Arendrup MC, Garcia-Effron G, Buzina W, Mortensen KL, Reiter N, Lundin C, et al. Breakthrough *Aspergillus fumigatus* and *Candida albicans* double infection during caspofungin treatment: laboratory characteristics and implication for susceptibility testing. *Antimicrob Agents Chemother*. 2009;53(3):1185-93.

96. Pasqualotto AC, Denning DW. New and emerging treatments for fungal infections. *J Antimicrob Chemother*. 2008;61 Suppl 1:i19-30.

97. Steinbach WJ, Stevens DA. Review of newer antifungal and immunomodulatory strategies for invasive aspergillosis. *Clin Infect Dis*. 2003;37 Suppl 3:S157-87.

98. Alcazar-Fuoli L, Mellado E. Ergosterol biosynthesis in *Aspergillus fumigatus*: its relevance as an antifungal target and role in antifungal drug resistance. *Front Microbiol*. 2012;3:439.

99. Mellado E, Diaz-Guerra TM, Cuenca-Estrella M, Rodriguez-Tudela JL. Identification of Two Different 14- α Sterol Demethylase-Related Genes (*cyp51A* and *cyp51B*) in *Aspergillus fumigatus* and Other *Aspergillus* Species. *J Clin Microbiol*. 2001;39(11):4225.

100. Xiao L, Madison V, Chau AS, Loebenberg D, Palermo RE, McNicholas PM. Three-dimensional models of wild-type and mutated forms of cytochrome P450 14 α -sterol demethylases from *Aspergillus fumigatus* and *Candida albicans* provide insights into posaconazole binding. *Antimicrob Agents Chemother*. 2004;48(2):568-74.

101. Gallin JI, Alling DW, Malech HL, Wesley R, Koziol D, Marciano B, et al. Itraconazole to prevent fungal infections in chronic granulomatous disease. *N Engl J Med*. 2003;348(24):2416-22.

102. Herbrecht R, Denning DW, Patterson TF, Bennett JE, Greene RE, Oestmann J-W, et al. Voriconazole versus amphotericin B for primary therapy of invasive aspergillosis. *N Engl J Med*. 2002;347(6):408-15.

103. Walsh TJ, Anaissie EJ, Denning DW, Herbrecht R, Kontoyiannis DP, Marr KA, et al. Treatment

of aspergillosis: clinical practice guidelines of the Infectious Diseases Society of America. Clin Infect Dis. 2008;46(3):327-60.

104. Lelièvre L, Groh M, Angebault C, Maherault A-C, Didier E, Bougnoux M-E. Azole resistant *Aspergillus fumigatus*: an emerging problem. Médecine Mal Infect. 2013;43(4):139-45.

105. Van der Linden JWM, Snelders E, Kampinga GA, Rijnders BJA, Mattsson E, Debets-Ossenkopp YJ, et al. Clinical Implications of Azole Resistance in *Aspergillus fumigatus*, the Netherlands, 2007–2009. Emerg Infect Dis. 2011;17(10):1846-54.

106. Verweij PE, Te Dorsthorst DTA, Rijs AJMM, De Vries-Hospers HG, Meis JFGM. Nationwide survey of in vitro activities of itraconazole and voriconazole against clinical *Aspergillus fumigatus* isolates cultured between 1945 and 1998. J Clin Microbiol. 2002;40(7):2648-50.

107. Escribano P, Peláez T, Muñoz P, Bouza E, Guinea J. Is azole resistance in *Aspergillus fumigatus* a problem in Spain? Antimicrob Agents Chemother. 2013;57(6):2815-20.

108. Howard SJ, Arendrup MC. Acquired antifungal drug resistance in *Aspergillus fumigatus*: epidemiology and detection. Med Mycol. 2011;49 Suppl 1:S90-5.

109. Diaz-Guerra TM, Mellado E, Cuenca-Estrella M, Rodriguez-Tudela JL. A point mutation in the 14alpha-sterol demethylase gene *cyp51A* contributes to itraconazole resistance in *Aspergillus fumigatus*. Antimicrob Agents Chemother. 2003;47(3):1120-4.

110. Mann PA, Parmegiani RM, Wei S-Q, Mendrick CA, Li X, Loebenberg D, et al. Mutations in *Aspergillus fumigatus* resulting in reduced susceptibility to posaconazole appear to be restricted to a single amino acid in the cytochrome P450 14alpha-demethylase. Antimicrob Agents Chemother. 2003;47(2):577-81.

111. Nascimento AM, Goldman GH, Park S, Marras SAE, Delmas G, Oza U, et al. Multiple resistance mechanisms among *Aspergillus fumigatus* mutants with high-level resistance to itraconazole. Antimicrob Agents Chemother. 2003;47(5):1719-26.

112. Snelders E, Karawajczyk A, Schaftenaar G, Verweij PE, Melchers WJG. Azole resistance profile of amino acid changes in *Aspergillus fumigatus* CYP51A based on protein homology modeling. Antimicrob Agents Chemother. 2010;54(6):2425-30.

113. Mellado E, Garcia-Effron G, Alcazar-Fuoli L, Cuenca-Estrella M, Rodriguez-Tudela JL. Substitutions at methionine 220 in the 14alpha-sterol demethylase (Cyp51A) of *Aspergillus fumigatus* are responsible for resistance in vitro to azole antifungal drugs. Antimicrob Agents Chemother. 2004;48(7):2747-50.

114. Mellado E, Garcia-Effron G, Alcázar-Fuoli L, Melchers WJG, Verweij PE, Cuenca-Estrella M, et al. A new *Aspergillus fumigatus* resistance mechanism conferring in vitro cross-resistance to azole antifungals involves a combination of *cyp51A* alterations. Antimicrob Agents Chemother. 2007;51(6):1897-904.

115. Fraczek MG, Bromley M, Bowyer P. An improved model of the *Aspergillus fumigatus* CYP51A protein. Antimicrob Agents Chemother. 2011;55(5):2483-6.

116. Snelders E, van der Lee HAL, Kuijpers J, Rijs AJMM, Varga J, Samson RA, et al. Emergence of azole resistance in *Aspergillus fumigatus* and spread of a single resistance mechanism. PLoS Med. 2008;5(11):e219.

117. Vermeulen E, Maertens J, Schoemans H, Lagrou K. Azole-resistant *Aspergillus fumigatus* due to TR46/Y121F/T289A mutation emerging in Belgium, 2012. Euro Surveill Bull Eur Sur Mal Transm Eur Commun Dis Bull. 2012;17(48).

118. Van der Linden JWM, Camps SMT, Kampinga GA, Arends JPA, Debets-Ossenkopp YJ, Haas PJA, et al. Aspergillosis due to voriconazole highly resistant *Aspergillus fumigatus* and recovery of genetically related resistant isolates from domiciles. Clin Infect Dis. 2013;57(4):513-20.

119. Chowdhary A, Sharma C, Kathuria S, Hagen F, Meis JF. Azole-resistant *Aspergillus fumigatus* with the environmental TR46/Y121F/T289A mutation in India. J Antimicrob Chemother. 2014;69(2):555-7.

120. Cannon RD, Lamping E, Holmes AR, Niimi K, Baret PV, Keniya MV, et al. Efflux-mediated antifungal drug resistance. Clin Microbiol Rev. 2009;22(2):291-321.

121. Slaven JW, Anderson MJ, Sanglard D, Dixon GK, Bille J, Roberts IS, et al. Increased expression of a novel *Aspergillus fumigatus* ABC transporter gene, *atrF*, in the presence of itraconazole in an itraconazole resistant clinical isolate. Fungal Genet Biol. 2002;36(3):199-206.

122. Rajendran R, Mowat E, McCulloch E, Lappin DF, Jones B, Lang S, et al. Azole resistance of *Aspergillus fumigatus* biofilms is partly associated with efflux pump activity. *Antimicrob Agents Chemother*. 2011;55(5):2092-7.
123. Buied A, Moore CB, Denning DW, Bowyer P. High-level expression of *cyp51B* in azole-resistant clinical *Aspergillus fumigatus* isolates. *J Antimicrob Chemother*. 2013;68(3):512-4.
124. Subcommittee on Antifungal Susceptibility Testing of the ESCMID European Committee for Antimicrobial Susceptibility Testing. EUCAST Technical Note on the method for the determination of broth dilution minimum inhibitory concentrations of antifungal agents for conidia-forming moulds. *Clin Microbiol Infect*. 2008;14(10):982-4.
125. Wayne P. CLSI. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of filamentous fungi; approved standard-second edition. Doc M38-A2. 2002.
126. EUCAST: Clinical breakpoints [Internet]. [cité 12 janv 2015]. Disponible sur: http://www.eucast.org/clinical_breakpoints/
127. Cuenca-Estrella M, Rodriguez-Tudela JL. The current role of the reference procedures by CLSI and EUCAST in the detection of resistance to antifungal agents in vitro. *Expert Rev Anti Infect Ther*. 2010;8(3):267-76.
128. Pfaller JB, Messer SA, Hollis RJ, Diekema DJ, Pfaller MA. In vitro susceptibility testing of *Aspergillus* spp.: comparison of Etest and reference microdilution methods for determining voriconazole and itraconazole MICs. *J Clin Microbiol*. 2003;41(3):1126-9.
129. 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;49(6):2243-51.
130. Morio F, Aubin GG, Danner-Boucher I, Haloun A, Sacchetto E, Garcia-Hermoso D, et al. High prevalence of triazole resistance in *Aspergillus fumigatus*, especially mediated by TR/L98H, in a French cohort of patients with cystic fibrosis. *J Antimicrob Chemother*. 2012;67(8):1870-3.
131. Van der Linden JWM, Snelders E, Arends JP, Daenen SM, Melchers WJG, Verweij PE. Rapid Diagnosis of Azole-Resistant Aspergillosis by Direct PCR Using Tissue Specimens. *J Clin Microbiol*. 2010;48(4):1478-80.
132. Garcia-Effron G, Dilger A, Alcazar-Fuoli L, Park S, Mellado E, Perlin DS. Rapid Detection of Triazole Antifungal Resistance in *Aspergillus fumigatus*. *J Clin Microbiol*. 2008;46(4):1200-6.
133. Verweij PE, Snelders E, Kema GHJ, Mellado E, Melchers WJG. Azole resistance in *Aspergillus fumigatus*: a side-effect of environmental fungicide use? *Lancet Infect Dis*. 2009;9(12):789-95.
134. Verweij PE, Kema GHJ, Zwaan B, Melchers WJG. Triazole fungicides and the selection of resistance to medical triazoles in the opportunistic mould *Aspergillus fumigatus*. *Pest Manag Sci*. 2013;69(2):165-70.
135. Denning DW, Venkateswarlu K, Oakley KL, Anderson MJ, Manning NJ, Stevens DA, et al. Itraconazole resistance in *Aspergillus fumigatus*. *Antimicrob Agents Chemother*. 1997;41(6):1364-8.
136. Lockhart SR, Frade JP, Etienne KA, Pfaller MA, Diekema DJ, Balajee SA. Azole Resistance in *Aspergillus fumigatus* Isolates from the ARTEMIS Global Surveillance Study Is Primarily Due to the TR/L98H Mutation in the *cyp51A* Gene. *Antimicrob Agents Chemother*. 2011;55(9):4465-8.
137. Van der Linden JWM, Arendrup MC, Verweij PE, SCARE network (2011) Prospective international surveillance of azole resistance in *Aspergillus fumigatus*: SCARE-Network. In: 51st Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy (ICAAC); Sep 17–20; Chicago, IL. Abstract M-490. (SCARE-NETWORK).
138. Dannaoui E, Persat F, Monier MF, Borel E, Piens MA, Picot S. In-vitro susceptibility of *Aspergillus* spp. isolates to amphotericin B and itraconazole. *J Antimicrob Chemother*. 1999;44(4):553-5.
139. Alanio A, Sitterlé E, Liance M, Farrugia C, Foulet F, Botterel F, et al. Low prevalence of resistance to azoles in *Aspergillus fumigatus* in a French cohort of patients treated for haematological malignancies. *J Antimicrob Chemother*. 2011;66(2):371-4.
140. Burgel P-R, Baixench M-T, Amsellem M, Audureau E, Chapron J, Kanaan R, et al. High prevalence of azole-resistant *Aspergillus fumigatus* in adults with cystic fibrosis exposed to

itraconazole. *Antimicrob Agents Chemother.* 2012;56(2):869-74.

141. Bueid A, Howard SJ, Moore CB, Richardson MD, Harrison E, Bowyer P, et al. Azole antifungal resistance in *Aspergillus fumigatus*: 2008 and 2009. *J Antimicrob Chemother.* 2010;65(10):2116-8.

142. Chowdhary A, Kathuria S, Xu J, Meis JF. Emergence of Azole-Resistant *Aspergillus fumigatus* Strains due to Agricultural Azole Use Creates an Increasing Threat to Human Health. *PLoS Pathog* 2013;9(10):e1003633.

143. Seyedmousavi S, Hashemi SJ, Zibafar E, Zoll J, Hedayati MT, Mouton JW, et al. Azole-Resistant *Aspergillus fumigatus*, Iran. *Emerg Infect Dis.* 2013;19(5):832-4.

144. Tashiro M, Izumikawa K, Minematsu A, Hirano K, Iwanaga N, Ide S, et al. Antifungal Susceptibilities of *Aspergillus fumigatus* Clinical Isolates Obtained in Nagasaki, Japan. *Antimicrob Agents Chemother.* 2012;56(1):584-7.

145. Rodriguez-Tudela JL, Alcazar-Fuoli L, Mellado E, Alastruey-Izquierdo A, Monzon A, Cuenca-Estrella M. Epidemiological cutoffs and cross-resistance to azole drugs in *Aspergillus fumigatus*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2008;52(7):2468-72.

146. Rocchi S, Daguindau E, Grenouillet F, Deconinck E, Bellanger A-P, Garcia-Hermoso D, et al. Azole-resistant *Aspergillus fumigatus* isolate with the TR34/L98H mutation in both a fungicide-sprayed field and the lung of a hematopoietic stem cell transplant recipient with invasive aspergillosis. *J Clin Microbiol.* 2014;52(5):1724-6.

147. Chowdhary A, Kathuria S, Xu J, Sharma C, Sundar G, Singh PK, et al. Clonal expansion and emergence of environmental multiple-triazole-resistant *Aspergillus fumigatus* strains carrying the TR34/L98H mutations in the *cyp51A* gene in India. *PLoS One.* 2012;7(12):e52871.

148. Pfaller M, Boyken L, Hollis R, Kroeger J, Messer S, Tendolkar S, et al. Use of Epidemiological Cutoff Values To Examine 9-Year Trends in Susceptibility of *Aspergillus* Species to the Triazoles. *J Clin Microbiol.* févr 2011;49(2):586-90.

149. Fréalle E, Decrucq K, Botterel F, Bouchindhomme B, Camus D, Dei-Cas E, et al. Diagnosis of invasive aspergillosis using bronchoalveolar lavage in haematology patients: influence of bronchoalveolar lavage human DNA content on real-time PCR performance. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2009;28(3):223-32.

150. Chemidlin Prévost-Bouré N, Christen R, Dequiedt S, Mougél C, Lelièvre M, Jolivet C, et al. Validation and application of a PCR primer set to quantify fungal communities in the soil environment by real-time quantitative PCR. *PLoS One.* 2011;6(9):e24166.

151. Costa C, Costa J-M, Desterke C, Botterel F, Cordonnier C, Bretagne S. Real-time PCR coupled with automated DNA extraction and detection of galactomannan antigen in serum by enzyme-linked immunosorbent assay for diagnosis of invasive aspergillosis. *J Clin Microbiol.* 2002;40(6):2224-7.

152. Haugland RA, Varma M, Wymer LJ, Vesper SJ. Quantitative PCR analysis of selected *Aspergillus*, *Penicillium* and *Paecilomyces* species. *Syst Appl Microbiol.* 2004;27(2):198-210.

153. European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. 2014 [cité 12 janv 2015]. Disponible sur: http://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/AFST/Antifungal_breakpoints_v_7.0.pdf

154. Balajee SA, Houbraken J, Verweij PE, Hong S-B, Yaguchi T, Varga J, et al. *Aspergillus* species identification in the clinical setting. *Stud Mycol.* 2007;59:39-46.

155. White TJ, Bruns T, Lee S, Taylor W. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*, eds. Innis, M. A., D. H. Gelfand, J. J. Sninsky, and T. J. White. Acad Press Inc N Y N. 1990;315-22.

156. Morton CO, Loeffler J, De Luca A, Frost S, Kenny C, Duval S, et al. Dynamics of extracellular release of *Aspergillus fumigatus* DNA and galactomannan during growth in blood and serum. *J Med Microbiol.* avr 2010;59(Pt 4):408-13.

157. Zhao Y, Stensvold CR, Perlin DS, Arendrup MC. Azole resistance in *Aspergillus fumigatus* from bronchoalveolar lavage fluid samples of patients with chronic diseases. *J Antimicrob Chemother.* 2013;68(7):1497-504.

158. Bafadhel M, Mckenna S, Agbetile J. *Aspergillus fumigatus* during stable state and exacerbations of COPD. *Eur Respir J.* 2014;(43):64-71.

159. Baxter CG, Rautemaa R, Jones AM, Webb AK, Bull M, Mahenthiralingam E, et al. Intravenous antibiotics reduce the presence of *Aspergillus* in adult cystic fibrosis sputum. *Thorax*. 2013;68(7):652-7.
160. Roussel S, Reboux G, Millon L, Parchas M-D, Boudih S, Skana F, et al. Microbiological evaluation of ten French archives and link to occupational symptoms. *Indoor Air*. 2012;22(6):514-22.
161. Vesper S, McKinstry C, Hartmann C, Neace M, Yoder S, Vesper A. Quantifying fungal viability in air and water samples using quantitative PCR after treatment with propidium monoazide (PMA). *J Microbiol Methods*. 2008;72(2):180-4.
162. Fairs A, Agbetile J, Bourne M, Hargadon B, Monteiro WR, Morley JP, et al. Isolation of *Aspergillus fumigatus* from sputum is associated with elevated airborne levels in homes of patients with asthma. *Indoor Air*. 2013;23(4):275-84.
163. Blanc PD, Quinlan PJ, Katz PP, Balmes JR, Trupin L, Cisternas MG, et al. Higher environmental relative moldiness index values measured in homes of adults with asthma, rhinitis, or both conditions. *Environ Res*. 2013;122:98-101.
164. Norbäck D, Markowicz P, Cai G-H, Hashim Z, Ali F, Zheng Y-W, et al. Endotoxin, ergosterol, fungal DNA and allergens in dust from schools in Johor Bahru, Malaysia- associations with asthma and respiratory infections in pupils. *PLoS One*. 2014;9(2):e88303.
165. Hong S-B, Kim D-H, Park I-C, Samson RA, Shin H-D. Isolation and Identification of *Aspergillus* Section *Fumigati* Strains from Arable Soil in Korea. *Mycobiology*. 2010;38(1):1-6.
166. Mortensen KL, Mellado E, Lass-Flörl C, Rodriguez-Tudela JL, Johansen HK, Arendrup MC. Environmental study of azole-resistant *Aspergillus fumigatus* and other aspergilli in Austria, Denmark, and Spain. *Antimicrob Agents Chemother*. 2010;54(11):4545-9.
167. Prigitano A, Venier V, Cogliati M, De Lorenzis G, Esposto MC, Tortorano AM. Azole-resistant *Aspergillus fumigatus* in the environment of northern Italy, May 2011 to June 2012. *Euro Surveill Bull Eur Sur Mal Transm Eur Commun Dis Bull*. 2014;19(12):20747.
168. Hamprecht A, Buchheidt D, Vehreschild JJ, Cornely OA, Spiess B, Plum G, et al. Azole-resistant invasive aspergillosis in a patient with acute myeloid leukaemia in Germany. *Euro Surveill Bull Eur Sur Mal Transm Eur Commun Dis Bull*. 2012;17(36):20262.
169. Mellado E, De La Camara R, Buendía B, Rodriguez-Tudela JL, Cuenca-Estrella M. Breakthrough pulmonary *Aspergillus fumigatus* infection with multiple triazole resistance in a Spanish patient with chronic myeloid leukemia. *Rev Iberoam Micol*. 2013;30(1):64-8.
170. 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;49(6):2243-51.
171. Bart-Delabesse E, Sarfati J, Debeaupuis JP, van Leeuwen W, van Belkum A, Bretagne S, et al. Comparison of restriction fragment length polymorphism, microsatellite length polymorphism, and random amplification of polymorphic DNA analyses for fingerprinting *Aspergillus fumigatus* isolates. *J Clin Microbiol*. 2001;39(7):2683-6.
172. Chong G-LM, van de Sande WWJ, Dingemans GJH, Gaajetaan GR, Vonk AG, Hayette M-P, et al. Direct detection of *Aspergillus* and azole resistance of *Aspergillus fumigatus* on bronchoalveolar lavage fluid. Validation of a new *Aspergillus* real-time PCR. *J Clin Microbiol*. 2015;53(3):868-874.
173. Spiess B, Seifarth W, Merker N, Howard SJ, Reinwald M, Dietz A, et al. Development of novel PCR assays to detect azole resistance-mediating mutations of the *Aspergillus fumigatus* *cyp51A* gene in primary clinical samples from neutropenic patients. *Antimicrob Agents Chemother*. 2012;56(7):3905-10.



DEMANDE D'AUTORISATION DE SOUTENANCE

Nom et Prénom de l'étudiant : DAUCHY épouse DEFORNE CAMILLE

Date, heure et lieu de soutenance :

Le 21/04/15 à 18h15 Amphithéâtre ou salle : Pauling

Avis du conseiller (directeur) de thèse

Nom : FICAU

Prénom : FICAU

Favorable

Défavorable

Motif de l'avis défavorable :

Date : 6 mars 2015

Signature: [Signature]

Avis du Président de Jury

Nom : AZI OVAI

Prénom : EL ROUKHAR

Favorable

Défavorable

Motif de l'avis défavorable :

Date : 17/03/15

Signature: [Signature]

Décision de Monsieur le Doyen

Favorable

Défavorable

Le Doyen
D. CUNY

NB : La faculté n'entend donner aucune approbation ou improbation aux opinions émises dans les thèses, qui doivent être regardées comme propres à leurs auteurs.

Université de Lille 2
FACULTE DES SCIENCES PHARMACEUTIQUES ET BIOLOGIQUES DE LILLE
MEMOIRE de DIPLOME D'ETUDES SPECIALISEES
(tenant lieu de Thèse en vue du Diplôme d'Etat de Docteur en Pharmacie)
Année Universitaire 2014/2015

Nom : DAUCHY épouse DEFURNE

Prénom : Camille

Titre du mémoire / thèse : Caractérisation de la résistance aux azolés d'*Aspergillus fumigatus* chez les patients atteints de BPCO dans la région Nord-Pas de Calais : circulation entre les réservoirs cliniques et environnementaux

Mots-clés : *Aspergillus fumigatus*, exposition environnementale, BPCO, qPCR, résistance aux azolés, gène *cyp51A*, TR34/L98H

Résumé :

Contexte : La BPCO est une pathologie respiratoire chronique qui pourrait devenir la troisième cause de mortalité d'ici 2020. Son évolution est caractérisée par des épisodes d'exacerbation dont l'origine peut être infectieuse, bactérienne et/ou virale mais le rôle des infections fongiques est peu documenté. Les patients BPCO constituent un groupe à risque de colonisation par *Aspergillus fumigatus* et d'API, et l'impact de l'isolement d'*A. fumigatus* dans leurs expectorations n'est pas clairement établi. Ils bénéficient rarement d'un traitement par antifongiques azolés et sont dits « naïfs ». L'émergence de la résistance aux azolés chez *A. fumigatus* ayant été rapportée chez des patients traités par azolés mais aussi chez des patients « naïfs » ainsi que dans l'environnement, elle serait liée à l'utilisation de fongicides azolés en agriculture. Le risque d'apparition d'isolats résistants aux azolés est donc réel chez les patients « naïfs » atteints de BPCO. Le principal mécanisme de résistance implique des mutations et/ou la surexpression du gène cible des azolés *cyp51A*. Notre étude vise, d'une part, à déterminer la prévalence de colonisation par *A. fumigatus* et le niveau d'exposition à *A. fumigatus* dans l'environnement domestique afin d'évaluer le rôle de l'exposition fongique dans la colonisation. D'autre part, nous avons caractérisé les phénomènes de résistance aux azolés dans les isolats cliniques et environnementaux d'*A. fumigatus* dans cette population de patients « naïfs » atteints de BPCO, afin d'étudier la circulation de ces isolats entre les réservoirs cliniques et environnementaux.

Méthode : Les prélèvements respiratoires de patients atteints de BPCO admis au CHRU de Lille pour un épisode d'exacerbation ont été collectés prospectivement entre août 2011 et juillet 2014 pour la recherche de la colonisation par *A. fumigatus* par culture et qPCR. Pour chaque patient, le niveau d'exposition domestique fongique a été mesuré par culture et qPCR (panfongique, *Aspergillus* et *A. fumigatus*) en utilisant un capteur à poussières exposé 10 semaines au domicile du patient. Après confirmation de l'identification phénotypique et moléculaire par séquençage des régions ITS et du gène de la *β -tubuline* des isolats cliniques et environnementaux d'*A. fumigatus*, le séquençage du gène *cyp51A* a été réalisé afin de détecter les mutations associées à une résistance aux azolés. Enfin, la détection directe par qPCR de la mutation TR34/L98H a été mise au point à partir des isolats et testée sur les capteurs à poussières.

Résultats : 41 patients ont été inclus et 36 capteurs à poussières ont été récupérés. La présence d'*A. fumigatus* a été détectée chez 15 patients par culture et/ou qPCR soit une prévalence de colonisation de 38,5%. *A. fumigatus* a été détecté dans 15/36 capteurs par culture (41.7%), correspondant à 5 patients colonisés et 10 patients non colonisés par *A. fumigatus*. Nous n'avons pas pu mettre en évidence de lien entre exposition environnementale (mesurée par culture ou qPCR) et colonisation. L'identification d'*A. fumigatus* a été confirmée pour les 68 isolats cliniques et les 48 isolats environnementaux obtenus, et aucune autre espèce de la section *Fumigati* n'a été isolée. Le séquençage *cyp51A* a permis de détecter 5 profils de mutations : les 5 mutations F46Y, M172V, N248T, D255E, E427K, les 3 mutations F46Y, M172V, E427K, la mutation A284T, la mutation H285Y jamais décrite, et la mutation TR34/L98H détectée dans 2 isolats environnementaux sur 48 (4,2%) chez 2 patients différents, soit une prévalence de la mutation TR34/L98H de 5,6% dans l'environnement domestique de notre population, et de 13,3% en fonction des capteurs positifs à *A. fumigatus*. Il s'agit de la première description d'isolats portant la mutation TR34/L98H dans le Nord-Pas de Calais. Sa présence dans des isolats environnementaux semble confirmer son origine environnementale. L'étude de la circulation entre les réservoirs cliniques et environnementaux a été possible chez 3 patients présentant à la fois des isolats cliniques et environnementaux mais ces isolats étaient tous sensibles aux azolés et l'impact de l'exposition aux isolats résistants n'a pas pu être mis en évidence dans notre étude. Une détection directe de la mutation TR34/L98H par qPCR a pu être validée sur les isolats mais la sensibilité de cette technique (qui cible un gène monocopie) était insuffisante pour une détection directe de cette mutation dans les capteurs à poussières. De meilleures performances pourraient être obtenues par l'ajout d'une étape préliminaire d'amplification, et une évaluation sur des prélèvements plus riches en ADN aspergillaire (tels que biopsies, LBA ou expectorations avec examen microscopique positif) pourrait être envisagée.

Président : Monsieur le Professeur EI Moukhtar ALIOUAT, Professeur des Universités
Asseseurs : Monsieur le Professeur Boualem SENDID, Professeur des Universités-Praticien Hospitalier
Monsieur le Professeur Saad NSEIR, Professeur des Universités-Praticien Hospitalier
Madame le Docteur Stéphanie FRY, Praticien Hospitalier
Directeur de thèse : Madame le Docteur Emilie FREALLE, Praticien Hospitalier