UNIVERSITE DE NANTES

_____

FACULTE DE MEDECINE

_____

Année 2018 N°

THESE

pour le

DIPLÔME D'ÉTAT DE DOCTEUR EN MÉDECINE

SPECIALITE BIOLOGIE MEDICALE

par

Boris FOURNIER
né le 4 juin 1984 à CHALLANS

_____

Présentée et soutenue publiquement le 5 avril 2019

_____

**RÉSISTANCE D' ASPERGILLUS FUMIGATUS AUX AZOLES :
ÉTUDE ÉPIDÉMIOLOGIQUE AU CHU DE NANTES
SUR LA PÉRIODE 2012/2013**

_____

Président : Monsieur le Professeur Didier LEPELLETIER
……
Directeur de thèse : Monsieur le Professeur Patrice LE PAPE
Membres du jury : Madame le Docteur Jocelyne CAILLON
Madame le Docteur Rose Anne LAVERGNE

REMERCIEMENTS

Aux membres du jury

A Mr le Professeur Didier LEPELLETIER
Merci de me faire l'honneur de présider mon jury.

A Mme la Maître de Conférence Jocelyne CAILLON
Merci de consacrer un peu de votre temps précieux à l'évaluation de ce travail.

A Mr le Professeur Patrice LE PAPE
Merci de m'avoir confié ce travail, de m'avoir aidé à mener à terme cet ouvrage. Merci profondément pour votre patience à mon égard, et pour tout le savoir et la passion que vous transmettez au quotidien.

A Mme la Docteur Rose Anne LAVERGNE
Merci infiniment pour ta disponibilité et ta sympathie. Tu as entre autres permis l'aboutissement de ce projet, pour cela je te suis très reconnaissant. Je suis également enchanté d'avoir pu travailler à tes côtés, et d'avoir pu bénéficié de tes compétences.

Je tiens à remercier également mes parents pour m'avoir toujours encouragé et soutenu pendant mes études. Vous êtes des exemples, et vos deux enfants sont fiers de vous.

Merci à mon frère Maxime, pour avoir notamment toujours été là quand il le fallait, je ne te remercierai jamais assez.

Merci à tous mes amis qui mon soutenus de près ou de loin. I'll be back!!!!

Merci au Dr BILLARD et au Dr DEFFUANT ainsi qu'à vos équipes pour votre accueil et la confiance que vous m'avez accordée.

Merci au Dr MIEGEVILLE de m'avoir transmis l'amour de la parasitologie et de m'avoir fait profité de votre expérience. C'était un plaisir de travailler à vos côtés.

Merci au Dr MORIO pour toutes les réponses que tu as apportées à mes questions et pour ta bonne humeur quotidienne.

Merci au Dr JEDDI pour ton calme en toute situation et tout le savoir transmis.

Merci à toutes les techniciennes du service de Parasitologie/Mycologie. Vous êtes adorables.

Merci aux Pr DEMAR, Dr BLANCHET, Dr AZNARD et à votre équipe pour votre accueil et pour l'excellent semestre que j'ai pu passer à vos cotés.

Merci à Chintoh, Joanna et Mme LADET pour leur participation.

Merci à Alessia, tu as le cœur sur la main, ton soutien a été très important.

Enfin Kofane, tu as été la force dont j'avais besoin pour rédiger cet ouvrage. Je ne saurai te remercier assez pour tout le bonheur que tu me procures.

Table des matières

Liste des figures....9
Liste des tableaux....11
Liste des abréviations....12

CHAPITRE I. ASPERGILLUS FUMIGATUS : DONNÉES BIBLIOGRAPHIQUES....15

I - Les champignons du genre *Aspergillus* et *A. fumigatus*....16
1. Historique....16
2. Ecologie et cycle de développement....18
2.1. Ecologie....18
2.2. Cycle de développement et mécanismes d'adaptation....19
2.3. Aspect pathogène d'*A. fumigatus*....23
3. Taxonomie du genre *Aspergillus*....24

II - Les maladies aspergillaires chez l'Homme....28
1. Les aspergilloses invasives....29
2. Les aspergilloses chroniques....32
2.1. Les Aspergilloses pulmonaires chroniques (APC)....32
2.1.1. Aspergillome pulmonaire simple....33
2.1.2. Aspergillose Pulmonaire Chronique Cavitaire....34
2.1.3. Aspergillose Pulmonaire Chronique Fibrosante....34
2.1.4. Nodule aspergillaire....35
2.1.5. Aspergillose pulmonaire semi-invasive (ASI)....35
2.2. La sinusite aspergillaire chronique avec balle fongique....35
3. Les maladies aspergillaires immuno-allergiques....36
3.1. Aspergillose broncho-pulmonaire allergique (ABPA)....36
3.2. Asthme sévère avec sensibilisation fongique (SAFS)....37
4. Traitement des aspergilloses....38
4.1. Les médicaments azolés....38
4.1.1. Structure chimique....38
4.1.2. Mode d'action des médicaments azolés....38
4.1.3. Indications....40

III - Le diagnostic biologique....41
1. Diagnostic....41
1.1. Le prélèvement 41
1.2. L'examen mycologique....41
1.2.1. L'examen direct....41
1.2.2. La culture....41
1.2.3. L'examen microscopique des cultures....42
1.3. Le diagnostic immunologique....42
1.3.1. Les techniques de dépistage....43
1.3.2. Les techniques de confirmation....43
1.4. La détection d'antigènes circulants....44
1.4.1. Antigène soluble spécifique....44
1.4.2. Antigène soluble « panfongique »....46
2. Détection de la résistance au laboratoire....46
2.1. Tests de sensibilité....46
2.1.1. Techniques de référence....47
2.1.2. Techniques commerciales....48

2.1.3. Seuils et ECVs....48
2.2. Détection de la résistance par biologie moléculaire....51
2.2.1. Techniques maison....51
2.2.2. Techniques commerciales....52

IV - Résistance d' *A. fumigatus* aux traitements azolés....53
1. Premiers cas de résistance / Historique....53
2. Épidémiologie de la résistance aux azolés chez *Aspergillus fumigatus*....54
3. Résistance acquise *versus* résistance environnementale....55
4. Mécanismes de résistance chez *Aspergillus fumigatus*....58
4.1. Substitution dans la protéine Cyp51....58
4.2. Répétitions en tandem et substitutions associées sur cyp51A....62
4.3. Pompes à efflux....64
4.3.1. Surexpression de la protéine Cdr1B....65
4.3.2. Surexpression de la protéine AtrF....65
4.4. Autres mécanismes....65
5. Résistance aux azolés parmi d'autres sections du genre d'*Aspergillus*....67
6. Cartographie des résistances....68
7. Paramètres influençant la prévalence de la résistance chez les patients....71
7.1. Variations dans le temps....71
7.2. Variations selon la localisation géographique....72
7.3. Variations selon les manifestations cliniques des populations observées....72
7.4. Variations selon la technique de recherche de résistance....73

CHAPITRE II. MATÉRIELS ET MÉTHODES....75

I - Cadre de l'étude....76
1. Prise en charge des isolats cliniques....76
2. Recueil de données à visée épidémiologique....76

II - Antifongigramme avec la méthode de référence EUCAST....77
1. Préparation des plaques EUCAST....77
1.1. Préparation du milieu....77
1.2. Préparation des solutions stocks de chaque molécule azolée....77
1.3. Préparation de plaques : dépôt de la molécule....77
2. Préparation de l'inoculum....77
3. Inoculation des plaques....78
4. Lecture des résultats....78

III - Identification de l'espèce des souches résistantes et analyse du cyp51A par biologie moléculaire....79
1. Extraction d'ADN fongique....79
1.1. Etape de lyse mécanique....79
1.2. Etape d'extraction....79
2. Amplification d'ADN fongique....80
2.1. Préparation des mix....80
2.2. Amplification de l'ADN par PCR et séquençage....80

CHAPITRE III. RÉSULTATS ET DISCUSSION....81

I - Données démographiques....84
1. Caractéristiques des patients....84

2. Services d'hospitalisation.....85

II - Prélèvements.....87
1. Origine des prélèvements positifs à *Aspergillus Section Fumigati*.....87
2. Nombre d'isolat par patient.....89
3. Origine géographique des patients.....90
4. Incidence de l'isolement des souches dans le temps.....91

III - Sensibilité des isolats aux azolés.....93
1. Antériorité de traitement aux azolés.....93
2. Résultats de la sensibilité *in vitro* des isolats à l'itraconazole et au tébuconazole.....93

IV - Souches résistantes à l'itraconazole.....98

CHAPITRE IV. CONCLUSION ET PERSPECTIVES.....104

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....107

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Planche de dessin issue de « *Nova plantarum genera juxta Tournefortii methodum disposita* » de Micheli....15
Figure 2: Les processus de reproduction chez Aspergillus fumigatus....19
Figure 3 : Neosartorya fumigata....20
Figure 4: Stratégies permettant l'adaptation aux molécules azolées....21
Figure 5 : Cycles saprophytes et pathogènes de A. fumigatus....22
Figure 7 : Classification d'*A. fumigatus* dans le règne fongique....24
Figure 8 : Interaction d'*Aspergillus* avec son hôte....26
Figure 9 : Schéma illustrant les différentes formes d'aspergillose pulmonaire chronique, en particulier les chevauchements qui sont souvent observés....30
Figure 10: Médicaments triazolés à usage systémique....36
Figure 11 : Schéma de la voie de biosynthèse de l'ergostérol fongique....38
Figure 12 : Distribution des CMI selon le CLSI de 363 isolats cliniques d'*A. fumigatus*....48
Figure 13 : Test Eucast E.def 10.1 de screening de la résistance aux azolés pour *Aspergillus fumigatus*....48
Figure 14 : Fréquence des *A. fumigatus* résistants aux azolés parmi les patients du Centre Mycologique de Référence de Manchester entre 1997 et 2009....51
Figure 15: Exemples d'inhibiteurs de déméthylase non médicamenteux....52
Figure 16 : Représentation schématique de la région promotrice du gène cyp51A..55
Figure 17 : Cartographie des mutations retrouvées dans le gène cyp51A d'*A. fumigatus* sur un modèle par homologie de Cyp51A....56
Figure 18 : Alignement des séquences TR34, TR46.1, TR46.2 et TR53....59
Figure 19 : Site de mutation de Hmg1....62
Figure 20 : Distribution mondiale de la résistance aux azolés par mécanisme chez *Aspergillus fumigatus*....63
Figure 21 : Evolution du nombre de patients porteurs de souches d'*A. fumigatus* résistantes aux azolés au sein de l'hôpital de Nijmegen de 1994 à 2016....65
Figure 22 : Répartition des isolats (n=336) en fonction du service d'origine du prélèvement....78
Figure 23 : Répartition des isolats inclus dans l'étude en fonction du type de prélèvements (n=336)....80
Figure 24 : Répartition des isolats d'origine respiratoire (n=336) parmi l'ensemble des prélèvements reçus au laboratoire de mycologie sur la période de l'étude (n=2545)....81
Figure 25 : Répartition du nombre d'isolats inclus par patient....82
Figure 26 : Répartition géographique, selon l'adresse du patient, des souches d'*Aspergillus Section Fumigati* isolées (n=336)....83
Figure 27 : Répartition dans le temps des isolats inclus dans l'étude (n=336)....84
Figure 28 : Répartition des CMI à l'itraconazole en mg/L pour les 336 isolats lors du screening....86
Figure 29 : Distribution des CMI à l'itraconazole de 361 isolats cliniques *d'A. fumigatus* sauvages selon le protocole de l'Eucast....87

Figure 30 : Répartition des CMI au tébuconazole en mg/L pour les 336 isolats lors du screening.....88
Figure 31 : Activité in vitro du tébuconazole contre 15 souches d'*A. fumigatus* sensibles à l'itraconazole et 15 souches résistantes 88
Figure 32 : Géolocalisation de l'habitat d'un patient porteur d'une souche TR_{34}/L98H en zone rurale.....91
Figure 33 : Géolocalisation des habitations de patients porteurs d'une souche TR_{34}/L98H dans l'agglomération nantaise.....91

LISTE DES TABLEAUX

Tableau I : Classification phylogénique d'Aspergillus fumigatus.....23

Tableau II : Patient non hématologique à haut risque d'aspergillose invasive.....28

Tableau III : Critères d'une probable infection fongique invasive, exceptées les mycoses endémiques 29

Tableau IV : Critères diagnostics pour la prise en charge de l'aspergillose pulmonaire chronique 31

Tableau V : Critères diagnostiques pour l'aspergillose bronchopulmonaire allergique chez des patients porteurs d'asthme ou de mucoviscidose.....35

Tableau VI : Table des seuils critiques cliniques de CMI d'Aspergillus fumigatus selon le protocole de l'EUCAST.....47

Tableau VII : Caractéristiques des résistances acquises par le patient et des résistances environnementales chez A. fumigatus.....54

Tableau VIII : Etudes portant sur la recherche de résistance aux azolés sur des souches environnementales d'Aspergillus fumigatus 64

Tableau IX : Amorces utilisées pour le séquençage.....73

Tableau X : Caractéristiques des 248 patients chez qui ont été isolées 336 souches d'Aspergillus Section Fumigati.....77

Tableau XI : Récapitulatif des souches confirmées résistantes lors du deuxième Eucast.....93

LISTE DES ABRÉVIATIONS

ABC : *ATP Binding Cassette*
ABPA : Aspergillose Broncho-Pulmonaire Allergique
Ac : Anticorps
AI : Aspergillose Invasive
APC : Aspergillose Pulmonaire Chronique
APCC : Aspergillose Pulmonaire Chronique Cavitaire
APCF : Aspergillose Pulmonaire Chronique Fibrosante
API : Aspergillose Pulmonaire Invasive
ASI : Aspergillose Semi-Invasive
ATF : Antifongique
BPCO : Broncho-Pneumopathie Chronique Obstructive
CBC : *CCAAT Binding Complex*
CHU : Centre Hospitalier Universitaire
CLSI : *Clinical Laboratory Standard Institute*
CME : Concentration Minimale Effective
CMI : Concentration Minimale Inhibitrice
DMI : Inhibiteur de déméthylase
ECOFF : *Epidemiological Cut OFF value*, seuils épidémiologiques
ECV : *Epidemiological Cutoff Value,* synonyme de ECOFF
EIA : *Enzyme ImmunoAssay* (méthode immunoenzymatique)
ELISA : *Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*
EORTC/MSG : *European Organization for Research and Treatment of Cancer/Mycosis Study Group*
ESCMID *: European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*
EUCAST : *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing*
IgA, IgE, IgG, IgM : Immunoglobuline d'isotype ou classe A, E, G, M
LAMP : *Loop-Mediated Isothermal Amplification*
LBA : Lavage Broncho-Alvéolaire
LCR : Liquide Céphalo-Rachidien
MAT : *Mating Type* (type sexuel)
MFS : *Major Facilitator Superfamily*
MOPS : 3-(N-morpholino) propanesulfonic acid
pb : Paires de Bases
PCR : amplification en Chaîne par Polymérase
RPMI : *Roswell Park Memorial Institute medium*
SREBP *: Sterol Regulatory Element Binding Protein*
SRE : *Sterol Regulatory Element*
TR : Répétition en Tandem
UFC : Unité Formant Colonie
VIH : Virus de l'Immunodéficience Humaine

INTRODUCTION

Aspergillus fumigatus est un organisme fongique ubiquitaire dans l'environnement et opportuniste chez certains patients atteints de maladies graves. Depuis le début du XXI^{ème} siècle, des résistances aux azolés, principale classe de traitement utilisée dans le traitement des aspergilloses, émergent à travers le monde, menaçant l'efficacité thérapeutique du traitement et ainsi parfois la survie du patient.

Ces résistances ont actuellement deux origines acceptées par la communauté scientifique, le traitement au long cours d'une pathologie aspergillaire chronique et l'utilisation importante de fongicides dans certains secteurs d'activité comme l'agriculture.

De nombreuses études existent sur des cohortes ciblées notamment de patients atteints de mucoviscidose, mais peu concernent le tout venant entraînant peut-être un biais dans l'importance de la résistance d'*A. fumigatus* aux azolés. Ainsi, alors que le taux de résistance semble ne faire qu'augmenter chez nos voisins européens, l'objectif de cette étude rétrospective puis prospective à visée épidémiologique est d'établir la prévalence de la résistance d'A. *fumigatus* aux azolés parmi les patients du CHU de Nantes sur la période s'étalant de juin 2012 à mai 2013, en testant à l'aide de la technique de référence EUCAST la sensibilité à l'itraconazole et au tébuconazole. Secondairement, les types de résistance retrouvée seront étudiés pour établir un état de la résistance dans la population du CHU de Nantes.

CHAPITRE I.

ASPERGILLUS FUMIGATUS :

DONNÉES BIBLIOGRAPHIQUES

I - Les champignons du genre *Aspergillus* et *A. fumigatus*

1. Historique

Dans les années 1720, Pier Antonio Micheli, botaniste italien considéré comme le fondateur de la mycologie scientifique, donne le nom d'*Aspergillus* aux moisissures qu'il étudie au microscope optique (Figure 1). L'idée lui vient de la ressemblance avec l'aspect du goupillon, « aspergillum » en latin, instrument utilisé dans les églises pour asperger l'auditoire d'eau bénite.

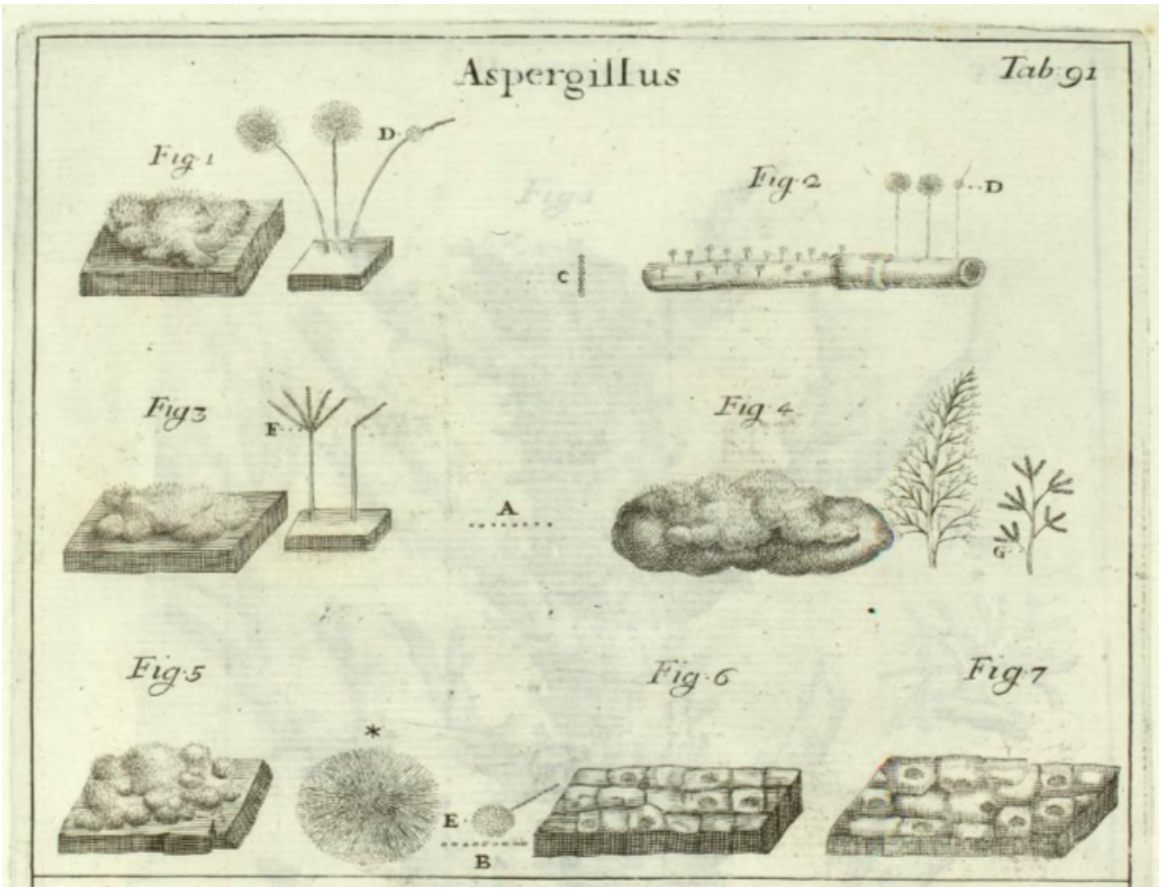


Figure 1 : Planche de dessin issue de « Nova plantarum genera juxta Tournefortii methodum disposita » de Micheli. 1729

Le premier cas d'infection attribuée à *Aspergillus* date de 1789 : une boule fongique est retirée du sinus maxillaire d'un soldat français de 22 ans, mais plusieurs récurrences sont observées suite à l'exérèse chirurgicale (Plaignaud, 1791).

La première aspergillose pulmonaire est décrite en 1842 par Bennett. Ce médecin observe fréquemment dans les crachats de certains patients tuberculeux des filaments transparents en forme de bambou. Ses suspicions de développement fongique intrapulmonaire sont confirmées lors d'une autopsie où il observe de

multiples nodules intracavitaires (Bennett, 1842).

Ce n'est qu'en 1863 que le nom d'espèce *fumigatus* apparaît. A partir du verbe latin « fumigare » qui signifie «faire de la fumée », le médecin Fresenius se réfère au nuage de spores produit par le champignon.

La première moitié du XX^{ème} siècle est principalement marquée par la description des différentes affections et le début de l'utilisation de traitements médicamenteux que sont l'iodure de potassium et les sulphonamides ainsi que la radiothérapie.

En 1939, le bactériologiste américain Arthur Trautman Henrici remarque qu'*A. fumigatus* produit des toxines hémolytiques et pyrogéniques, découverte importante permettant la compréhension de diverses affections comme la *Turkey X disease* dans les années 1960.

En parallèle, la recherche de la forme sexuée et l'affinement de la taxonomie d'*A. fumigatus* s'étalent sur tout le XX^{ème} siècle. Ainsi, en 1927 est introduit le nom de genre *Sartorya* par Vuillemin en référence au pharmacien français Auguste Sartory spécialiste de la cryptogamie. Ce dernier observe ce qu'il pense être la forme sexuée d'*A. fumigatus* en irradiant ces souches avec du radon. Considéré quarante ans plus tard par Rapper et Fennell puis Malloch et Cain comme étant une contamination de l'expérience de Sartory, le genre *Sartorya* disparaît en 1972 pour laisser place au genre *Neosartorya* (Malloch et Cain, 1972). Ce dernier comprend alors la forme sexuée observée pour 7 espèces dont *N. fischeri*. Mais ce n'est qu'en 2009 que la forme téléomorphe d'*A. fumigatus* est identifiée et se nomme *Neosartorya fumigata (O*'Gorman et al., 2009). Cet exemple parmi tant d'autres illustre la difficulté durant tout le vingtième siècle de classer les différentes espèces holomorphiques comme celles du genre *Aspergillus*, difficulté relevée grâce à l'approche biochimique puis génétique.

Concernant la thérapeutique, Woolley est le premier à observer dès 1944 l'effet antifongique d'une molécule azolée (Woolley, 1944). En 1950 est découverte la première molécule antifongique active sur *A. fumigatus* : la fungicidin ou nystatine (Hazen et Brown, 1951). Produite par la bactérie *Streptomyces noursei*, elle appartient à la grande famille des polyènes et sera utilisée lors d'infections fongiques superficielles. En 1953, la découverte de l'amphotéricine B (Dutcher, 1968), molécule issue de la même famille, va radicalement transformer la prise en charge des infections fongiques systémiques et profondes, et notamment des aspergilloses . Produite par *Streptomyces nodosus*, et dotée d'un large spectre d'activité, elle sera utilisée sous sa forme désoxycholate dès 1959.

Le premier triazolé efficace contre *A. fumigatus* est une révolution dans le monde médical. En effet, l'itraconazole, synthétisé en 1980 et mis sur le marché en 1986, possède une action systémique avec des effets secondaires moindre que l'amphotéricine B (« Janssen Pharmaceutica », 2018). Les triazolés deviennent alors jusqu'à aujourd'hui la principale classe thérapeutique pour lutter contre les aspergilloses. Suivent la synthèse du voriconazole brevetée en 1990 et mis sur le marché en 2002, du posaconazole (2005) et plus récemment de l'isavuconazole (2015).

Les trois dernières décades du XXème siècle sont en partie marquées par une importante croissance des incidences des aspergilloses invasives expliquée par l'augmentation du nombre de patients présentant une immunodépression (Denning, 1998).

Les premiers cas cliniques d'infection à *A. fumigatus* due à une souche résistante (ou considérée comme résistante car les seuils cliniques de sensibilité ou *breakpoints* n'étaient pas encore établis) ont été mis en évidence chez deux patients provenant de Californie aux Etats Unis , dans la fin des années 1980 (Denning et al., 1997). Le nombre de cas d'échecs thérapeutiques n'a cessé d'augmenter depuis, et ceci plus particulièrement vis à vis de la classe des azolés.

2. Ecologie et cycle de développement

2.1. Ecologie

Les champignons du genre *Aspergillus* vivent en saprobiose sur ou dans une grande variété de substrats solides tels que le sol, le compost, sur des débris organiques animaux ou végétaux. Ils jouent un rôle majeur dans le recyclage environnemental du carbone et de l'azote organique (Church, 1918 ; Haines, 1995). Ils vivent aussi de manière endophytique où leur rôle exact est encore à préciser sur de nombreux végétaux .

A. fumigatus est de plus retrouvé dans des milieux humides tels que l'eau douce, l'eau de mer, les terrains marécageux, les eaux des égoûts ou encore des systèmes de distribution des eaux comme celui d'un hôpital (Anaissie et al., 2003). Ayant la capacité de produire de nombreux métabolites secondaires qui répondent à ses exigences de survie, il est retrouvé de manière cosmopolite et ubiquiste, aussi bien dans le monde rural que urbain, extérieur que intérieur (Kwon-Chung et al., 2013).

Non pathogène pour les végétaux, *A. fumigatus* est doué de parasitisme chez les animaux non vertébrés ou vertébrés. Chez ces derniers, le micromycète infecte son

hôte via les conidies, principalement par voie aérienne. Il entraîne des aspergilloses chez les oiseaux et est retrouvé en tant que parasite facultatif (opportunisme) chez des mammifères comme l'être humain, le chien, le cochon d'Inde (Church, 1918).

A. fumigatus est une espèce thermotolérante. Son mycélium se développe durant le stade végétatif sur une large plage de température entre 10 et 55°C avec un optimum autour de 37°C (Ayerst, 1969), (Krijgsheld et al., 2013), mais ses spores, comme tous ceux du genre *Neosartorya*, peuvent survivre à des températures avoisinant 70°C. Cette caractéristique lui permet par exemple de ne pas disparaître contrairement à la plupart des êtres vivants, durant la phase thermophile du compostage et de devenir le champignon dominant du compost (Haines, 1995).

Le développement d'*A. fumigatus* nécessite un environnement humide avec une activité de l'eau supérieure à 0.82, un optimum à 0,97 et un pH du milieu compris entre 3 et 8 (Magan et al., 1984 ; Krijgsheld et al., 2013).

Les conidies de ce micromycète sont aéroportées. Elles sont retrouvées dans les échantillons d'air et de sol, faisant partie des plus nombreuses du groupe des eucaryotes (Pringle et al., 2005). Elles sont retrouvées sur presque toute la surface terrestre de basse altitude ainsi que dans l'air (Nolard, 1994 ; Mullins et al., 1976 ; Santucci et al., 2007). *A. fumigatus* est ainsi plus omniprésent que les autres *Aspergilli* dans la nature en raison de sa capacité supérieure à survivre et à croître dans une plus large gamme de conditions environnementales par rapport aux autres espèces. Le caractère hautement aérosolisé et dispersif d'*A. fumigatus* a conduit à l'hypothèse qu'il s'agit d'un organisme véritablement «globalisé». De plus l'identification du cycle sexuel laisse à penser que cette espèce est panmictique (O'Gorman et al., 2009), c'est-à dire que la population est globalement homogène et qu'elle se reproduit aléatoirement. Si cela est vrai, cela implique que les allèles de résistance aux azoles qui possèdent un avantage sélectif dans la nature auraient un potentiel possiblement illimité pour se disperser dans l'espace.

2.2. Cycle de développement et mécanismes d'adaptation

A. fumigatus est une moisissure qui en tant que telle, présente un état végétatif pendant lequel le champignon développe dans le milieu un réseau de filaments hyalins de 2 à 3 µm de diamètre nommés hyphes qui constituent le mycélium. Ces filaments produisent des enzymes permettant la digestion de la matière organique environnante afin de pouvoir absorber les aliments par osmotrophie. Puis, en fonction des conditions environnementales, A. fumigatus peut développer trois processus de reproduction (Figure 2) : sexué, asexué et parasexué (Verweij et al., 2016).

Si les conditions environnementales le permettent, *A. fumigatus* développe une reproduction sexuée : cet évènement a lieu au sein d'un cycle facultatif. Il requiert du fait de son caractère hétérothallique la présence de 2 souches de types sexuels opposés (MAT1-1 et MAT1-2). Ce processus, observé pour plus d'un tiers des espèces aspergillaires, n'a été observé que en condition de laboratoire pour *A. fumigatus* (Figure 3), (O'Gorman et al., 2009 ; Losada et al. 2015 ; Verweij et al., 2016). Ce mode de reproduction pourrait être à l'origine de la survenue de résistances retrouvées dans l'environnement car la progéniture sexuelle présenterait une plus grande variation génétique par rapport aux populations asexuées (Zhang et al. 2017).

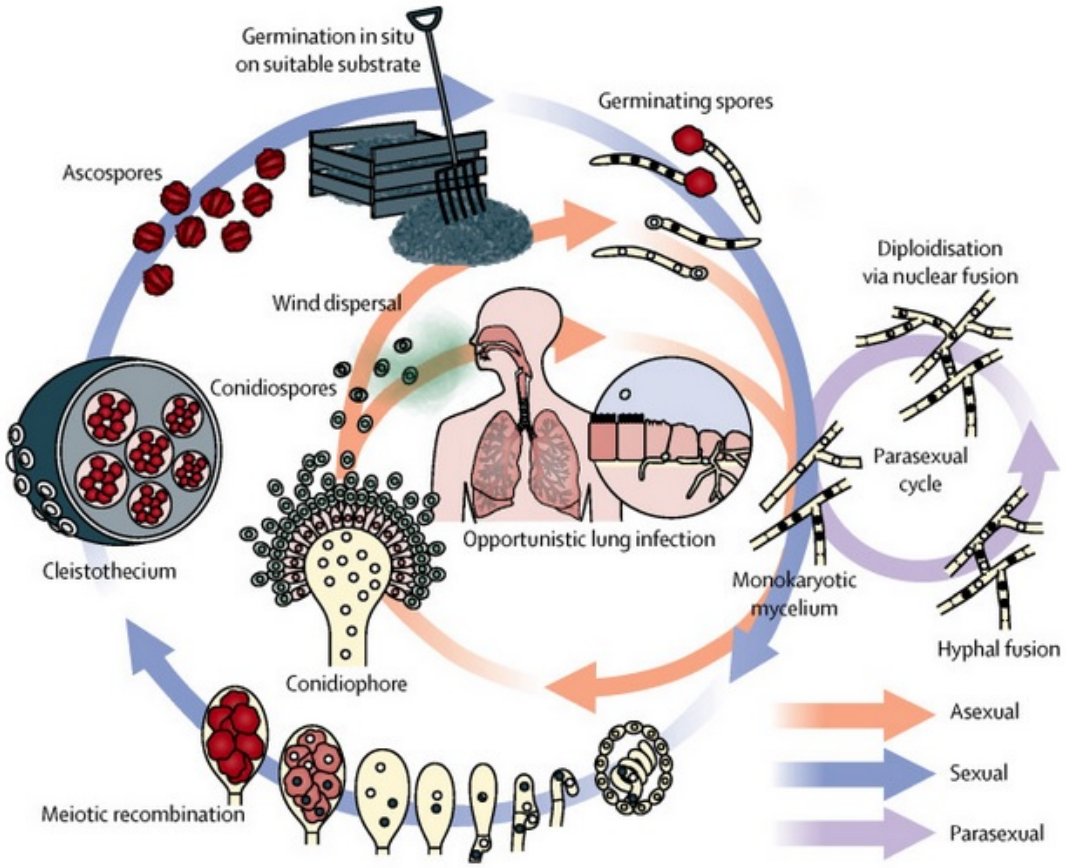


Figure 2: Les processus de reproduction chez Aspergillus fumigatus, d'après Verweij et al. 2016

Le mode de reproduction principal d'*A. fumigatus* est la reproduction asexuée (Figure 2), s'effectuant soit au cours d'un cycle saprophyte, soit au cours d'un cycle parasitique en fonction du lieu de développement du mycélium. Si les ressources viennent à manquer, le stade de fructification débute, stade durant lequel la moisissure produit des filaments aériens plus larges (6-7 µm) nommés conidiophores

(Haines, 1995). La formation des conidies est de type blastique phialidique : les filaments conidiophores présentent à leur extrémité terminale un renflement de 10 à 30 µm de diamètre nommé vésicule. Celle-ci donne naissance directement à une couche de phialides qui produisent des chaînes de conidies uni-nuclées prêtes à être disséminées pour reproduire une colonie. Chaque conidiophore peut produire plus de 10000 conidies. Les conidies libérées sont facilement dispersées dans l'environnement. Entre sa genèse sur le conidiophore et son arrivée sur un milieu solide propice au développement, la conidie reste en dormance. Quand les conditions environnementales deviennent favorables, la conidie active son métabolisme : elle gonfle puis germe en produisant un premier filament ce qui signe le départ d'une nouvelle colonie (Krijgsheld et al., 2013).

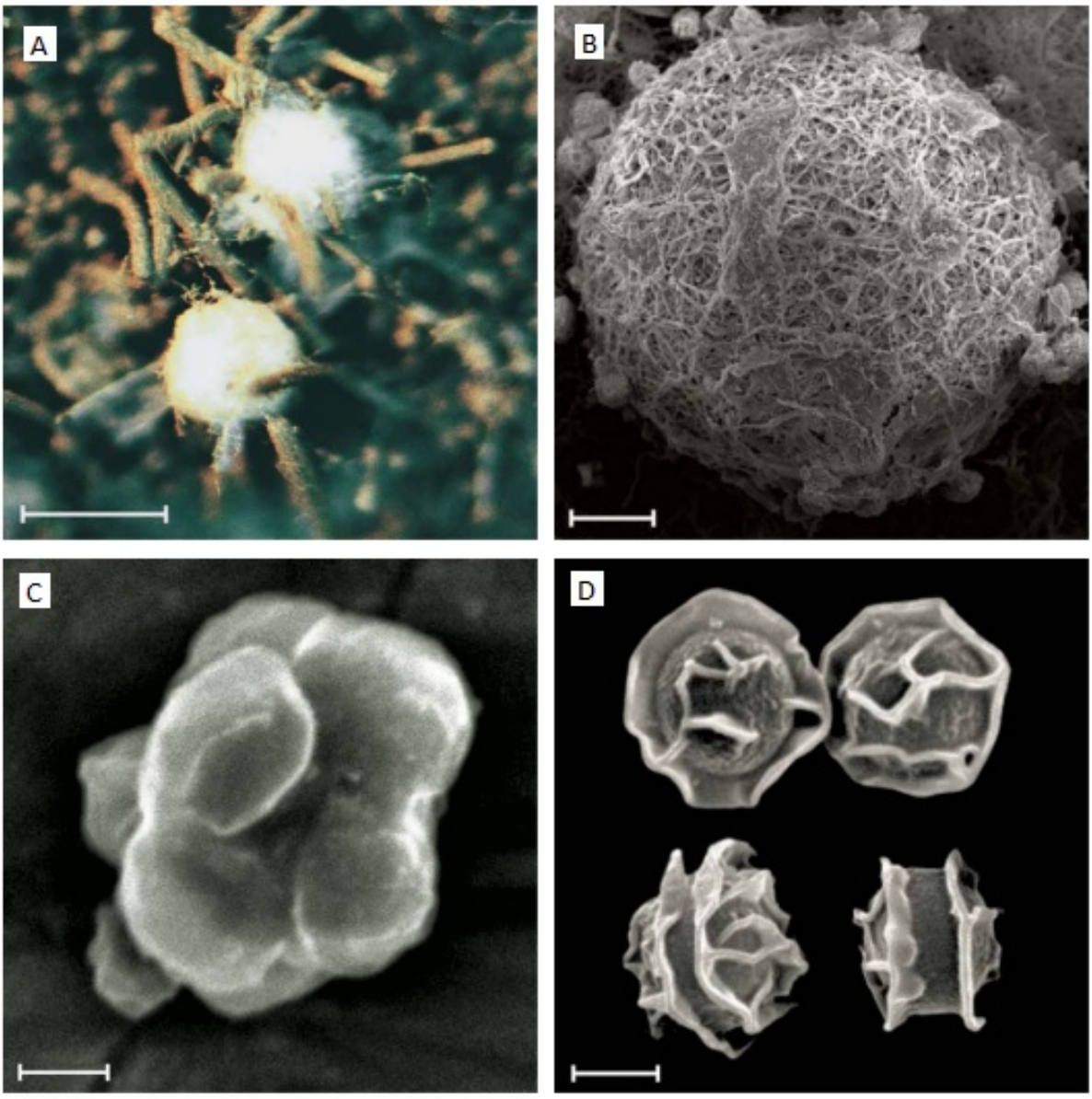


Figure 3 : Neosartorya fumigata, (d'après O'Gorman 2009).
A, Cleistothèces parmi des chaînes de conidies ; B, cleistothèces en microscopie électronique ; C, D, microscopie électronique montrant une asque contenant 8 ascospores (C) et 4 ascospores libres (D).

Un dernier processus de développement est la reproduction parasexuée qui consiste d'avantage en une stratégie fongique pour générer une diversité génétique qu'un mode de reproduction (Verweij et al., 2016).

La conséquence de ces aspects du cycle de vie est une augmentation de la diversité génétique due à des mutations spontanées et au remaniement des génotypes (Figure 4), ce qui augmente la probabilité que la progéniture comprenne des phénotypes mieux adaptés à un nouvel environnement. Il n'est pas connu que les azoles soient mutagènes ou recombinogènes en soi, mais l'exposition d'*A. fumigatus* provoque sans nul doute une forte pression de sélection pour la résistance aux azoles (Verweij, et al. 2016).

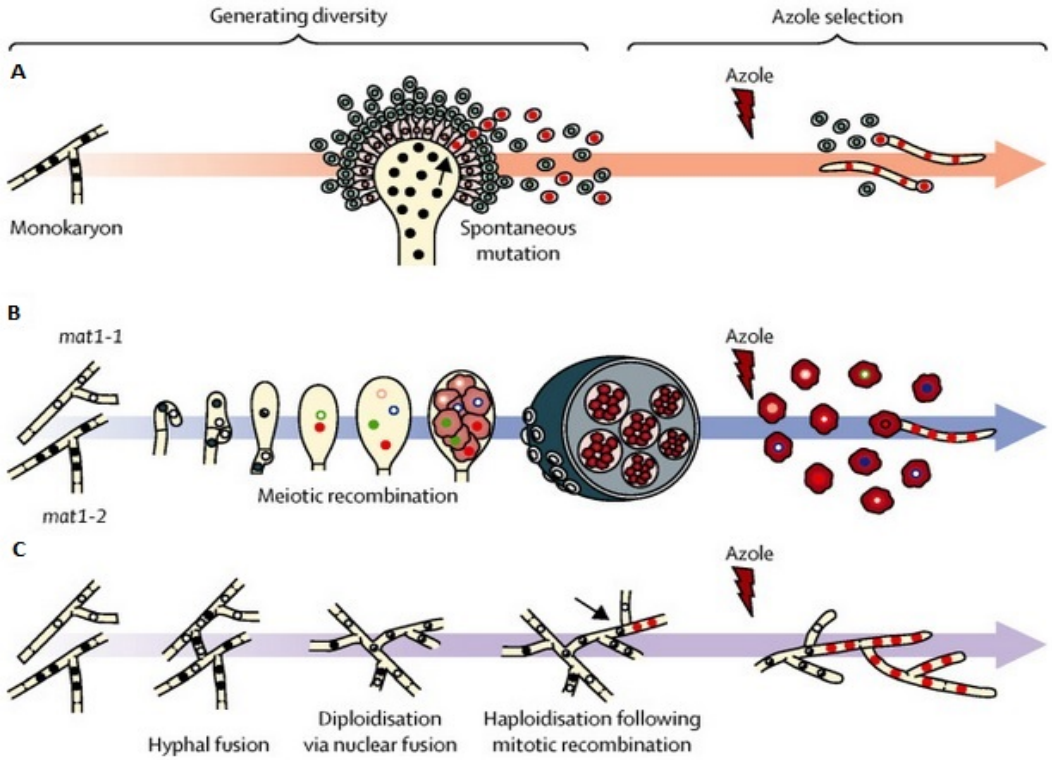


Figure 4: Stratégies permettant l'adaptation aux molécules azolées, d'après Verweij et al. 2016

A, Reproduction asexuée : mutations spontanées avec la mitose lors de la production de nombreux conidiospores ; B, Reproduction sexuée : importante variété génétique grâce à la recombinaison méïotique ; C, Cycle parasexué : recombinaison mitotique

2.3. Aspect pathogène d'*A. fumigatus*

A. fumigatus est l'espèce de micromycète filamenteux la plus fréquemment retrouvée chez l'être humain. La principale voie de contamination, quasi-exclusive, de l'Homme

par ce micromycète. est la voie aérogène par inhalation des spores dans les cavités dans lesquelles le champignon se développe Figure 5 . L'être humain inhalerait quotidiennement des centaines de conidies (Latgé, 1999), conidies qui ont un diamètre suffisamment petit (2 à 3 µm) pour atteindre les alvéoles pulmonaires (Raper et al., 1965).

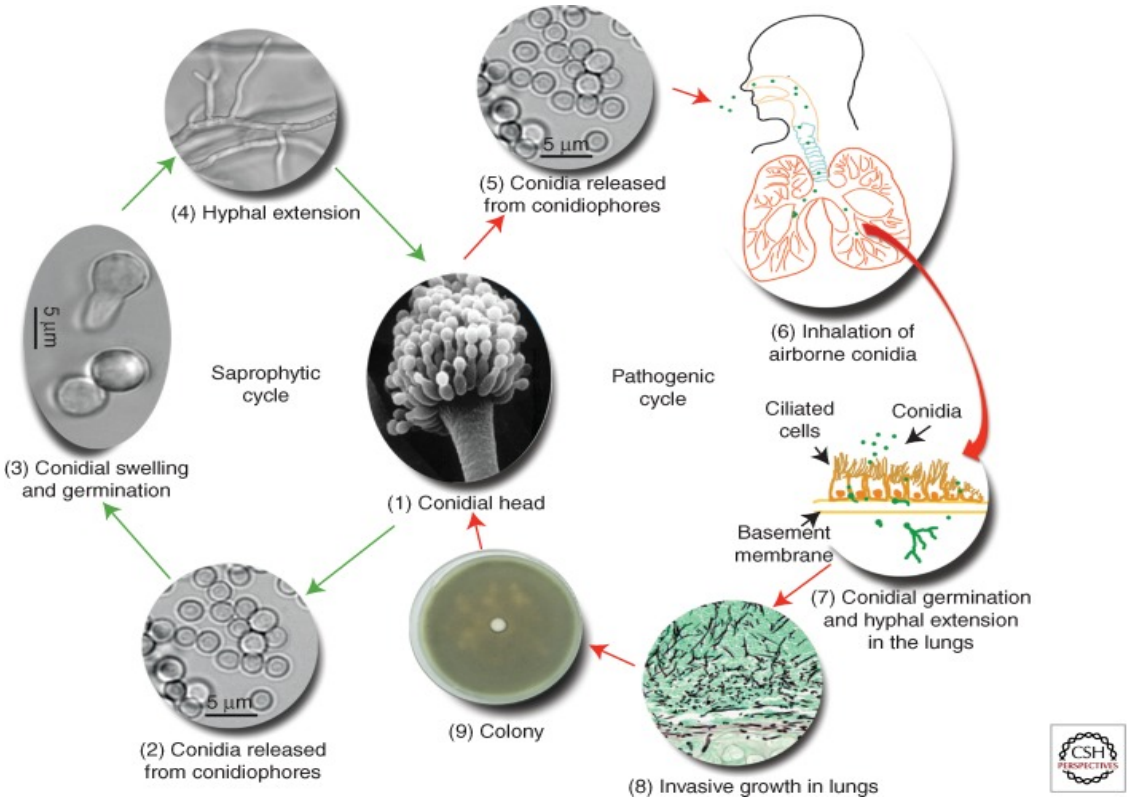


Figure 5 : Cycles saprophytes et pathogènes de A. fumigatus d'après Sugui 2015

Cycle saprophyte : (1) Tête conidiale portant des conidies. (2) Les conidies matures sont très hydrophobes et facilement dispersées. (3) A la germination, les conidies se gonflent et germent en filaments. (4) L'extension des filaments hyphaux forme un filet entrelacé appelé mycélium. Cycle pathogène : (5) et (6) Les conidies aéroportées sont constamment inhalées par l'homme. (7) Chez les patients gravement immunodéprimés, les conidies peuvent échapper aux défenses de l'hôte et croître de façon invasive. (8) Croissance extensive des hyphes dans les poumons d'un patient immunodéprimé. (9) Croissance des colonies.

3. Taxonomie du genre *Aspergillus*

La classification d'*A. fumigatus* est définie par des critères morphologiques et biochimiques qui ont été affinés durant ces dernières décennies par l'étude phylogénétique (Whittaker, 1969 ; Hibbett et al., 2007) . Une des classifications proposées est présentée dans le Tableau I illustrée par la Figure 7 .

Tableau I : Classification phylogénique d'Aspergillus fumigatus

Rang	Caractéristique propre
Domaine **:** **Eukaryota**	Organisme uni ou multicellulaire possédant un noyau contenant de l'ADN en chromosomes linéaires, un cytosquelette et des endomembranes développées avec flux membranaire, présence d'endosymbioses
Sous-domaine **:** **Unikonta**	Organisme possédant ancestralement un seul flagelle à leur cellule mobile
Super-Règne **:** **Opisthokonta**	Organisme possédant ancestralement un flagelle unique et postérieur, des mitochondries à crêtes aplaties, de la chitine, ayant perdu la capacité de biosynthèse de la lysine, et utilisant le glycogène comme forme de réserve
Règne **:** **Fungi**	Autrement nommé Eumyceta, organisme osmotrophe présentant une forme filamenteuse coenocytique et une paroi chitino-callosique. Réinvention de la biosynthèse de la lysine par la voie biochimique de l'alpha-amino-adipate. Membrane cellulaire composée d'ergostérol
Sous-Règne **:** **Dikarya**	Autrement nommé Septomycète, organisme unicellulaire ou filamenteux, avec une fécondation dissociée en deux étapes plasmogamie puis caryogamie, présentant des hyphes septées dépourvus de flagelles, pouvant présenter un état dicaryote
Division **:** **Ascomycota**	Communément appelé Ascomycète, ce phylum comprend des organismes produisant des spores dits ascospores élaborés de manières intracellulaire, à l'intérieur de sacs nommés asques
Sous-Division **:** **Pezizomycotina**	Anciennement nommé *Euascomycetes*, organisme filamenteux dont le mycélium est composé d'hyphes septées communiquant par des pores simples dont la régulation s'effectue à l'aide de corps de Voronine
Classe **:** **Eurotiomycetes**	Organisme présentant des organes de fructifications ou ascocarpes de type cleistothèce ou de type gymnothèce
Sous Classe **:** **Eurotiomycetidae**	Organisme dont l'ascocarpe ne présente pas de paraphyse
Ordre **:** **Eurotiales**	Organisme non kératinophile dont la reproduction asexuée produit des conidies à partir de phialides
Famille **:** **Aspergillaceae**	Organisme produisant des asques à l'intérieur de cleistothèce ou entourées par des cellules de Hülle
Genre anamorphique **:** ***Aspergillus***	Organisme présentant un conidiophore vésiculeux ressemblant à un aspergillum
Genre téléomorphique **:** ***Neosartorya***	Organisme thermophile, cleistothèce avec pseudo-parenchyme blanc, ascospore hyalin thermorésistant
Sous-genre anamorphique (ou Section) **:** **Fumigati**	Têtes conidiales colonnaires, phialides unisériées, conidies bleu-vert à vert pâles de 2,5 à 3,5µm
Espèce anamorphique : ***fumigatus***	Détermination génétique
Espèce télomorphique : ***fumigata***	

La classification générique et infra-générique d'*A. fumigatus* a été modifiée ces dernières années du fait notamment de la découverte de la forme sexuée (O'Gorman

et al., 2009). Ainsi malgré les recommandations du Code International de la Nomenclature pour les algues, les champignons et les plantes (ICN) adopté au Congrès International de Botanique de Melbourne en 2011 pour l'utilisation du nom sexué comme seule et unique dénomination d'une espèce, la Commission Internationale des *Pénicillium* et *Aspergillus* (ICPA) statue en 2012 pour exceptionnellement conserver le genre asexué (ici *Aspergillus*) et associer au nom binomial le genre sexué (ici *Neosartorya*). Cette décision, établie dans le but d'une perte minime d'information et d'une stabilité de la classification pour tous les acteurs, s'appuie sur la monophylie avérée du genre *Aspergillus* (Samson et al., 2014), (Houbraken et al., 2014).

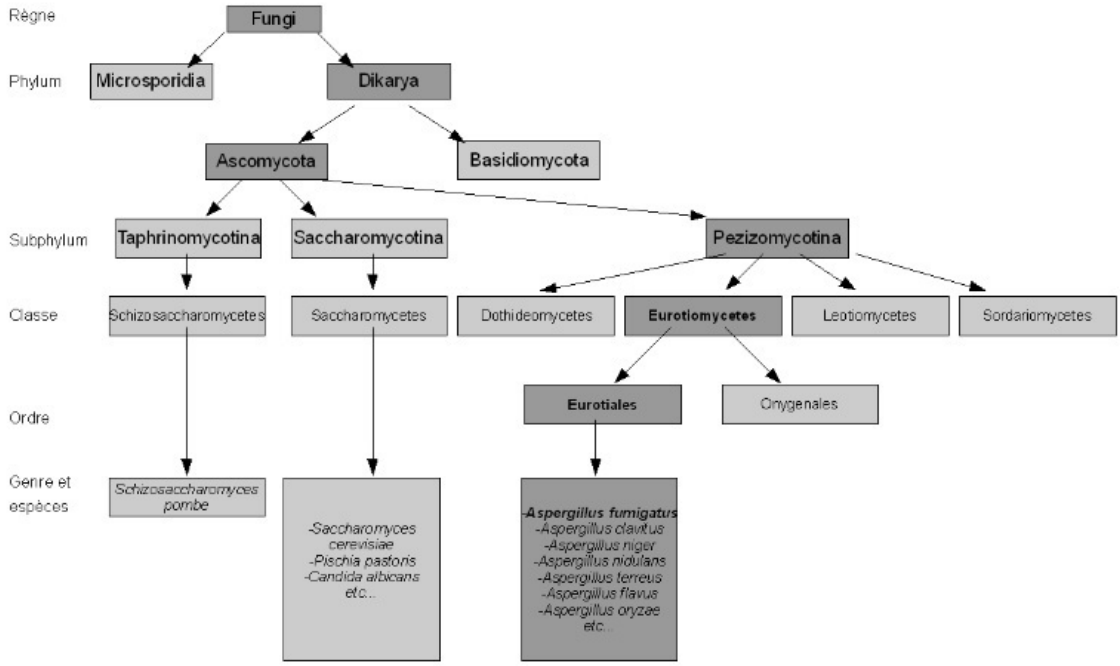


Figure 7 : Classification d'A. fumigatus dans le règne fongique, d'après Lecointe, 2015 modifié à partir de Tefsen et al., 2012

Plus de 300 espèces sont répertoriées dans le genre *Aspergillus* et plus de 40 dans le genre *Neosartorya* (Samson et al., 2014). Les espèces contenues dans le genre sexué correspondent à celles de la section *Fumigati*. Cette section regroupe des espèces dites cryptiques car morphologiquement similaires à une espèce majeure, dont certaines présentent un intérêt médical particulier. Ainsi en plus d'*A. fumigatus*, 12 espèces cryptiques de la section *Fumigati* sont connues comme agents étiologiques de l'aspergillose invasive (AI) : *Aspergillus udagawae* (*Neosartorya udagawae*), *Aspergillus pseudofischeri* (*Neosartorya pseudofischeri*), *Aspergillus lentulus, Aspergillus felis, Aspergillus hiratsukae* (*Neosartorya hiratsukae*), *Aspergillus fischeranus* (*Neosartorya fischeri*), *Aspergillus viridinutans, Aspergillus pseudoviridinutans, Aspergillus fumisynnematus, Aspergillus fumigatiaffinis,*

Aspergillus novofumigatus et *Aspergillus laciniosa* (*Neosartorya laciniosa*) (Sugui et al., 2015 ; Seyedmousavi et al., 2018). De plus, ces espèces cryptiques décrites de manière générale dans 0 à 15% des aspergilloses ont des profils de sensibilité aux ATF différents et de manière sauvage, sont souvent résistantes au moins à l'une des trois classes d'ATF couramment utilisées (Alanio et al., 2011 ; V. D. Linden et al., 2011 ; Howard, 2014 ; Vidal-Acuña et al., 2018 ; Pinto et al., 2018).

II - Les maladies aspergillaires chez l'Homme

A. fumigatus est un organisme saprophyte et un pathogène opportuniste. La maladie aspergillaire dépend donc de l'immunité locale ou générale de l'hôte. Ainsi un défaut qualitatif (ex : granulomatose chronique) ou quantitatif de l'immunité (ex : leucémie aiguë, cavité pulmonaire), ou une réponse disproportionnée de cette immunité (ex : ABPA) sont des terrains indispensables au développement des maladies aspergillaires (Figure 8).

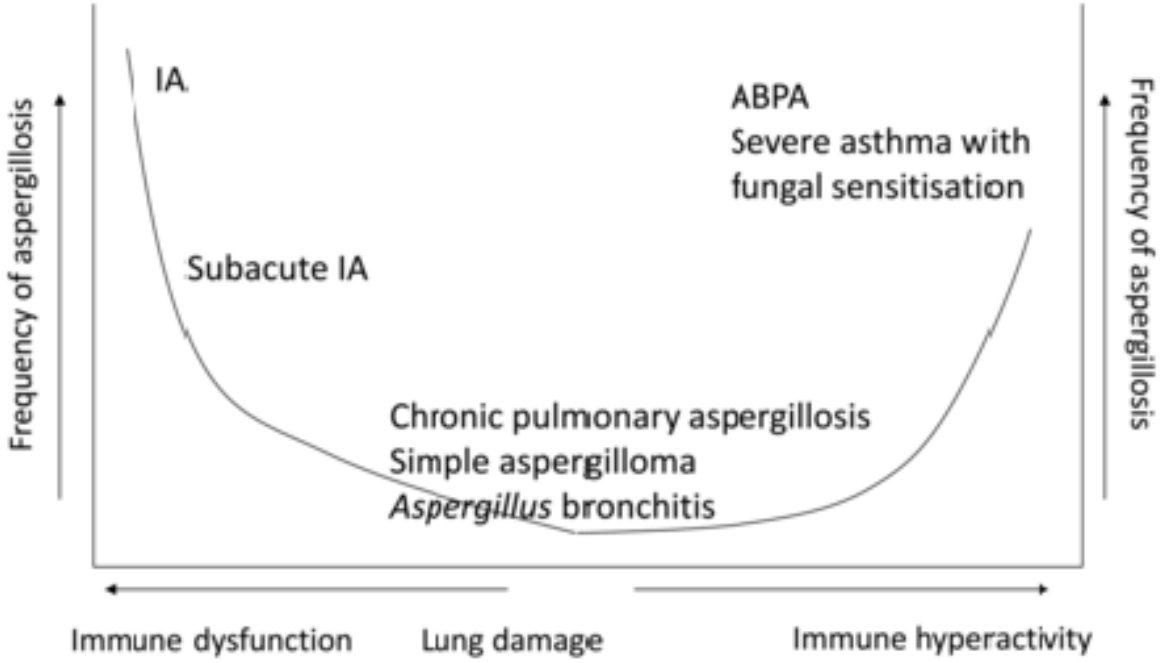


Figure 8 : Interaction d'Aspergillus avec son hôte, (d'après Denning 2014)
ABPA, aspergillose bronchopulmonaire allergique ; IA, aspergillose invasive

Le spectre clinique des pathologies aspergillaires est très large avec un tropisme à prédominance pulmonaire. Sans que la nosologie soit encore complètement fixée, ces pathologies sont actuellement répertoriées en 3 grands groupes : aspergilloses invasives, chroniques et immuno-allergiques.

Il est à noter que selon les localisations géographiques et les types de maladies concernées, l'espèce *A. fumigatus* stricto sensu est responsable de 56 à 92% des cas d'aspergillose suivie par *A. flavus* et *A. niger* (Pappas et al., 2010 ; Kontoyiannis et al., 2010 ; Alastruey-Izquierdo et al., 2013 ; Taccone et al., 2015 ; Edith Vermeulen et al., 2015). Aujourd'hui, les estimations suggèrent que plus de 3 millions de personnes ont des infections invasives ou chroniques qui entraînent plus de 600000

décès chaque année (Gsaller et al., 2016).

1. Les aspergilloses invasives

Estimée à plus de 200 000 cas par an dans le monde, et près de 1200 cas par an en France cette affection aiguë à porte d'entrée principalement respiratoire mais aussi sinusienne ou digestive comprend surtout l'aspergillose pulmonaire invasive (API) qui correspond à près de 95 % des cas (Taccone et al., 2015).

Les autres présentations cliniques comprennent la sinusite aspergillaire invasive, l'aspergillose trachéobronchique, l'aspergillose du système nerveux central, l'aspergillose avec atteinte cardiaque (endocardite, myocardite, péricardite), l'ostéomyélite aspergillaire, l'arthrite septique, l'endophtalmie et la kératite aspergillaire, l'aspergillose cutanée et l'aspergillose digestive.

A. fumigatus est un pathogène angiotrophique, ce qui suppose que tous les organes vascularisés sont susceptibles d'être atteints.

Survenant lors d'un défaut important du système immunitaire, l'AI touche quasi exclusivement des patients dits à risque : un contexte hématologique avec leucémie aiguë, une greffe de cellules souches hématopoïétiques ou une maladie lymphoprolifération chronique concernent près de 80 % des AI. Sont aussi considérés comme facteur de risque une transplantation d'organe solide (pulmonaire > cardiaque > hépatique), une tumeur solide, une maladie systémique inflammatoire traitée avec une corticothérapie à forte dose, une pathologie respiratoire chronique (Lortholary et al., 2011), l'infection par le virus du VIH avec moins de 100 CD4/µL (Denis et al., 2015), certains déficits immunitaires (ex : granulomatose chronique, déficit en CARD 9...). Ces dernières années, d'autres facteurs ont été admis comme favorisants l'AI : les patients admis en réanimations (Taccone et al., 2015) notamment ceux atteints d'une BPCO et/ou d'une grippe sévère (Wauters et al., 2012). Ainsi aux Pays-Bas en 2016, 16 % des patients admis en réanimation pour grippe présentaient une AI probable ou prouvée (van de Veerdonk et al., 2017), (Tableau II). 2,5 % des AI n'ont pas de facteurs de risques identifiés (Lortholary et al., 2011).

Tableau II : Patient non hématologique à haut risque d'aspergillose invasive, d'après le résumé de l'ECMID-ECMM-ERS 2017 (Ullmann et al. 2018)

Population	Intention	Intervention	SoR	QoE
SOT lung with pre-transplantation colonization and *Aspergillus* in intraoperative culture OR CMV disease OR higher donor age OR prolonged ischaemia time OR receiving daclizumab OR bronchial anastomotic ischaemia OR bronchial stent OR single lung SOT	To identify patients with high risk of IA	Consider prophylaxis	B	III
SOT lung with repeated acute and chronic rejection			B	II_t
SOT heart with re-operation, CMV infection, haemodialysis, other episode of IA in the program within 2 months	To identify patients with high risk of IA	Consider prophylaxis	A	II_h
SOT heart with airborne *Aspergillus* spores in ICU			A	II
SOT heart with sirolimus OR tacrolimus OR hypogammaglobulinaemia			B	II_h
SOT liver with one of the following characteristics: requirement for dialysis OR re-transplantation OR fulminant hepatic failure OR MELD score >30	To identify patients with high risk of IA	Consider prophylaxis	B	II_h
SOT liver with one of the following characteristics: ICU admission or corticosteroid requirement previous 2–4 weeks to transplant OR >15 units of packed red blood cells during transplant surgery OR reoperation involving the intra-abdominal cavity OR choledochojejunostomy			C	III
SOT kidney with one of the following characteristics: pre-transplant COPD OR delayed graft function OR post-transplant bloodstream infection OR acute graft rejection	To identify patients with high risk of IA	Consider prophylaxis	A	II_h
COPD with one of the following characteristics: high (systemic) cumulative glucocorticosteroid dose OR refractory to antibiotic therapy OR admission to the intensive-care unit	To identify patients with high risk of IA	Consider prophylaxis	A	II_t
HIV with CD4 count <100 cells/μL	To identify patients with high risk of IA	Consider prophylaxis	A	II_h
ICU patients with either COPD OR requiring glucocorticosteroids therapy	To identify patients with high risk of IA	Consider prophylaxis	A	II_h
ICU patients with either acute liver failure OR burns OR severe bacterial infection OR malnutrition			B	III
ICU or SOT recipients with increased environmental exposure	To identify patients with high risk of IA	Consider prophylaxis	A	II
Liver insufficiency	To identify patients with high risk of IA	Consider prophylaxis	B	II_h
Burn patients with positive fungal cultures	To identify patients with high risk of IA	Consider prophylaxis	A	II_h
Percentage of total body surface area burn injury; length of stay			B	III
Patient receiving one of the following: tumour necrosis factor-α blockers, basiliximab, daclizumab, infliximab, etanercept, alemtuzumab, adalimumab, rituximab, abatacept	To identify populations at high risk of IA	Consider prophylaxis	C	III

BAL : Lavage broncho-alvéolaire ; CMV : Cytomégalovirus ; COPD : Broncho-pneumopathie obstructive chronique ; IA : Aspergillose invasive ; ICU : Unité de soins intensifs ; QoE ; Qualité des données ; SoR : Poids de la recommandation ; SOT : Transplantation d'organe solide

Le diagnostic de l'AI est très délicat à poser car les symptômes cliniques, notamment fièvre, toux, sécrétions respiratoires et dyspnée, ne sont pas spécifiques à cette maladie. Il s'appuie sur la présence d'un contexte clinique favorable à l'AI et sur le résultat d'investigations radiologiques (TDM thoracique) et microbiologiques (échantillons respiratoires et sérum) relativement accessibles.

Pour améliorer la qualité des études cliniques, des critères assez précis établis par le groupe d'étude mycologique de l'organisation européenne pour la recherche et le traitement du cancer (EORTC/MSG) révisés en 2008 (De Pauw et al., 2008), associant des facteurs d'hôtes, des critères cliniques et microbiologiques permettent de classer les AI en catégories prouvées, probables ou possibles (Tableau III). Ces critères ont été initialement établis pour des patients présentant une maladie hématologique ou un cancer solide. Ainsi, devant la difficulté d'utiliser ces critères pour certains patients hors critères EORTC/MSG, notamment ceux d'unités de

réanimation, une catégorie AI putative a été établie (Blot et al. 2012).

Tableau III : Critères d'une probable infection fongique invasive, exceptées les mycoses endémiques (De Pauw, 2008)

Host factors[a]
Recent history of neutropenia (<0.5 × 10^9 neutrophils/L [<500 neutrophils/mm^3] for >10 days) temporally related to the onset of fungal disease
Receipt of an allogeneic stem cell transplant
Prolonged use of corticosteroids (excluding among patients with allergic bronchopulmonary aspergillosis) at a mean minimum dose of 0.3 mg/kg/day of prednisone equivalent for >3 weeks
Treatment with other recognized T cell immunosuppressants, such as cyclosporine, TNF-α blockers, specific monoclonal antibodies (such as alemtuzumab), or nucleoside analogues during the past 90 days
Inherited severe immunodeficiency (such as chronic granulomatous disease or severe combined immunodeficiency)
Clinical criteria[b]
Lower respiratory tract fungal disease[c]
The presence of 1 of the following 3 signs on CT:
Dense, well-circumscribed lesions(s) with or without a halo sign
Air-crescent sign
Cavity
Tracheobronchitis
Tracheobronchial ulceration, nodule, pseudomembrane, plaque, or eschar seen on bronchoscopic analysis
Sinonasal infection
Imaging showing sinusitis plus at least 1 of the following 3 signs:
Acute localized pain (including pain radiating to the eye)
Nasal ulcer with black eschar
Extension from the paranasal sinus across bony barriers, including into the orbit
CNS infection
1 of the following 2 signs:
Focal lesions on imaging
Meningeal enhancement on MRI or CT
Disseminated candidiasis[d]
At least 1 of the following 2 entities after an episode of candidemia within the previous 2 weeks:
Small, target-like abscesses (bull's-eye lesions) in liver or spleen
Progressive retinal exudates on ophthalmologic examination
Mycological criteria
Direct test (cytology, direct microscopy, or culture)
Mold in sputum, bronchoalveolar lavage fluid, bronchial brush, or sinus aspirate samples, indicated by 1 of the following:
Presence of fungal elements indicating a mold
Recovery by culture of a mold (e.g., *Aspergillus*, *Fusarium*, Zygomycetes, or *Scedosporium* species)
Indirect tests (detection of antigen or cell-wall constituents)[e]
Aspergillosis
Galactomannan antigen detected in plasma, serum, bronchoalveolar lavage fluid, or CSF
Invasive fungal disease other than cryptococcosis and zygomycoses
β-D-glucan detected in serum

NOTE. Probable IFD requires the presence of a host factor, a clinical criterion, and a mycological criterion. Cases that meet the criteria for a host factor and a clinical criterion but for which mycological criteria are absent are considered possible IFD.

En France métropolitaine l'incidence de l'AI ne cesse d'augmenter passant de 1,1/100000 habitants en 2001 à 1,8/100000 en 2010 (Bitar et al., 2014). Ainsi entre ces deux dates, plus de 8500 cas d'AI ont été déclarés avec une mortalité attribuable moyenne de 28,5 %. Le pronostic à 12 semaines est plus sévère notamment pour les patients de réanimation (Taccone et al., 2015), ou pour les atteintes cérébrales (Lortholary et al., 2011), avec une mortalité avoisinant les 70 %.

2. Les aspergilloses chroniques

2.1. Les Aspergilloses pulmonaires chroniques (APC)

L'APC est une maladie progressive et destructrice des poumons causée par des espèces du genre *Aspergillus*, compliquant d'autres troubles respiratoires actuels ou anciens chez des sujets non ou peu immunodéprimés. Elle comprend l'aspergillome simple, l'aspergillose pulmonaire chronique cavitaire (APCC), l'aspergillose pulmonaire chronique fibrosante (APCF), les nodules aspergillaires, et l'aspergillose semi-invasive (ASI) (Figure 9). Il est estimé à plus de 2,2 millions le nombre de patients atteints à travers le monde (Denning et al., 2011 ; Denning et al., 2016), et environ 240 000 en Europe (Denning et al., 2016).

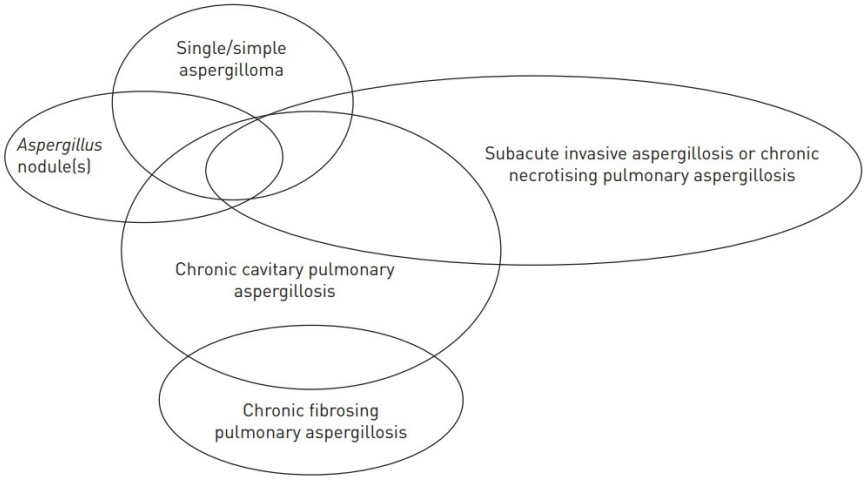


Figure 9 : Schéma illustrant les différentes formes d'aspergillose pulmonaire chronique, en particulier les chevauchements qui sont souvent observés, d'après Denning et al., 2016

La tuberculose, l'ABPA et les infections mycobactériennes non-tuberculeuses (NTM) sont les facteurs de risque les plus importants de développement de l'APC. Ainsi il est estimé que l'APC complique environ 10 % des ABPA (Denning et al., 2013b), environ 4 % des tuberculoses pulmonaires (Denning et al., 2011). D'autres pathologies pulmonaires comme la BPCO, un antécédent de pneumothorax, un cancer pulmonaire traité sont des terrains relativement communs à l'APC (Denning et al., 2016).

Les symptômes courants sont l'asthénie, la perte de poids, la dyspnée, la toux productive et l'hémoptysie. La maladie est souvent confondue avec la tuberculose pulmonaire et les deux maladies peuvent coexister.

Le diagnostic d'APC fait appel à la combinaison de caractéristiques radiologiques (imagerie thoracique : cavité(s) avec ou sans boule fongique ou nodules) et mycologiques (biopsie : cultures ou examen direct positif à *Aspergillus spp*) ou immunologiques (sérologie aspergillaire) positives en l'absence de diagnostic alternatif (Tableau IV).

Tableau IV : Critères diagnostics pour la prise en charge de l'aspergillose pulmonaire chronique (APC), Denning 2015.

Term	Definition
Simple aspergilloma	Single pulmonary cavity containing a fungal ball, with serological or microbiological evidence implicating *Aspergillus* spp. in a non-immunocompromised patient with minor or no symptoms and no radiological progression over at least 3 months of observation.
CCPA	One or more pulmonary cavities (with either a thin or thick wall) possibly containing one or more aspergillomas or irregular intraluminal material, with serological or microbiological evidence implicating *Aspergillus* spp. with significant pulmonary and/or systemic symptoms and overt radiological progression (new cavities, increasing pericavitary infiltrates or increasing fibrosis) over at least 3 months of observation.
CFPA	Severe fibrotic destruction of at least two lobes of lung complicating CCPA leading to a major loss of lung function. Severe fibrotic destruction of one lobe with a cavity is simply referred to as CCPA affecting that lobe. Usually the fibrosis is manifest as consolidation, but large cavities with surrounding fibrosis may be seen.
***Aspergillus* nodule**	One or more nodules which may or may not cavitate are an unusual form of CPA. They may mimic tuberculoma, carcinoma of the lung, coccidioidomycosis and other diagnoses and can only be definitively diagnosed on histology. Tissue invasion is not demonstrated, although necrosis is frequent.
SAIA	Invasive aspergillosis, usually in mildly immunocompromised patients, occurring over 1–3 months, with variable radiological features including cavitation, nodules, progressive consolidation with "abscess formation". Biopsy shows hyphae in invading lung tissue and microbiological investigations reflect those in invasive aspergillosis, notably positive *Aspergillus* galactomannan antigen in blood (or respiratory fluids).

CCPA: chronic cavitary pulmonary aspergillosis; CFPA: chronic fibrosing pulmonary aspergillosis; SAIA: subacute invasive aspergillosis/chronic necrotising/semi-invasive.

2.1.1. Aspergillome pulmonaire simple

Autrement nommée « truffe aspergillaire », ou encore « boule fongique » de part son aspect morphologique, l'aspergillome consiste en un enchevêtrement de mycélium aspergillaire et de matrice extracellulaire.

L'aspergillome pulmonaire simple est la colonisation d'une unique boule fongique dans une unique cavité pulmonaire chronique comme par exemple dans un poumon post-tuberculose ou post-traumatique (Isnard et al., 2018). Parfois l'aspergillome ne représente pas un grelot aspergillaire typique mais consiste en un simple

épaississement pariétal.

L'aspergillome simple peut être trouvé dans toutes les formes d'APC hormis le nodule aspergillaire. Sa prévalence n'est pas bien connue : dans une série en Angleterre, 25 % des APC étudiées présentaient un aspergillome (Felton et al., 2010), ainsi que environ 20 % des APC post-tuberculeuses (Denning et al., 2011) et 1 à 11 % des APC post-sarcoïdosiques (Denning et al., 2013a).

Caractérisé par une grande latence clinique, l'aspergillome est parfois découvert fortuitement ou plus fréquemment à la suite d'une complication hémoptysique. L'aspect radiologique est caractérisé par une image nodulaire partiellement recouvert d'un croissant gazeux clair polaire supérieur. Ce croissant n'est ni constant, ni pathognomonique de l'aspergillome, car il peut être retrouvé dans les API et les APS.

Le diagnostic repose sur une imagerie accompagnée d'une sérologie aspergillaire positive, l'isolement de l'*Aspergillus* et la confirmation histologique de la pièce opératoire. Plus exceptionnellement, une boule fongique pulmonaire provient d'un autre genre qu'*Aspergillus,* comme *Scedosporium* (Rahman et al., 2016).

Le traitement de l'aspergillome pulmonaire simple est à discuter au cas par cas, le seul traitement définitif étant la résection chirurgicale. L'instillation intra-cavitaire d'un antifongique (amphoB principalement, itraconazole, miconazole, nystatine ou iodure de sodium) est réservée aux contre-indications chirurgicales. Le traitement par antifongique systémique, notamment l'itraconazole, présente une efficacité variable et n'est donc pas recommandé (Godet et al., 2014).

2.1.2. Aspergillose Pulmonaire Chronique Cavitaire

Anciennement nommée « aspergillome complexe », il s'agit de la forme la plus commune d'APC. Elle présente généralement de multiples cavités qui peuvent ou non contenir un aspergillome. Sont associés des symptômes locaux et généraux avec des marqueurs inflammatoires élevés. Non traitées, au fil des ans, les cavités s'agrandissent et fusionnent, développent des infiltrats péricavitaires ou perforent la plèvre, ou encore peuvent être le siège d'aspergillomes pour finalement évoluer vers l'APCF.

2.1.3. Aspergillose Pulmonaire Chronique Fibrosante

L'APCF est souvent le résultat final d'une APCC non traitée. Elle correspond à une fibrose étendue avec une destruction tissulaire d'au moins deux lobes pulmonaires compliquant une APCC entraînant une perte importante de la fonction pulmonaire.

2.1.4. Nodule aspergillaire

Pathologie consistant en la présence intrathoracique généralement sans être inclus dans une cavité, de un ou plusieurs nodules inférieurs à 3 cm de diamètre. La présentation radiologique nodulaire peut être très similaire à d'autres pathologies comme un cancer du poumon, des métastases ou un nodule cryptococcique par exemple. Le diagnostic repose sur l'histologie où l'invasion tissulaire n'est généralement pas démontrée mais présente fréquemment un centre nécrotique.

2.1.5. Aspergillose pulmonaire semi-invasive (ASI)

Autrement nommée aspergillose pulmonaire chronique nécrosante ou subaiguë invasive , il s'agit d'une maladie plus rapidement progressive que l'aspergillose pulmonaire chronique (APC), évoluant entre 1 et 3 mois, touchant des personnes dont l'immunité est imparfaite ou modérément diminuée (ex : diabète, alcoolisme, âge avancé, malnutrition, corticothérapie prolongée, BPCO, connectivite, radiothérapie, certains agents modérément immuno-compromettants, infection par le VIH, infection à mycobactérie non-tuberculeuse...).

L'absence de lésion cavitaire pulmonaire antérieure dans l'ASI est habituelle. Il n'est couramment retrouvé qu'un seul site lésionnel, situé habituellement dans un lobe supérieur, et qui va évoluer en quelques jours ou semaines en une cavité. Contrairement à l'APCC où le mycélium se développe en intracavitaires, l'histologie montre ici une invasion tissulaire par *Aspergillus spp.*, comme dans l'AI (Denning et al., 2016). L'ASI doit être prise en charge comme l'aspergillose pulmonaire invasive.

2.2. La sinusite aspergillaire chronique avec balle fongique

Atteinte fongique localisée, non invasive, bénigne, extra-muqueuse, touchant des sujets immunocompétents. Comme pour la sinusite aspergillaire invasive, le diagnostic microbiologique est caractérisé par la domination de l'espèce *A. fumigatus* autour de 85% et par une très faible sensibilité de la culture (environ 30%) (Morio et al., 2018). Le traitement repose principalement sur le drainage des sinus. Si les sinus sphénoïdaux sont atteints, une intervention chirurgical ainsi qu'un traitement antifongique sont nécessaires.

3. Les maladies aspergillaires immuno-allergiques

3.1. Aspergillose broncho-pulmonaire allergique (ABPA)

L'ABPA, ou maladie de Hinson-Pepys, est un fardeau mondial qui concernerait plus de 4,8 millions de patients chez les patients asthmatiques (Denning et al., 2013b).

Il s’agit d’une affection inflammatoire chronique résultant d'une colonisation des voies respiratoires par *Aspergillus* sans invasion tissulaire associée à un mécanisme d'hypersensibilité à ce pathogène. Cette pathologie est une forme non infectieuse d'aspergillose, et *A. fumigatus* en est le principal agent étiologique.

L’ABPA complique principalement les patients asthmatiques (1 à 5%) et plus particulièrement ceux qui sont cortico-dépendants (6 à 15%), et les patients atteints de mucoviscidose (2-15%), notamment ceux présentant un terrain atopique (22%) (Greenberger, 2002 ; Agarwal, 2009). Plus rarement, l'ABPA est retrouvée chez des patients atteints de bronchopneumopathies chroniques comme la BPCO, ou sur un terrain de granulomatose septique chronique ou de syndrome hyper IgE.

Elle évolue par exacerbations durant lesquelles peuvent survenir une insuffisance respiratoire aiguë ou apparaître des bronchectasies, avec un risque *in fine* au fil des années de développement d'une insuffisance respiratoire chronique. L' ABPA peut aussi se compliquer d'API, d'APC ou d'hypertension artérielle pulmonaire (Latgé ,1999 ; Lowes et al., 2015 ; Agarwal et al., 2013).

L’ABPA aurait pour origine une colonisation pulmonaire chronique par *Aspergillus* résultant notamment d'un défaut d’élimination des conidies aspergillaires. La clairance défectueuse des conidies permet ainsi à ces dernières de germer en hyphes habituellement détruites par l’immunité innée. Chez ces patient au terrain d'hypersensibilité à *Aspergillus*, cela engendre dans les bronches une stimulation antigénique majeure conduisant à une réponse allergique de la part de l'hôte.

De nombreuses anomalies génétiques intervenant dans la réponse immunitaire ont révélé une susceptibilité accrue des patients à développer une ABPA (Agarwal et al., 2013 ; Overton et al., 2018). Cette potentielle susceptibilité génétique permettrait d’expliquer que par exemple parmi les asthmatiques, certains développent une ABPA alors que la majorité d’entre eux ne semblent pas affectée par une exposition à *A. fumigatus (*Overton et al., 2018).

L' ABPA se caractérise par des exacerbations d'asthme, des infiltrats radiographiques thoraciques transitoires récurrents ainsi qu'une éosinophilie périphérique et pulmonaire, en particulier lors d'une exacerbation. Le diagnostic repose sur un faisceau d'arguments cliniques, radiologiques et une réactivité immunologique à *A. fumigatus.* Les critères diagnostiques sont affinés régulièrement, les derniers établis étant ceux du JACI 2012 (Knutsen et al., 2012), (Tableau V).

Tableau V : Critères diagnostiques pour l'aspergillose bronchopulmonaire allergique chez des patients porteurs d'asthme ou de mucoviscidose, traduit d'après Greenberger et al., 2014)

Critères dans JACI 2012	Conférence de consensus sur l'ABPA, de la Fondation pour la mucoviscidose 2003
Asthme ou mucoviscidose, avec détérioration de la fonction pulmonaire	Détérioration clinique aiguë ou subaiguë (augmentation de la toux, des sifflements, des crachats, diminution de la fonction pulmonaire, asthme induit par l'exercice)
Réactivité cutanée immédiate aux espèces du genre *Aspergillus*	Réactivité cutanée immédiate (prick test) à *Aspergillus* ou présence d'IgE sériques anti-*A. fumigatus*
IgE totales sériques ≥ 1000 ng/mL (416 UI/mL*).	IgE totales sériques > 1000 kU/L en dehors d'une corticothérapie systémique
IgE et IgG spécifiques anti-*Aspergillus* augmentées	Anticorps précipitants à *Aspergillus* ou IgG sériques anti-*A. fumigatus*
Infiltrats thoraciques à la radiographie	
Critères additionnels possibles : éosinophilie dans le sang périphérique, anticorps sériques précipitants anti-*Aspergillus*, bronchectasies centro-lobulaires, bouchons mucus contenant une espèce d'*Aspergillus*.	Si IgE totales > 500 mais < 1000, répéter le dosage, particulièrement si le patient ne requiert une corticothérapie que depuis peu.

*1 IU/mL = 1kU/L = 2,4 ng/mL

3.2. Asthme sévère avec sensibilisation fongique (SAFS)

Cette maladie concerne les patients atteints d'un asthme mal contrôlé malgré un traitement optimal, sensibilisés par un organisme fongique (test cutané ou IgE spécifiques positifs). Contrairement à l'ABPA, ces patients présent un taux sérologique d'IgE totale inférieur à 1000 UI/mL (Agarwal et al., 2013).

Parmi les micro-organismes fongiques responsables de SAFS, les plus communs étant *Aspergillus spp.* et *Candida albicans*, on note aussi la présence de *Alternaria alternata*, *Trichophyton spp.*, *Cladosporium herbarum*, *Penicillium chrysogenum* et *Botrytis cinerea* (Denning et al., 2006).

4. Traitement des aspergilloses

Les traitements antifongiques systémiques actuellement disponibles pour le traitement des aspergilloses se divisent en trois catégories : polyènes, échinocandines et azolés. Ces derniers et en particulier les triazolés sont les médicaments de premier choix dans le traitement et la prophylaxie des aspergilloses.

4.1. Les médicaments azolés

4.1.1. Structure chimique

Les triazolés sont caractérisés par la présence d'un hétérocyle triazole possédant 3 atomes d'azote et relié au reste de la molécule par un carbone asymétrique, ainsi qu'un hétérocycle substitué par 2 halogènes. Comptant aujourd'hui 5 molécules utilisées en clinique, seul le fluconazole n'est pas actif sur *Aspergillus sp*. (Figure 10).

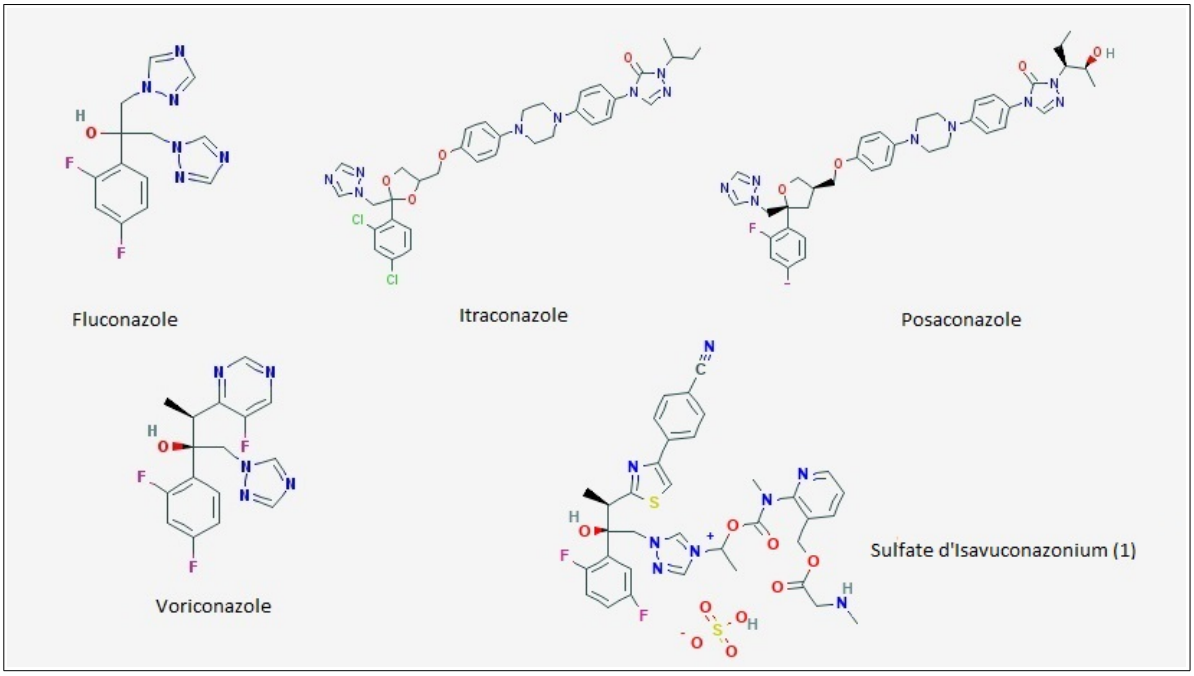


Figure 10: Médicaments triazolés à usage systémique

(1 : Prodrogue de l'isavuconazole)

4.1.2. Mode d'action des médicaments azolés

Concernant les champignons filamenteux, les traitements azolés agissent en inhibant la biosynthèse de l'ergostérol, élément essentiel de la membrane cellulaire fongique. Ce composant est synthétisé à partir du lanostérol en éliminant le groupe méthyl en C14 lors d'une réaction catalysée par l'enzyme Cyp51A membre de la famille des cytochromes P450 (Figure 11). *A. fumigatus* possède deux voies parallèles à la synthèse de l'ergostérol, et deux copies du gène cible cyp51, les orthologues *cyp51A* et *cyp51B* autrement nommés *erg11*. Ces gènes codent pour deux protéines Cyp51A et Cyp51B bien différenciées mais en relation l'une avec l'autre (Mellado et al., 2001).

Les azolés inhibent directement l'enzyme Cyp51A en se fixant dans le site actif ce qui entraîne un appauvrissement en ergostérol et une accumulation de composés toxiques et ainsi une modification de l'intégrité de la membrane cellulaire fongique

(Diaz-Guerra et al., 2003 ; Odds et al., 2003). Parallèlement, les azolés inhibent Cyp51B, bloquant ainsi les deux voies de formation de l'ergostérol. L'action des azolés est fongistatique chez les levures, et fongicide chez les filamenteux.

Les 4 molécules triazolées actives sur *Aspergillus spp.* sont lipophiles et agissent en inhibant le CYP450 fongique (Cyp51 ou 14-α-lanostérol-déméthylase ou ERG11) qui catalyse la déméthylation du 14-α-lanostérol ou 14-α-éburicol, phase essentielle de la biosynthèse de l'ergostérol membranaire fongique (Figure 11). Plus précisément, l'atome N-4 de l'hétérocycle de la molécule triazolée se lie à l'atome de fer de l'hème situé au niveau du site actif du CYP450 fongique inhibant de manière irréversible l'enzyme. De plus la molécule peut former également des liaisons hydrogènes dans la partie hydrolase ou dans le tunnel d'accès au site actif pour les molécules à longues chaînes comme l'itraconazole et le posaconazole. Cette inhibition entraîne une accumulation de 14-α-méthylstérol associée à une diminution de l'ergostérol dans la membrane cellulaire fongique qui conduit à une inhibition de la croissance fongique. De plus, au niveau cellulaire, l'accumulation de lanostérol altère la perméabilité membranaire, la chaîne respiratoire ainsi que la synthèse de chitine provoquant la mort du champignon.

4.1.3. Indications

Les molécules triazolées sont la principale classe d'antifongiques utilisés dans le traitement des aspergilloses. Concernant l'AI, le posaconazole est indiqué en prophylaxie chez les patients à haut risque comme ceux atteints de leucémie myéloïde ou ceux présentant une maladie du greffon contre l'hôte dans le cadre d'une greffe de cellules souches hématopoïétiques (Liss et al., 2015). Le voriconazole et plus récemment l'isavuconazole sont utilisés en première intention pour le traitement de l'AI (Patterson et al., 2016 ; Maertens et al., 2016 ;.Ullmann et al. 2018).

Du côté de l'aspergillose pulmonaire chronique, un premier traitement de 6 mois par antifongique oral triazolé est maintenant recommandé. L'itraconazole et le voriconazole sont indiqués en première intention, le posaconazole peut aussi être utilisé (Denning et al., 2016).

En ce qui concerne l'ABPA, le traitement est multiple : prévention à l'exposition à *A. fumigatus*, contrôle de l'inflammation avec l'administration de glucocorticoïdes par voie systémique ou inhalée associée dans certaines conditions à un traitement azolé, principalement l'itraconazole, pour diminuer la charge fongique (Greenberger et al. 2014). De même dans la prise en charge du SAFS, l'itraconazole est utilisé quand *Aspergillus sp.* est impliqué. Depuis quelques années, l'Omalizumab, anticorps

monoclonal anti-IgE utilisé dans l'asthme sévère, aurait sa place dans le traitement de l'ABPA (Agarwal R. et al. 2013 ; Tillie-Leblond I. et al. 2011 ; Greenberger et al. 2014)

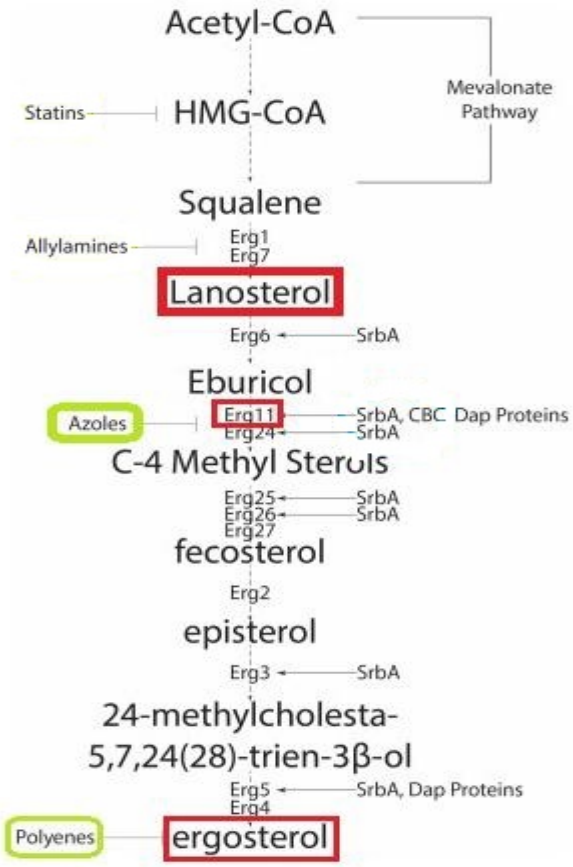


Figure 11 : Schéma de la voie de biosynthèse de l'ergostérol fongique, d'après Dhingra et al., 2017.

4.2. Les polyènes

Famille d'antifongique dont l'amphotéricine B est la principale molécule. Existant sous plusieurs formulations, l'amphotéricine B manifeste son action fongicide en se fixant à l'ergostérol membranaire pour former des canaux ce qui a pour conséquence de favoriser la fuite de cations intracellulaire. Son administration systémique uniquement intraveineuse et sa toxicité rénale sont des éléments qui rendent son utilisation moins fréquente que celle des azolés.

4.3. Les échinocandines

Classe d'antifongiques active et fongistatique sur *Aspergillus spp* uniquement disponible par voie parentérale, composée actuellement de trois molécules : mycafungine, caspofungine et anidulafungine. Le mode d'action est l'inhibition de la synthèse du β-(1,3)-D glucane, élément essentiel de la paroi fongique.

III - Le diagnostic biologique

1. Diagnostic

1.1. Le prélèvement

En mycologie, le prélèvement est une étape critique du fait d'un risque élevé de contamination et d'une sensibilité parfois prélèvement dépendante.

La recherche de l'implication de mycètes du genre *Aspergillus* s'effectue sur divers prélèvements issus de l'appareil respiratoire (expectoration, aspiration endotrachéale, aspiration endobronchique, liquide de lavage bronchoalvéolaire,...), du système sanguin (ponction veineuse), du liquide céphalo-rachidien (LCR) ou encore d'une biopsie d'un tissu pathologique (nodule, cornée..). En fonction de la maladie suspectée, différents types de recherches sont effectuées : mycologique avec un examen direct et une en mise culture, immunologique avec des techniques de dépistage et de confirmation ou encore la recherche d'antigènes circulants.

Les prélèvements respiratoires, éléments quasi-indispensables à l'approche diagnostique dans l'aspergillose pulmonaire sont caractérisés par une faible sensibilité à l'examen direct ou en culture et par une positivité qui ne doit pas être confondue avec une contamination environnementale ou une simple colonisation du tractus respiratoire.

1.2. L'examen mycologique

Il s'effectue en 3 étapes indissociables et successives

1.2.1. L'examen direct

La préparation du prélèvement s'effectue avec un éclaircissant ou une fixation-coloration pour une lecture au microscope optique. Il permet la recherche d'éléments fongiques avec une orientation vers une origine de "type aspergillaire" en présence de filaments hyalins, fins (environ 5µm de diamètre) à bords parallèles et réguliers, septés et ramifiés à 45°. Les colorations utilisées sont variées comme la coloration argentique de Gomori Grocott ou les marquages fluorescents (Calcofluor white, Uvitex 2B, Blancophor).

1.2.2. La culture

La culture permet l'examen macroscopique et microscopique. L'analyse porte sur la vitesse de pousse, la présence ou absence de pigment diffusé dans la gélose ainsi que la taille et l'aspect des colonies.

Les colonies des formes anamorphiques d'*A. fumigatus* sont extensives avec une croissance rapide pouvant atteindre 4+/-1 cm en une semaine à 25°C (Raper et Fennell, 1965).

Lorsque la culture atteint son stade de maturité, au recto, les filaments initialement blancs laissent place en 2-3 jours à une colonie bleue verte, puis verte foncée voire brune d'aspect poudreux. La culture présente alors des organes de fructification asexués indispensables pour son identification. Un fragment de culture est prélevé à l'oese ou au scotch pour examen microscopique.

1.2.3. L'examen microscopique des cultures

Ce fragment sus-cité est déposé dans une goutte de bleu de lactophénol entre lame et lamelle puis observé au microscope optique. Ainsi, *A. fumigatus* présente un thalle septé, régulier, de diamètre étroit (5µm), des parois d'hyphes hyalines, des conidies de 2,5 à 3µm de diamètre, nommées ici amérospores, finement échinulées exogènes issues de cellules conidiogènes ou phialides réparties en colonnes et portées par un filament conidiophore unisérié, court, lisse, incolore avec évasement progressif à l'apex mesurant 20 à 30µm de diamètre.

Dans les conditions standards de culture, on n'observe pas d'élément de reproduction sexuée.

L'identification macro et microscopique permet de déterminer le genre *Aspergillus* section *Fumigati*, mais n'est pas suffisant pour s'assurer de l'espèce *fumigatus*.

1.3. Le diagnostic immunologique

Il correspond à la recherche d'une réponse de l'hôte à un contact récent ou ancien avec un agent pathogène.

Pour *A. fumigatus*, ces examens pratiqués sur un simple sérum ont l'autre avantage d'avoir une sensibilité dans l'ensemble plus élevée que l'examen mycologique. Cependant, du fait d'un délai de réponse de l'immunité et de possibles faux négatifs chez les patients immunodéprimés, ils sont limités au diagnostic et au suivi des maladies aspergillaires subaiguës (IgG), chroniques (IgG) ou allergiques (IgG, IgE spécifiques et totales).

La recherche des Ac spécifiques comprend deux techniques différentes : une technique pour le dépistage (hémagglutination ou HAI, immunofluorescence indirecte ou IFI, méthode immunoenzymatique ou EIA) et une autre pour la confirmation immunologique (coélectrosynérèse ou COES, immunoélectrophorèse

ou IELP, immunoempreinte ou IE).

Pour la recherche indirect d'aspergillose, les techniques immunologiques utilisent deux types d'antigènes : des antigènes métaboliques et/ou des antigènes somatiques. Selon la méthode, sont utilisés des antigènes bruts et/ou des antigènes recombinants, ces derniers permettant d'améliorer la spécificité de la technique.

1.3.1. Les techniques de dépistage

Hémagglutination

Technique sensible et semi-quantitative (taux de dilution du sérum) qui consiste à mettre en présence le sérum du patient avec des hématies préalablement recouvertes d'Ag aspergillaires somatiques et/ou métaboliques provenant de broyat de champignon ou de surnageant de culture. La réaction lue à l'œil nu est positive quand des rosettes d'agglutination forment un voile au fond de la cupule.Cette méthode est rapide (2h), opérateur et lecteur dépendant.

Immunofluorescence indirecte

Des Ag aspergillaires somatiques (structure du champignon préservée) sont mis au contact du sérum du patient puis la réaction Ag-Ac est révélée par l'ajout d'un anticorps anti-Ig couplé à un fluorochrome. La lecture visuelle est réalisée au microscope à fluorescence et le résultat est semi-quantitatif.

Méthodes enzymatiques

L'EIA est une méthode rapide (2h), sensible, et quantitative, ce qui en fait le test de choix pour le suivi des Ac anti aspergillaires. C'est aujourd'hui la méthode de dépistage la plus utilisée. Des Ag aspergillaires (bruts et/ou recombinants) sont mis au contact du sérum du patient pour créer des complexes immuns. Puis des Ac anti-Ig humains conjugués à une enzyme sont introduits, et enfin un substrat. La réaction est positive si les complexes immuns sont reconnus par les anti-Ig activant ainsi l'enzyme qui va créer une réaction colorée (ELISA) ou un produit fluorescent (FEIA).

1.3.2. Les techniques de confirmation

Immunoélectrophorèse

Cette technique d'immunoprécipitation réalisée en milieu gélosé combine une séparation électrophorétique des antigènes testés suivie d'une diffusion double (antigènes et sérum) perpendiculaire à l'axe de migration. Pour *Aspergillus*, les

antigènes utilisés sont somatiques et métaboliques. Après 24 à 36h de migration, l'examen est lu à l'œil nu à la recherche d'arcs de précipitations et d'une éventuelle activité enzymatique (catalasique ou chymotrypsique). Il est positif par convention à partir de trois arcs ou en présence d'une activité enzymatique. L'immunoélectrophorèse est considérée comme la technique de référence.

Immunoempreinte

Les Ag spécifiques d'espèce sont préalablement séparés par électrophorèse et transférés sur une membrane de nitrocellulose. La révélation immunologique est effectué en mettant en contact le sérum à tester avec cette membrane. Les Ac du patients fixés sont ensuite révélés par l'ajout d'Ac anti-Ig humaines spécifiques de l'isotype recherché conjugués à un réactif coloré (la phosphatase alcaline). L'apparition de bandes lues à l'œil nu spécifiques d'un Ag montrent la présence d'Ac spécifiques de l'espèce étudiée. Cette méthode est très spécifique et rapide (4h) mais contraignante en l'absence d'automate.

1.4. La détection d'antigènes circulants

Il permet de rechercher la présence indirecte de l'agent pathogène. Parmi ces marqueurs , les antigènes sont indiqués au dépistage chez des personnes immunodéprimées à fort risque d'AI, au diagnostic en cas de suspicion d'AI et au suivi de la réponse thérapeutique.

1.4.1. Antigène soluble spécifique

Le galactomannane (GM) par technique ELISA

Le GM est un polymère linéaire de mannose comprenant latéralement des chaînes de galactose, retrouvé dans la paroi et secrété par certains végétaux et certains champignons.

Plusieurs techniques de détection du GM ont été utilisées et en particulier l'agglutination de particules de latex sensibilisées. Mais cette dernière est jugée obsolète du fait d'une sensibilité trop faible.

Aujourd'hui le GM est recherché par méthode ELISA avec le test Platellia®, à partir d'un sérum ou d'un LBA. L'Ac monoclonal EB-A2 de rat reconnaît et se lie à 1 tétramère de galactofuranes avec liaisons β-(1→5) produit par *Aspergillus spp et aussi* certains *Penicillium spp, Paecilomyces spp*, *C. neoformans*, *Fusarium spp*, *P. marneffei* ou *H. capsulatum*. Le nombre d'épitopes varie selon les espèces, les souches et les conditions de culture (Latgé et al., 1994).

L'interprétation des résultats est délicate. En effet la sensibilité varie en fonction des facteurs extrinsèques au test comme la présence d'une prophylaxie antifongique ou le terrain du patient, et la spécificité des anticorps monoclonaux avec le tétrasaccharide n'est pas absolue puisque l'Ac EB-A2 semble reconnaître des oligosaccharides plus courts et des oligosaccharides avec liaisons alternées β-(1→5)/β-(1→6), non spécifiques d'*Aspergillus sp*.

Même si le GM est aussi retrouvé chez d'autres champignons d'intérêt médical, ce test se prévaut d'une bonne spécificité mais d'une sensibilité qui varie énormément en fonction de multiples facteurs comme la présence d'une prophylaxie antifongique ou le terrain du patient.

Une glycoprotéine

Un test rapide immuno-chromatographique à flux latéral spécifique des infections aspergillaires a été développé plus récemment dans l'idée d'augmenter la sensibilité et la rapidité de réalisation par rapport au GM (Thornton, 2008). En quinze minutes, il détecte dans le sérum ou le LBA de manière qualitative une glycoprotéine présente dans la paroi cellulaire des hyphes des *Aspergillus spp* et de certains *Penicillium spp* et *Paecilomyces spp*, et secrétée par les hyphes en croissance. L'épitope protéique de cette glycoprotéine est reconnue par l'Ac monoclonal murin JF5.

Même si la glycoprotéine recherchée est un antigène plus spécifique que le GM et que ce test n'est pas encore commercialisé, les performances analytiques de ce test rapide semblent proches de celles du GM par ELISA. Cependant elles doivent être confirmées par des études supplémentaires (Hoenigl et al. 2014 ; Castillo et al. 2017 ; Mercier et al. 2019).

L'Afmp1p

Une autre glycoprotéine de la paroi fongique, plus précisément une galactomannoprotéine nommée Afmp1p, semble spécifique d'*A. fumigatus*. Un test ELISA à la recherche de cet Ag est encore à l'étude (Woo et al., 2002 ; Wang et al., 2012).

1.4.2. Antigène soluble « panfongique »

Le β-(1-3)-D-glucane (BG)

Le BG est un polysaccharide entièrement constitué de D-glucose, composant naturel ubiquiste de l'environnement, et notamment de la paroi fongique des champignons. Il

n’est habituellement pas détectable chez certaines espèces comme les zygomycètes, les cryptocoques et *B. dermatidis*.

La technique de dosage la plus couramment rencontrée sous la dénomination Fungitell® est effectuée sur sérum et repose sur une réaction protéase-zymogène révélée par méthode colorimétrique.

Le BG est un marqueur précoce d’infection fongique doté d’une très bonne valeur prédictive négative.

2. Détection de la résistance au laboratoire

La recherche de la sensibilité d’*A. fumigatus* aux traitements azolés est devenue primordiale depuis l’émergence de résistances à ces traitements. En pratique clinique, ces tests *in vitro* ont un double objectif : tout d’abord clinique en aidant à choisir un traitement antifongique et à prédire son efficacité et ensuite épidémiologique pour dépister, recenser et comprendre la survenue d’une éventuelle résistance. Il est toujours à noter que l’antifongigramme ne permet pas à lui seul de prédire la réponse au traitement chez un patient.

La recherche de résistance à un traitement sur une souche aspergillaire nécessite que le prélèvement soit positif en culture, ce qui demande souvent 4 à 5 jours minimums. L’inconvénient premier de la culture est sa très faible sensibilité (Langridge et al., 2016 ; Denning et al., 2011 ; Fraczek et al., 2013). En effet même si il existe des moyens d’augmenter cette sensibilité en améliorant le traitement des échantillons (Fraczek et al., 2013 ; Pashley et al., 2012), les cultures de prélèvements respiratoires des patients atteints d’une maladie aspergillaire restent négatifs dans plus de 90 % des prélèvement (Langridge et al., 2016).

2.1. Tests de sensibilité

Les tests de sensibilité ne peuvent être réalisés en pratique courante que si une souche a été isolée en culture à partir d’un prélèvement. Il existe aujourd’hui deux types de tests utilisables pour *A. fumigatus* : les techniques de référence (EUCAST et CLSI) qui utilisent le principe de microdilution en milieu liquide, et les techniques commerciales (Etest®, MIC Test Strip® et EZY MIC Strip® utilisent la dilution sur gélose agar et Sensititre Yeast One® la microdilution en milieu liquide). Le résultat de ces tests est exprimé en Concentration Minimale Inhibitrice (CMI), Efficace (CME) ou Fongicide (CMF) selon l’agent pathogène ou l’antifongique testé. La CMI antifongique est définie comme la plus faible concentration, exprimée en mg/L, d’un agent inhibant la la croissance d’un champignon.

2.1.1. Techniques de référence

Les techniques de référence sont principalement utilisées en recherche ou en épidémiologie. Leur principe repose sur l'association d'une quantité standardisée d'inoculum fongique et d'un gradient de concentration d'antifongique en milieu liquide sur plaque classiquement à 96 puits.

Protocole du sous comité fongique de l'EUCAST (Europe)

Les principales caractéristiques techniques de l'EUCAST sont l'utilisation d'un milieu synthétique (RPMI 1640 : *Roswell Park Memorial Institute medium*) supplémenté au glucose (2%), tamponné au pH 7,0 par une concentration final de 0,165 mol/L de MOPS (3-(N-morpholino) propanesulfonic acid). Le support est une plaque stérile de 96 puits en plastique à fond plat. L'incoculum pour les champignons filamenteux est compris entre 1 et 2,5 x 10^5 UFC/mL final et préparé par comptage microscopique des conidies à l'hématimètre de Malassez préalablement mélangé à une solution d'eau stérile supplémentée par 0,1 % de Tween 20. La lecture de la pousse est réalisée visuellement après un temps d'incubation de 48h pour *Aspergillus sp* entre 34 et 37°C en air ambiant. La règle de détermination de la CMI pour les azolés est basée sur l'inhibition complète de la croissance du filamenteux. Ainsi la valeur de la CMI est la plus faible concentration du médicament pour lequel aucune croissance fongique n'est observé (Arendrup et al., 2017).

Protocole du sous comité fongique du CLSI (Etats Unis)

Nommé M38-A pour les filamenteux, il diffère de l'EUCAST par l'utilisation de plaques avec puits à fond rond, par la teneur en glucose du RPMI à 0,2%, par la concentration de l'inoculum de 10^4 UFC/mL ajustée au spectrophotomètre et par la concentration finale de DMSO à 1% au lieu de 0,5% pour l'EUCAST.

2.1.2. Techniques commerciales

Etest®

L' Etest® est le test commercial de sensibilité aux antifongiques le plus utilisé. Il utilise le principe de diffusion. La méthode consiste en un gradient prédéfini de 15 concentrations de médicaments antifongiques disposé sur une bandelette de plastique et utilisé pour déterminer la CMI. Lorsque la bande est appliquée sur une surface de gélose inoculée, l'agent antifongique est immédiatement transféré dans la matrice d'agar et après une période d'incubation de 48 à 72h pour les champignons filamenteux, une ellipse d'inhibition située sur le long de la bande est formée. La

gélose recommandée est du RPMI 1640 additionné de 2% de glucose, préparé avec du MOPS dans une base d'agar à 1,5%. De réalisation simple et unitaire, cette technique est plus onéreuse que les précédentes. L'obtention des résultats nécessite une lecture à 48h par une personne expérimentée. Pour l'*Aspergillus*, la concordance de résultats avec la technique du CLSI est excellente pour le voriconazole (97,6%) (Pfaller et al., 2003). Cette concordance varie entre 80 et 100% concernant l'itraconazole et le posaconazole (Pfaller et al., 2003).

Sensititre YeastOne® (SYO)

Il s'agit d'un test commercial de sensibilité aux antifongiques, dérivé de la méthode de microdilution du CLSI basé sur la norme M27-A3 pour levures, d'utilisation plus pratique en routine que les méthodes de référence, et utilisant un indicateur colorimétrique, la résazurine. Très utilisé pour les levures, le SYO a des performances qui sont très variables pour les filamenteux et dépendantes de l'antifongique testé. Ainsi pour les triazolés et notamment l'itraconazole, le SYO donne globalement des CMI plus faibles que les méthodes de référence et détecte ainsi moins bien les résistances (Mazuelos et al. 2003 ; Resendiz-Sharpe et al., 2016).

2.1.3. Seuils et ECVs

Un micro-organisme est défini comme de type sauvage ou "wild type" au sein d'une espèce en l'absence de mécanisme de résistance acquis ou mutationnel à une molécule donnée (Turnidge et al., 2006).

La résistance primaire d'une espèce est caractérisée à partir des seuils épidémiologiques (ECOFF pour l'EUCAST et ECV pour le CLSI). Les ECOFF sont des valeurs obtenues à partir de l'analyse visuelle ou statistique d'une distribution des CMI vis-à-vis d'une molécule sur un grand nombre de souches d'une même espèce (Turnidge et al. 2006). Elles correspondent à la valeur de CMI qui identifie la limite supérieure d'une population de souches sauvages (Dannaoui, 2015). Les ECVs sont donc des constantes pour l'espèce considérée et ne sont pas modifiés en fonction de l'échantillonnage, du temps, de la source des souches isolées ou de leur origine géographique.

Chez *A. fumigatus*, testé avec l'itraconazole, l'ECOFF selon l'EUCAST est à 2 mg/L, c'est-à dire que les isolats sont considérés comme sauvage/sensibles à l'itraconazole si la CMI est ≤ 2mg/L et non-sauvages/résistants si la CMI est > 2 mg/L (Rodriguez-Tudela et al. 2008), alors qu'il est à 1mg/L avec le CLSI.

Les ECVs ou ECOFF sont à différencier des *breakpoints* ou seuils critiques cliniques. Ce sont les seuils de CMI qui en pratique permettent de décider si une souche est traitable ou non avec un antifongique. Ils sont établis à partir de nombreux paramètres comme les ECVs de l'espèce, les paramètres pharmacocinétiques et pharmacodynamiques de la molécule... Les souches sont ensuite catégorisées en sensibles (S), intermédiaires (I) ou résistantes (R) selon que la probabilité du succès thérapeutique soit jugée en grande (S), indéterminable ou faible (I) et improbable (R).

Pour *A. fumigatus*, les seuils critiques cliniques à l'itraconazole sont ≤1mg/L pour les souches sensibles et > 2 mg/L pour les souches résistantes selon l'EUCAST (Tableau VI).

Tableau VI : Table des seuils critiques cliniques de CMI d'Aspergillus fumigatus selon le protocole de l'EUCAST

Agent antifongique	**seuil de CMI d'*A. fumigatus* (en mg/L)**	
	Sensible ≤	Résistant >
Fluconazole	-	-
Itraconazole	1	2
Voriconazole	1	2
Posaconazole	0,125	0,25
Isavuconazole	1	1
Amphotéricine B	1	2
Caspofungine	IE	IE
Anidulafungine	IE	IE
Micafungine	IE	IE

"-" : test de sensibilité non recommandé, doit être considéré comme résistant à cette molécule.
"IE" : Preuves insuffisantes que *Aspergillus* soit une bonne cible pour le traitement par ces antifongiques.

Avant l'apparition des souches TR_{46}, le dépistage des résistances aux azolés s'effectuait presque exclusivement à l'aide d'une seule molécule qui était l'itraconazole. En effet cette dernière est très efficace pour mettre en évidence les résistances dues à des mutations ponctuelles ou à des répétitions en tandem de type TR_{34}. Seulement un nombre non négligeable de souches TR_{46} (24% dans la série de Buil et al., 2018), n'étaient pas dépistées (Figure 12). Ainsi il est aujourd'hui recommandé de tester au moins deux molécules azolées (itraconazole et voriconazole au minimum), pour dépister les résistances aux triazolés.

Les tests de sensibilité habituellement utilisés pour les screenings et pour la réalisation des ECVs sont la microdilution selon les protocoles CLSI (M-38) ou

EUCAST (E. Def 9.3.1). Ces protocoles étant longs à mettre en œuvre, fastidieux, nécessitant du personnel expérimenté, leur utilisation est donc souvent limitée à une utilisation de recherche.

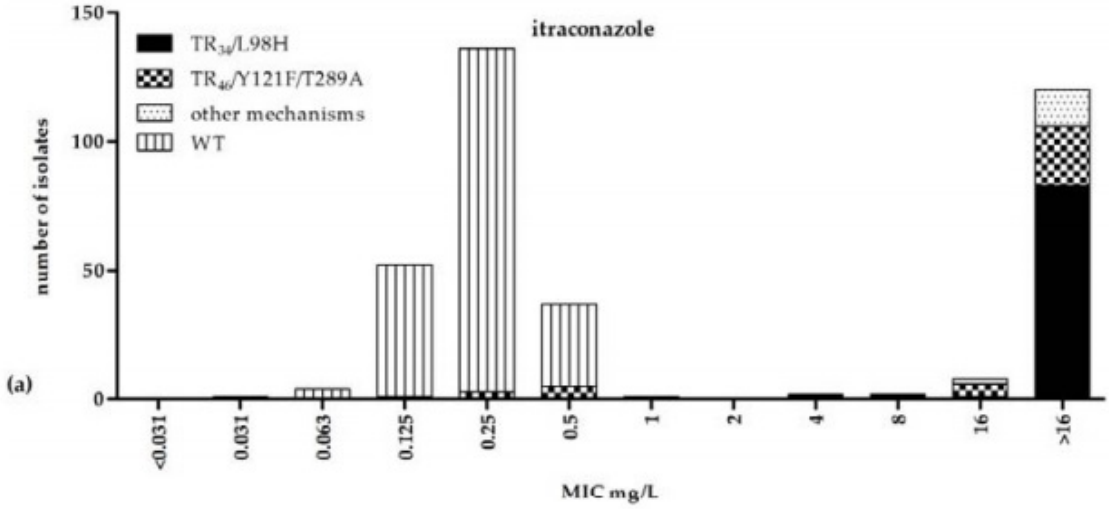


Figure 12 : Distribution des CMI selon le CLSI de 363 isolats cliniques d'A. fumigatus, d'après Buil et al. 2018.

De plus, pouvant passer à côté d'une résistance si une seule colonie est testée, il était nécessaire de trouver un autre protocole plus simple utilisable en routine. Initialement proposé par Van der Linden et al., 2015, la méthode de la procédure Eucast E.def 10.1 est basée sur l'inoculation simultanée de 4 géloses agar avec et sans azole et sur la détermination visuelle de la croissance fongique après un et deux jours d'incubation. (Figure 13).

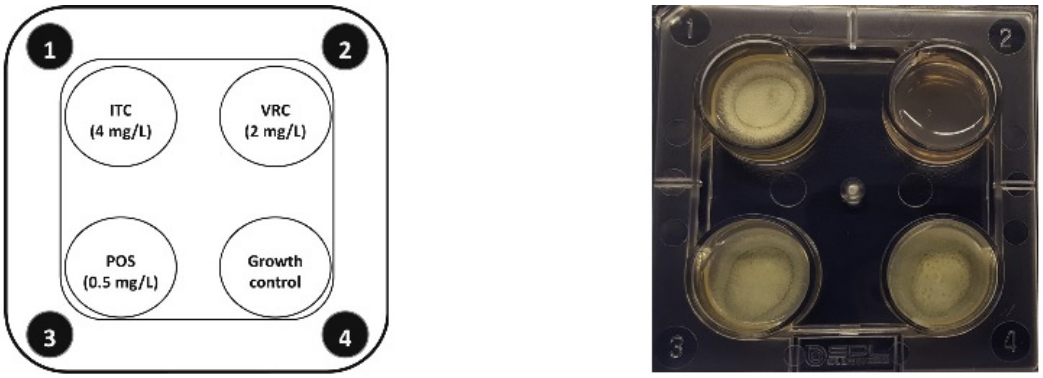


Figure 13 : Test Eucast E.def 10.1 de screening de la résistance aux azolés pour Aspergillus fumigatus

A gauche : schéma de la plaque d'agar avec 3 puits (1-3) contenant 1mL de milieu supplémenté d'une molécule azolée et le puit n°4 exempt d'azole utilisé comme contrôle de croissance. ITC : itraconazole, POS : posaconazole, VRC : voriconazole. A droite : exemple de profil de croissance attendue pour une souche porteuse d'une mutation G54W du gène cyp51A, (d'après Guinea et al., 2018).

2.2. Détection de la résistance par biologie moléculaire

Classiquement, le dépistage de résistance aux antifongiques s'effectue avec les tests

de sensibilité cité ci-dessus. Depuis 2010, il est possible de dépister la résistance d'*A. fumigatus* aux azolés en recherchant directement les mutations les plus fréquentes de cyp51A et de sa région promotrice par biologie moléculaire sur le prélèvement respiratoire ainsi que les biopsies (Van der Linden et al., 2010). Cette démarche permet ainsi de pallier à la faible sensibilité de la culture et de gagner du temps sur le diagnostic ainsi que sur le phénotype de la souche. Elle est utilisée ici pour rechercher de manière spécifique les mutations connues pour engendrer une résistance. Seules les mutations recherchées peuvent être retrouvées et donc les souches présentant une résistance de mécanisme inconnu ou non recherché ne sont pas dépistées.

2.2.1. Techniques maison

En 2010, l'équipe de Jacques Meis met au point une technique de PCR permettant de dépister les mutations les plus fréquemment rencontrées dans la résistance d'*A. fumigatus* aux azolés : G54, L98H, G138, M220 (Klaassen et al., 2010). Aujourd'hui, peuvent être dépistées en plus les mutations TR34, TR46, Y121F et T289A (Engel et al., 2018).

En 2018, Yu et al. en Allemagne mettent au point une technique d'amplification génique isothermique à boucle (LAMP) pour le dépistage de la répétition en tandem TR_{34} (Yu et al., 2018). Ce type de technique déjà utiliséé en pratique clinique pour le diagnostic de plusieurs agents pathogènes ou mutations, présente l'intérêt par rapport à une PCR classique d'être très spécifique, rapide (résultat en moins d'une heure) et ne nécessitant pas l'emploi d'un thermocycleur. Cette technique adaptée à une utilisation de routine va probablement se répandre rapidement et s'étendre à d'autres mutations. Cependant, il est encore aujourd'hui compliqué de développer une technique multiplexe avec la LAMP comme en PCR classique qui permettrait de dépister avec un seul échantillon plusieurs mutations.

2.2.2. Techniques commerciales

Deux techniques commerciales existent. Le kit de PCR duplex en temps réel nommé MycoGENIE® permettant de rechercher la présence d'*Aspergillus fumigatus* et l'altération TR_{34}/L98H. La PCR multiplexe en temps réel nommée Aspergenius® permet en plus de détecter la présence d'espèces aspergillaire autre qu'*A. fumigatus* et la présence de mutations : L98H, TR_{34}, T289A et Y121F, ces dernières étant associées chez *Aspergillus* avec le TR_{46}.

IV - Résistance d' *A. fumigatus* aux traitements azolés

A. fumigatus est un organisme naturellement sensible aux antifongiques triazolés, mais capable d'acquérir plusieurs mécanismes de résistance et ainsi de s'adapter aux différentes situations de stress. Les seules résistances rencontrées sont des résistances secondaires, donc induites par un processus de sélection génétique sous l'effet de l'action répétée et/ou prolongée d'un ATF chez le patient ou d'un fongicide dans le milieu extérieur.

1. Premiers cas de résistance / Historique

Les premiers cas cliniques d'infection à *A. fumigatus* dues à une souche résistante ont été mis en évidence en 1997 sur deux isolats datant de 1989 provenant de patients vivant en Californie aux Etats Unis (Denning et al., 1997). Puis 3 patients en 1995 en Suède (Chryssanthou, 1997). En 1998, des cas résistants sont observés aux Pays Bas (Verweij et al., 2002), en Italie (Lazzarini et al., 2016), au Japon (Tashiro et al., 2012). L'année suivante, les premiers isolats cliniques résistants anglais et français sont relevés (Howard et al., 2009 ; Dannaoui et al., 1999). Le premier cas clinique porteur d'une souche TR_{34}/L98H est observé en 1998 (Verweij et al., 2002). Quelques années plus tard en 2003, cet ensemble d'altérations est retrouvé chez un patient naïf de tout traitement azolé (Verweij et al., 2007), amenant ainsi l'hypothèse que ces altérations génétiques ont une origine environnementale , (Meneau, 2005.; Snelders et al., 2008). Cette hypothèse apparaît et se confirme durant les années 2000. En effet, 94 % des isolats cliniques d'*Aspergillus fumigatus* résistants des hôpitaux de Hollande prélevés entre 1999 et 2007 (Snelders et al., 2008) présentent un seul mécanisme de résistance (TR_{34}/L98H), alors qu'il n'existe pas de lien épidémiologique entre les différents patients à l'origine de ces isolats. Les études sur des échantillons d'*A. fumigatus* environnementaux débutent alors et mettent en évidence de nombreuses souches avec des CMI élevées à l'itraconazole et des phénotypes variés aux azolés (Meneau et al., 2005). En utilisant un panel de marqueurs génétiques hautement polymorphes il a été montré que ces souches environnementales et cliniques présentaient une parenté, laissant supposer que ces souches résistantes ont été acquises par les patients à partir de leur environnement (Camps et al., 2012). S'ensuit en 2006 l'apparition de la première souche avec une mutation TR_{53} (Hodiamont et al., 2009), puis en 2009 est découvert aux Pays-Bas la mutation TR_{46}/Y121F/T289A (Camps et al., 2011). Le premier cas actuellement connu de TR_{46} date de 2008 aux Etats-Unis (Wiederhold et al., 2016).

2. Épidémiologie de la résistance aux azolés chez *Aspergillus fumigatus*

Depuis vingt ans la résistance d'*A. fumigatus* aux médicaments azolés est devenue de plus en plus importante (Figure 14). En cause notamment, l'utilisation massive de fongicides azolés dans l'agriculture classique généralisée depuis la fin des années 1970.

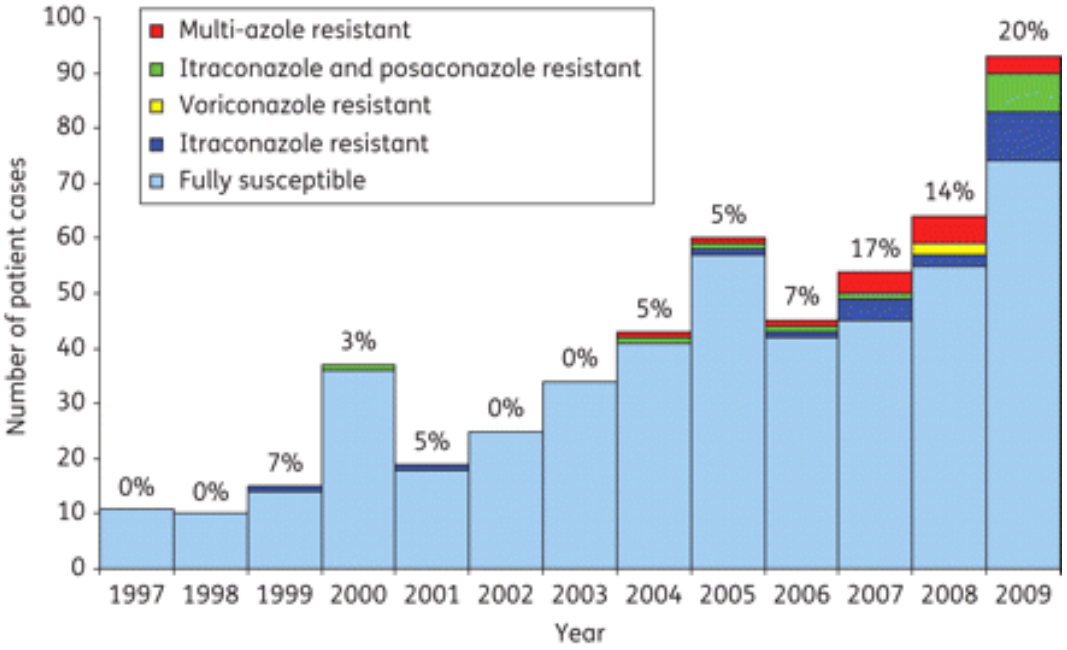


Figure 14 : Fréquence des A. fumigatus résistants aux azolés parmi les patients du Centre Mycologique de Référence de Manchester entre 1997 et 2009, (Bueid et al. 2010).

Bien qu'il n'existe aucune étude randomisée, il est accepté qu'une infection due à un *A. fumigatus* résistant aux azolés augmente le risque d'échec clinique. Par exemple, la mortalité des patients présentant une aspergillose invasive due à un *A. fumigatus* résistant aux azoles est très élevée dépassant souvent les 80 % (Van Der Linden et al., 2011 ; Steinmann et al., 2015). Récemment, une étude sur cinq ans a observé une mortalité accrue de 21% à 42 jours (49% vs 28% ; p=0,017) et de 25% à 90 jours (62% vs 37% ; p=0,0038) des patients d'hématologie présentant une AI avec une souche résistante par rapport à une souche sensible (Lestrade et al., 2018). Même si l'échec clinique d'une aspergillose peut aussi être du à de nombreux autres facteurs, dont une fonction immunitaire altérée, l'état avancé de l'infection, une faible exposition au médicament due à une faible biodisponibilité du médicament administré ou encore à un métabolisme accéléré du médicament (Nivoix et al., 2008), devant l'augmentation des *A. fumigatus* résistants, certains centres se posent la question voire ont décidé de ne plus utiliser les médicaments azolés en tant que traitement thérapeutique de première intention (Lockhart et al., 2011 ; Snelders et al., 2008 ; Verweij et al., 2015).

3. Résistance acquise *versus* résistance environnementale

En dehors du cadre médical, les triazolés sont nommés inhibiteurs de déméthylase (DMI) et certains sont utilisés comme fongicides, dans la prévention ou le traitement de l'infestation par les moisissures, dans de nombreux domaines : protection des cultures, biocides dans les peintures, revêtements de bâtiments, pâte à papier, vêtements, bois. Ils ont le même mode d'action que les médicaments. Bien qu'ubiquitairement distribué et pathogène pour l'homme et certains animaux, *A. fumigatus* n'est pas considéré comme un phytopathogène, mais comme un simple saprophyte. Ainsi dans l'agriculture dite classique, les fongicides sont dirigés contre des champignons pathogènes des cultures comme *Mycosphaerella graminicola, Rynchosporium secalis, Slerotinia homeocarpa ou encore Colletotrichum graminicola*. Or certains de ces DMI, notamment ceux utilisés depuis le début des années 1990, possèdent également une activité croisée contre *A. fumigatus* et d'autres champignons initialement non ciblés. En effet, la modélisation structurale a montré qu'il existe une similarité moléculaire spatiale entre les triazolés médicaux et les DMI tels que le tébuconazole et le propiconazole (Snelders et al., 2012), (Figure 15). Comme pour les traitements médicaux, ces molécules agissent en bloquant le site actif de la 14-alpha-lanostérol-déméthylase (Cyp51). Ainsi une résistance crée dans l'environnement sous pression d'un DMI a pour effet d'induire des résistances croisées d' *A. fumigatus* aux médicament azolés.

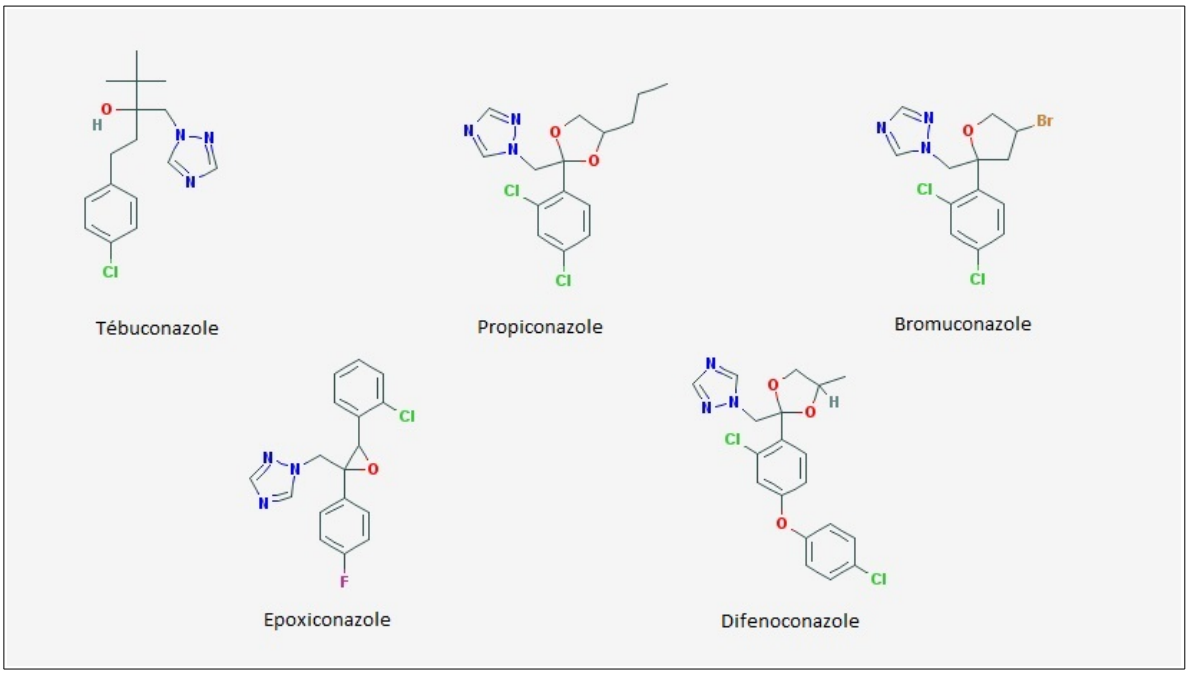


Figure 15: Exemples d'inhibiteurs de déméthylase non médicamenteux

Il est accepté que l'apparition des mécanismes de résistance aux traitements azolés

ne s'effectue que selon deux voies bien distinctes (Meis et al., 2016) . Bien que les caractéristiques cliniques de ces voies soient différentes (Tableau VII), les prérequis fondamentaux pour l'obtention d'une souche résistante sont les mêmes : toute situation associant un composé azolé avec *A. fumigatus* se reproduisant activement peut conférer une résistance aux composés azolés (Camps et al., 2012 ; Howard et al., 2013). Ces conditions sont présentes d'une part dans l'environnement et notamment dans l'agriculture où *A. fumigatus* est soumis à la pression d'inhibiteurs de déméthylase agricoles utilisés de manière généralisée (par exemple : prochloraze, epoxiconazole, tébuconazole…) ce qui a fait de cette voie la cause majeure de production de résistance au cours de la dernière décade (Snelders et al., 2008 ; Chowdhary et al., 2013), et d'autre part chez les patients atteints d'aspergillome ou d'APCC où le champignon exposé à des concentrations parfois sublétales d'azolés se multiplie activement de façon asexuée (Howard et al., 2009). Alors que la seconde voie n'est possible que chez des patients relativement rares, la première voie pose le problème du risque d'acquisition par tout patient d'une souche résistante *de novo* au traitement antifongique de première indication.

Voici quelques observations qui ont permis d'étayer ce constat :

- Certaines souches deviennent résistantes alors que les génotypes restent très proches au sein de mêmes patients traités (Dannaoui et al., 2001 ; Howard et al., 2009 ; Hagiwara et al., 2014).

- Certains patients sont porteurs de souches présentant des combinaisons de plusieurs mutations (ex : TR_{34}/L98H-S297-F495), laissant penser à l'acquisition d'une souche résistante avant la colonisation

- Pour un même patient, il n'est pas observé de souches sensibles aux azolés partageant le même génotype qu'une souche de type TR (ex : TR_{34}/L98H), alors que les patients porteurs d'une souche résistante avec un autre mécanisme présentent simultanément des souches sensibles avec un génotype identique. A ce jour, aucun cas de souche d'*A. fumigatus* ayant développé une mutation TR_{34}/L98H sous la pression d'un traitement médicamenteux antifongique n'a été retrouvé chez un patient (Verweij et al. 2007 ; Howard et al., 2006)

- Les patients porteurs de souches de type TR_{34} ou TR_{46} ont tendance à avoir été moins exposés aux azolés que ceux porteurs de souches présentant la substitution M220

- Une grande partie des patients porteurs de souches de type TR sont naïfs de

tout traitement médical azolés, (Verweij et al., 2007 ; V. D. Linden et al., 2013 ; Lavergne et al., 2017).

- Les mutations de type TR ont été retrouvées sur des prélèvements provenant de l'environnement , (Verweij et al., 2007 ; V. D. Linden et al., 2013 ; Alvarez-Moreno et al. 2017).

- La présence de fongicides dans les prélèvements de sol où ont été isolées des souches résistantes de type TR notamment (Alvarez-Moreno et al. 2017).

- Des souches résistantes de génotype indentique ont été retrouvées dans les prélèvements du patient et dans son domicile (Lavergne et al. 2017).

Tableau VII : Caractéristiques des résistances acquises par le patient et des résistances environnementales chez A. fumigatus, d'après Verweij et al. 2016 modifié

Résistance acquise par le patient	**Résistance environnementale**
Aspergillose pulmonaire chronique avec lésion cavitaire ou aspergillome	Toutes les maladies aspergillaires, aiguës, allergiques ou chroniques.
Antécédent de traitement azolé ou traitement en cours	Deux tiers des patients n'ont jamais reçu aucun traitement azolé
Échec clinique au traitement azolé	Échec clinique au traitement azolé
De multiple mutations entraînant une résistance peuvent être présentes sur un seul échantillon clinique	Seulement un seul mécanisme de résistance présent chez la plupart des patients
Présence de phénotypes à la fois sensibles et résistants présents simultanément en culture	Présence de phénotypes à la fois sensibles et résistants présents simultanément en culture
Phénotypes de résistance multi-azole ou pan-azole	Phénotypes de résistance multi-azole ou pan-azole
Mutations ponctuelles du gène cyp51A incluant les substitutions aux positions G54, P216, F219, M220, G138, Y431, et G448 Mécanismes de résistance non médiés par le cyp51A : HapE, mécanismes inconnus	Mutations situées sur le gène cyp51A en combinaison avec un activateur transcriptionnel (répétition en tandem) dans la région promotrice du gène : TR_{34}/L98H, TR_{53}, TR_{46}/Y121F/T289A (1)
Grande diversité génétique des isolats résistants aux azolés provenant de patients sans liens entre eux	Faible diversité génétique des isolats résistants aux azolés provenant de patients sans liens entre eux
Les colonies d'*A. fumigatus* peuvent montrer une morphologie anormale, une faible sporulation, une croissance réduite	Pas de coût de fitness apparent

(1) Récemment la présence de trois mutations ponctuelles (G54A, G54E et M220I) ont été observées dans l'environnement (Bader et al. 2015; Sharma et al. 2015)

Pour étayer ces observations, certaines équipes ont réussi à obtenir des souches présentant les même mutations que celles retrouvées chez les patients en faisant croître de l'*A. fumigatus* sous une pression fongicide . Ainsi il a été observé que certains d'entre eux (tébuconazole, propiconazole, epoxiconazole, hexaconazole, metconazole) engendraient des souches d'*A. fumigatus* résistants aux triazolés (Snelders et al., 2012 ; Ren et al., 2017 ; Cui et al., 2019).

4. Mécanismes de résistance chez *Aspergillus fumigatus*

Il existe de multiples mécanismes de résistance acquise aux azolés (Howard et al., 2011 ; Fraczek et al., 2013 ; Meneau et al., 2016), le plus commun étant l'altération du gène Cyp51A (Verweij et al., 2009 ; Chowdhary et al., 2014 ; Chowdhary et al., 2015). De plus, il est observé un risque élevé de résistance croisée entre les différents médicaments de la famille des azolés. En effet en 2009 il a été rapporté (S. J. Howard et al. 2009) que 74 et 65 % des isolats résistants à l'itraconazole avaient une résistance croisée respectivement au posaconazole et au voriconazole.

4.1. Substitution dans la protéine Cyp51

Situé sur le chromosome 4, le gène cyp51A code pour une 14 -α stérol déméthylase autrement nommée Cyp51A, ou ERG11 (Figure 11 , page 38). La Cyp51A utilise le fer comme co-facteur catalytique. La synthèse de cette enzyme est régulée grâce à une région promotrice située en amont du gène cyp51A (Figure 16).

Un certain nombre de mutations du gène cyp51A à des positions déterminées engendrent une résistance à un ou plusieurs azolés. Ces mutations ponctuelles entraînent, via l'altération de la 14-alpha-stérol-déméthylase, une modification conformationnelle des canaux qui permettent l'accès des médicaments azolés à l'hème et aux autres ligands importants pour l'ancrage, les empêchant ainsi de se fixer et donc d'exercer leur action antifongique (Snelders et al. 2010).

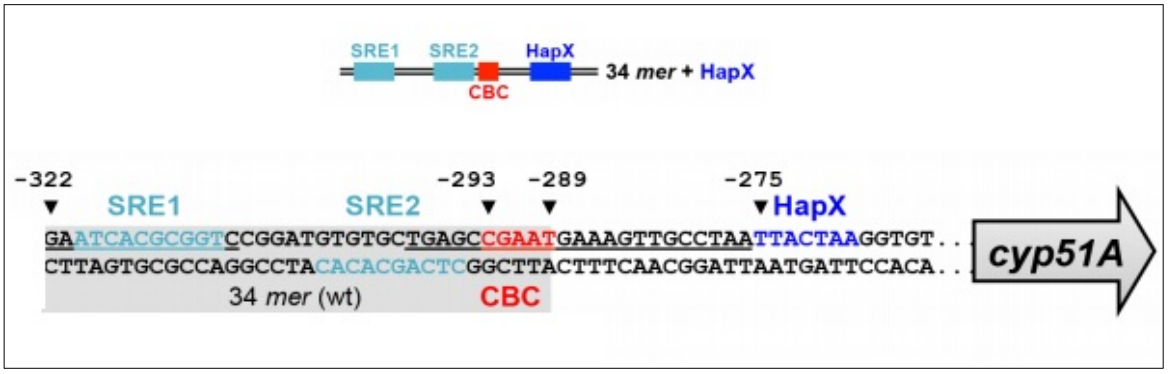


Figure 16 : Représentation schématique de la région promotrice du gène cyp51A, d'après Gsaller et al., 2016 modifié.

Au niveau des codons de ce gène, trois positions de substitution, sont plus fréquemment retrouvées et connues pour conférer de la résistance à un ou plusieurs azolés : G54(E/K/R/V/W), G138(C/R) et M220(K/I/T/V). Elles sont donc considérées comme des points chauds ou *hotspots* (Chowdhary et al., 2014). En effet ces 3 positions correspondraient à l'entrée de deux canaux de la Cyp51A qui permettent aux azolés d'avoir accès à l'hème (Figure 17, Snelders et al., 2010). Les mutations associées à un changement de la glycine 54 (G54) et 138 (G138) procurent une résistance croisée à ITZ et POS. Une mutation de la méthionine 220 (M220) induit des profils de sensibilité variés aux azolés (Chowdhary et al., 2017). Ces trois positions de substitution sont plus fréquemment rencontrées chez des patients aspergillaires chroniques ayant reçu un traitement prolongé par médicaments azolés.

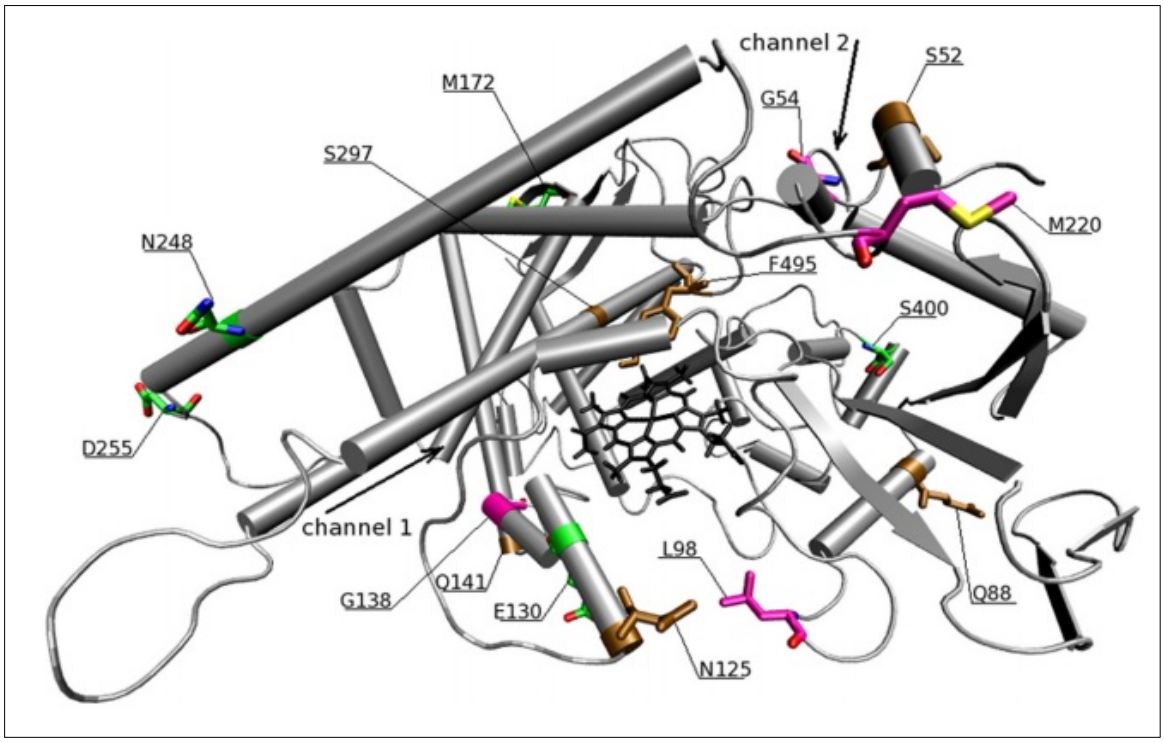


Figure 17 : Cartographie des mutations retrouvées dans le gène cyp51A d'A. fumigatus sur un modèle par homologie de Cyp51A, d'après Snelders et al., 2010

Les deux canaux d'accès du ligand sont indiqués par des flèches. En noir : l'hème cofacteur. En violet : les mutations corrélées avec une résistance. En marron : des mutations additionnellement retrouvées sur des souches résistantes. En vert : des mutations associées à des profils sensibles aux azolés.

De nombreuses autres substitutions moins fréquentes ont été observées seules sur des isolats résistants (liste non exhaustive) : P216L, F219C, F219I, A284T, H285Y, Y431C, G432S, G434C, G448S (Chowdhary et al., 2017 ; Paluch et al., 2019). Comme dit précédemment, ces mutations ponctuelles sont jusqu'à aujourd'hui quasi-exclusivement retrouvées sur des isolats cliniques de patients avec une histoire de

traitement azolé permettant de considérer ces mutations comme acquises par le patient ou *de novo* (Verweij et al., 2016). Cependant, quelques exceptions ont été observées :

- la substitution G54E, déjà observée plusieurs fois chez des patients sous traitement azolé (Camps et al., 2012), a été retrouvée chez un patient naïf de tout traitement (Leonardelli et al., 2017), et de nombreuses fois dans l'environnement (Sharma et al., 2015). Dans certains pays, cette mutation apparaît être comme le deuxième (Roumanie, Inde), voire le premier mécanisme de résistance (Tanzanie) retrouvé dans l'environnement (Sharma et al., 2015).

- la substitution G54A a été observée une fois dans l'environnement, mais pas encore chez un patient (Bader et al., 2015).

- la substitution M220I bien connue pour les isolats cliniques, a été retrouvée deux fois dans l'environnement (Bader et al., 2015).

L'observation de ce type de mutation dans l'environnement devrait augmenter du fait du nombre encore restreint à travers le monde d'études sur les souches environnementales.

Certains polymorphismes sont fréquemment rencontrés tels que F46Y, M172V, N248T, D255E et E427K présents seuls ou en combinaisons, et observés sur des isolats cliniques le plus souvent sensibles mais parfois avec une sensibilité aux azolés plus élevée qu'une souche sauvage, notamment lors de combinaisons à 5 (Susan et al., 2009 , Snelders et al., 2010 ; Rodriguez-Tudela et al., 2008 ; Chowdhary et al., 2017 ;.Garcia-Rubio et al., 2018). Ces acides aminés sont situés en périphérie de la protéine Cyp51A (Snelders et al., 2010), ce qui expliquerait l'impact moindre de ces mutations dans le phénotype de résistance. Ces mutations ont également été décrites chez des souches résistantes en Europe et aux USA.

A noter que le gène cyp51B peut fonctionner comme un cyp51A efficace chez *A. fumigatus*. Plusieurs substitutions ont été observées chez des souches résistantes à l'itraconazole : S177F, S505P, F59L, Q24L, D387E (Ferreira et al., 2005). Mais l'implication des mutations dans la résistance demeure non prouvée. Ni cyp51A, ni cyp51B ne sont individuellement indispensables pour la croissance d'*A. fumigatus*, mais la tentative d'inactivation des deux gènes est létale.

4.2. Répétitions en tandem et substitutions associées sur cyp51A

Il s'agit de répétitions en tandem d'une séquence d'acides aminés contenant une

séquence de 34 pb dans la région promotrice du cyp51A. Ces répétitions nommées TR pour *tandem repeat* sont parfois associées à d'autres substitutions sur le gène cyp51A comme le couple TR_{34}/L98H (Snelders et al., 2010), ou TR_{46}/Y121F/T289A (Vermeulen et al., 2012). Le doublement ou plus de cette zone à dominance activatrice (Gsaller et al., 2016) entraîne une augmentation de la production de Cyp51A. En effet chez les souches présentant ces deux altérations combinées, il a été observé une expression du gène Cyp51A multipliée par 8 par rapport aux souches sensibles aux triazolés. Il s'ensuit une élévation des CMI des triazolés (itraconazole, tébuconazole, ravuconazole, posaconazole) (Snelders et al., 2008 ; Mellado et al., 2007).

3 types de répétitions de 34 pb ont été observés plusieurs fois et étudiés (Figure 18), un dernier type plus récent n'a été observé qu'une seule fois :

- TR_{34}/L98H est de loin la plus fréquente. Un profil variant, TR_{34}/L98H/S297T/F495I, a été de nombreuses fois retrouvé. Il est notamment prédominant en Asie du Sud-Est (Chine, Taïwan. Corée) (Lockhart et al., 2011 ; Liu et al., 2015 ; Hagiwara, 2018).

- TR_{46}/Y121F/M172I, observé sur des isolats cliniques et environnementaux, ce génotype est caractérisé par une une CMI souvent très élevée au voriconazole avec des CMI variables à l'itraconazole et au posaconazole (V. D. Linden et al., 2013 ; Alvarez-Moreno et al., 2017). En 2014, une souche clinique retrouvée chez un patient pulmonaire chronique naïf de tout traitement azolé révèle une mutation Y121F isolée avec un phénotype sensible au fluconazole et au posaconazole et une CMI ≥ 2µg/mL pour le voriconazole. Cette souche semble être un intermédiaire entre une souche sauvage et une souche de type TR_{46} (Lescar et al. 2014). Des variants de cette altération existent Le génotype TR_{46}^{3} est découvert pour la première fois à partir de 2012 sur 3 isolats cliniques originaires des Pays-BAS provenant à chaque fois d'une colonisation à *Aspergillus* et sur du compost exposé à des fongicides azolés en 2017 (Zhang et al., 2017). De plus, en 2012, une souche mutante $TR46^{4}$/Y121F/M172I/T289A/G448S est observée sur un isolat clinique dont l'impact pathogène n'a pas été démontré.

- de manière exceptionnelle est retrouvé chez l'être humain (Hodiamont et al., 2009) ou dans l'environnement (Alvarez-Moreno et al., 2017), le TR_{53}.

- TR_{120}, observé une seule fois, isolé à partir d'un patient sous traitement antifongique depuis plusieurs années (Hare et al., 2019).

L'expression accrue de cyp51A dans les souches contenant TR_{34}, TR_{46} ou TR_{53} est le résultat d'une activité augmentée de SrbA résultant de la duplication de ses sites de liaison consensus et d'un manque de CBC et de répression CBC/HapX. La régulation positive de cyp51A par la famille des TR résulterait d'une duplication efficace des sites de liaison de SrbA en combinaison avec une duplication inefficace du site CBC (Gsaller et al., 2016).

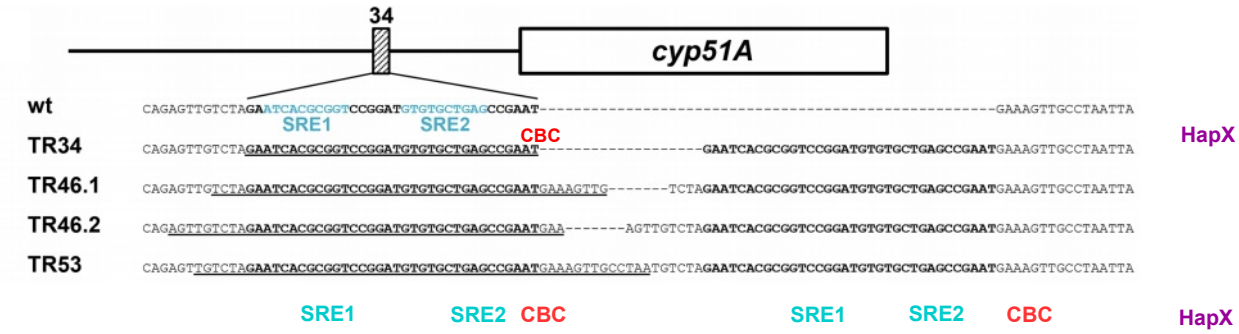


Figure 18 : Alignement des séquences TR34, TR46.1, TR46.2 et TR53. La région de 34 pb est dupliquée dans tous les variants TR , d'après (Gsaller et al. 2016) modifié.

Il existe plusieurs types de substitutions rencontrées en association avec les différentes répétitions en tandem de la région promotrice du gène cyp51A : celles rencontrées de manière permanente qui sont indispensables à l'obtention d'un phénotype résistant, et celles qui sont facultatives, pouvant modifier le phénotype de résistance habituellement observé.

L'acide aminé leucine du codon 98 de la Cyp51A est hautement conservé et important pour le maintien de la structure de la protéine Cyp51A et est essentiel à l'ancrage des azolés (Snelders et al., 2011). Une substitution L98H augmente la tolérance aux azolés en changeant la structure tertiaire de Cyp51A sans en impacter son activité biologique. Si la substitution L98H est associée à une répétition TR_{34}, alors la souche développe une résistance aux azolés (Mellado et al., 2007).

La modification de la tyrosine (Y) 121 en phénylalanine (F) perturbe le réseau d'interaction qui assure la présence et le maintien du voriconazole au contact de l'hème de la Cyp51A. La Y121 serait normalement liée par une liaison halogène au noyau pyrimidine du voriconazole, absent du posaconazole et de l'itraconazole, ainsi la substitution Y121F entraîne un phénotype résistant au voriconazole, mais aurait un faible impact sur l'itraconazole et le posaconazole (Lescar et al., 2014).

4.3. Pompes à efflux

Ce mécanisme permet à la cellule fongique de réduire rapidement sa concentration intracellulaire d'ATF en évacuant la molécule azolée à l'extérieur de la cellule et donc de diminuer l'efficacité de ce dernier. Il passe par la surexpression constitutionnelle ou induite par le traitement appliqué, de gènes permettant la production de protéines membranaires variées nommées transporteurs qui ont la capacité de médier l'efflux de composés toxiques. Les pompes impliquées dans le transport des azolés appartiennent à deux grandes familles : les transporteurs ABC (*ATP Binding Cassette*), et les transporteurs MFS (*Major Facilitator Superfamily*). Caractérisé pour *Aspergillus* dans de nombreuses études à partir de la fin du siècle dernier (Tobin et al., 1997 ; Del Sorbo et al., 1997 ; Denning et al., 1997 ; Manavathu et al., 1999), ce mécanisme qui reste partiellement non élucidé est moins répertorié que les mutations cyp51. Or, il se révèle aujourd'hui être impliqué dans la résistance de nombreuses souches cliniques.

4.3.1. Surexpression de la protéine Cdr1B

Le gène cdr1B/abcB code pour un transporteur ABC nommé Cdr1B ou AbcB. Ce transporteur a un rôle majeur chez *A. fumigatus* dans la tolérance aux azolés. En outre, la délétion de cdr1B entraîne une sensibilité accrue d'*A. fumigatus* aux azolés (Paul et al., 2013). Des isolats cliniques, avec une surexpression constitutionnelle de Cdr1B ont révélé un phénotype résistant aux azolés (Fraczek et al., 2013). Bien que l'expression de cdr1B soit dépendante entre autre d'un facteur de transcription récemment exploré, AtrR (Hagiwara et al., 2017), le mécanisme de surexpression reste encore inexpliqué. Les patients pour lesquels les renseignements étaient disponibles ont préalablement reçu des traitements azolés (Fraczek et al., 2013). Dans ces isolats cliniques, le voriconazole, et non l'itraconazole, était capable d'induire une augmentation de l'expression de cdr1B (Paul et al., 2013).

4.3.2. Surexpression de la protéine AtrF

Le gène atrF code chez *A. fumigatus* pour un transporteur ABC nommé AtrF. Une surexpression d'AtrF induite par la présence d'itraconazole a été observée sur un isolat clinique résistant issu d'un crachat d'un patient traité pour une aspergillose péricardique (Slaven et al. 2002). Une autre étude plus récente corrobore l'implication d'AtrF dans la sensibilité aux azolés (Meneau et al. 2016).

4.4. Autres mécanismes

En 2008 l'équipe de Cramer et en 2016 celle de Bromley font de grandes avancées dans la compréhension du fonctionnement de la région promotrice du cyp51A. Celle-ci se compose d'une région réceptrice de HapX précédée par une région de 34 pb.

Cette dernière est composée de deux régions réceptrices SRE1 et SRE2 liant le SREBP nommé SrbA chez *Aspergillus*, et d'une région CCAGT liant le CBC. Chez *A. fumigatus*, la protéine SrbA est un régulateur transcriptionnel à action positive directe de la biosynthèse des stérols en général et de la Cyp51A, et joue un rôle crucial dans la tolérance aux azolés (Willger et al., 2008 ; Gsaller et al., 2016). Le CBC, *CCAAT-Binding Complex*, est un facteur de transcription qui a un rôle critique dans la croissance et la virulence d'*A. fumigatus*. Il est composé d'un "cœur" comprenant 3 sous-unités (HapB, HapC et HapE) qui interagit étroitement avec une sous-unité "annexe" (HapX). Le "cœur" du CBC reconnaît spécifiquement les motifs consensuels CCAAT et CGAAT présents dans les régions promotrices de nombreux gènes eucaryotes, et forme un complexe de liaison associé avec HapX qui joue entre autres un rôle dans la régulation négative de l'expression de plusieurs gènes de la voie de synthèse de l'ergostérol incluant cyp51B, erg13B, erg7B et notamment cyp51A (Gsaller et al., 2016). HapX est un régulateur de transcription notamment associé à l'adaptation au fer environnemental, qui va reconnaître une région promotrice juste à côté des 34 pb.

Dans les isolats sauvages, les homodimères SrbA se lient à SRE1 et SRE2, activant ainsi l'expression de cyp51A. Le CBC est en concurrence avec la liaison de SrbA aux 34 pb et inhibe donc l'expression de cyp51A. Dans les isolats résistants, porteurs du duplicata de 34 pb (TR_{34}), les deux SRE sont dupliqués alors que seul le motif CGAAT situé à l'extrémité 3 'des 34 pb est effectivement lié par le CBC (Figure 16, page 55).

La perte du CBC entraîne une régulation à la hausse des gènes impliqués dans plusieurs étapes de la voie de synthèse de l'ergostérol. Cela se traduit par une résistance aux inhibiteurs de la biosynthèse de l'ergostérol appartenant aux classes de médicaments azolés, allylamines et statines (Gsaller et al., 2016). Cependant, ces mutations ont montré une réduction sévère de la croissance et de la virulence d'*A. fumigatus* sur modèle murin.

Le gène *hapE* code pour la sous-unité HapE du CBC. Une substitution P88L de HapE, retrouvée sur un isolat clinique résistant aux azolés d'un patient atteint de granulomatose chronique (Arendrup et al., 2010), entraîne une perte de fonction du CBC modifié qui le rend incapable de se lier correctement à la région promotrice du cyp51A. La compétition du CBC avec SrbA étant perturbée en faveur du SrbA, ceci conduit *in fine* à l'expression accrue du gène cyp51A (Camps et al., 2012 ; Gsaller et al., 2016). Le patient avait ici reçu 160 semaines de voriconazole puis 35 semaines de posaconazole avant l'isolement de cette souche. Cette mutation entraîne aussi une nette atténuation de la virulence d'*A. fumigatus*.

Hmg1 est une HMG-CoA réductase qui catalyse la réduction de HMG-CoA en acide mévalonique. Cette réaction est l'étape cinétiquement déterminante de la biosynthèse des stérols chez les Eucaryotes (Brown et al., 1973) et contrôle ainsi la synthèse de l'ergostérol chez *A. fumigatus*. Plusieurs isolats cliniques de plusieurs patients au Japon ont présenté une résistance globale aux triazolés non médiée par le cyp51A. Des substitutions non silencieuses en position 269, qui correspond au début du domaine de détection des stérols de Hmg1 ont été identifiées (Figure 19). Une substitution S269F ou S269Y semblerait affecter l'efficacité de la biosynthèse de l'ergostérol. En effet cette mutation (S269F/Y) engrainerait une suraccumulation d'ergostérol cellulaire. De plus, il a été observé que la sensibilité *in vitro* aux polyènes de ces isolats mutés était accrue (Hagiwara et al., 2018).

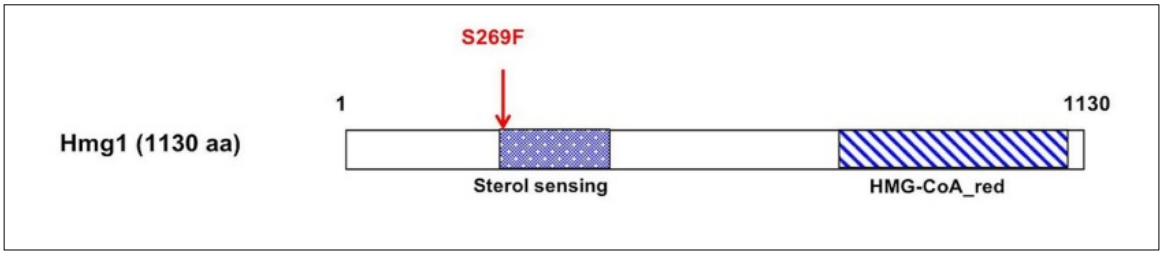


Figure 19 : Site de mutation de Hmg1, modifié d'après Hagiwara et al., 2018

La flèche indique le site de mutation ; Sterol sensing : domaine de détection des stérols ; HMG-CoA_red : domaine de l'HMG-CoA réductase

En 2011, chez un patient suivi pour APC avec deux aspergillomes qui présentaient de nombreux isolats d'*A. fumigatus* multirésistants, l'isolat avec la plus grande expression du cyp51A présentait un transposon nommé Aft1 placé 370 pb en amont du codon de départ (Albarrag et al., 2011). Ce cas unique jusqu'à présent chez qui le rôle du transposon n'est pas clairement établi, illustre la variété de mécanismes à disposition du champignon pour répondre aux azolés.

Au total, les mécanismes de résistance observés pour *A. fumigatus* sont les mêmes que ceux qui ont été préalablement observés par exemple pour *C. albicans* ou *S. cerevisiae*. Ainsi en regardant ce qui a déjà été trouvé pour ces levures, on peut envisager que d'autres mécanismes de résistance comme l'aneuploïdie ou la formation d'isochromosome puissent être retrouvés aussi chez *A. fumigatus* (Selmecki et al., 2006).

5. Résistance aux azolés parmi d'autres sections du genre d'*Aspergillus*

Au sein même d'autres sections taxonomiques pathogènes pour l'homme, il est

régulièrement observé des résistances acquises aux traitements azolés. Ce phénomène a été observé chez *A. niger, A. terreus, A. flavus, A. sydowii, A. nidulans, A. versicolor* (Gomez-Lopez et al., 2003).

6. Cartographie des résistances

La découverte des premières résistances aux azolés n'a pas eu un effet immédiat sur la recherche de la prévalence des souches d'*A. fumigatus* résistants. La recherche systématique dans les laboratoires de la sensibilité d'*A. fumigatus* aux azolés étant rare durant cette période, il faut en effet attendre le début des années 2000 pour voir apparaître les premières études sur la sensibilité aux azolés, et les années 2010 pour que les grandes cohortes de cas cliniques et de prélèvements environnementaux sortent. Aujourd'hui ces 20 ans de recherche à travers le monde mettent en évidence le caractère mondial du problème (Figure 20 ; Rivero-Menendez et al. 2016).

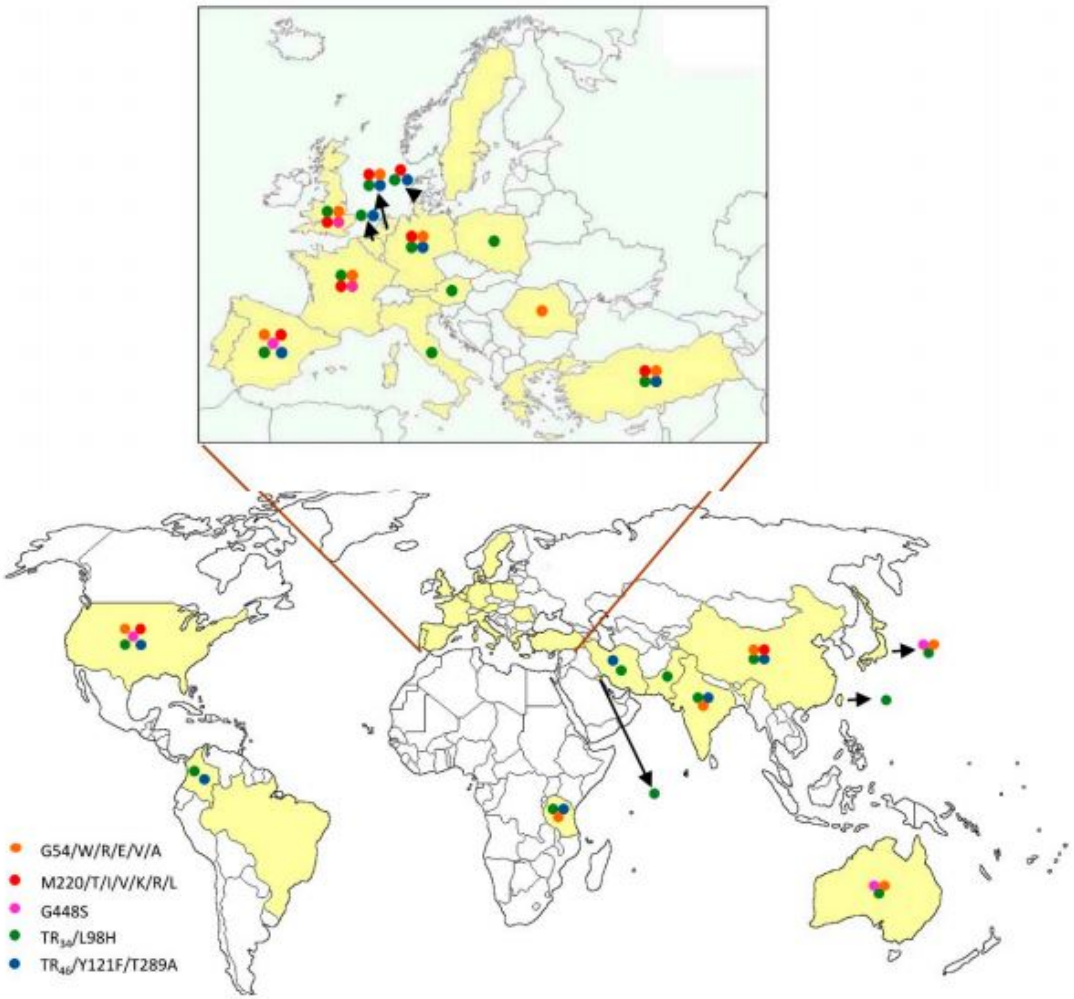


Figure 20 : Distribution mondiale de la résistance aux azolés par mécanisme chez Aspergillus fumigatus

En plus du caractère globalisé, ces différentes études montrent que l'altération TR_{34}/L98H est le mécanisme dominant de résistance retrouvé dans l'environnement avec très souvent plus de 80% de souches résistantes porteuses de l'altération. De plus le taux de résistance varie bien évidemment à travers le monde mais aussi à l'échelle des pays montrant de réelles différences loco-régionales intéressantes à analyser Tableau VIII.

Tableau VIII : Etudes portant sur la recherche de résistance aux azolés sur des souches environnementales d'Aspergillus fumigatus (liste non exhaustive)

Pays	Nombre d'échan-tillons testé	%d'échanti-llon avec un *A. fumigatus* résistant	% d'*A. fumigatus* résistant parmi *A. Fumigati*	% de souche résistante avec la mutation TR_{34}/L98H	Autre mutation du cyp51 retrouvée	Sources
Europe						
Allemagne	455	12,1	NC	82	TR_{46}, G54A, M220I	Bader et al. 2015
Danemark	239	0	0	0		Astvad et al. 2014
France	NC	NC	NC	87,5	TR_{46}	Rocchi et al. 2018
(Ext et int hôpital)	3885	0	0/388	0	aucune	Loeffert et al. 2018
Italie	177	16,9	NC	97	G54E	Prigitano et al. 2018
	84	4,7	80	75	aucune	Trovato et al. 2018
Pays-Bas (extérieurs hôpital)	79	19	NC	87	NC	Snelders et al. 2009
Royaume-Uni	671	4,47	6	97	TR_{46}	Tsitsopoulou et al. 2018
Suisse	150 A. f.	NC	24	NR	NR	I. Meneau et al. 2005
	64	9,4	NC	83 I*	G54R	Riat et al. 2018
Amérique						
Colombie	86	9,3	NC	5	TR_{46}, TR_{53}	Alvarez-Moreno et al. 2017
Asie						
Chine	144	2,1	NC	33	TR_{46}	Ren et al. 2017
Inde	488	4,9	11,9	100 I*	aucune	Chowdhary et al. 2012
Iran	45 A. f.	NR	15,6	0	aucune	Zarrin et al. 2018
	108	3,7	12,9	50	aucune	Vaezi et al. 2018
Intra-hospitalier	170	0	0	0	aucune	(Mohammadi et al. 2018)
Océanie						
Australie	185 A. f.	0	0	0	aucune	Talbot et al. 2018

7. Paramètres influençant la prévalence de la résistance chez les patients

7.1. Variations dans le temps

Dans la première décade du 21ème siècle, aux Pays-bas (Figure 21) tout d'abord puis en Norvège, au Royaume-Uni (Figure 14, page 51), en France, en Espagne,

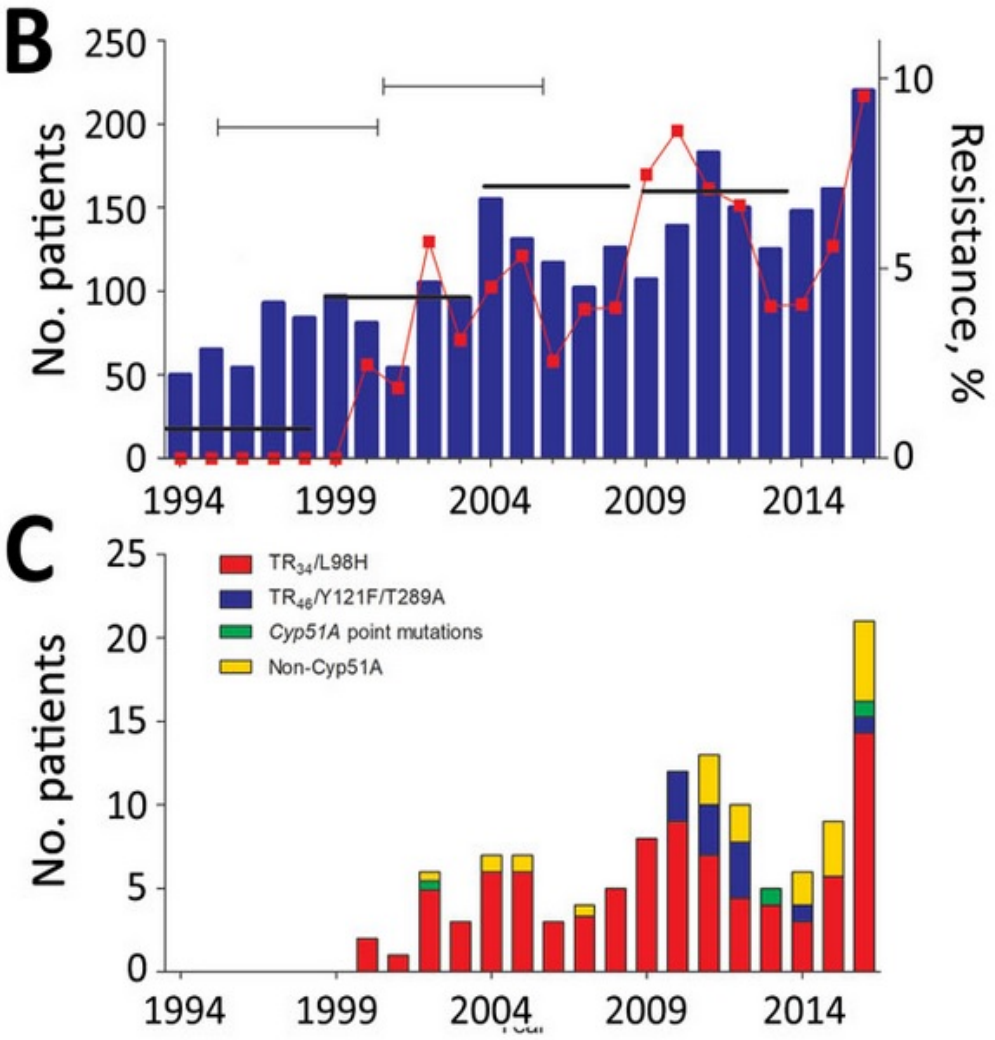


Figure 21 : Evolution du nombre de patients porteurs de souches d'A. fumigatus résistantes aux azolés au sein de l'hôpital de Nijmegen de 1994 à 2016, d'après Buil et al. 2019

B) Proportion de résistance (courbe rouge) ajustée en fonction du nombre de patients. Les barres noires horizontales indiquent la moyenne sur 5 ans de la proportion ajustée de patients porteur d'une souche résistante. $p<0,05$. C) Mécanismes de résistance retrouvés sur les souches d'*A. fumigatus* résistantes.

dans le reste de l'Europe et dans le monde, il est observé une prévalence accrue d'isolats cliniques d'*A. fumigatus* résistants (Howard et al., 2009 ; Snelders et al., 2008 ; Bueid et al., 2010).

7.2. Variations selon la localisation géographique

Une revue de la littérature de Vermeulen en 2013 montre que selon les régions, le taux global de prévalence de la résistance varie entre 0,6 et 27,8% selon les études (Vermeulen et al., 2013). Une autre étude, prospective de 2009 à 2011 multicentrique portant sur 3788 *Aspergillus Section Fumigati* dans 19 pays avec 18 centres européens et 4 centres non-européens montrent une prévalence moyenne de 3,2% de résistance étalée de 0 à 26,1% selon les centres avec 46 *A. fumigatus stricto sensu* sur les 60 souches résistantes (Van der Linden et al., 2015).

7.3. Variations selon les manifestations cliniques des populations observées

En France, pays ou la prévalence de la résistance semble relativement faible, il a été observé que la prévalence de la résistance aux azolés d'isolats cliniques d'*A. fumigatus* dépend aussi des conditions cliniques sous-jacentes : 1,1 % des isolats de patients d'hématologie à Paris (Alanio et al., 2011), 1,5% des isolats retrouvés chez des patients immunodéprimés lors d'AI probable ou pouvée (Alanio et al., 2016), des 1,8% chez des patients non sélectionnés, 8 et 12,2% des isolats de patients atteints de mucoviscidose respectivement à Nantes (Morio et al., 2012) et à Rennes (Guegan et al., 2018). En Angleterre, la prévalence monte à 13,3% pour les patients d'un centre cardio-thoracique de Londres culminant à 16,3% de résistance parmi les isolats de patients atteints de mucoviscidose (Abdolrasouli et al., 2018), alors que toujours à Londres dans une population hospitalière variée, la prévalence récente est observée à 2,2% (Abdolrasouli et al., 2018). Au Pays-Bas, une étude prospective multicentrique observe une résistance à 7,1% chez les patients atteints de mucoviscidose (Engel et al., 2018). Ces données montrent entre autre que les patients avec une pathologie pulmonaire chronique sont plus à risque d'être colonisés ou infectés par un *A. fumigatus* résistant comparé à une population mixée de patients.

7.4. Variations selon la technique de recherche de résistance

Le diagnostic microbiologique d'aspergillose est limité par un rendement pauvre de la culture menant à une incertitude sur la fréquence des résistances aux azolés. En effet, la très faible charge fongique responsable d'une infection peu empêcher la culture et la détection par la voie classique de la résistance aux azolés. C'est ce qui a été montré en recherchant la résistance après culture, ou directement par PCR (réduite à cyp51A) à partir du prélèvement (ici des LBA et crachats) chez des

patients atteints d'ABPA ou d'APC. La taille des échantillons ne permet pas de conclure sur une différence de prévalence de la résistance entre la culture positive et la PCR directe positive (50% vs 55,1%). Seulement la meilleure sensibilité de la PCR (0% vs 78,9% pour l'ABPA et 16,7% vs 71,4% pour l'APC) permet de dépister de nombreuses résistances supplémentaires (Denning et al., 2011).

CHAPITRE II.

MATÉRIELS ET MÉTHODES

I - Cadre de l'étude

Entre le 1er juin 2012 et le 31 mai 2013, tous les prélèvements cliniques respiratoires et profonds du CHU de Nantes, revenant positifs en culture à *Aspergillus Section Fumigati* au laboratoire de parasitologie/mycologie ont été inclus dans l'étude. L'étude est rétrospective de juin 2012 à août 2012 puis prospective de septembre 2012 à mai 2013.

Chaque isolat clinique se voit attribuer un numéro d'anonymat commençant par "S" pour souche suivi du nombre correspondant au rang chronologique d'inclusion dans l'étude. Chaque nouveau patient pour lequel un isolat est inclus, se voit attribuer un numéro d"anonymat commençant par "P" pour patient suivi du nombre correspondant au rang chronologique d'inclusion dans l'étude.

1. Prise en charge des isolats cliniques

Chaque isolat clinique est récupéré à partir de la souche de conservation qui a été établie à partir d'une colonie sur la culture initiale du prélèvement après identification morphologique de *Aspergillus Section Fumigati*. Après repiquage sur milieu Sabouraud et incubation 2 à 5 jours à 35°C, la souche est utilisée pour tester l'itraconazole (médicament antifongique) et le tébuconazole (fongicide phytosanitaire). Si la croissance de cette souche est macroscopiquement atypique, un montage entre lame et lamelle avec du bleu lactophénol est effectué afin de contrôler microscopiquement l'espèce.

2. Recueil de données à visée épidémiologique

Les informations concernant le prélèvement sur lequel a été isolé la souche sont recueillies sur le logiciel du laboratoire, DxLab. Les informations relatives au patient dont est issu le prélèvement sont recherchées et recueillies quand elles étaient présentes sur le logiciel clinique, Clinicom. Les statistiques sur les données recueillies sont effectuées avec le logiciel BiostaTGV. Les données de géolocalisation sont exploitées avec le logiciel E-space via le système géodésique 84 (WGS84).

II - Antifongigramme avec la méthode de référence EUCAST

La résistance aux azolés est dépistée en effectuant un antifongigramme pour chaque souche incluse en testant deux molécules, l'itraconazole et le tébuconazole. Les CMI de l'itraconazole et du tébuconazole sont déterminées selon la méthode de référence par microdilution du protocole E.DEF 9.1 de l'EUCAST (EUCAST, 2008).

1. Préparation des plaques EUCAST

Pour les constituer sont utilisées les molécules antifongiques (itraconazole et tébuconazole), le 3-(N-morpholino) propanesulfonic acid (MOPS), le Roswell Park Memorial Institute medium (RPMI), et le diméthylsulfoxyde (DMSO), (Sigma Aldrich, France).

1.1. Préparation du milieu

17,26 g de MOPS (0,165 M) et 10 g de Glucose (2%) sont pesés, puis déposés dans un bécher de 300 mL. A cela sont ajoutés 250 mL de RPMI 1640 sans bicarbonate. Ensuite, le pH est ajusté à 7. Enfin, la solution est stérilisée sur un filtre de 0,22 µM grâce à un Stericup®. Le milieu ainsi préparé est conservé à 4°C.

1.2. Préparation des solutions stocks de chaque molécule azolée

La molécule est dissoute dans du DMSO, pour obtenir une solution stock à 1600 µg/mL. Ces solutions peuvent être conservées durant 6 mois, à -80°C. Des dilutions des solutions stocks sont ensuite réalisées dans du DMSO selon le protocole de l'EUCAST .

1.3. Préparation de plaques : dépôt de la molécule

100 µL de concentration croissante de raison 2 d'itraconazole allant de 0,0625 à 2 mg/L et de tébuconazole allant de 0,5 à 8 mg/L, sont déposés par puits dans la plaque. La colonnes 1 sert de témoin négatif. Afin de les conserver (durant 6 mois), les plaques sont emballées dans du papier aluminium et congelées à -80°C.

2. Préparation de l'inoculum.

Une suspension de spores est préparée à partir de cultures d'*A. Section Fumigati* de 2 à 5 jours, ayant poussé sur milieu Sabouraud. De l'eau physiologique stérile avec 0,1% de Tween 20 déposée dans les tubes de culture contenant les différentes souches de champignons. Chaque tube est doucement agité, pour décoller les

spores. Le liquide déposé dans chaque tube est ensuite prélevé avec une pipette stérile, pour ainsi obtenir la suspension mère. Les spores sont alors comptées à la cellule de Malassez. A partir du comptage, la concentration de chaque suspension mère peut être déterminée en Unité Formant Colonie (UFC)/mL. En vue d'obtenir une suspension à 2-5.10^5 UFC/mL pour une concentration finale sur plaque de 1-2,5.10^5 UFC/mL, une dilution appropriée doit être réalisée à partir de ces suspensions mères dans du RPMI .

3. Inoculation des plaques

A partir de la suspension à 2-5.10^5 UFC/mL, 100 µL par puits sont inoculés, des colonnes 2 à 12 d'une plaque. Dans la première colonne, 100 µL de RPMI sont déposés. Les plaques sont incubées en atmosphère humide à 35°C pendant 48 heures.

4. Lecture des résultats

La plaque est déposée sur un support équipé d'un miroir grossissant. Des scores allant de 0 à 4 sont attribués à chaque puit correspondant à la pousse centrale, c'est-à-dire sous ATF, 0 signifiant qu'il n'y a pas de pousse de champignon, et 4 indiquant que la pousse du champignon est totale (uniforme dispersée dans tout le puits). Il est alors recherché la Concentration d'Inhibition à 100%, CI_{100}, c'est-à-dire la première cupule dans laquelle il n'y a pas eu de pousse. Les isolats présentant une CMI à l'itraconazole strictement supérieure à 2 mg/L sont considérés résistants (EUCAST 2012).

III - Identification de l'espèce des souches résistantes et analyse du cyp51A par biologie moléculaire

La détermination taxonomique de chacun des isolats est réalisée par analyse phénotypique macro et microscopique et se limite donc au rang taxonomique de Section. Afin de préciser l'espèce à son dernier rang taxonomique, une amplification et un séquençage du gène de la β-tubuline est réalisé (Balajee et al., 2005). De plus, pour étudier l'éventuelle origine de la résistance, l'amplification et le séquençage du gène cyp51A et de sa région promotrice sont réalisés.

1. Extraction d'ADN fongique

L'extraction d'ADN fongique est ici effectuée à l'aide du kit NucleoSpin® Tissue (Macherey-Nagel, Düren, Allemagne) à partir d'un repiquage récent de la souche étudiée placé 2 à 5 jours en étuve à 30°C.

1.1. Etape de lyse mécanique

Dans un tube contenant des billes de céramique (Roche) sont ajoutés 220µL de tampon T1 du kit. A l'aide d'une anse microbiologique sont prélevés des spores et/ou du mycelium de la souche pour inoculer les billes. Le tube est ensuite placé dans l'instrument MagNA-Lyser (Roche, Meylan, France) avec une agitation de 6500tr/min pendant 35 secondes.

1.2. Etape d'extraction

Le culot est transféré dans un tube eppendorf et le protocole suivant est appliqué. Ajout de 25µL de protéinase K, puis vortex. Incubation à 56°C pendant 1 à 3h puis vortex. Ajout de 200µL de buffer B3, vortex et incuber 10 minutes à 70°C et vortex. Ajout de 210µL d'éthanol (96-100%) et vortex. Transfert sur la colonne avec un tube collecteur de 2mL et centrifugation 1 minute à plus de 10000 rpm et jet du tube collecteur. Transfert de la colonne sur un nouveau tube collecteur et ajout de 500µL de Buffer BW. Centrifugation 1 minute à plus de 10000 rpm et jet du tube collecteur. Transfert de la colonne sur un nouveau tube collecteur et ajout de 600µL de Buffer B5. Centrifugation deux fois 1 minute à plus de 10000 rpm en changeant de tube collecteur au milieu. Placement de la colonne sur un tube de 1,5mL, ajout de 100µL de Buffer BE (à 70°C) et incubation 1 minute à température ambiante. Dernière centrifugation 1min à plus de 10000 rpm pour éluer l'ADN dans l'eppendorf.

2. Amplification d'ADN fongique

2.1. Préparation des mix

Dans la salle pré-PCR sur une paillasse dite propre, les mix sont préparés pour une amplification génique par PCR de 6 séquences cibles : une pour la β tubuline, une pour la région promotrice du cyp51A qui comprend la zone Tandem Repeat et 4 séquences qui se recouvrent pour séquencer entièrement le gène cyp51A (Tableau IX).

Tableau IX : Amorces utilisées pour le séquençage

Cible	Amorce	Séquence	Référence des Amorces
β-Tubuline	βTub1	5'-AATTGGTGCCGCTTTCTGG-3'	Balajee et al. ASM 2005
	βTub2	5'-AGTTGTCGGGACGGAATAG-3'	
Cyp51A Segment1	AF306F	5'-CACTGCAACTCTAATCCTCG-3'	Alanio et al. JAC 2010
	AF855R	5'-TAACGCAGACTGAGTCAAGC-3'	
Cyp51A Segment2	AF766F	5'-TTCGGATCGGACGTGGTGTA-3'	
	AF1330R	5'-CGCTGATGGACGAAGACGAA-3'	
Cyp51A Segment3	AF1179F	5'-TGACGGTGACAAGGACTCTC-3'	
	AF1709R	5'-ACAACCTCGTCGTTCTCCTG-3'	
Cyp51A Segment4	AF1426F	5'-AGTCTTCCTCCGCTCCAGTA-3'	
	AF2025R	5'-ACACCTATTCCGATCACACC-3'	
Région du Tandem Repeat	AFTR-F	5'-TAATCGCAGCACCACTTCAG-3'	Amorces design "maison"
	AFTR-R	5'-GCCTAGGACAAGGACGAATG-3'	

Pour chaque séquence amplifiée le mix préparé est composé de 25µL d'eau pour préparation injectable (24µL pour la β-tubuline), 10µL de Tampon 5X, 4µL de MgCl2 à 2mM, 2,5µL à 0,5µM des deux amorces entourant la zone cible, 2µL à 0,2mM de mélange des quatre désoxyribonucléotides dATP, dCTP, dGTP et dTTP et 0,3µL à 0,03U/µL d'ADN polymérase Taq (FlexiTaq, Promega).

2.2. Amplification de l'ADN par PCR et séquençage

En utilisant les mix préparés ci-dessus, chaque souche confirmée résistante (n=10) a vu ses 6 séquences cibles amplifiées à l'aide d'un thermocylceur. La présence d'une amplification est confirmé par électrophorèse en gel d'agarose. Les amplicons sont ensuite séquencés et les séquences obtenues sont comparées avec celles disponibles sur la banque de donnée GenBank (programme Blast).

CHAPITRE III.

RÉSULTATS ET DISCUSSION

L'étude réalisée portant sur tous les prélèvements hors recherche de dermatophyte mis en culture au laboratoire de Mycologie (dont 2545 prélèvements respiratoires) du CHU de Nantes de manière rétrospective du premier juin à fin octobre 2012 et ensuite de manière prospective de début novembre 2012 au 31 mai 2013 a permis de colliger 350 souches d'*Aspergillus Section Fumigati.* Ces 350 isolats concernent 256 patients.

14 isolats ont du être retirés de l'étude pour les raisons suivantes : 10 isolats n'ont pas repoussé lors de la mise en culture pour étudier leur sensibilité aux antifongiques, 2 souches étaient contaminées par une autre moisissure, une souche a été considérée comme de la contamination et une dernière n'a pas été retrouvée.

Au total, 336 isolats d'*Aspergillus* au morphotype d'*Aspergillus fumigatus* ont été inclus dans l'étude, ce qui concerne 248 patients.

Il est probable que certains de ces isolats ne soient pas de l'*Aspergillus fumigatus* stricto sensu mais une espèce dite cryptique comme il l'a été décrit dans 0 à 15% des aspergilloses (Alanio et al. 2011 ; V. D. Linden et al. 2011 ; Vidal-Acuña et al. 2018 ; Pinto et al. 2018 ; Howard 2014). Seules les souches résistantes bénéficieront d'une identification moléculaire au rang de l'espèce et toutes ont été identifiées comme de l'*Aspergillus fumigatus* stricto sensu. Ainsi la présence de ce biais de recrutement définit notre prévalence de la résistance comme étant celle d'*Aspergillus Section Fumigati* et pourrait légèrement sous-évaluer la prévalence de la résistance d'*Aspergillus fumigatus* stricto sensu.

Au cours de l'étude, les 244 dossiers médicaux de patients ont pu être consultés à partir des logiciels cliniques Clinicom et Millenium. 3 dossiers ne comportaient pas d'information sur le terrain du patient. 4 prélèvements étaient anonymisés du fait de la participation des patients à un protocole sur l'ABPA nommé TARC ABPA. Ce protocole concernait des patients atteints d'ABPA mais non porteurs de mucoviscidose. Le dossier clinique de ces 4 patients n'a pu être étudié.

Le CHU de Nantes faisant partie du "Centre de référence mucoviscidose et affections liées à anomalie du CFTR", une partie importante des isolats recueillis dans l'étude concerne des patients atteints de mucoviscidose. Ces derniers représentent 35% des 248 patients.

I - Données démographiques

1. Caractéristiques des patients

Les caractéristiques des 248 patients sont présentées dans le Tableau X. Sur l'ensemble de l'étude, soit 244 patients, le sexe est en faveur des patients du sexe masculin avec un sex ratio hommes/femmes de 1,4. En regardant de plus près en deux sous-populations, le sex ratio est de 1,12 pour les 87 patients atteints de mucoviscidose et de 1,57 pour les 157 autres patients.

L'âge moyen des 244 patients dans notre étude était de 47,6 ans (minimum = 9 ans, maximum = 91 ans) avec un âge médian de 50,5 ans. L'âge moyen des patients atteints de mucoviscidose était de 25,3 ans (minimum = 9 ans et maximum = 63 ans) avec un âge médian de 24 ans, alors que l'âge moyen des patients non atteints de mucoviscidose était de 60 ans (minimum = 13 ans et maximum = 91 ans) avec un âge médian de 62 ans. Ainsi en dehors de la population particulièrement jeune des patients atteints de mucoviscidose, les autres patients chez lesquels il a été isolé de l'*Aspergillus Section Fumigati* sont préférentiellement d'âge mur et de sexe masculin. Les caractéristiques de la population de patients atteints de mucoviscidose correspondent très fortement à celles retrouvées dans l'étude prospective multicentrique internationale "MucoFong International Project" (5-67 ans ; âge médian : 24 ; sex ratio : 1,16 ; n=469) (Delhaes et al., 2018).

D'un point de vue simplement épidémiologique, il est intéressant de voir chez quelles populations de patients *Aspergillus Section Fumigati* a été isolé en culture. 35% des patients de cette étude étaient atteints de mucoviscidose. Cela correspond à 87 patients dont 10 d'entre eux ont bénéficié d'une greffe pulmonaire. Ces patients totalisent à eux seuls 32% des isolats d'*Aspergillus Section Fumigati*. Concernant les 154 autres patients "non-muco" pour lesquels il a pu être recueilli des informations sur les antécédents, 90% d'entre-eux présentaient un terrain particulier pouvant favoriser une colonisation ou une maladie aspergillaire. Le Tableau X illustre aussi les ATCD pulmonaires chroniques (hors cancer) qui concernent exactement 50% de cette population "non-muco". Ainsi en additionnant les patient atteints de mucoviscidose, on note que les deux tiers de patients chez qui il a été isolé une souche aspergillaire présentaient une pathologie respiratoire chronique.

Tableau X : Caractéristiques des 248 patients chez qui ont été isolées 336 souches d'Aspergillus Section Fumigati

	Nombre de patients n (%)	Sex Ratio M/F	Age médian	Age min-max (année)
Ensemble des patients (hors TARC)	244 (98,3)	1,4	50,5 (+/- 21,9)	9-91
Patients "muco"	**87** (35,1)	1,12	24 (+/- 10,8)	9-63
dont greffé pulmonaire	10			
Patients "non-muco"	**157** (63,3)	1,57	62 (+/- 15,8)	13-91
BPCO	41 (26,6)			
DDB	24 (24)			
Asthme	12 (7,8)			
Tuberculose pulmonaire	6 (3,9)			
Autre pathologie pulmonaire chronique	6 (3,9)			
Diabète	20 (8,1)			
Hémopathie maligne	19 (7,7)			
dont allogreffe	4			
Cancer solide	11 (4,4)			
Transplantation d'organe solide	16 (6,5)			
dont pulmonaire	12			
Maladie de système	11 (4,4)			
Déficit immunitaire ou maladie génétique	5 (2,0)			
dont allogreffe	1			
VIH	3(1,2)			
Intubation au moment du prélèvement	14			
Sans facteurs sus-cité	17 (6,9)			
Patients anonymisés du TARC, avec une ABPA	**4** (1,7)	NA	NA	NA

BPCO : Bronchopneumopathie obstructive ; DDB : Dilatation des bronches ; ABPA : Aspergillose bronchopulmonaire allergique

2. Services d'hospitalisation

Du fait de la porte d'entrée et de la physiopathologie principalement pulmonaire d'*A. fumigatus*, certains services sont plus sujets à accueillir des patients porteurs de ce

pathogène. La Figure 22 illustre la répartition des isolats d'*Aspergillus Section Fumigati* au sein des services du CHU de Nantes.

Comme il pouvait être prévu, les souches proviennent en grande majorité des services de pneumologie adulte (avec ou sans transplantation) et de pédiatrie.

Il peut être aussi noter le faible nombre d'isolats retrouvés chez les patients notamment les plus à risque d'AI que sont ceux d'hématologie durant une période où la prophylaxie au posaconazole n'était pas encore appliquée. Ceci pourrait refléter l'importante difficulté chez ces patients fragiles de réaliser des prélèvements respiratoires de qualité et à isoler une souche fongique d'origine pulmonaire, mais il faut prendre en considération que beaucoup de patients d'hématologie sont hébergés dans d'autres services au moment du prélèvement.

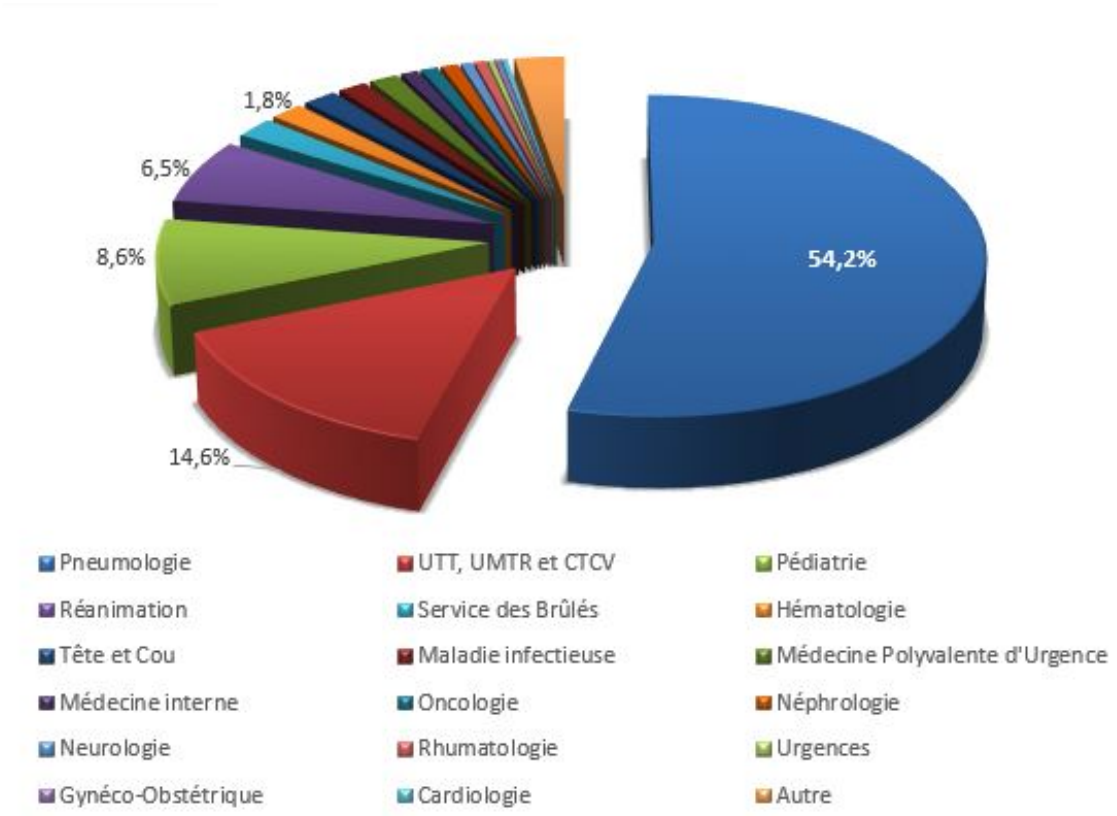


Figure 22 : Répartition des isolats (n=336) en fonction du service d'origine du prélèvement

Au total, en associant les services de pneumologie, de transplantation thoracique et de pédiatrie, ce dernier concernant dans cette étude majoritairement des enfants ou adolescents atteints de mucoviscidose, on peut estimer que près de 75% des isolats de l'étude proviennent de services liés à la pneumologie au sens large.

II - Prélèvements

1. Origine des prélèvements positifs à *Aspergillus Section Fumigati*

Afin d'étudier au mieux l'épidémiologie de la résistance d'*A. fumigatus* chez l'être humain, l'étude porte sur les isolats provenant de tous les prélèvements reçus au laboratoire de mycologie hors recherche de dermatophyte, sur la période juin 2012-mai 2013. Les prélèvements ont été inclus sur la base du morphotype typique d'*A.* de la *Section Fumigati*. Seule la souche S250 provenant d'un patient muco était macroscopiquement blanche au recto.

Sans surprise, comme l'illustre la Figure 23, sur les 336 prélèvements positifs inclus à *A. Section Fumigati*, 312 *(93%)* proviennent d'un prélèvement respiratoire, dont 56,5% sont des crachats, 26,8% des aspirations bronchiques et 8% des LBA. Concernant les isolats ne provenant pas d'un prélèvements respiratoire (n=28), les biopsies sont en première position (n=12, soit 3%) avec une origine ORL pour 6 d'entre-elles [sphénoïdale : n=3, maxillaire : n=1, ethmoïdale : n=1, septum nasal : n=1], pulmonaire (n=1), bronchique (n=1), pleurale (n=1), cérébrale (n=1), cutanée (n=1) et digestive (n=1). La répartition par type de prélèvement ressemble à celle retrouvée par Alanio où dans une étude monocentrique parisienne concernant une population d'hémopathie, 96% des *Aspergillus Section Fumigati* isolés proviennent de prélèvements respiratoires au sens large (Alanio et al., 2011).

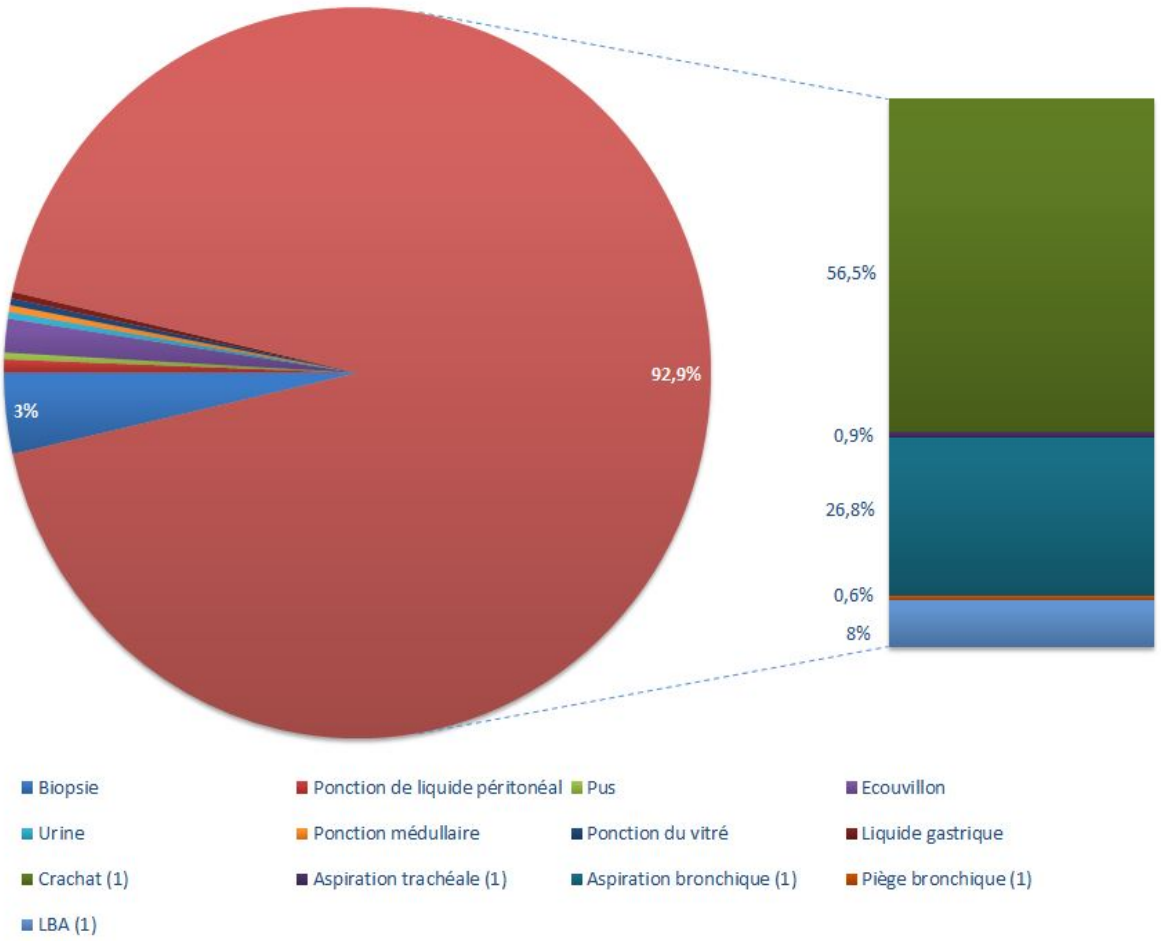
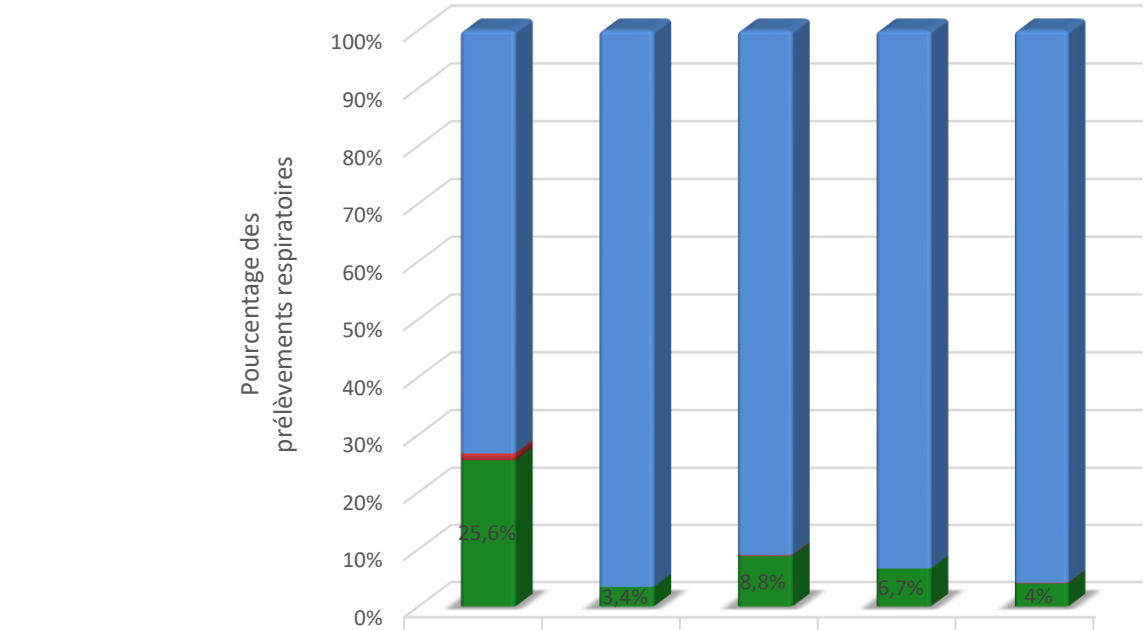


Figure 23 : Répartition des isolats inclus dans l'étude en fonction du type de prélèvements (n=336); (1) Prélèvements respiratoires.

Même si parmi nos prélèvements quelques uns ont été considérés comme de la contamination (ponction médullaire, écouvillon vaginal..), la provenance globale des isolats inclus correspond à l'écologie du germe étudié. Le caractère pathologique ou non des souches isolées n'a pas pu être étudié au cours de l'étude, même si leur implication était évidente pour certains patients. En effet la partie rétrospective complique toute répartition pathologique versus simple colonisation qui ne peut être que ambiguë dans bon nombre de cas du fait de la difficulté d'établir certains diagnostics comme l'API ou l'APS.

Concernant le rendement des prélèvements, il est a noter à travers la Figure 24 que le prélèvement le plus profond (LBA), n'est revenu positif en culture pour *A. Section Fumigati* que dans 4,2% des prélèvements alors que la culture des crachats poussent dans 26,8% des cas. La différence observée ($p<0,001\%$; test exact de Fischer), malgré la présence de biais de recrutement montre une nette différence de rendement en faveur des crachats. Or comme expliqué dans l'introduction de cette

thèse, l'identification de l'espèce *A. fumigatus stricto sensu* nécessite l'usage de la biologie moléculaire, en particulier du séquençage. C'est la raison pour laquelle tous les isolats inclus du morphotype *A. fumigatus* et devaient être considérés comme de l'*Aspergillus Section Fumigati*.



	Crachat (n=742)	Aspiration trachéale (n=87)	Aspiration bronchique (n=1018)	Piège bronchique (n=30)	LBA (n=668)
Prélèvements non positifs à A. fumigatus	543	84	926	28	640
Cultures positives pour A. fumigatus, non incluses dans l'étude	9	0	2	0	1
Cultures positives pour A. fumigatus, incluses	190	3	90	2	27

Figure 24 : Répartition des isolats d'origine respiratoire (n=336) parmi l'ensemble des prélèvements reçus au laboratoire de mycologie sur la période de l'étude (n=2545)

2. Nombre d'isolat par patient

Comme l'illustre la Figure 25, au cours de l'étude, un seul isolat a été recueilli pour la majorité des patients (80%). Vingt pourcents des patients (n=50) ont eu au moins deux isolats et seulement 3 patients ont eu plus de 4 prélèvements (5, 7 et 12). L'étude compte ainsi un nombre important de souches provenant de patients différents, ce qui permettra théoriquement de couvrir un territoire géographique relativement large et d'avoir une vue globale sur la prévalence de la résistance d'*Aspergillus fumigatus* aux azolés. Cependant, le nombre élevé de patient avec seulement une ou deux souches ne permet en aucun cas de conclure en l'absence de portage d'une souche résistance chez ces patients puisque une seule colonie a

été sélectionnée sur chaque prélèvement. En effet, il est aujourd'hui recommandé, bien que cela soit difficile de le réaliser dans la routine hospitalière, de tester 5 colonies par prélèvement pour minimiser le risque de passer à côté d'une souche résistante (Verweij et al., 2015).

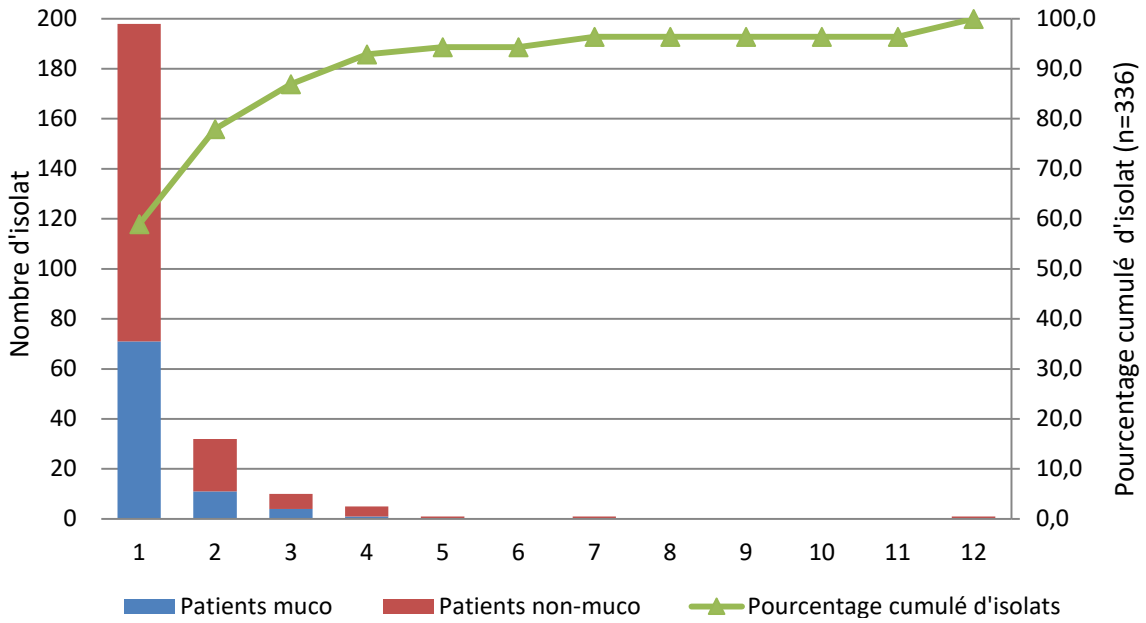


Figure 25 : Répartition du nombre d'isolats inclus par patient.

3. Origine géographique des patients

L'ensemble des adresses connues des patients (n=244) pour lesquels un isolat a été inclus, ont été exploitées via leurs coordonnées WGPS84 afin d'élaborer une cartographie des isolats par rapport au du lieu de vie des patients et donc potentiellement du lieu d'origine des souches isolées dans cette étude Figure 26 . 89% des isolats (300/336) sont ici représentés dans un rayon de 100km autour de Nantes avec environ un tiers dans la ville de Nantes et sa périphérie. Parmi les 11% restants, 20 isolats sont placés à l'ouest de la Bretagne. La répartition des isolats semble donc relativement homogène dans la région nantaise avec une couverture plus dense de la zone urbaine. Seules les zones proches des autres grandes villes (principalement Angers et Rennes) ne sont pas concernées.

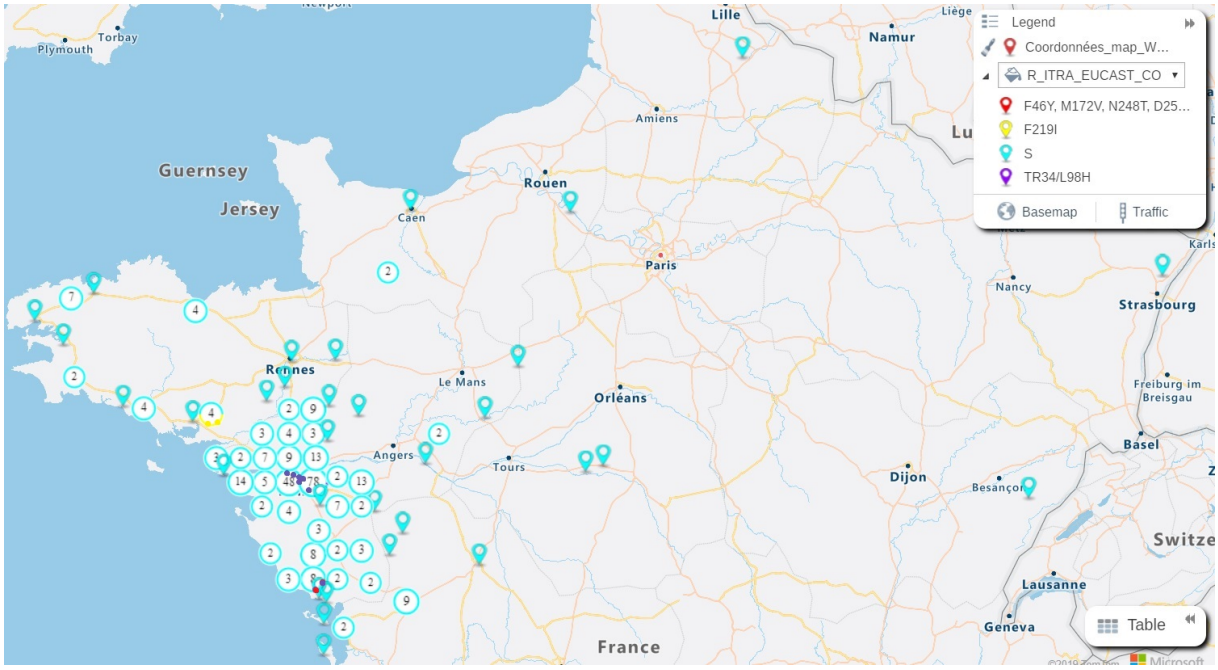


Figure 26 : Répartition géographique, selon l'adresse du patient, des souches d'Aspergillus Section Fumigati isolées (n=336)

Point violet : altération TR34/L98H (n=7), rouge : mutations F46Y/M172V/N248T/D255E/E427K (n=1), jaune : mutation F219I (n=2); Nombre : nombre de souches isolées ;

4. Incidence de l'isolement des souches dans le temps

Contrairement à certains agents infectieux respiratoires comme par exemple le virus de la grippe qui présentent des caractères épidémiques, *A. fumigatus* n'est pas connu pour arborer cette caractéristique. En effet comme expliqué précédemment dans la première partie, la transmission ne s'effectue pas entre les patients porteurs.

De plus, alors que certains agents notamment allergisants comme le pollen revêtent un caractère saisonnier, *A. fumigatus* n'est pas connu non plus pour cela. Même si les conditions météorologiques peuvent influencer son développement environnemental et donc sa sporulation, sa capacité à se développer dans une zone avec un minimum d'humidité et une grande amplitude thermique pour une moisissure font que cet agent pathogène est retrouvé de manière relativement constante sur une année.

Dans notre étude, la Figure 27 illustre ces propos en montrant l'absence de pic épidémique et une relative constance de la découverte du pathogène tout au long de l'année. Ceci est à interpréter avec le nombre d'examens mycologiques sur prélèvements respiratoires demandés sur cette année (n=2545) et le nombre de

patients qui sont venus consulter ou qui ont été hospitalisés au CHU sur cette période.

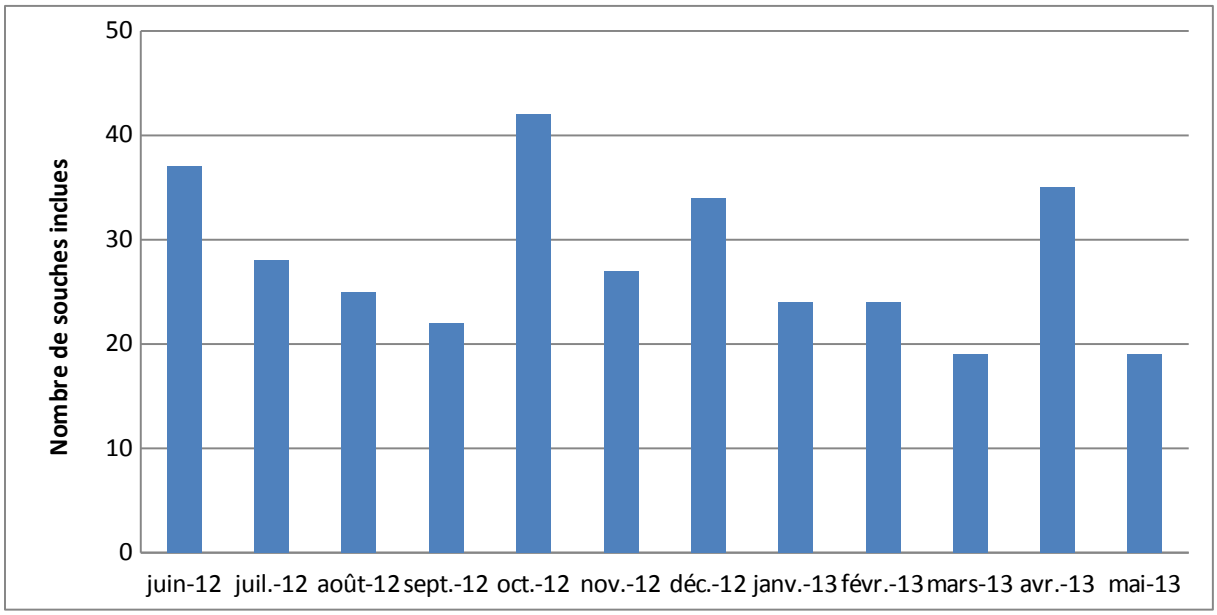


Figure 27 : Répartition dans le temps des isolats inclus dans l'étude (n=336)

III - Sensibilité des isolats aux azolés.

1. Antériorité de traitement aux azolés.

Il a été observé qu'au moins 28,3% des patients, chez qui un *Aspergillus Section Fumigati* a été isolé (n=69), ont reçu au moins une fois un traitement antifongique actif sur *A. fumigatus* (soit 112 souches concernées) dans les 3 ans précédent le prélèvement, et 97% de ces 69 patients, ont reçu au moins une fois un triazolé. Le traitement a parfois duré plusieurs années. Bien que la notion de traitement antifongique peut être distante dans le temps par rapport à la date de l'isolement de la souche, ces quelques chiffres montrent que plus d'un quart des patients ont subi une pression antifongique azolée provenant des médicaments. Ils illustrent aussi le fait que cette classe de médicament soit, hors contre-indication, utilisée comme traitement de première intention quelque soit la forme clinique de l'aspergillose. Ainsi toute émergence de résistance à cette classe médicamenteuse va considérablement mettre en difficulté la prise en charge déjà souvent compliquée.

2. Résultats de la sensibilité *in vitro* des isolats à l'itraconazole et au tébuconazole

Le screening de la sensibilité vis à vis des deux molécules a été réalisé détermination de la CMI vis-à-vis des deux molécules a été réalisé pour l'intégralité des isolats inclus (n=336) à l'aide d'un test EUCAST modifié.

Les CMIs des 336 isolats pour l'itraconazole se répartissaient entre < 0,125 et > 2 mg/L avec un mode à 0,5mg/L, une CMI50 de 0,5 mg/L et une CMI90 de 1 mg/L (Figure 28). Une répartition bimodale des isolats est ainsi observée avec une majorité de souches (n=311) à gauche de la concentration 2mg/L, et un rebond à droite de cette valeur (n=21). Le seuil épidémiologique (ou ECOFF) peut donc ici être établi visuellement à 2 mg/L. Ainsi les souches avec une CMI > 2mg/L sont considérées comme résistantes ce qui est admis aujourd'hui dans l'ensemble des études concernant la résistance à l'itraconazole.

Les 21 isolats pour lesquels la CMI a été retrouvée > 2 mg/L ont donc été testés une seconde fois en microdilution pour vérifier la valeur. 12 souches ont ainsi été écartées des souches à CMI élevée et redirigées vers les souches sensibles. Plusieurs raisons peuvent expliquer ce fait. Tout d'abord, les très faibles pousses à 2mg/L ont été prises en compte et se sont révélées être finalement sensibles. De plus, le premier passage a pu détecter un clone résistant dans le mélange de

souches du premier isolat, qui aurait été perdu par les repiquages successifs. La congélation de la souche dès son isolement en évitant ainsi des repiquages supplémentaires, et la double lecture sur toutes les souches auraient probablement diminué ces erreurs de répartition.

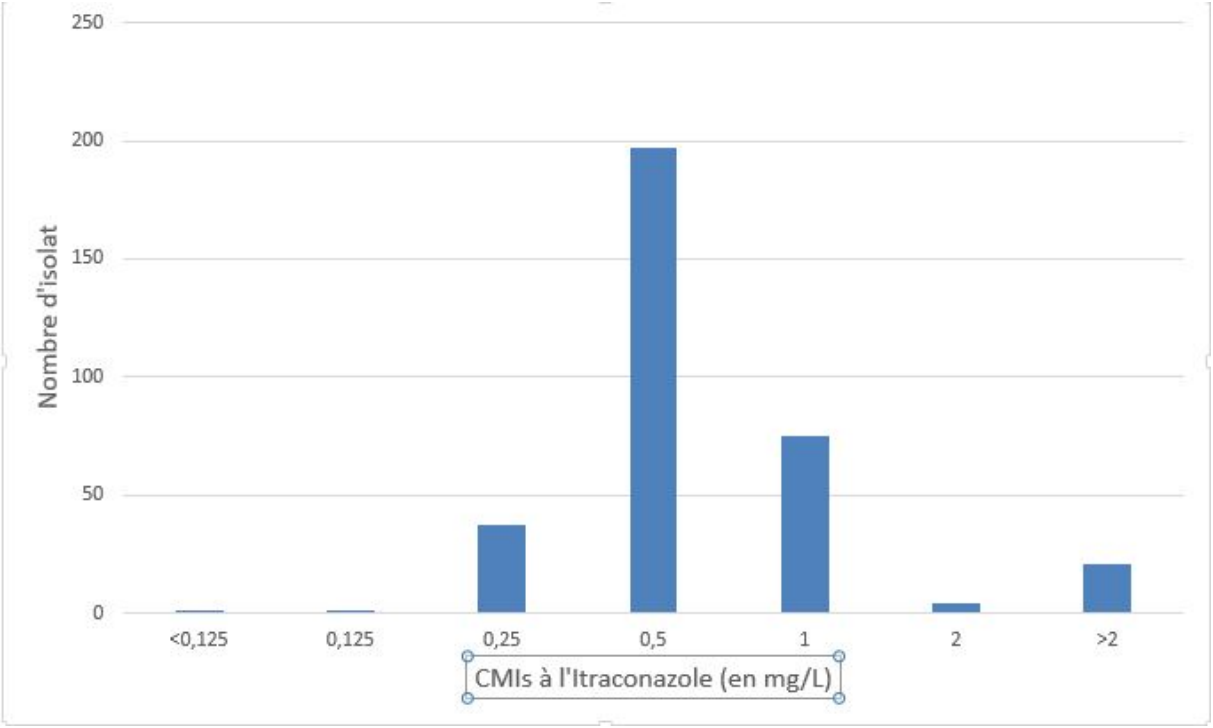


Figure 28 : Répartition des CMI à l'itraconazole en mg/L pour les 336 isolats lors du screening

Une dernière raison pourrait expliquer cette différence. En effet, il a été montré que des souches initialement sensibles, puis devenues résistantes par l'exposition au tébuconazole (ici sans mutation du cyp51A), redevenaient sensibles après 5 repiquages successifs sans pression azolée (Cui et al., 2019). Ce phénomène serait en partie due à la surexpression de pompe à efflux induite par la présence d'un azolé.

Les résultats obtenus sont en concordance avec ceux attendus avec la technique de microdilution EUCAST (Figure 29 ; Rodriguez-Tudela et al., 2008). En effet, la valeur de CMI la plus élevée parmi ces souches sauvages est de 2 mg/L ce qui correspond à l'ECOFF observé dans notre étude.

Le pourcentage de souches cliniques résistantes aux azolés varient de moins de 1% à plus de 20% selon les pays et la population étudiée (Bueid et al., 2010 ; Denardi et al., 2018). Une grande étude internationale regroupant 19 pays incluant notamment 17 centres hospitaliers européens avaient surveillé de manière prospective entre 2009 et 2011 la résistance à *Aspergillus Section Fumigati* sur des isolats cliniques (n=3788) et a montré une prévalence moyenne de 3,2% (0-26,1% selon les centres)

avec 48,9% de TR_{34}/L98H (Van der Linden et al. 2015). Il est toutefois important de comparer des études qui ciblent les mêmes populations et les mêmes protocoles d'évaluation de la résistance ce qui est parfois impossible. Le pourcentage de souches résistantes retrouvées dans l'étude lors du screening est de 2,98%, soit un taux que l'on peut considérer comme un taux moyen.

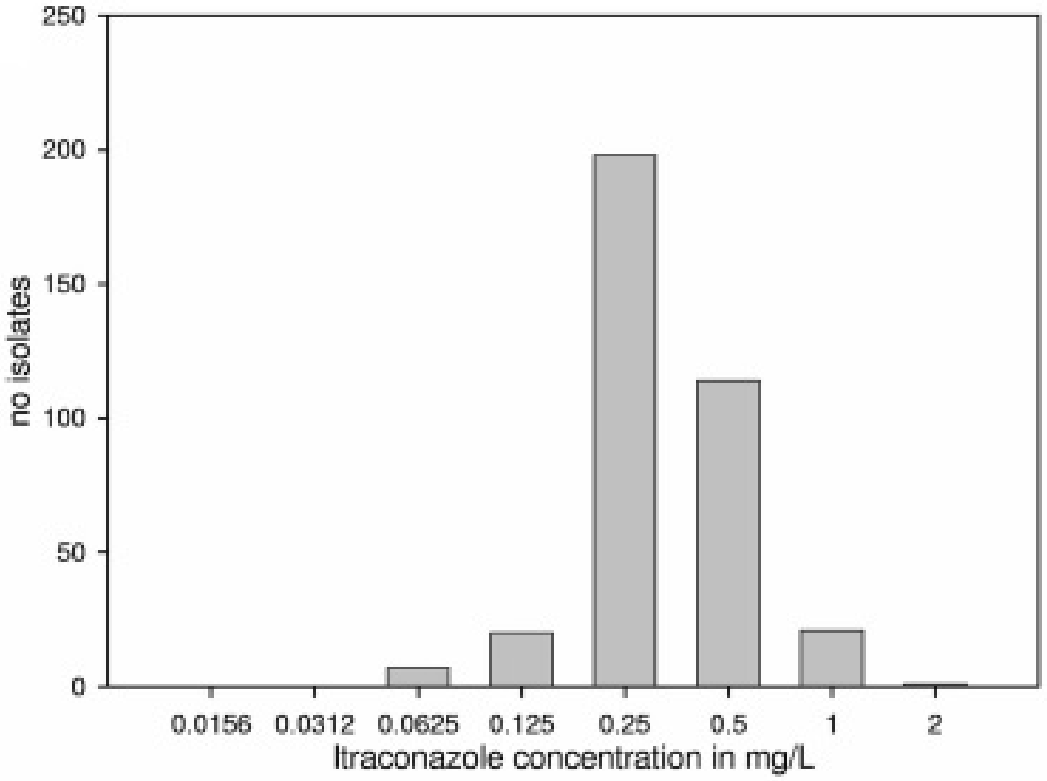


Figure 29 : Distribution des CMI à l'itraconazole de 361 isolats cliniques d'A. fumigatus sauvages selon le protocole de l'Eucast

Les CMIs pour le tébuconazole se répartissent entre < 1 mg/L et > 8 mg/L avec une CMI50 de 4 mg/L et une CMI90 de 8 mg/L (Figure 30). Parmi les 19 souches avec une CMI au tébuconazole > 8 mg/L, 16 ont été testées sur une plaque allant jusqu'à 16mg/L de tébuconazole et seulement 2 souches montraient une CMI à 16mg/L, les autres étant supérieures à 16mg/L. Une répartition de type bimodal apparaît comme pour l'itraconazole permettant d'établir un seuil épidémiologique à 16mg/L pour le tébuconazole.

Des CMI plus élevées de 3 dilutions vers la droite sont observées pour les CMI du tébuconazole par rapport à celles de l'itraconazole, ce qui est concordant avec les CMI obtenues par Snelders et al., 2009, (Figure 31). L'étude réalisée et celle de Snelders sont les seules actuellement qui observent les CMI du tébuconazole sur *A. fumigatus* avec des isolats cliniques sauvages et résistants. Cette étude à la particularité supplémentaire d'avoir testé un nombre important de souches.

Seulement 2 souches (S24 et S228) présentaient une CMI sensible à l'itraconazole et > 8 mg/L au tébuconazole. Toutes les autres souches retrouvées > 8 mg/L au tébuconazole avaient une CMI > 2 mg/L à l'itraconazole. Ceci est en accord avec la présence de résistance croisée entre les molécules de formules chimiques proches de la classe des azolés.

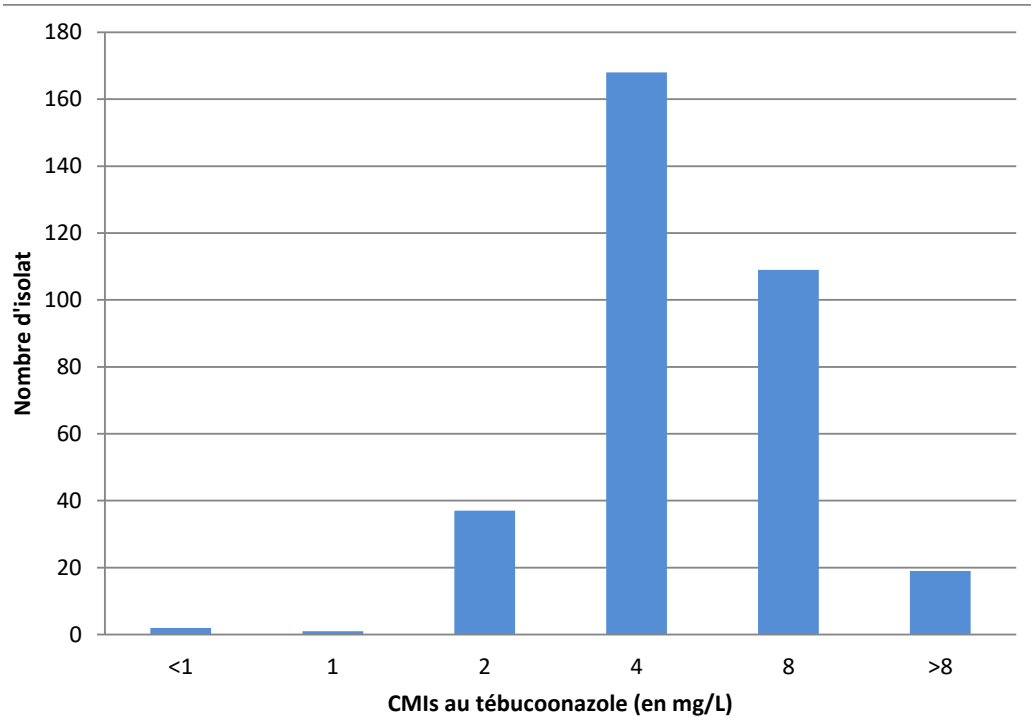


Figure 30 : Répartition des CMI au tébuconazole en mg/L pour les 336 isolats lors du screening

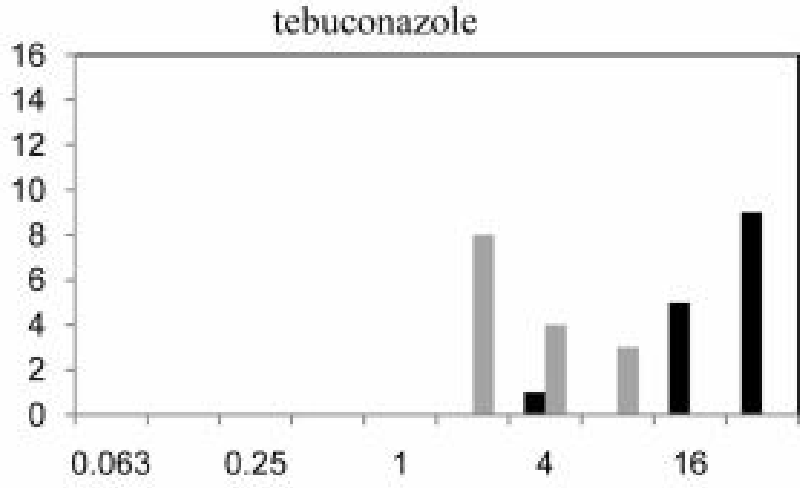


Figure 31 : Activité in vitro du tébuconazole contre 15 souches d'A. fumigatus sensibles à l'itraconazole (barres grises) et 15 souches résistantes (barres noires), d'après Snelders et al., 2009

IV - Souches résistantes à l'itraconazole

Toutes les souches retrouvées résistantes à l'itraconazole lors du premier passage en EUCAST ont été retestées en EUCAST. L'ADN des souches confirmées résistantes à été extrait pour amplification, séquençage et analyse du gène cyp51A, et de la région promotrice du gène cyp51A afin d'observer d'éventuels mécanismes de résistance, et du gène de la β-tubuline afin de confirmer l'espèce *Aspergillus fumigatus stricto sensu.*

Au cours de l'étude menée pendant deux ans au CHU de Nantes, il a été isolé des souches résistantes chez 9 patients (Tableau XI). Chez 7 d'entre eux l'altération TR_{34}/L98H a été mise en évidence. Il est important de noter que 5 de ces 9 patients sont atteints de mucoviscidose. Ainsi la prévalence observée chez les patients atteints de mucoviscidose est de 5,75% (5/87), légèrement inférieure à celles observées 2 ans plus tôt (8%; 4/50) sur une étude rétrospective de 16 mois et 3 ans plus tard (6,8%; 6/88) dans une étude prospective d'un an chez les patients atteints de mucoviscidose au CHU de Nantes (Morio et al. 2012 ; Lavergne et al. 2018). Cette dernière a montré en plus la présence chez un patient de l'altération de type TR_{46}. Par ailleurs, des souches résistantes sans altérations sur le gène cyp51 ou son promoteur avaient également été identifiées.

Il n'est pas observé de différence significative entre le taux de résistant chez les patients atteints de mucoviscidose (5,75%) et chez les patients "non-muco" (2,48%), (p=0,289, test exact de Fischer).

La prévalence de la mutation TR_{34}/L98H retrouvée dans l'étude est en accord avec les données rencontrées dans les publication sur l'origine environnementale de cette altération majeure dans plusieurs pays d'Europe tels que les Pays Bas, le Danemark, l'Allemagne où respectivement 12% (6/49), 11% (4/38) et 10% (45/455) des échantillons de sol retrouvent des isolats TR_{34}/L98H (Bader et al., 2015 ; Mortensen et al., 2010 ; Snelders et al., 2009). Il faut remarquer toutefois que la méthodologie ciblée sur la seule résistance à l'itraconazole ne permet pas de mettre en évidence des mécanismes comme le TR_{46} impliquant des valeurs de CMI normales à l'itraconazole mais élevées au voriconazole (Figure 12 , page 48, Buil et al. 2018). Cette altération peut donc être détectée soit en utilisant un milieu moins concentré en itraconazole à l'instar de celui réalisé par Bader (Bader et al. 2015), ou en sélectionnant les souches avec un milieu supplémenté par le voriconazole à 4m/L.

Le patient P127 présente une ABPA traitée par itraconazole pendant 6 mois. Une

souche d'*A. fumigatus* résistante TR_{34}/L98H a été isolée des sécrétions bronchiques.

Le patient P144 est également un patient qui présente des bronchectasies associées à une mucoviscidose. Il est traité par itraconazole au moment de l'isolement d'*A. fumigatus*. Une souche résistante à l'itraconazole de type TR_{34}/L98H a été isolée à partir des crachats.

Le patient P222 est un patient atteint de mucoviscidose sous itraconazole pour son ABPA. Une souche résistante TR_{34}/L98H a été isolée d'un LBA..

Le patient P45 est un patient atteint de mucoviscidose compliqué d'un diabète. La souche, isolée sur un crachat, présentait une CMI > 16mg/L avec une altération TR_{34}/ L98H. Le patient n'a pas d'antécédent de traitement par triazolés.

Les 3 derniers patients sont des sujets non mucoviscidose sans documentation de traitement par médicament azolé comme beaucoup de patients colonisés par des souches résistantes par le mécanisme environnemental c'est-à-dire sous la pression des fongicides. Le patient P244 présente une souche TR_{34}/L98H qui a été isolée d'un liquide péritonéal. Le patient P246 est lui atteint d'un lymphome B. La souche résistante avec une altération TR_{34}/L98H, a été isolée de l'humeur aqueuse. Enfin pour ce qui est du patient P250, il est suivi pour un glioblastome et un cancer pulmonaire, avec une exposition professionnelle à l'amiante et présentait aussi une souche TR_{34}/L98H.

Parmi ces patients porteurs de l'altération TR_{34}/L98H, deux habitent en zone rurale, proche d'une zone d'activité agricole ou maraîchère comme illustré pour l'un deux sur la Figure 32.

Les 5 autres patients porteurs d'un isolats avec une altération TR_{34}/L98H habitent en zone urbaine. Et étonnamment, 3 de ces patients habitent à environ 2 kilomètres les uns des autres (Figure 33) sans qu'il y ait une activité agricole intense dans cette zone. Il serait intéressant d'investiguer les souches environnementales de ces lieux ainsi que pour et les secteurs d'activités qui utilisent des fongicides azolés comme cela a déjà pu être fait auparavant (Lavergne et al., 2017).

En plus des 7 patients présentant un isolat porteur d'une altération TR_{34}/L98H considérée comme provenant de l'environnement, 2 patients présentaient une souche avec une altération considérée comme provenant du patient.

Le patient P49 est un patient atteint de mucoviscidose qui présente une ABPA traitée

pendant 5 ans par itraconazole, lequel a finalement été relayé par le voriconazole.

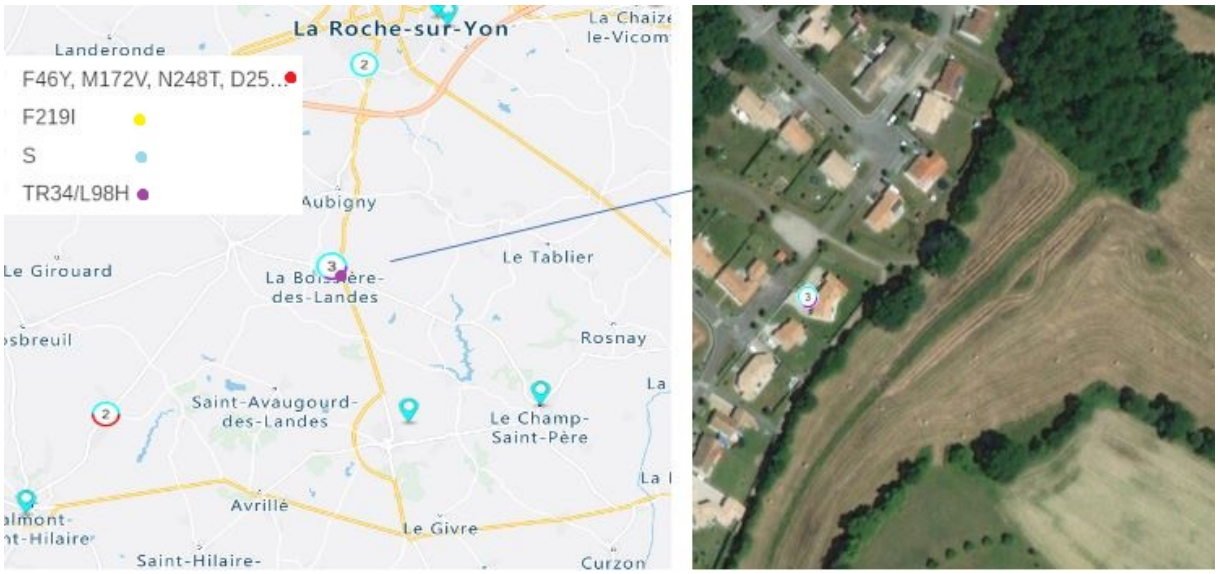


Figure 32 : Géolocalisation de l'habitat d'un patient porteur d'une souche TR34/L98H en zone rurale

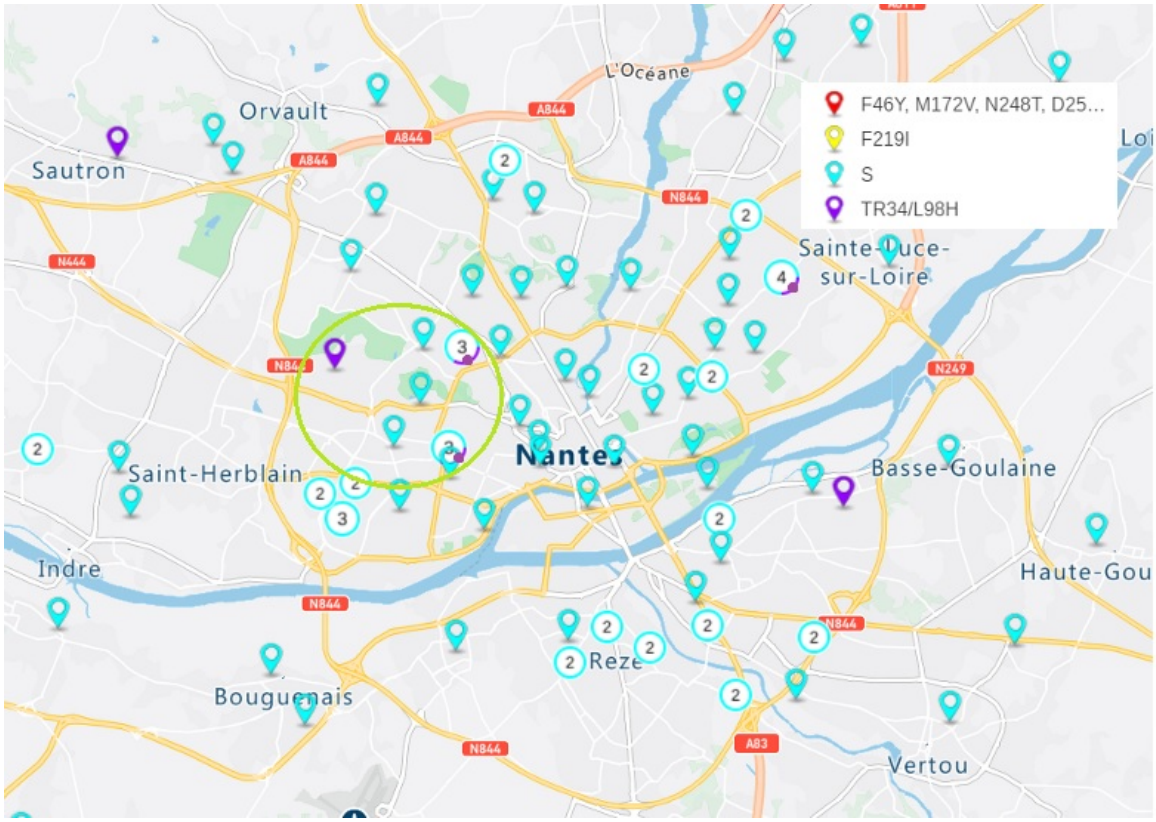


Figure 33 : Géolocalisation des habitations de patients porteurs d'une souche TR34/L98H dans l'agglomération nantaise

Le cercle vert met en évidence les 3 isolats géographiquement rapprochés.

Il peut être noté par ailleurs que ce patient était sous Cortancyl au long cours, déjà montré dans l'étude des patients BPCO comme un facteur d'aggravation des exacerbations de l'ABPA. Ce patient présente une altération qui associe plusieurs substitutions sur le gène cyp51A, F46Y-M172V-N248T-255E-E427K. Des combinaisons similaires ont été retrouvées chez des souches sensibles aux azolés en Europe (Snelders et al., 2010 ; Alanio et al., 2012), mais des isolats avec des CMI élevées ont été décrits en Europe et aux U.S.A. (Howard et al., 2009; Heo et al., 2017).

Le patient P54 est un patient atteint de mucoviscidose.qui a été traité par plusieurs antifongiques de la classe des azolés dont l'itraconazole, le voriconazole puis le posaconazole et ceci pendant une période de plus de 5 ans. Une première souche S67 a été isolée à partir de crachats. Une autre souche S290 a été isolée à partir d'un autre crachats 8 mois après. Cette souche résistante présente une substitution F219I sur le Cyp51A. Par l'utilisation d'un modèle 3D par homologie du Cyp51A et une méthodologie de mutagénèse dirigée dans laquelle la mutation a été introduite dans une souche sensible, il a été démontré que la substitution F219 était associée à une résistance à l'itraconazole et au posaconazole (Camps et al., 2012 ; Paluch et al., 2019). Les études de modélisation restent aujourd'hui une bonne approche pour évaluer l'impact de mutations dans le Cyp51. Des schématisations expérimentales à haute résolution des différentes molécules azolées liés à l'enzyme fongique sont maintenant nécessaires pour comprendre les mécanismes de résistance aux différens azolés au niveau atomique (Snelders et al., 2010 ; Chen et al., 2010 ; Fraczek et al., 2011; Lescar et al., 2014).

En ce qui concerne les autres mécanismes de résistance, des études de séquençage du génome entier dites *WGS* (*Whole Genome Sequencing*) sont nécessaires pour une meilleure compréhension (Abdolrasouli et al. 2015 ; Losada et al. 2015). De plus des mécanismes non génétiques liés à l'épigénétique seraient impliqués dans la survenue de résistance chez *Aspergillus fumigatus* (Müller et al., 2012 ; Abdolrasouli et al., 2015).

Au final, la résistance d'*A. fumigatus* semble concerner plutôt le patient atteint de mucoviscidose d'où l'intérêt de cette étude sur le tout venant.

Ces données prennent en compte *Aspergillus Section Fumigati* ce qui pourrait sous-estimer la prévalence de la résistance de l'espèce *Aspergillus fumigatus* du fait de l'existence d'espèces cryptiques, mais dans les deux études réalisées à Nantes, aucune des souches résistantes aux azolés n'était une souche d'espèce cryptique (Morio et al., 2012 ; Lavergne et al., 2018).

Tableau XI : Récapitulatif des souches confirmées résistantes lors du deuxième Eucast

N° de souche	N° de patient	Sexe	Âge	Service	Mucoviscidose	CMI ITRA EUCAST (mg/L)	CMI TEBU EUCAST (mg/L)	CMI ITRA Etest (mg/L)	CMI VORI Etest (mg/L)	TTT triazolé dans les 3 ans avant le prélèvement	Tandem Repeat	Mutations sur le gène cyp51A
S56	P45	F	21	Pneumologie	Oui	>2	>8	NF	NF	Non	TR34	L98H
S60	P49	H	33	Pneumologie	Oui	>2	>8	NF	NF	Oui	Sauvage	F46Y, M172V, N248T, D255E, E427K
S67	P54	H	25	Pneumologie	Oui	>2	8	NF	NF	Oui	Sauvage	F219I
S290	P54	H	25	Pneumologie	Oui	>2	8	>32	0,25	Oui	Sauvage	F219I
S163	P127	H	86	Autre	Non	>2	>8	>32	4	Oui	TR34	L98H
S205	P144	F	32	Pneumologie	Oui	>2	>8	NF	NF	Oui	TR34	L98H
S301	P222	H	23	Pneumologie	Oui	>2	>8	24	2	Oui	TR34	L98H
S332	P244	F	51	Urgence	Non	>2	>8	NF	NF	Non	TR34	L98H
S336	P246	F	67	Tête et Cou	Non	>2	>8	>32	4	Non	TR34	L98H
S342	P250	H	65	Oncologie	Non	>2	>8	NF	NF	Non	TR34	L98H

CMI : Concentration minimale inhibitrice ; ITRA : Itraconazole ; TEBU : Tébuconazole ; VORI ; Voriconazole ; TTT : Traitement ;

CHAPITRE IV.

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Le phénomène de résistance des micromycètes aux azolés a aujourd'hui une étendue mondiale et n'a de cesse de progresser depuis 40 ans (Fisher et al. 2018). L'usage des triazolés dans le monde médical pour lutter contre les aspergillose est depuis 20 ans confronté à la survenue de résistances chez *A. fumigatus.* L'utilisation massive de fongicides contribue à ce développement.

Certains de nos voisins européens pâtissent d'une prévalence de la résistance dépassant 10% dans l'environnement et parfois 20% chez certaines populations des patients les obligeant à modifier leur molécule utilisée en première intention. Le travail réalisé dans cet ouvrage qui portait sur 336 souches *d'A. Section Fumigati* isolées à partir de tout prélèvement admis au laboratoire de Parasitologie-Mycologie du CHU de Nantes sur la période s'étalant de juin 2012 à mai 2013, a mis en évidence une présence de la résistance chez 2,97% des souches (n=336) ce qui concernait 3,6% des patients (n=248). Même si la population de patients du CHU de Nantes ne fait pas exception à ce constat international, les prévalences observées sont bien plus faibles que les chiffres les plus alarmants. De plus, les résultats obtenus sont à analyser selon le terrain des patients. Il a ainsi été observé une prévalence de 5,75% (5/87) pour les patients atteints de mucoviscidose, et de 2,55% (4/157) pour les patients autres patients. Les mutations mises en évidence montrent comme presque partout une origine médicamenteuse chez une partie des patients, mais principalement comme déjà mentionné une cause environnementale.

Ce travail a été réalisé sur des prélèvements effectués il y a déjà 6 ans, quelle est la situation aujourd'hui? En observant les rares suivis épidémiologiques réalisés en Angleterre et aux Pays-Bas, on ne peut qu'être alarmés devant la continuelle augmentation du taux de résistance. La poursuite d'un suivi épidémiologique loco-régional paraît donc indispensable. Il doit aussi être amélioré d'une part en réalisant une étude entièrement prospective et d'autre part en testant en parallèle le voriconazole pour avoir une vue complète de la résistance. Une troisième amélioration primordiale doit être l'exploration et la compréhension des mécanismes autres que ceux touchant le cyp51 comme les pompes à efflux. Le dépistage de la résistance de ces souches non mutée cyp51A ne semble pas encore totalement généralisé. Des travaux doivent donc être fait dans ce sens ce qui permettrait d'améliorer grandement la compréhension de la résistance.

La principale menace de résistance venant aujourd'hui de souches mutées dans l'environnement, un travail similaire sur les souches issues de l'environnement des patients à risques semble plus qu'opportun.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Abdolrasouli, Alireza, Michael A. Petrou, Hyun Park, Johanna L. Rhodes, Timothy M. Rawson, Luke S. P. Moore, Hugo Donaldson, Alison H. Holmes, Matthew C. Fisher, et Darius Armstrong-James. 2018. « Surveillance for Azole-Resistant Aspergillus Fumigatus in a Centralized Diagnostic Mycology Service, London, United Kingdom, 1998–2017 ». *Frontiers in Microbiology* 9. https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02234.

Abdolrasouli, Alireza, Andrew Scourfield, Johanna Rhodes, Anand Shah, J. Stuart Elborn, Matthew C. Fisher, Silke Schelenz, et Darius Armstrong-James. 2018. « High Prevalence of Triazole Resistance in Clinical Aspergillus Fumigatus Isolates in a Specialist Cardio-Thoracic Centre ». *International Journal of Antimicrobial Agents*, août. https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2018.08.004.

Agarwal R., Chakrabarti A., Shah A., Gupta D., Meis J. F., Guleria R., Moss R., Denning D. W., et null null. 2013. « Allergic bronchopulmonary aspergillosis: review of literature and proposal of new diagnostic and classification criteria ». *Clinical & Experimental Allergy* 43 (8): 850-73. https://doi.org/10.1111/cea.12141.

Agarwal, Ritesh. 2009. « Allergic Bronchopulmonary Aspergillosis ». *Chest* 135 (3): 805-26. https://doi.org/10.1378/chest.08-2586.

Alanio, Alexandre, Odile Cabaret, Emilie Sitterlé, Jean-Marc Costa, Sylvain Brisse, Catherine Cordonnier, et Stéphane Bretagne. 2012. « Azole Preexposure Affects the Aspergillus Fumigatus Population in Patients ». *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 56 (9): 4948-50. https://doi.org/10.1128/AAC.05990-11.

Alanio, Alexandre, Blandine Denis, Samia Hamane, Emmanuel Raffoux, Régis Peffault de Latour, Jean Menotti, Sandy Amorim, Sophie Touratier, Anne Bergeron, et Stéphane Bretagne. 2016. « Azole Resistance of Aspergillus fumigatus in Immunocompromised Patients with Invasive Aspergillosis ». *Emerging Infectious Diseases* 22 (1): 157-58. https://doi.org/10.3201/eid2201.150848.

Alanio, Alexandre, Emilie Sitterlé, Martine Liance, Cécile Farrugia, Françoise Foulet, Françoise Botterel, Yosr Hicheri, Catherine Cordonnier, Jean-Marc Costa, et Stéphane Bretagne. 2011. « Low Prevalence of Resistance to Azoles in Aspergillus Fumigatus in a French Cohort of Patients Treated for Haematological Malignancies ». *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 66 (2): 371-74. https://doi.org/10.1093/jac/dkq450.

Alastruey-Izquierdo, A., E. Mellado, T. Peláez, J. Pemán, S. Zapico, M. Alvarez, J. L. Rodríguez-Tudela, et M. Cuenca-Estrella. 2013. « Population-Based Survey of Filamentous Fungi and Antifungal Resistance in Spain (FILPOP Study) ». *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 57 (9): 4604. https://doi.org/10.1128/AAC.01287-13.

Albarrag, Ahmed M., Michael J. Anderson, Susan J. Howard, Geoff D. Robson, Peter A. Warn, Dominique Sanglard, et David W. Denning. 2011. « Interrogation of Related Clinical Pan-Azole-Resistant Aspergillus fumigatus Strains: G138C, Y431C, and G434C Single Nucleotide Polymorphisms in cyp51A, Upregulation of cyp51A, and Integration and Activation of Transposon Atf1 in the cyp51A Promoter ▽ ». *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 55 (11): 5113-21. https://doi.org/10.1128/AAC.00517-11.

Alvarez-Moreno, Carlos, Rose-Anne Lavergne, Ferry Hagen, Florent Morio, Jacques F. Meis, et Patrice Le Pape. 2017. « Azole-resistant Aspergillus fumigatus harboring TR34/L98H, TR46/Y121F/T289A and TR53 mutations related to flower fields in Colombia ». *Scientific Reports* 7 (mars). https://doi.org/10.1038/srep45631.

Anaissie, Elias J., Shawna L. Stratton, M. Cecilia Dignani, Choon-kee Lee, Richard C. Summerbell, John H. Rex, Thomas P. Monson, et Thomas J. Walsh. 2003. « Pathogenic Molds (Including Aspergillus Species) in Hospital Water Distribution Systems: A 3-Year Prospective Study and Clinical Implications for Patients with Hematologic Malignancies ». *Blood* 101 (7): 2542-46. https://doi.org/10.1182/blood-2002-02-0530.

Arendrup, M. C., J. Meletiadis, J. W. Mouton, K. Lagrou, Petr Hamal, et J. Guinea. 2017. « EUCAST DEFINITIVE DOCUMENT E.DEF 9.3.1 Method for the determination of broth dilution minimum inhibitory concentrations of antifungal agents For conidiaforming moulds ». http://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/AFST/Files/EUCAST_E_Def_9_3_1_Mould_testing__definitive.pdf.

Arendrup, Maiken Cavling, Eleftheria Mavridou, Klaus Leth Mortensen, Eveline Snelders, Niels Frimodt-Møller, Humara Khan, Willem J. G. Melchers, et Paul E. Verweij. 2010. « Development of Azole Resistance in Aspergillus fumigatus during Azole Therapy Associated with Change in Virulence ». *PLoS ONE* 5 (4). https://doi.org/10.1371/journal.pone.0010080.

Ashu, Eta E, Gregory A Korfanty, Himeshi Samarasinghe, Nicole Pum, Man You, Deborah Yamamura, et Jianping Xu. 2018. « Widespread amphotericin B-resistant strains of Aspergillus fumigatus in Hamilton, Canada ». *Infection and Drug Resistance* 11 (septembre): 1549-55. https://doi.org/10.2147/IDR.S170952.

Astvad, K. M. T., R. H. Jensen, T. M. Hassan, E. G. Mathiasen, G. M. Thomsen, U. G. Pedersen, M. Christensen, O. Hilberg, et M. C. Arendrup. 2014. « First Detection of TR46/Y121F/T289A and TR34/L98H Alterations in Aspergillus Fumigatus Isolates from Azole-Naive Patients in Denmark despite Negative Findings in the Environment ». *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 58 (9): 5096-5101. https://doi.org/10.1128/AAC.02855-14.

Ayerst, G. 1969. « The effects of moisture and temperature on growth and spore germination in some fungi ». *Journal of Stored Products Research* 5 (2): 127-41. https://doi.org/10.1016/0022-474X(69)90055-1.

Bader, Oliver, Jana Tünnermann, Anna Dudakova, Marut Tangwattanachuleeporn, Michael Weig, et Uwe Groß. 2015. « Environmental Isolates of Azole-Resistant Aspergillus fumigatus in Germany ». *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 59 (7): 4356-59. https://doi.org/10.1128/AAC.00100-15.

Balajee, S. Arunmozhi, Jennifer L. Gribskov, Edward Hanley, David Nickle, et Kieren A. Marr. 2005. « Aspergillus Lentulus Sp. Nov., a New Sibling Species of A. Fumigatus ». *Eukaryotic Cell* 4 (3): 625-32. https://doi.org/10.1128/EC.4.3.625-632.2005.

Bedin Denardi, Laura, Bianca Hoch Dalla-Lana, Francielli Pantella Kunz de Jesus, Cecília Bittencourt Severo, Janio Morais Santurio, Régis Adriel Zanette, et Sydney Hartz Alves. 2018. « In vitro antifungal susceptibility of clinical and environmental isolates of Aspergillus fumigatus and Aspergillus flavus in Brazil ». *The Brazilian Journal of Infectious Diseases* 22 (1): 30-36. https://doi.org/10.1016/j.bjid.2017.10.005.

Bennett, John Hughes. 1842. « On the Parasitic Vegetable Structures Found Growing in Living Animals ». *Trans. Roy. Soc.*, 277-94.

Bitar, Dounia, Olivier Lortholary, Yann Le Strat, Javier Nicolau, Bruno Coignard, Pierre Tattevin, Didier Che, et Françoise Dromer. 2014. « Population-Based Analysis of Invasive Fungal Infections, France, 2001–2010 ». *Emerging Infectious Diseases* 20 (7): 1149-55. https://doi.org/10.3201/eid2007.140087.

Blot, Stijn I., Fabio Silvio Taccone, Anne-Marie Van den Abeele, Pierre Bulpa, Wouter Meersseman, Nele Brusselaers, George Dimopoulos, et al. 2012. « A Clinical Algorithm to Diagnose Invasive Pulmonary Aspergillosis in Critically Ill Patients ». *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 186 (1): 56-64. https://doi.org/10.1164/rccm.201111-1978OC.

Brown, Derek. 2012. « Rationale for the EUCAST Clinical Breakpoints », 11.

Brown, Michael S., Suzanna E. Dana, et Joseph L. Goldstein. 1973. « Regulation of 3-Hydroxy-3-Methylglutaryl Coenzyme A Reductase Activity in Human Fibroblasts by

Lipoproteins ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 70 (7): 2162-66.

Bueid, Ahmed, Susan J. Howard, Caroline B. Moore, Malcolm D. Richardson, Elizabeth Harrison, Paul Bowyer, et David W. Denning. 2010. « Azole Antifungal Resistance in Aspergillus Fumigatus: 2008 and 2009 ». *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 65 (10): 2116-18. https://doi.org/10.1093/jac/dkq279.

Buil, J., Ferry Hagen, Anuradha Chowdhary, Paul Verweij, Jacques Meis, Jochem B. Buil, Ferry Hagen, Anuradha Chowdhary, Paul E. Verweij, et Jacques F. Meis. 2018. « Itraconazole, Voriconazole, and Posaconazole CLSI MIC Distributions for Wild-Type and Azole-Resistant Aspergillus Fumigatus Isolates ». *Journal of Fungi* 4 (3): 103. https://doi.org/10.3390/jof4030103.

Buil, Snelders, Denardi, Melchers, et Verweij. 2019. « Trends in Azole Resistance in Aspergillus Fumigatus, the Netherlands, 1994–2016 », Emerging Infectious Diseases journal, 25 (1). https://doi.org/10.3201/eid2501.171925.

Camps, Simone M. T., Bas E. Dutilh, Maiken C. Arendrup, Antonius J. M. M. Rijs, Eveline Snelders, Martijn A. Huynen, Paul E. Verweij, et Willem J. G. Melchers. 2012. « Discovery of a hapE Mutation That Causes Azole Resistance in Aspergillus fumigatus through Whole Genome Sequencing and Sexual Crossing ». *PLoS ONE* 7 (11). https://doi.org/10.1371/journal.pone.0050034.

Camps, Simone M. T., Jan W. M. van der Linden, Yi Li, Ed J. Kuijper, Jaap T. van Dissel, Paul E. Verweij, et Willem J. G. Melchers. 2012. « Rapid Induction of Multiple Resistance Mechanisms in Aspergillus fumigatus during Azole Therapy: a Case Study and Review of the Literature ». *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 56 (1): 10-16. https://doi.org/10.1128/AAC.05088-11.

Camps, Simone M. T., Antonius J. M. M. Rijs, Corné H. W. Klaassen, Jacques F. Meis, Céline M. O'Gorman, Paul S. Dyer, Willem J. G. Melchers, et Paul E. Verweij. 2012. « Molecular Epidemiology of Aspergillus fumigatus Isolates Harboring the TR34/L98H Azole Resistance Mechanism ». *Journal of Clinical Microbiology* 50 (8): 2674-80. https://doi.org/10.1128/JCM.00335-12.

Camps, S.M.T., J. W. M. Van Der Linden, W. J. G. Melchers, et P. E. Verweij. 2011. « A new resistance mechanism emerging in clinical Aspergillus fumigatus isolates in The Netherlands | Aspergillus & Aspergillosis Website ». 2011. https://www.aspergillus.org.uk/content/new-resistance-mechanism-emerging-clinical-aspergillus-fumigatus-isolates-netherlands.

Castillo, Caroline G., Carol A. Kauffman, Jingyi Zhai, Hui Jiang, Stephanie M. Agozino, et Marisa H. Miceli. 2017. « Testing the Performance of a Prototype Lateral Flow Device Using Bronchoalveolar Lavage Fluid for the Diagnosis of Invasive Pulmonary Aspergillosis in High-Risk Patients ». *Mycoses* 61 (1): 4-10. https://doi.org/10.1111/myc.12694.

Chowdhary, Anuradha, Shallu Kathuria, Jianping Xu, et Jacques F. Meis. 2013. « Emergence of Azole-Resistant Aspergillus fumigatus Strains due to Agricultural Azole Use Creates an Increasing Threat to Human Health ». *PLoS Pathogens* 9 (10). https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003633.

Chowdhary, Anuradha, Shallu Kathuria, Jianping Xu, Cheshta Sharma, Gandhi Sundar, Pradeep Kumar Singh, Shailendra N. Gaur, Ferry Hagen, Corné H. Klaassen, et Jacques F. Meis. 2012. « 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* 7 (12). https://doi.org/10.1371/journal.pone.0052871.

Chowdhary, Anuradha, Cheshta Sharma, Ferry Hagen, et Jacques F Meis. 2014. « Exploring Azole Antifungal Drug Resistance in *Aspergillus Fumigatus* with Special Reference to Resistance Mechanisms ». *Future Microbiology* 9 (5): 697-711.

https://doi.org/10.2217/fmb.14.27.
Chowdhary, Anuradha, Cheshta Sharma, Shallu Kathuria, Ferry Hagen, et Jacques F. Meis. 2015. « Prevalence and mechanism of triazole resistance in Aspergillus fumigatus in a referral chest hospital in Delhi, India and an update of the situation in Asia ». *Frontiers in Microbiology* 6 (mai). https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00428.
Chowdhary, Anuradha, Cheshta Sharma, et Jacques F. Meis. 2017. « Azole-Resistant Aspergillosis: Epidemiology, Molecular Mechanisms, and Treatment ». *The Journal of Infectious Diseases* 216 (suppl_3): S436-44. https://doi.org/10.1093/infdis/jix210.
Chryssanthou, E. 1997. « In Vitro Susceptibility of Respiratory Isolates of Aspergillus Species to Itraconazole and Amphotericin B. Acquired Resistance to Itraconazole ». *Scandinavian Journal of Infectious Diseases* 29 (5): 509-12.
Church, Margaret B. 1918. *Aspergillus Fumigatus, A. Nidulans, A. Terreus N. Sp. and Their Allies*. American Journal of Botany. http://archive.org/details/jstor-2435130.
Cornely, Oliver A., Lambertus Meems, Raoul Herbrecht, Claudio Viscoli, Ronald G. M. van Amsterdam, et Markus Ruhnke. 2015. « Randomised, Multicentre Trial of Micafungin vs. an Institutional Standard Regimen for Salvage Treatment of Invasive Aspergillosis ». *Mycoses* 58 (1): 58-64. https://doi.org/10.1111/myc.12274.
Cui, Ning, Yiwen He, Shijie Yao, Hongchao Zhang, Jingbei Ren, Hua Fang, et Yunlong Yu. 2019. « Tebuconazole induces triazole-resistance in Aspergillus fumigatus in liquid medium and soil ». *Science of The Total Environment* 648 (janvier): 1237-43. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.08.247.
Dannaoui, E., E. Borel, M. F. Monier, M. A. Piens, S. Picot, et F. Persat. 2001. « Acquired Itraconazole Resistance in Aspergillus Fumigatus ». *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 47 (3): 333-40.
Dannaoui, E., F. Persat, M. F. Monier, E. Borel, M. A. Piens, et S. Picot. 1999. « In-Vitro Susceptibility of Aspergillus Spp. Isolates to Amphotericin B and Itraconazole ». *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 44 (4): 553-55.
De Pauw, Ben, Thomas J. Walsh, J. Peter Donnelly, David A. Stevens, John E. Edwards, Thierry Calandra, Peter G. Pappas, et al. 2008. « Revised Definitions of Invasive Fungal Disease from the European Organization for Research and Treatment of Cancer/Invasive Fungal Infections Cooperative Group and the National Institute of Allergy and Infectious Diseases Mycoses Study Group (EORTC/MSG) Consensus Group ». *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America* 46 (12): 1813-21. https://doi.org/10.1086/588660.
Del Sorbo, G., A. C. Andrade, J. G. Van Nistelrooy, J. A. Van Kan, E. Balzi, et M. A. De Waard. 1997. « Multidrug Resistance in Aspergillus Nidulans Involves Novel ATP-Binding Cassette Transporters ». *Molecular & General Genetics: MGG* 254 (4): 417-26.
Delhaes, Laurence, Kada Touati, Odile Faure-Cognet, Muriel Cornet, Françoise Botterel, Eric DannaouiI, Florent Morio, et al. 2018. « Prevalence, geographic risk factor, and development of a standardized protocol for fungal isolation in cystic fibrosis: Results from the international prospective study “MFIP” ». *Journal of Cystic Fibrosis*, octobre. https://doi.org/10.1016/j.jcf.2018.10.001.
Denis, Blandine, Marguerite Guiguet, Nathalie de Castro, Frédéric Mechaï, Matthieu Revest, Giovanna Melica, Dominique Costagliola, et Olivier Lortholary. 2015. « Relevance of EORTC Criteria for the Diagnosis of Invasive Aspergillosis in HIV-Infected Patients, and Survival Trends Over a 20-Year Period in France ». *Clinical Infectious Diseases* 61 (8): 1273-80. https://doi.org/10.1093/cid/civ492.
Denning, D. W. 1998. « Invasive Aspergillosis ». *Clinical Infectious Diseases: An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America* 26 (4): 781-803; quiz 804-5.
Denning, D. W., B. R. O’Driscoll, C. M. Hogaboam, P. Bowyer, et R. M. Niven. 2006. « The Link between Fungi and Severe Asthma: A Summary of the Evidence ». *European*

Respiratory Journal 27 (3): 615-26. https://doi.org/10.1183/09031936.06.00074705.

Denning, D W, K Venkateswarlu, K L Oakley, M J Anderson, N J Manning, D A Stevens, D W Warnock, et S L Kelly. 1997. « Itraconazole resistance in Aspergillus fumigatus. » *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 41 (6): 1364-68.

Denning, David W., Jacques Cadranel, Catherine Beigelman-Aubry, Florence Ader, Arunaloke Chakrabarti, Stijn Blot, Andrew J. Ullmann, George Dimopoulos, et Christoph Lange. 2016. « Chronic Pulmonary Aspergillosis: Rationale and Clinical Guidelines for Diagnosis and Management ». *European Respiratory Journal* 47 (1): 45-68. https://doi.org/10.1183/13993003.00583-2015.

Denning, David W., Steven Park, Cornelia Lass-Florl, Marcin G. Fraczek, Marie Kirwan, Robin Gore, Jaclyn Smith, et al. 2011. « High-frequency Triazole Resistance Found In Nonculturable Aspergillus fumigatus from Lungs of Patients with Chronic Fungal Disease ». *Clinical Infectious Diseases: An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America* 52 (9): 1123-29. https://doi.org/10.1093/cid/cir179.

Denning, David W, Alex Pleuvry, et Donald C Cole. 2011. « Global burden of chronic pulmonary aspergillosis as a sequel to pulmonary tuberculosis ». *Bulletin of the World Health Organization* 89 (12): 864-72. https://doi.org/10.2471/BLT.11.089441.

Denning, David W., Alex Pleuvry, et Donald C. Cole. 2013a. « Global Burden of Chronic Pulmonary Aspergillosis Complicating Sarcoidosis ». *European Respiratory Journal* 41 (3): 621-26. https://doi.org/10.1183/09031936.00226911.

———. 2013b. « Global Burden of Allergic Bronchopulmonary Aspergillosis with Asthma and Its Complication Chronic Pulmonary Aspergillosis in Adults ». *Medical Mycology* 51 (4): 361-70. https://doi.org/10.3109/13693786.2012.738312.

Dhingra, Sourabh, et Robert Cramer. 2017. « Regulation of Sterol Biosynthesis in the Human Fungal Pathogen Aspergillus fumigatus: Opportunities for Therapeutic Development ». *Frontiers in Microbiology* 8 (février). https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00092.

Diaz-Guerra, T. M., E. Mellado, M. Cuenca-Estrella, et J. L. Rodriguez-Tudela. 2003. « A Point Mutation in the 14alpha-Sterol Demethylase Gene Cyp51A Contributes to Itraconazole Resistance in Aspergillus Fumigatus ». *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 47 (3): 1120-24.

Dutcher, James D. 1968. « The Discovery and Development of Amphotericin B ». *Diseases of the Chest* 54 (octobre): 296-98. https://doi.org/10.1378/chest.54.Supplement_1.296.

Engel, Tobias G. P., Lydie Slabbers, Carmen de Jong, Willem J. G. Melchers, Ferry Hagen, Paul E. Verweij, Peter Merkus, et Jacques F. Meis. 2018. « Prevalence and diversity of filamentous fungi in the airways of cystic fibrosis patients – A Dutch, multicentre study ». *Journal of Cystic Fibrosis*, décembre. https://doi.org/10.1016/j.jcf.2018.11.012.

« EUCAST Technical Note on the method for the determination of broth dilution minimum inhibitory concentrations of antifungal agents for conidia–forming moulds ». 2008. *Clinical Microbiology and Infection* 14 (10): 982-84. https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2008.02086.x.

« Eucast2 ». s. d. Eucast.org. Consulté le 8 mars 2019. https://mic.eucast.org/Eucast2/regShow.jsp?Id=37757.

Felton, Timothy W., Caroline Baxter, Caroline B. Moore, Stephen A. Roberts, William W. Hope, et David W. Denning. 2010. « Efficacy and Safety of Posaconazole for Chronic Pulmonary Aspergillosis ». *Clinical Infectious Diseases* 51 (12): 1383-91. https://doi.org/10.1086/657306.

Ferreira, M. E. da Silva, A. L. Colombo, I. Paulsen, Q. Ren, J. Wortman, J. Huang, M. H. S. Goldman, et G. H. Goldman. 2005. « The Ergosterol Biosynthesis Pathway, Transporter Genes, and Azole Resistance in Aspergillus Fumigatus ». *Medical Mycology* 43 Suppl 1 (mai): S313-319.

Fisher, Matthew C., Nichola J. Hawkins, Dominique Sanglard, et Sarah J. Gurr. 2018. « Worldwide Emergence of Resistance to Antifungal Drugs Challenges Human Health and Food Security ». *Science* 360 (6390): 739-42. https://doi.org/10.1126/science.aap7999.

Fraczek, M. G., Michael Bromley, Ahmed Buied, Caroline B. Moore, Ranjith Rajendran, Riina Rautemaa, Gordon Ramage, David W. Denning, et Paul Bowyer. 2013. « The Cdr1B Efflux Transporter Is Associated with Non-Cyp51a-Mediated Itraconazole Resistance in Aspergillus Fumigatus ». *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 68 (7): 1486-96. https://doi.org/10.1093/jac/dkt075.

Fraczek Marcin G., Kirwan Marie B., Moore Caroline B., Morris Julie, Denning David W., et Richardson Malcolm D. 2013. « Volume dependency for culture of fungi from respiratory secretions and increased sensitivity of Aspergillus quantitative PCR ». *Mycoses* 57 (2): 69-78. https://doi.org/10.1111/myc.12103.

Garcia-Rubio, Rocio, Sara Monzon, Laura Alcazar-Fuoli, Isabel Cuesta, et Emilia Mellado. 2018. « Genome-Wide Comparative Analysis of Aspergillus Fumigatus Strains: The Reference Genome as a Matter of Concern ». *Genes* 9 (7): 363. https://doi.org/10.3390/genes9070363.

Godet, Cendrine, Bruno Philippe, François Laurent, et Jacques Cadranel. 2014. « Chronic Pulmonary Aspergillosis: An Update on Diagnosis and Treatment ». *Respiration* 88 (2): 162-74. https://doi.org/10.1159/000362674.

Gomez-Lopez, Alicia, Guillermo Garcia-Effron, Emilia Mellado, Araceli Monzon, Juan L. Rodriguez-Tudela, et Manuel Cuenca-Estrella. 2003. « In Vitro Activities of Three Licensed Antifungal Agents against Spanish Clinical Isolates of Aspergillus spp. » *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 47 (10): 3085-88. https://doi.org/10.1128/AAC.47.10.3085-3088.2003.

Greenberger, Paul A. 2002. « Allergic bronchopulmonary aspergillosis ». *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 110 (5): 685-92. https://doi.org/10.1067/mai.2002.130179.

Greenberger, Paul A., Robert K. Bush, Jeffrey G. Demain, Amber Luong, Raymond G. Slavin, et Alan P. Knutsen. 2014. « Allergic Bronchopulmonary Aspergillosis ». *The journal of allergy and clinical immunology. In practice* 2 (6): 703-8. https://doi.org/10.1016/j.jaip.2014.08.007.

Gsaller, Fabio, Peter Hortschansky, Takanori Furukawa, Paul D. Carr, Bharat Rash, Javier Capilla, Christoph Müller, et al. 2016. « Sterol Biosynthesis and Azole Tolerance Is Governed by the Opposing Actions of SrbA and the CCAAT Binding Complex ». *PLoS Pathogens* 12 (7). https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1005775.

Guegan, Hélène, Sylviane Chevrier, Chantal Belleguic, Eric Deneuville, Florence Robert-Gangneux, et Jean-Pierre Gangneux. 2018. « Performance of Molecular Approaches for Aspergillus Detection and Azole Resistance Surveillance in Cystic Fibrosis ». *Frontiers in Microbiology* 9. https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00531.

Guinea, J., P. E. Verweij, J. Meletiadis, J. W. Mouton, F. Barchiesi, M. C. Arendrup, M. C. Arendrup, et al. 2018. « How to: EUCAST Recommendations on the Screening Procedure E.Def 10.1 for the Detection of Azole Resistance in Aspergillus Fumigatus Isolates Using Four-Well Azole-Containing Agar Plates ». *Clinical Microbiology and Infection* 0 (0). https://doi.org/10.1016/j.cmi.2018.09.008.

Hagiwara, Daisuke. 2018. « Current Status of Azole-Resistant Aspergillus Fumigatus Isolates in East Asia ». *Medical Mycology Journal* 59 (4): E71-76. https://doi.org/10.3314/mmj.18.010.

Hagiwara, Daisuke, Teppei Arai, Hiroki Takahashi, Yoko Kusuya, Akira Watanabe, et Katsuhiko Kamei. 2018. « Non-cyp51A Azole-Resistant Aspergillus fumigatus Isolates with Mutation in HMG-CoA Reductase ». *Emerging Infectious Diseases* 24 (10): 1889-97. https://doi.org/10.3201/eid2410.180730.

Hagiwara, Daisuke, Daisuke Miura, Kiminori Shimizu, Sanjoy Paul, Ayumi Ohba, Tohru

Gonoi, Akira Watanabe, et al. 2017. « A Novel Zn2-Cys6 Transcription Factor AtrR Plays a Key Role in an Azole Resistance Mechanism of Aspergillus fumigatus by Co-regulating cyp51A and cdr1B Expressions ». *PLoS Pathogens* 13 (1). https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1006096.

Hagiwara, Daisuke, Hiroki Takahashi, Akira Watanabe, Azusa Takahashi-Nakaguchi, Susumu Kawamoto, Katsuhiko Kamei, et Tohru Gonoi. 2014. « Whole-Genome Comparison of Aspergillus Fumigatus Strains Serially Isolated from Patients with Aspergillosis ». *Journal of Clinical Microbiology* 52 (12): 4202. https://doi.org/10.1128/JCM.01105-14.

Haines, John. 1995. « Aspergillus in compost : straw man or fatal flaw ? » *Biocycle*, 32-35.

Hare, Rasmus K., Jan B. Gertsen, Karen M.T. Astvad, Kristine B. Degn, Anders Løkke, Marc Stegger, Paal S. Andersen, Lise Kristensen, et Maiken C. Arendrup. 2019. « In Vivo Selection of a Unique Tandem Repeat Mediated Azole Resistance Mechanism (TR120) in Aspergillus fumigatus cyp51A, Denmark ». *Emerging Infectious Diseases* 25 (3): 577-80. https://doi.org/10.3201/eid2503.180297.

Hazen, E. L., et R. Brown. 1951. « Fungicidin, an Antibiotic Produced by a Soil Actinomycete ». *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine. Society for Experimental Biology and Medicine (New York, N.Y.)* 76 (1): 93-97.

Heinz, Werner J., Dieter Buchheidt, et Andrew J. Ullmann. 2016. « Clinical Evidence for Caspofungin Monotherapy in the First-line and Salvage Therapy of Invasive Aspergillus Infections ». *Mycoses* 59 (8): 480-93. https://doi.org/10.1111/myc.12477.

Heo, Sang Taek, Alexander M. Tatara, Cristina Jiménez-Ortigosa, Ying Jiang, Russell E. Lewis, Jeffrey Tarrand, Frank Tverdek, et al. 2017. « Changes in In Vitro Susceptibility Patterns of Aspergillus to Triazoles and Correlation With Aspergillosis Outcome in a Tertiary Care Cancer Center, 1999–2015 ». *Clinical Infectious Diseases: An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America* 65 (2): 216-25. https://doi.org/10.1093/cid/cix297.

Hibbett, David S., Manfred Binder, Joseph F. Bischoff, Meredith Blackwell, Paul F. Cannon, Ove E. Eriksson, Sabine Huhndorf, et al. 2007. « A higher-level phylogenetic classification of the Fungi ». *Mycological Research* 111 (5): 509-47. https://doi.org/10.1016/j.mycres.2007.03.004.

Hiemenz, J. W., I. I. Raad, J. A. Maertens, R. Y. Hachem, A. J. Saah, C. A. Sable, J. A. Chodakewitz, et al. 2010. « Efficacy of Caspofungin as Salvage Therapy for Invasive Aspergillosis Compared to Standard Therapy in a Historical Cohort ». *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases* 29 (11): 1387-94. https://doi.org/10.1007/s10096-010-1013-0.

Hodiamont, Caspar J., Koert M. Dolman, Ten Berge, Ineke J. M, Willem J. G. Melchers, Paul E. Verweij, et Dasja Pajkrt. 2009. « Multiple-Azole-Resistant Aspergillus Fumigatus Osteomyelitis in a Patient with Chronic Granulomatous Disease Successfully Treated with Long-Term Oral Posaconazole and Surgery ». *Medical Mycology* 47 (2): 217-20. https://doi.org/10.1080/13693780802545600.

Hoenigl, M., J. Prattes, B. Spiess, J. Wagner, F. Prueller, R. B. Raggam, V. Posch, et al. 2014. « Performance of Galactomannan, Beta-d-Glucan, Aspergillus Lateral-Flow Device, Conventional Culture, and PCR Tests with Bronchoalveolar Lavage Fluid for Diagnosis of Invasive Pulmonary Aspergillosis ». *Journal of Clinical Microbiology* 52 (6): 2039-45. https://doi.org/10.1128/JCM.00467-14.

Houbraken, Jos, Ronald P. de Vries, et Robert A. Samson. 2014. « Modern Taxonomy of Biotechnologically Important Aspergillus and Penicillium Species ». *Advances in Applied Microbiology* 86: 199-249. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800262-9.00004-4.

Howard, S. J., Dasa Cerar, Michael J. Anderson, Ahmed Albarrag, Matthew C. Fisher, Alessandro C. Pasqualotto, Michel Laverdiere, Maiken C. Arendrup, David S. Perlin,

et David W. Denning. 2009. « Frequency and Evolution of Azole Resistance in Aspergillus fumigatus Associated with Treatment Failure1 ». *Emerging Infectious Diseases* 15 (7): 1068-76. https://doi.org/10.3201/eid1507.090043.

Howard, S. J., A. C. Pasqualotto, M. J. Anderson, H. Leatherbarrow, A. M. Albarrag, E. Harrison, L. Gregson, P. Bowyer, et D. W. Denning. 2013. « Major Variations in Aspergillus Fumigatus Arising within Aspergillomas in Chronic Pulmonary Aspergillosis ». *Mycoses* 56 (4): 434-41. https://doi.org/10.1111/myc.12047.

Howard, Susan J., Ian Webster, C. B. Moore, Rebecca Gardiner, Steven Park, David S. Perlin, et David W. Denning. 2006. « Multi-azole resistance in Aspergillus fumigatus ».

Howard, Susan Julie. 2014. « Multi-Resistant Aspergillosis Due to Cryptic Species ». *Mycopathologia* 178 (5): 435-39. https://doi.org/10.1007/s11046-014-9774-0.

Howard, Susan Julie, et Maiken Cavling Arendrup. 2011. « Acquired Antifungal Drug Resistance in Aspergillus Fumigatus: Epidemiology and Detection ». *Medical Mycology* 49 (Supplement_1): S90-95. https://doi.org/10.3109/13693786.2010.508469.

Isnard, M., E. Hullo, Y. Robert, C. Piolat, C. Durand, S. Lantuejoul, C. Garnaud, et I. Pin. 2018. « [Post-traumatic pulmonary aspergilloma] ». *Revue Des Maladies Respiratoires*, mars. https://doi.org/10.1016/j.rmr.2017.05.005.

« Janssen Pharmaceutica ». 2018. *Wikipedia*. https://en.wikipedia.org/w/index.php?title=Janssen_Pharmaceutica&oldid=836057344.

Jiménez-Ortigosa, Cristina, Caroline Moore, David W. Denning, et David S. Perlin. 2017. « Emergence of Echinocandin Resistance Due to a Point Mutation in the fks1 Gene of Aspergillus fumigatus in a Patient with Chronic Pulmonary Aspergillosis ». *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 61 (12). https://doi.org/10.1128/AAC.01277-17.

Klaassen, Corné H. W., Hanneke A. de Valk, Ilse M. Curfs-Breuker, et Jacques F. Meis. 2010. « Novel Mixed-Format Real-Time PCR Assay to Detect Mutations Conferring Resistance to Triazoles in Aspergillus Fumigatus and Prevalence of Multi-Triazole Resistance among Clinical Isolates in the Netherlands ». *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 65 (5): 901-5. https://doi.org/10.1093/jac/dkq041.

Knutsen, Alan P., Robert K. Bush, Jeffrey G. Demain, David W. Denning, Anupma Dixit, Abbie Fairs, Paul A. Greenberger, et al. 2012. « Fungi and allergic lower respiratory tract diseases ». *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 129 (2): 280-91. https://doi.org/10.1016/j.jaci.2011.12.970.

Kontoyiannis, Dimitrios P., Kieren A. Marr, Benjamin J. Park, Barbara D. Alexander, Elias J. Anaissie, Thomas J. Walsh, James Ito, et al. 2010. « Prospective Surveillance for Invasive Fungal Infections in Hematopoietic Stem Cell Transplant Recipients, 2001-2006: Overview of the Transplant-Associated Infection Surveillance Network (TRANSNET) Database ». *Clinical Infectious Diseases: An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America* 50 (8): 1091-1100. https://doi.org/10.1086/651263.

Krijgsheld, P., R. Bleichrodt, G.J. van Veluw, F. Wang, W.H. Müller, J. Dijksterhuis, et H.A.B. Wösten. 2013. « Development in Aspergillus ». *Studies in Mycology* 74 (1): 1-29. https://doi.org/10.3114/sim0006.

Kwon-Chung, Kyung J., et Janyce A. Sugui. 2013. « Aspergillus fumigatus—What Makes the Species a Ubiquitous Human Fungal Pathogen? » *PLoS Pathogens* 9 (12). https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003743.

Langridge, Philip J., Reyenna L. Sheehan, et David W. Denning. 2016. « Microbial yield from physiotherapy assisted sputum production in respiratory outpatients ». *BMC Pulmonary Medicine* 16 (février). https://doi.org/10.1186/s12890-016-0188-2.

Latgé, J P, H Kobayashi, J P Debeaupuis, M Diaquin, J Sarfati, J M Wieruszeski, E Parra, J P Bouchara, et B Fournet. 1994. « Chemical and immunological characterization of the

extracellular galactomannan of Aspergillus fumigatus. » *Infection and Immunity* 62 (12): 5424-33.

Latgé, Jean-Paul. 1999. « Aspergillus fumigatus and Aspergillosis ». *Clinical Microbiology Reviews* 12 (2): 310-50.

Lavergne, Rose-Anne, Taieb Chouaki, Ferry Hagen, Bénédicte Toublanc, Hervé Dupont, Vincent Jounieaux, Jacques F. Meis, Florent Morio, et Patrice Le Pape. 2017. « Home Environment as a Source of Life-Threatening Azole-Resistant Aspergillus Fumigatus in Immunocompromised Patients ». *Clinical Infectious Diseases* 64 (1): 76-78. https://doi.org/10.1093/cid/ciw664.

Lavergne, Rose-Anne, Florent Morio, Isabelle Danner-Boucher, Delphine Horeau-Langlard, V. David, Jacques Meis, Ferry Hagen, et Patrice Le Pape. 2018. « One-year prospective survey of azole resistance in Aspergillus fumigatus at a French cystic fibrosis reference center: prevalence and mechanisms of resistance ». Nantes.

Lavergne, Rose-Anne, Florent Morio, Loïc Favennec, Stéphane Dominique, Jacques F. Meis, Gilles Gargala, Paul E. Verweij, et Patrice Le Pape. 2015. « First Description of Azole-Resistant Aspergillus fumigatus Due to TR46/Y121F/T289A Mutation in France ». *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 59 (7): 4331-35. https://doi.org/10.1128/AAC.00127-15.

Lazzarini, Cristina, Maria Carmela Esposto, Anna Prigitano, Massimo Cogliati, Gabriella De Lorenzis, et Anna Maria Tortorano. 2016. « Azole Resistance in Aspergillus Fumigatus Clinical Isolates from an Italian Culture Collection ». *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 60 (1): 682-85. https://doi.org/10.1128/AAC.02234-15.

Leonardelli, Florencia, Laura Theill, María Elena Nardin, Daiana Macedo, Catiana Dudiuk, Emilce Mendez, Soledad Gamarra, et Guillermo Garcia-Effron. 2017. « First Itraconazole Resistant Aspergillus Fumigatus Clinical Isolate Harbouring a G54E Substitution in Cyp51Ap in South America ». *Revista Iberoamericana De Micologia* 34 (1): 46-48. https://doi.org/10.1016/j.riam.2016.05.005.

Lescar, J., I. Meyer, K. Akshita, K. Srinivasaraghavan, C. Verma, M. Palous, D. Mazier, A. Datry, et A. Fekkar. 2014. « Aspergillus Fumigatus Harbouring the Sole Y121F Mutation Shows Decreased Susceptibility to Voriconazole but Maintained Susceptibility to Itraconazole and Posaconazole ». *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 69 (12): 3244-47. https://doi.org/10.1093/jac/dku316.

Lestrade, Pieter P., Robbert G. Bentvelsen, Alexander F. A. D. Schauwvlieghe, Steven Schalekamp, Walter J. F. M. van der Velden, Ed J. Kuiper, Judith van Paassen, et al. 2018. « Voriconazole Resistance and Mortality in Invasive Aspergillosis: A Multicenter Retrospective Cohort Study ». *Clinical Infectious Diseases: An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America*, octobre. https://doi.org/10.1093/cid/ciy859.

Linden, Jan W. M. van der, Eveline Snelders, Jan P. Arends, Simon M. Daenen, Willem J. G. Melchers, et Paul E. Verweij. 2010. « Rapid Diagnosis of Azole-Resistant Aspergillosis by Direct PCR Using Tissue Specimens ». *Journal of Clinical Microbiology* 48 (4): 1478-80. https://doi.org/10.1128/JCM.02221-09.

Linden, J.W.M. van der, M.C. Arendrup, A. Warris, K. Lagrou, H. Pelloux, P.M. Hauser, E. Chryssanthou, et al. 2015. « Prospective Multicenter International Surveillance of Azole Resistance in Aspergillus fumigatus ». *Emerging Infectious Diseases* 21 (6): 1041-44. https://doi.org/10.3201/eid2106.140717.

Linden, Van Der, Jan W. M, Simone M. T. Camps, Greetje A. Kampinga, Jan P. A. Arends, Yvette J. Debets-Ossenkopp, Pieter J. A. Haas, et al. 2013. « Aspergillosis Due to Voriconazole Highly Resistant Aspergillus Fumigatus and Recovery of Genetically Related Resistant Isolates From Domiciles ». *Clinical Infectious Diseases* 57 (4): 513-20. https://doi.org/10.1093/cid/cit320.

Linden, Van Der, Jan W. M, Adilia Warris, et Paul E. Verweij. 2011. « Aspergillus Species

Intrinsically Resistant to Antifungal Agents ». *Medical Mycology* 49 (Supplement_1): S82-89. https://doi.org/10.3109/13693786.2010.499916.

Liss, B., J. J. Vehreschild, C. Bangard, D. Maintz, K. Frank, S. Grönke, G. Michels, et al. 2015. « Our 2015 Approach to Invasive Pulmonary Aspergillosis ». *Mycoses* 58 (6): 375-82. https://doi.org/10.1111/myc.12319.

Liu, Musang, Rong Zeng, Lili Zhang, Dongmei Li, Guixia Lv, Yongnian Shen, Hailin Zheng, et al. 2015. « Multiple cyp51A-Based Mechanisms Identified in Azole-Resistant Isolates of Aspergillus fumigatus from China ». *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 59 (7): 4321-25. https://doi.org/10.1128/AAC.00003-15.

Lockhart, Shawn R., João P. Frade, Kizee A. Etienne, Michael A. Pfaller, Daniel J. Diekema, et S. Arunmozhi Balajee. 2011. « Azole Resistance in Aspergillus fumigatus Isolates from the ARTEMIS Global Surveillance Study Is Primarily Due to the TR/L98H Mutation in the cyp51A Gene▽ ». *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 55 (9): 4465-68. https://doi.org/10.1128/AAC.00185-11.

Loeffert, S. T., L. Hénaff, D. Dupont, A. -L. Bienvenu, C. Dananché, P. Cassier, T. Bénet, M. Wallon, M. -P. Gustin, et P. Vanhems. 2018. « Prospective survey of azole drug resistance among environmental and clinical isolates of Aspergillus fumigatus in a French University hospital during major demolition works ». *Journal de Mycologie Médicale*, mai. https://doi.org/10.1016/j.mycmed.2018.05.007.

Lortholary, O., J.-P. Gangneux, K. Sitbon, B. Lebeau, F. de Monbrison, Y. Le Strat, B. Coignard, F. Dromer, et S. Bretagne. 2011. « Epidemiological Trends in Invasive Aspergillosis in France: The SAIF Network (2005–2007) ». *Clinical Microbiology and Infection* 17 (12): 1882-89. https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2011.03548.x.

Lowes, David, Livingstone Chishimba, Melanie Greaves, et David W. Denning. 2015. « Development of chronic pulmonary aspergillosis in adult asthmatics with ABPA ». *Respiratory Medicine* 109 (12): 1509-15. https://doi.org/10.1016/j.rmed.2015.09.007.

Maertens, Johan A, Issam I Raad, Kieren A Marr, Thomas F Patterson, Dimitrios P Kontoyiannis, Oliver A Cornely, Eric J Bow, et al. 2016. « Isavuconazole versus Voriconazole for Primary Treatment of Invasive Mould Disease Caused by Aspergillus and Other Filamentous Fungi (SECURE): A Phase 3, Randomised-Controlled, Non-Inferiority Trial ». *The Lancet* 387 (10020): 760-69. https://doi.org/10.1016/S0140-6736(15)01159-9.

Magan, N., et J. Lacey. 1984. « Effect of temperature and pH on water relations of field and storage fungi », 71-81.

Malloch, David, et R. F. Cain. 1972. « The Trichocomataceae: Ascomycetes with Aspergillus, Paecilomyces, and Penicillium imperfect states ». *Canadian Journal of Botany* 50 (12): 2613-28. https://doi.org/10.1139/b72-335.

Manavathu, Elias K., Jose A. Vazquez, et Pranatharthi H. Chandrasekar. 1999. « Reduced susceptibility in laboratory-selected mutants of Aspergillus fumigatus to itraconazole due to decreased intracellular accumulation of the antifungal agent ». *International Journal of Antimicrobial Agents* 12 (3): 213-19. https://doi.org/10.1016/S0924-8579(98)00102-2.

Martin Mazuelos, Estrella, Javier Peman, Anastasio Valverde, Mónica Chaves, M Carmen Serrano, et Emilia Cantón. 2003. « Comparison of the Sensititre YeastOne colorimetric antifungal panel and Etest with the NCCLS M38-A method to determine the activity of amphotericin B and itraconazole against clinical isolates of Aspergillus spp ». *The Journal of antimicrobial chemotherapy* 52 (septembre): 365-70. https://doi.org/10.1093/jac/dkg384.

Meis, Jacques F., Anuradha Chowdhary, Johanna L. Rhodes, Matthew C. Fisher, et Paul E. Verweij. 2016. « Clinical implications of globally emerging azole resistance in Aspergillus fumigatus ». *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 371 (1709). https://doi.org/10.1098/rstb.2015.0460.

Mellado, E., T. M. Diaz-Guerra, M. Cuenca-Estrella, et J. L. Rodriguez-Tudela. 2001. « Identification of Two Different 14-α Sterol Demethylase-Related Genes (cyp51A and cyp51B) in Aspergillus fumigatus and Other Aspergillus species ». *Journal of Clinical Microbiology* 39 (7): 2431-38. https://doi.org/10.1128/JCM.39.7.2431-2438.2001.

Mellado, E., G. Garcia-Effron, L. Alcázar-Fuoli, W. J. G. Melchers, P. E. Verweij, M. Cuenca-Estrella, et J. L. Rodríguez-Tudela. 2007. « A New Aspergillus Fumigatus Resistance Mechanism Conferring in Vitro Cross-Resistance to Azole Antifungals Involves a Combination of Cyp51A Alterations ». *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 51 (6): 1897-1904. https://doi.org/10.1128/AAC.01092-06.

Meneau, I., et D. Sanglard. 2005. « Azole and Fungicide Resistance in Clinical and Environmental Aspergillus Fumigatus Isolates ». *Medical Mycology* 43 Suppl 1 (mai): S307-311.

Meneau, Isabelle, Alix T. Coste, et Dominique Sanglard. 2016. « Identification of Aspergillus Fumigatus Multidrug Transporter Genes and Their Potential Involvement in Antifungal Resistance ». *Medical Mycology* 54 (6): 616-27. https://doi.org/10.1093/mmy/myw005.

Mercier, Toine, Alexander Schauwvlieghe, Elizabeth de Kort, Albert Dunbar, Marijke Reynders, Ellen Guldentops, Bart Rijnders, Paul E. Verweij, Katrien Lagrou, et Johan Maertens. 2019. « Diagnosing Invasive Pulmonary Aspergillosis in Hematology Patients: A Retrospective Multicenter Evaluation of a Novel Lateral Flow Device ». *Journal of Clinical Microbiology*, janvier, JCM.01913-18. https://doi.org/10.1128/JCM.01913-18.

Mohammadi, Faezezeh, Seyed Jamal Hashemi, Seyed Mojtaba Seyedmousavi, et Dorna Akbarzade. 2018. « Isolation and Characterization of Clinical Triazole Resistance Aspergillus Fumigatus in Iran ». *Iranian Journal of Public Health* 47 (7): 994-1000.

Morio, Florent, Guillaume G. Aubin, Isabelle Danner-Boucher, Alain Haloun, Emilie Sacchetto, Dea Garcia-Hermoso, Stéphane Bretagne, Michel Miegeville, et Patrice Le Pape. 2012. « High Prevalence of Triazole Resistance in Aspergillus Fumigatus, Especially Mediated by TR/L98H, in a French Cohort of Patients with Cystic Fibrosis ». *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 67 (8): 1870-73. https://doi.org/10.1093/jac/dks160.

Morio, Florent, Eric Dannaoui, Taieb Chouaki, Estelle Cateau, Olivier Malard, Pierre Bonfils, Cyril Page, et al. 2018. « PCR-Based Detection of Aspergillus Fumigatus and Absence of Azole Resistance Due to TR34/L98H in a French Multicenter Cohort of 137 Patients with Fungal Rhinosinusitis ». *Mycoses* 61 (1): 30-34. https://doi.org/10.1111/myc.12702.

Mortensen, Klaus Leth, Emilia Mellado, Cornelia Lass-Flörl, Juan Luis Rodriguez-Tudela, Helle Krogh Johansen, et Maiken Cavling Arendrup. 2010. « Environmental Study of Azole-Resistant Aspergillus Fumigatus and Other Aspergilli in Austria, Denmark, and Spain ». *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 54 (11): 4545-49. https://doi.org/10.1128/AAC.00692-10.

Mullins, J., R. Harvey, et A. Seaton. 1976. « Sources and Incidence of Airborne Aspergillus Fumigatus (Fres) ». *Clinical Allergy* 6 (3): 209-17.

Nivoix, Yasmine, Michel Velten, Valérie Letscher-Bru, Alireza Moghaddam, Shanti Natarajan-Amé, Cécile Fohrer, Bruno Lioure, et al. 2008. « Factors Associated with Overall and Attributable Mortality in Invasive Aspergillosis ». *Clinical Infectious Diseases* 47 (9): 1176-84. https://doi.org/10.1086/592255.

Nolard, N. 1994. « [Links between risks of aspergillosis and environmental contamination. Review of the literature] ». *Pathologie-Biologie* 42 (7): 706-10.

Odds, Frank C., Alistair J. P. Brown, et Neil A. R. Gow. 2003. « Antifungal Agents: Mechanisms of Action ». *Trends in Microbiology* 11 (6): 272-79.

https://doi.org/10.1016/S0966-842X(03)00117-3.
O'Gorman, Céline M., Hubert T. Fuller, et Paul S. Dyer. 2009. « Discovery of a Sexual Cycle in the Opportunistic Fungal Pathogen Aspergillus Fumigatus ». *Nature* 457 (7228): 471-74. https://doi.org/10.1038/nature07528.
Overton, Nicola L. D., Axel A. Brakhage, Andreas Thywißen, David W. Denning, et Paul Bowyer. 2018. « Mutations in EEA1 are associated with allergic bronchopulmonary aspergillosis and affect phagocytosis of Aspergillus fumigatus by human macrophages ». *PLoS ONE* 13 (3). https://doi.org/10.1371/journal.pone.0185706.
Paluch, M., S. Lejeune, E. Hecquet, A. Prévotat, A. Deschildre, et E. Fréalle. 2019. « High airborne level of Aspergillus fumigatus and presence of azole-resistant TR34/L98H isolates in the home of a cystic fibrosis patient harbouring chronic colonisation with azole-resistant H285Y A. fumigatus ». *Journal of Cystic Fibrosis*, janvier. https://doi.org/10.1016/j.jcf.2019.01.001.
Pappas, Peter G., Barbara D. Alexander, David R. Andes, Susan Hadley, Carol A. Kauffman, Alison Freifeld, Elias J. Anaissie, et al. 2010. « Invasive Fungal Infections among Organ Transplant Recipients: Results of the Transplant-Associated Infection Surveillance Network (TRANSNET) ». *Clinical Infectious Diseases: An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America* 50 (8): 1101-11. https://doi.org/10.1086/651262.
Pashley, Catherine H, Abbie Fairs, Joseph P Morley, Shreeya Tailor, Joshua Agbetile, Mona Bafadhel, Christopher E Brightling, et Andrew J Wardlaw. 2012. « Routine processing procedures for isolating filamentous fungi from respiratory sputum samples may underestimate fungal prevalence ». *Medical Mycology* 50 (4): 433-38. https://doi.org/10.3109/13693786.2011.615762.
Patterson, Thomas F., George R. Thompson, David W. Denning, Jay A. Fishman, Susan Hadley, Raoul Herbrecht, Dimitrios P. Kontoyiannis, et al. 2016. « Practice Guidelines for the Diagnosis and Management of Aspergillosis: 2016 Update by the Infectious Diseases Society of America ». *Clinical Infectious Diseases: An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America* 63 (4): e1-60. https://doi.org/10.1093/cid/ciw326.
Paul, Sanjoy, Daniel Diekema, et W. Scott Moye-Rowley. 2013. « Contributions of Aspergillus fumigatus ATP-Binding Cassette Transporter Proteins to Drug Resistance and Virulence ». *Eukaryotic Cell* 12 (12): 1619-28. https://doi.org/10.1128/EC.00171-13.
Pfaller, J. B., S. A. Messer, R. J. Hollis, D. J. Diekema, et M. A. Pfaller. 2003. « In Vitro Susceptibility Testing of Aspergillus spp.: Comparison of Etest and Reference Microdilution Methods for Determining Voriconazole and Itraconazole MICs ». *Journal of Clinical Microbiology* 41 (3): 1126-29. https://doi.org/10.1128/JCM.41.3.1126-1129.2003.
Pinto, Eugénia, Carolina Monteiro, Marta Maia, Miguel A. Faria, Virgínia Lopes, Catarina Lameiras, et Dolores Pinheiro. 2018. « Aspergillus Species and Antifungals Susceptibility in Clinical Setting in the North of Portugal: Cryptic Species and Emerging Azoles Resistance in A. Fumigatus ». *Frontiers in Microbiology* 9. https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01656.
Plaignaud, M. 1791. « Observation sur un fungus du sinus maxillaire ». J. Chir.
Prigitano, Anna, Maria C. Esposto, Luisa Romanò, Francesco Auxilia, et Anna M. Tortorano. 2018. « AZOLE-RESISTANT ASPERGILLUS FUMIGATUS IN THE ITALIAN ENVIRONMENT ». *Journal of Global Antimicrobial Resistance*, octobre. https://doi.org/10.1016/j.jgar.2018.10.017.
Pringle, A., D. M. Baker, J. L. Platt, J. P. Wares, J. P. Latgé, et J. W. Taylor. 2005. « Cryptic Speciation in the Cosmopolitan and Clonal Human Pathogenic Fungus Aspergillus Fumigatus ». *Evolution; International Journal of Organic Evolution* 59 (9): 1886-99.

Rahman, Fasih Ur, Muhammad Irfan, Naima Fasih, Kauser Jabeen, et Hasanat Sharif. 2016. « Pulmonary Scedosporiosis Mimicking Aspergilloma in an Immunocompetent Host: A Case Report and Review of the Literature ». *Infection* 44 (1): 127-32. https://doi.org/10.1007/s15010-015-0840-4.

Raper, K.B., et D.I. Fennell. 1965. *The Genus Aspergillus*.

Reichert-Lima, Franqueline, Luzia Lyra, Lais Pontes, Maria Luiza Moretti, Cau D. Pham, Shawn R. Lockhart, et Angélica Zaninelli Schreiber. 2018. « Surveillance for Azoles Resistance in Aspergillus Spp. Highlights a High Number of Amphotericin B-Resistant Isolates ». *Mycoses* 61 (6): 360-65. https://doi.org/10.1111/myc.12759.

Ren, Jingbei, Xiangxiang Jin, Qian Zhang, Yuan Zheng, Dunli Lin, et Yunlong Yu. 2017. « Fungicides Induced Triazole-Resistance in Aspergillus Fumigatus Associated with Mutations of TR46/Y121F/T289A and Its Appearance in Agricultural Fields ». *Journal of Hazardous Materials* 326 (mars): 54-60. https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2016.12.013.

Resendiz-Sharpe, A., J. Poelmans, S. Patteet, R. Merckx, I. Montesinos, et K. Lagrou. 2016. « Comparison of EUCAST and Sensititre YeastOne ® Broth microdilution methods for detection of azole resistance in Aspergillus fumigatus | Aspergillus & Aspergillosis Website ». 2016. https://www.aspergillus.org.uk/conference_abstracts/comparison-eucast-and-sensititre-yeastone-%C2%AE-broth-microdilution-methods.

Riat, Arnaud, Jérôme Plojoux, Katia Gindro, Jacques Schrenzel, et Dominique Sanglard. 2018. « Azole Resistance of Environmental and Clinical Aspergillus fumigatus Isolates from Switzerland ». *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 62 (4). https://doi.org/10.1128/AAC.02088-17.

Rivero-Menendez, Olga, Ana Alastruey-Izquierdo, Emilia Mellado, et Manuel Cuenca-Estrella. 2016. « Triazole Resistance in Aspergillus spp.: A Worldwide Problem? » *Journal of Fungi* 2 (3). https://doi.org/10.3390/jof2030021.

Rocchi, Steffi, Manon Ponçot, Nadia Morin-Crini, Audrey Laboissière, Benoit Valot, Chloé Godeau, Clothilde Léchenault-Bergerot, Gabriel Reboux, Grégorio Crini, et Laurence Millon. 2018. « Determination of Azole Fungal Residues in Soils and Detection of Aspergillus Fumigatus-Resistant Strains in Market Gardens of Eastern France ». *Environmental Science and Pollution Research*, septembre. https://doi.org/10.1007/s11356-018-3177-6.

Rodriguez-Tudela, Juan Luis, Laura Alcazar-Fuoli, Emilia Mellado, Ana Alastruey-Izquierdo, Araceli Monzon, et Manuel Cuenca-Estrella. 2008. « Epidemiological Cutoffs and Cross-Resistance to Azole Drugs in Aspergillus fumigatus ». *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 52 (7): 2468-72. https://doi.org/10.1128/AAC.00156-08.

Samson, R. A., C. M. Visagie, J. Houbraken, S. -B. Hong, V. Hubka, C. H. W. Klaassen, G. Perrone, et al. 2014. « Phylogeny, identification and nomenclature of the genus Aspergillus ». *Studies in Mycology* 78 (juin): 141-73. https://doi.org/10.1016/j.simyco.2014.07.004.

Santucci, R., O. Meunier, M. Ott, F. Herrmann, A. Freyd, et F. de Blay. 2007. « Contamination fongique des habitations : bilan de 10 années d'analyses ». *Revue Française d'Allergologie et d'Immunologie Clinique* 47 (6): 402-8. https://doi.org/10.1016/j.allerg.2007.02.105.

Selmecki, Anna, Anja Forche, et Judith Berman. 2006. « Aneuploidy and Isochromosome Formation in Drug-Resistant Candida albicans ». *Science (New York, N.Y.)* 313 (5785): 367-70. https://doi.org/10.1126/science.1128242.

Seyedmousavi, S., M. S. Lionakis, M. Parta, S. W. Peterson, et K. J. Kwon-Chung. 2018. « Emerging Aspergillus Species Almost Exclusively Associated With Primary Immunodeficiencies ». *Open Forum Infectious Diseases* 5 (9). https://doi.org/10.1093/ofid/ofy213.

Sharma, Cheshta, Ferry Hagen, Ruxandra Moroti, Jacques F. Meis, et Anuradha Chowdhary.

2015. « Triazole-resistant Aspergillus fumigatus harbouring G54 mutation: Is it de novo or environmentally acquired? » *Journal of Global Antimicrobial Resistance* 3 (2): 69-74. https://doi.org/10.1016/j.jgar.2015.01.005.

Slaven, John W., Michael J. Anderson, Dominique Sanglard, Graham K. Dixon, Jacques Bille, Ian S. Roberts, et David W. Denning. 2002. « Increased Expression of a Novel Aspergillus Fumigatus ABC Transporter Gene, AtrF, in the Presence of Itraconazole in an Itraconazole Resistant Clinical Isolate ». *Fungal Genetics and Biology: FG & B* 36 (3): 199-206.

Snelders, Eveline, Simone M. T. Camps, Anna Karawajczyk, Gijs Schaftenaar, Gert H. J. Kema, Henrich A. van der Lee, Corné H. Klaassen, Willem J. G. Melchers, et Paul E. Verweij. 2012. « Triazole Fungicides Can Induce Cross-Resistance to Medical Triazoles in Aspergillus fumigatus ». *PLoS ONE* 7 (3). https://doi.org/10.1371/journal.pone.0031801.

Snelders, Eveline, Robert A. G. Huis in 't Veld, Anthonius J. M. M. Rijs, Gert H. J. Kema, Willem J. G. Melchers, et Paul E. Verweij. 2009. « Possible Environmental Origin of Resistance of Aspergillus fumigatus to Medical Triazoles ». *Applied and Environmental Microbiology* 75 (12): 4053-57. https://doi.org/10.1128/AEM.00231-09.

Snelders, Eveline, Anna Karawajczyk, Gijs Schaftenaar, Paul E. Verweij, et Willem J. G. Melchers. 2010. « Azole Resistance Profile of Amino Acid Changes in Aspergillus Fumigatus CYP51A Based on Protein Homology Modeling ». *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 54 (6): 2425-30. https://doi.org/10.1128/AAC.01599-09.

Snelders, Eveline, Anna Karawajczyk, Rob J. A. Verhoeven, Hanka Venselaar, Gijs Schaftenaar, Paul E. Verweij, et Willem J. G. Melchers. 2011. « The Structure-Function Relationship of the Aspergillus Fumigatuscyp51A L98H Conversion by Site-Directed Mutagenesis: The Mechanism of L98H Azole Resistance ». *Fungal Genetics and Biology: FG & B* 48 (11): 1062-70. https://doi.org/10.1016/j.fgb.2011.08.002.

Snelders, Eveline, Henrich A. L van der Lee, Judith Kuijpers, Anthonius J. M. M Rijs, János Varga, Robert A Samson, Emilia Mellado, A. Rogier T Donders, Willem J. G Melchers, et Paul E Verweij. 2008. « Emergence of Azole Resistance in Aspergillus fumigatus and Spread of a Single Resistance Mechanism ». *PLoS Medicine* 5 (11). https://doi.org/10.1371/journal.pmed.0050219.

Steinmann, J., A. Hamprecht, M. J. G. T. Vehreschild, O. A. Cornely, D. Buchheidt, B. Spiess, M. Koldehoff, J. Buer, J. F. Meis, et P.-M. Rath. 2015. « Emergence of Azole-Resistant Invasive Aspergillosis in HSCT Recipients in Germany ». *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 70 (5): 1522-26. https://doi.org/10.1093/jac/dku566.

Sugui, Janyce A., Kyung J. Kwon-Chung, Praveen R. Juvvadi, Jean-Paul Latgé, et William J. Steinbach. 2015. « Aspergillus fumigatus and Related Species ». *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine* 5 (2). https://doi.org/10.1101/cshperspect.a019786.

Taccone, Fabio Silvio, Anne-Marie Van den Abeele, Pierre Bulpa, Benoit Misset, Wouter Meersseman, Teresa Cardoso, José-Artur Paiva, et al. 2015. « Epidemiology of invasive aspergillosis in critically ill patients: clinical presentation, underlying conditions, and outcomes ». *Critical Care* 19 (1). https://doi.org/10.1186/s13054-014-0722-7.

Talbot, Jessica J., Shradha Subedi, Catriona L. Halliday, David E. Hibbs, Felcia Lai, Francisco J. Lopez-Ruiz, Lincoln Harper, et al. 2018. « Surveillance for Azole Resistance in Clinical and Environmental Isolates of Aspergillus Fumigatus in Australia and Cyp51A Homology Modelling of Azole-Resistant Isolates ». *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 73 (9): 2347-51. https://doi.org/10.1093/jac/dky187.

Tashiro, Masato, Koichi Izumikawa, Asuka Minematsu, Katsuji Hirano, Naoki Iwanaga, Shotaro Ide, Tomo Mihara, et al. 2012. « Antifungal Susceptibilities of Aspergillus Fumigatus Clinical Isolates Obtained in Nagasaki, Japan ». *Antimicrobial Agents and*

Chemotherapy 56 (1): 584-87. https://doi.org/10.1128/AAC.05394-11.

Thornton, Christopher R. 2008. « Development of an Immunochromatographic Lateral-Flow Device for Rapid Serodiagnosis of Invasive Aspergillosis ». *Clinical and Vaccine Immunology : CVI* 15 (7): 1095-1105. https://doi.org/10.1128/CVI.00068-08.

Tillie-Leblond I., Germaud P., Leroyer C., Tétu L., Girard F., Devouassoux G., Grignet J.-P., Prudhomme A., Dusser D., et Wallaert B. 2011. « Allergic bronchopulmonary aspergillosis and omalizumab ». *Allergy* 66 (9): 1254-56. https://doi.org/10.1111/j.1398-9995.2011.02599.x.

Tobin, Matthew B, Robert B Peery, et Paul L Skatrud. 1997. « Genes encoding multiple drug resistance-like proteins in Aspergillus fumigatus and Aspergillus flavus ». *Gene* 200 (1): 11-23. https://doi.org/10.1016/S0378-1119(97)00281-3.

Trovato, Laura, Guido Scalia, Maria Domina, et Salvatore Oliveri. 2018. « Environmental Isolates of Multi-Azole-Resistant Aspergillus Spp. in Southern Italy ». *Journal of Fungi (Basel, Switzerland)* 4 (4). https://doi.org/10.3390/jof4040131.

Tsitsopoulou, Alexandra, Raquel Posso, Lorna Vale, Scarlett Bebb, Elizabeth Johnson, et P. L. White. 2018. « Determination of the Prevalence of Triazole Resistance in Environmental Aspergillus Fumigatus Strains Isolated in South Wales, UK ». *Frontiers in Microbiology* 9: 1395. https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01395.

Turnidge, J., G. Kahlmeter, et G. Kronvall. 2006. « Statistical Characterisation of Bacterial Wild-Type MIC Value Distributions and the Determination of Epidemiological Cut-off Values ». *Clinical Microbiology and Infection* 12 (5): 418-25. https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2006.01377.x.

Ullmann, A.J., J.M. Aguado, S. Arikan-Akdagli, D.W. Denning, A.H. Groll, K. Lagrou, C. Lass-Flörl, et al. 2018. « Diagnosis and Management of Aspergillus Diseases: Executive Summary of the 2017 ESCMID-ECMM-ERS Guideline ». *Clinical Microbiology and Infection*, mars. https://doi.org/10.1016/j.cmi.2018.01.002.

Vaezi, A., H. Fakhim, J. Javidnia, S. Khodavaisy, Z. Abtahian, M. Vojoodi, F. Nourbakhsh, et H. Badali. 2018. « Pesticide Behavior in Paddy Fields and Development of Azole-Resistant Aspergillus Fumigatus: Should We Be Concerned? » *Journal De Mycologie Medicale* 28 (1): 59-64. https://doi.org/10.1016/j.mycmed.2017.12.007.

Van Der Linden, J. W.M., Eveline Snelders, Greetje A. Kampinga, Bart J.A. Rijnders, Eva Mattsson, Yvette J. Debets-Ossenkopp, Ed J Kuijper, Frank H. Van Tiel, Willem J.G. Melchers, et Paul E. Verweij. 2011. « Clinical Implications of Azole Resistance in *Aspergillus fumigatus* , the Netherlands, 2007–2009 ». *Emerging Infectious Diseases* 17 (10): 1846-54. https://doi.org/10.3201/eid1710.110226.

Veerdonk, Frank L. van de, Eva Kolwijck, Pieter P. A. Lestrade, Caspar J. Hodiamont, Bart J. A. Rijnders, Judith van Paassen, Pieter-Jan Haas, et al. 2017. « Influenza-associated Aspergillosis in Critically Ill Patients ». *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 196 (4): 524-27. https://doi.org/10.1164/rccm.201612-2540LE.

Vermeulen, E., K. Lagrou, et P. E. Verweij. 2013. « Azole Resistance in Aspergillus Fumigatus: A Growing Public Health Concern ». *Current Opinion in Infectious Diseases* 26 (6): 493-500. https://doi.org/10.1097/QCO.0000000000000005.

Vermeulen, E., J. Maertens, H. Schoemans, et K. Lagrou. 2012. « Azole-Resistant Aspergillus Fumigatus Due to TR46/Y121F/T289A Mutation Emerging in Belgium, July 2012 ». *Eurosurveillance* 17 (48): 20326. https://doi.org/10.2807/ese.17.48.20326-en.

Vermeulen, E., Johan Maertens, Annelies De Bel, Eric Nulens, Jerina Boelens, Ignace Surmont, Anna Mertens, An Boel, et Katrien Lagrou. 2015. « Nationwide Surveillance of Azole Resistance in Aspergillus Diseases ». *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 59 (8): 4569-76. https://doi.org/10.1128/AAC.00233-15.

Verweij, Paul E., Michelle Ananda-Rajah, David Andes, Maiken C. Arendrup, Roger J. Brüggemann, Anuradha Chowdhary, Oliver A. Cornely, et al. 2015. « International expert opinion on the management of infection caused by azole-resistant Aspergillus

fumigatus ». *Drug Resistance Updates* 21-22 (juillet): 30-40. https://doi.org/10.1016/j.drup.2015.08.001.

Verweij, Paul E., Anuradha Chowdhary, Willem J. G. Melchers, et Jacques F. Meis. 2016. « Azole Resistance in Aspergillus fumigatus: Can We Retain the Clinical Use of Mold-Active Antifungal Azoles? » *Clinical Infectious Diseases: An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America* 62 (3): 362-68. https://doi.org/10.1093/cid/civ885.

Verweij, Paul E., Debbie T. A. Te Dorsthorst, Anthonius J. M. M. Rijs, Hilly G. De Vries-Hospers, Jacques F. G. M. Meis, et the Dutch Interuniversity Working Party for Invasive Mycoses. 2002. « Nationwide Survey of In Vitro Activities of Itraconazole and Voriconazole against Clinical Aspergillus Fumigatus Isolates Cultured between 1945 and 1998 ». *Journal of Clinical Microbiology* 40 (7): 2648-50. https://doi.org/10.1128/JCM.40.7.2648-2650.2002.

Verweij, Paul E., Emilia Mellado, et Willem J.G. Melchers. 2007. « Multiple-Triazole–Resistant Aspergillosis ». *New England Journal of Medicine* 356 (14): 1481-83. https://doi.org/10.1056/NEJMc061720.

Verweij, Paul E, Eveline Snelders, Gert HJ Kema, Emilia Mellado, et Willem JG Melchers. 2009. « Azole Resistance in Aspergillus Fumigatus: A Side-Effect of Environmental Fungicide Use? » *The Lancet Infectious Diseases* 9 (12): 789-95. https://doi.org/10.1016/S1473-3099(09)70265-8.

Verweij, Paul E, Jianhua Zhang, Alfons J M Debets, Jacques F Meis, Frank L van de Veerdonk, Sijmen E Schoustra, Bas J Zwaan, et Willem J G Melchers. 2016. « In-host adaptation and acquired triazole resistance in Aspergillus fumigatus: a dilemma for clinical management ». *The Lancet Infectious Diseases* 16 (11): e251-60. https://doi.org/10.1016/S1473-3099(16)30138-4.

Vidal-Acuña, María Reyes, Maite Ruiz, María José Torres, et Javier Aznar. 2018. « Prevalence and in Vitro Antifungal Susceptibility of Cryptic Species of the Genus Aspergillus Isolated in Clinical Samples ». *Enfermedades Infecciosas Y Microbiologia Clinica*, octobre. https://doi.org/10.1016/j.eimc.2018.07.010.

Wang, Z.-Y., J.-P. Cai, L.-W. Qiu, W. Hao, Y.-X. Pan, E. T. K. Tung, C. C. Y. Lau, et al. 2012. « Development of Monoclonal Antibody-Based Galactomannoprotein Antigen-Capture ELISAs to Detect Aspergillus Fumigatus Infection in the Invasive Aspergillosis Rabbit Models ». *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases: Official Publication of the European Society of Clinical Microbiology* 31 (11): 2943-50. https://doi.org/10.1007/s10096-012-1645-3.

Wauters, Joost, Ingrid Baar, Philippe Meersseman, Wouter Meersseman, Karolien Dams, Rudi De Paep, Katrien Lagrou, Alexander Wilmer, Philippe Jorens, et Greet Hermans. 2012. « Invasive Pulmonary Aspergillosis Is a Frequent Complication of Critically Ill H1N1 Patients: A Retrospective Study ». *Intensive Care Medicine* 38 (11): 1761-68. https://doi.org/10.1007/s00134-012-2673-2.

Whittaker, R. H. 1969. « New Concepts of Kingdoms or Organisms. Evolutionary Relations Are Better Represented by New Classifications than by the Traditional Two Kingdoms ». *Science (New York, N.Y.)* 163 (3863): 150-60.

Wiederhold, Nathan P., Veronica Garcia Gil, Felipe Gutierrez, Jonathan R. Lindner, Mohammad T. Albataineh, Dora I. McCarthy, Carmita Sanders, Hongxin Fan, Annette W. Fothergill, et Deanna A. Sutton. 2016. « First Detection of TR34 L98H and TR46 Y121F T289A Cyp51 Mutations in Aspergillus fumigatus Isolates in the United States ». *Journal of Clinical Microbiology* 54 (1): 168-71. https://doi.org/10.1128/JCM.02478-15.

Willger, Sven D., Srisombat Puttikamonkul, Kwang-Hyung Kim, James B. Burritt, Nora Grahl, Laurel J. Metzler, Robert Barbuch, Martin Bard, Christopher B. Lawrence, et Robert A. Cramer. 2008. « A Sterol-Regulatory Element Binding Protein Is Required

for Cell Polarity, Hypoxia Adaptation, Azole Drug Resistance, and Virulence in Aspergillus fumigatus ». *PLoS Pathogens* 4 (11). https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000200.

Woo, Patrick C. Y., Che-Man Chan, Andy S. P. Leung, Susanna K. P. Lau, Xiao-Yan Che, Samson S. Y. Wong, Liang Cao, et Kwok-Yung Yuen. 2002. « Detection of Cell Wall Galactomannoprotein Afmp1p in Culture Supernatants of Aspergillus fumigatus and in Sera of Aspergillosis Patients ». *Journal of Clinical Microbiology* 40 (11): 4382-87. https://doi.org/10.1128/JCM.40.11.4382-4387.2002.

Woolley, D. W. 1944. « Some Biological Effects Produced by Benzimidazole and Their Reversal by Purines ». *Journal of Biological Chemistry* 152 (2): 225-32.

Yu, Ling-Shan, Jesus Rodriguez-Manzano, Kenny Malpartida-Cardenas, Thomas Sewell, Oliver Bader, Darius Armstrong-James, Matthew C. Fisher, et Pantelis Georgiou. 2018. « Rapid and Sensitive Detection of Azole-Resistant Aspergillus Fumigatus by Tandem-Repeat Loop-Mediated Isothermal Amplification ». *The Journal of Molecular Diagnostics: JMD*, décembre. https://doi.org/10.1016/j.jmoldx.2018.10.004.

Zarrin, Majid, et Sama Faramarzi. 2018. « Study of Azole - Resistant and Cyp51a Gene in Aspergillus Fumigatus ». *Open Access Macedonian Journal of Medical Sciences* 6 (5): 747-50. https://doi.org/10.3889/oamjms.2018.171.

Zhang, Jianhua, Eveline Snelders, Bas J. Zwaan, Sijmen E. Schoustra, Jacques F. Meis, Karin van Dijk, Ferry Hagen, et al. 2017. « A Novel Environmental Azole Resistance Mutation in Aspergillus fumigatus and a Possible Role of Sexual Reproduction in Its Emergence ». *mBio* 8 (3). https://doi.org/10.1128/mBio.00791-17.

Vu, le Président du jury,

Monsieur le Professeur Didier LEPELLETIER

Vu, le Directeur de Thèse,

Monsieur le Professeur Patrice LE PAPE

Vu, le Doyen de la Faculté

Madame le Professeur Pascale JOLLIET

UNIVERSITÉ DE NANTES

Année de la soutenance 2019

Nom : **FOURNIER** **Prénom :** **Boris**

Titre de Thèse :

Résistance d'Aspergillus fumigatus aux azolés: Etude épidémiologique au Centre Hospitalier Universitaire de Nantes sur la période 2012/2103.

RÉSUMÉ :

Aspergillus fumigatus est un organisme fongique ubiquitaire dans l'environnement et opportuniste chez certains patients atteints de maladies graves. Depuis le début du 21ème siècle, des résistances aux azolés, principale classe de traitement utilisée dans le traitement des aspergilloses, émergent à travers le monde.

Sur la période de juin 2012 à mai 2013, la sensibilité de 336 isolats cliniques d'*Aspergillus Section Fumigati* isolés au service de Parasitologie-Mycologie du CHU de Nantes a été testé en EUCAST pour deux molécules, l'itraconazole et le tébuconazole permettant d'établir une prévalence de résistance à l'itraconazole à 3,2% des patients concernés. L'altération TR_{34}/L98H, d'origine environnementale, est la principale détectée.

La résistance aux azolés, facteur d'échec thérapeutique, est bien présente dans la région et ne ce cessent de croître dans le monde. Elle doit continuer de bénéficier d'une surveillance épidémiologique, notamment auprès des populations à risque.

MOTS CLÉS : *Aspergillus fumigatus* - résistance - azolés - TR34/L98H

JURY :

PRÉSIDENT : Mr Didier LEPELLETIER, PUPH - université de Nantes

ASSESSEURS : **Mr Patrice LE PAPE, PUPH - université de Nantes**
Mme Jocelyne CAILLON, MCUPH - CHU de Nantes
Mme Rose Anne LAVERGNE, Dr - CHU de Nantes