

Aspects mycologiques des aspergilloses

**Jean-Philippe Bouchara, Patrick Vandeputte, Marc Pihet,
Agnès Marot, Maxime Fleury, Sandrine Giraud et Nicolas Papon**

**Groupe d'Etude des interactions Hôte-Pathogène, EA 3142, Université d'Angers
et Laboratoire de Parasitologie-Mycologie, CHU d'Angers**



Aspects mycologiques des aspergilloses

Détection des pathogènes fongiques en présence

Identification

Détermination de la sensibilité *in vitro* aux antifongiques

Enquête environnementale au domicile du patient (détection d'une source de contamination)

Détection d'une réponse immune

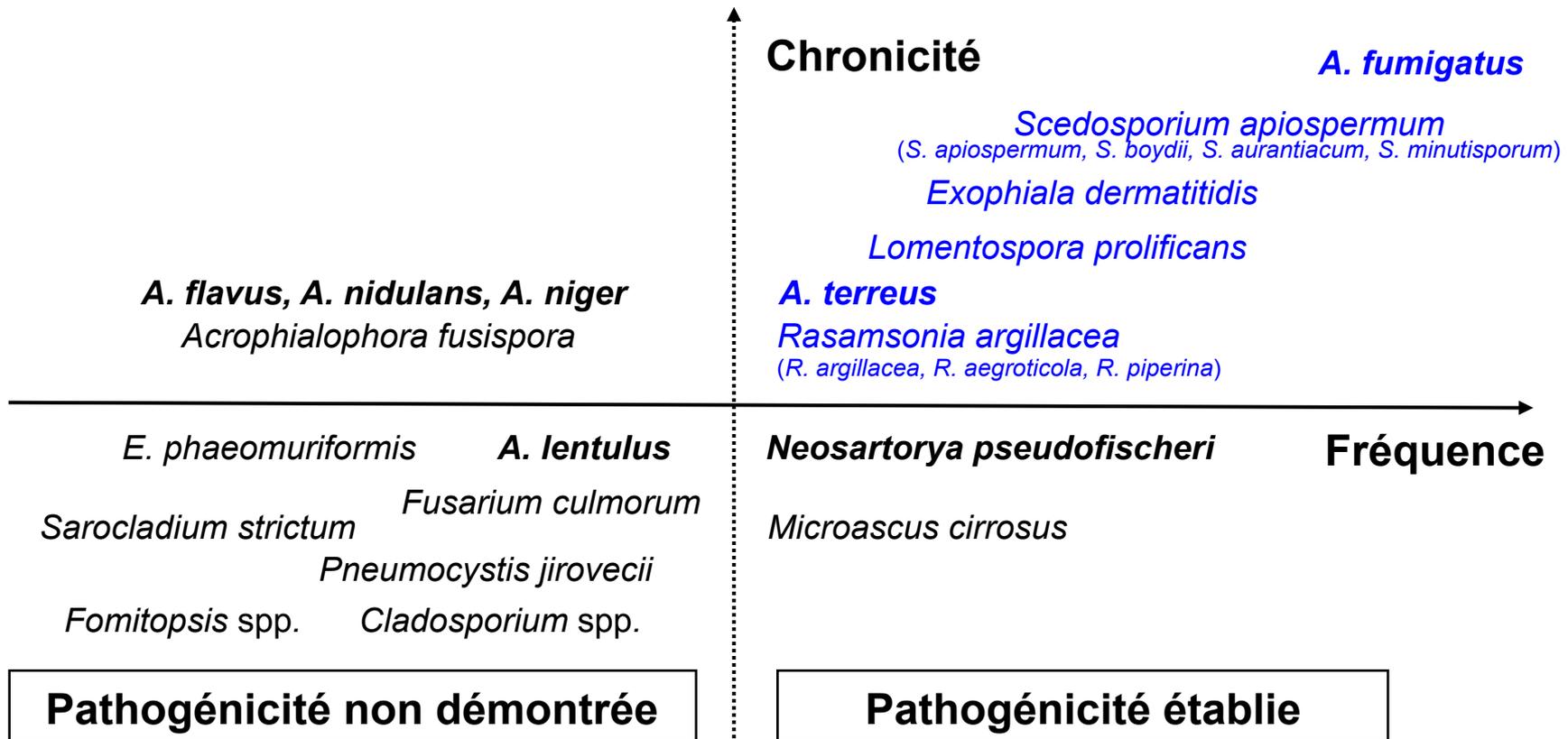
Aspects mycologiques des aspergilloses

***Aspergillus fumigatus* : le principal agent de colonisation fongique des voies respiratoires**

6 à 58% des patients (selon Liu *et al.*, J Cyst Fibros 2013)

	Patients (n)	<i>Aspergillus</i> + (%)
Becker <i>et al.</i> , Chest 1996 – USA	49	16
Milla <i>et al.</i> , Pediatr Pulmonol 1996 – USA	212	21,2
Burns <i>et al.</i> , Clin Infect Dis 1998 – USA	465	24,5
Cimon <i>et al.</i> , Eur J Med Microbiol Infect Dis 2000 – France	128	46,1
Bakare <i>et al.</i> , Mycoses 2003 - Allemagne	94	45,7
Mortensen <i>et al.</i> , J Clin Microbiol 2011 – Danemark	287	51

Détection des pathogènes fongiques en présence



Pathogénicité non démontrée

Pathogénicité établie

Détection des pathogènes fongiques en présence

Relativement aisée pour *A. fumigatus* par ensemencement sur gélose de Sabouraud + ATB, plus délicate pour les autres espèces fongiques

Association fréquente avec *A. fumigatus* (croissance rapide et extensive) qui peut masquer la présence d'autres champignons

Absence de standardisation de l'examen mycologique des expectorations (boîtes de Pétri/tubes – nombre et nature des milieux de culture, températures et durées d'incubation)

Premières recommandations (groupe Muco-Microbes, REMIC 2015)

Homogénéisation préalable par un mucolytique (Digest-Eur®), puis ensemencement en parallèle :

- Gélose chromogène (levures)

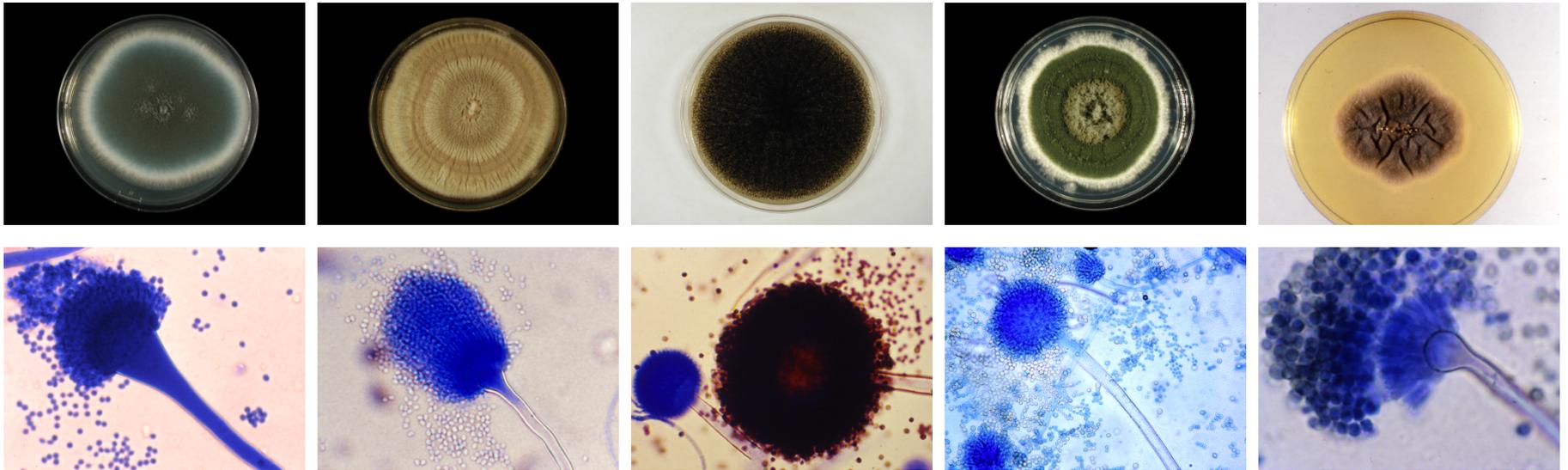
- Gélose de Sabouraud + chloramphénicol et gentamicine (tous filamenteux)

- Gélose de Sabouraud + chloramphénicol et cycloheximide (*S. apiospermum*)

Incubation 35-37°C pendant 15 jours

Identification des pathogènes fongiques

Critères purement morphologiques



A. fumigatus

A. terreus

A. niger

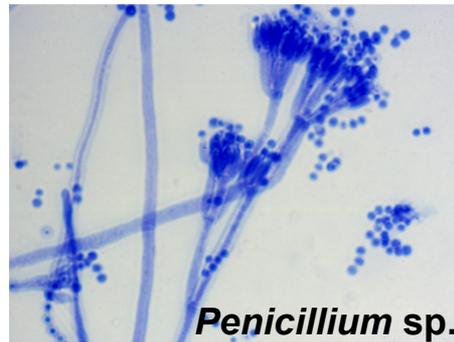
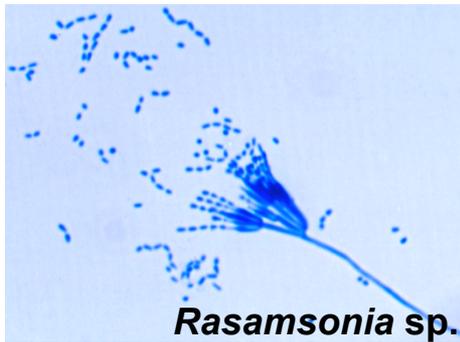
A. flavus

A. nidulans

Identification habituellement facile pour les *Aspergillus* (aspect des colonies et morphologie microscopique)

Identification des pathogènes fongiques

Plus difficile pour les autres filamenteux ou devant une souche atypique ou non sporulante



Identification moléculaire (séquençage des régions ITS 1 et 2 de l'ADNr, ou du gène codant la beta-tubuline)



Spectrométrie de masse de type MALDI-TOF (bioMérieux, Bruker)

Détermination de la sensibilité aux antifongiques

Méthode de référence

CLSI (Clinical Laboratory Standard Institute) ou EUCAST (European Committee of Antifungal Susceptibility testing),

Microdilution en milieu liquide (RPMI 1640 + glucose tamponné à pH 7,2)

Difficile à mettre en œuvre

En pratique, diffusion en gélose à l'aide de bandelettes E-test

Très bonne concordance avec la technique de référence, y compris sur les *Aspergillus*

Pourcentage d'agrément :

94% pour l'amphotéricine B et les azolés

100% pour la caspofungine



Gupta *et al.*, J Clin Diagn Res, 2015

Détermination de la sensibilité aux antifongiques

Le principal agent de colonisation fongique des voies respiratoires
(6 à 58% des patients)

Colonisation chronique des voies respiratoires avec parfois des exacerbations

Bronchite aspergillaire, aspergillome et **ABPA**

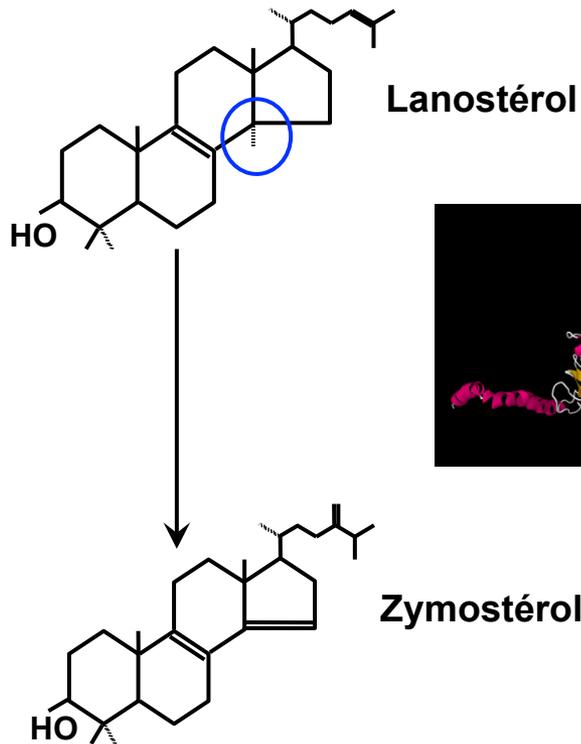
Cures répétées d'antifongiques (Itra, Vori) qui peuvent conduire à une résistance aux azolés

20% des patients sous itraconazole présentaient un isolat résistant

Burgel *et al.*, Antimicrob Agents Chemother, 2012

Aspergillus fumigatus et résistance aux azolés

Azolés: inhibiteurs de la synthèse de l'ergostérol membranaire



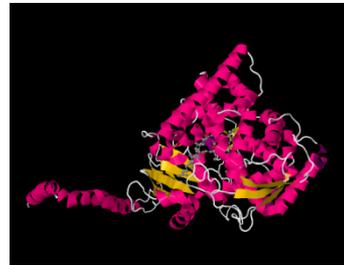
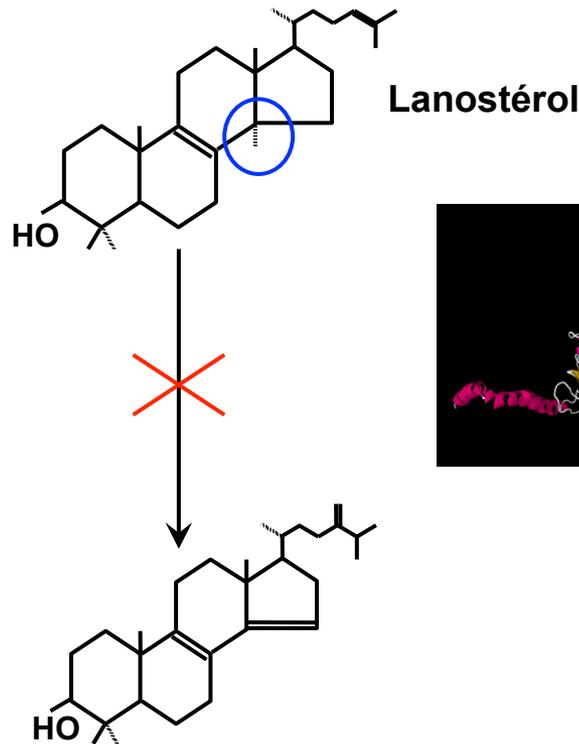
Cible intracellulaire :

lanostérol 14 α -déméthylase
codée par le gène *CYP51A*

Conversion du lanostérol en zymostérol (perte
du -CH₃ en 14)

Aspergillus fumigatus et résistance aux azolés

Azolés: inhibiteurs de la synthèse de l'ergostérol membranaire



Azolés :

Inhibiteurs compétitifs de la 14 α -déméthylase
Arrêt de la synthèse d'ergostérol et
accumulation de précurseurs 14 α -méthylés
toxiques

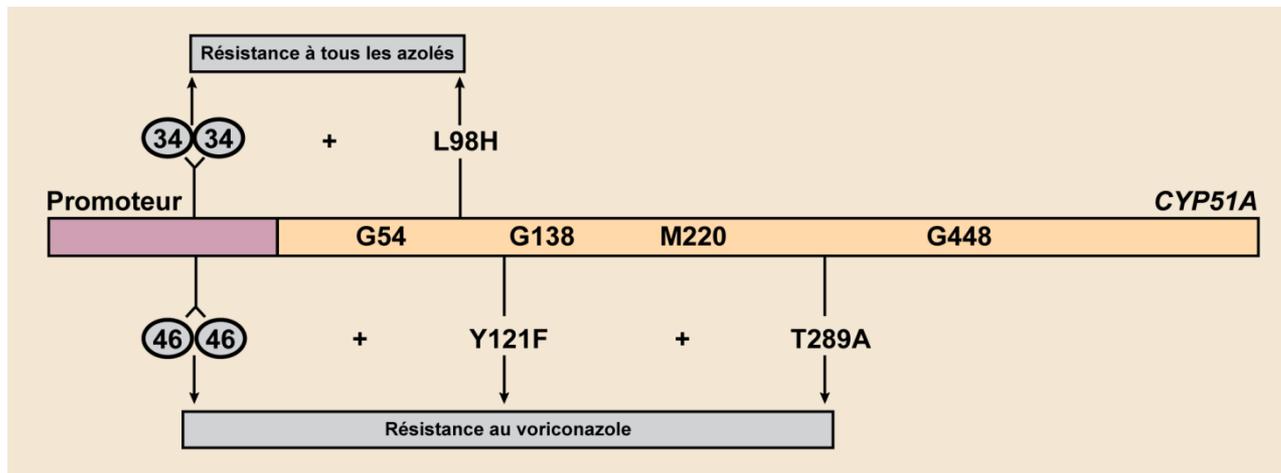
Cible intracellulaire :

lanostérol 14 α -déméthylase
codée par le gène *CYP51A*

Conversion du lanostérol en zymostérol (perte
du -CH₃ en 14)

Aspergillus fumigatus et résistance aux azolés

Emergence d'isolats résistants par mutation sur *CYP51A* chez des patients naïfs (75% des isolats résistants étudiés par Fischer *et al.* provenaient de patients naïfs, 100% pour ceux étudiés par Bader *et al.*)



TR46/Y121F/T289A :
Pays-Bas, Belgique,
Allemagne, France,
Danemark, Inde, Tanzanie

TR34/L98H-S297T-F495I :
Pays-Bas, Danemark,
Chine

TR34/L98H : aujourd'hui décrite dans la plupart des pays Européens (Espagne, Pays-Bas, France, Allemagne, Royaume-Uni, Danemark, Norvège, Italie), mais aussi Inde, Iran, Chine, Koweït, Tanzanie et USA

Aspergillus fumigatus et mutation TR34/L98H

Lien avec l'utilisation de fongicides triazolés en agriculture et la pression de sélection exercée dans l'environnement

Analyse rétrospective d'une collection d'isolats :

Aux Pays-Bas, le premier isolat porteur de cette mutation avait été collecté en 1997

Au cours des années précédentes, cinq fongicides triazolés avaient reçu une autorisation pour leur utilisation en agriculture (propiconazole, bromuconazole, tébuconazole, époxiconazole et difénoconazole).

Insertion de séquences répétées en tandem dans le promoteur du gène *CYP51A1* également décrite pour des phytopathogènes dans des isolats résistants aux fongicides triazolés

Résistance croisée antifongiques triazolés/fongicides triazolés

85% des fongicides, 37 000 tonnes annuelles, > 600 millions €

Aspergillus fumigatus et résistance aux azolés

Résistance acquise aux azolés: un évènement peu fréquent

	Isolats résistants (%)	Fréquence (%) patients colonisés	Fréquence (%) mucoviscidose
Mortensen <i>et al.</i> , JCM 2011 – Danemark	2,2	4,5	2,1
Morio <i>et al.</i> , JAC 2012 – Nantes	9,3	8	---
Burgel <i>et al.</i> , AAC, 2012 - APHP Cochin	2,1	4,6	2,4
Bader <i>et al.</i> , AAC 2013 – Allemagne	5,5	5,5	---
Fischer <i>et al.</i> , JAC 2014 – Allemagne	1	---	1,8

L'éradication de l'*Aspergillus* reste cependant difficile

Burgel *et al.*, Antimicrob Agents Chemother, 2012 : 36% des patients colonisés par *A. fumigatus* avaient déjà reçu de l'itraconazole, 80% d'entre eux présentaient un isolat sensible aux azolés *in vitro*.

Amorim *et al.*, Int J Antimicrob Agents, 2010 : 159 isolates of *A. fumigatus* collected from cystic fibrosis (CF) patients receiving azole antifungal therapy
No resistant isolates detected.....Even after azole exposure, several recurrent *A. fumigatus* strains were detected in the subsequent sputum samples.

Adaptation au microenvironnement

Epaississement du mucus bronchique lié à l'absence de synthèse ou d'adressage à la membrane ou au dysfonctionnement de la protéine CFTR

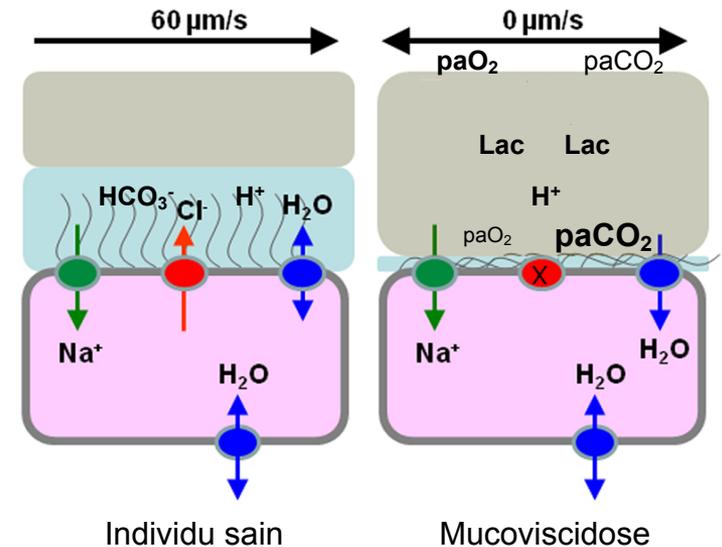
Diminution de la sécrétion de Cl^-
et réabsorption des ions Na^+

Diminution de la pression osmotique

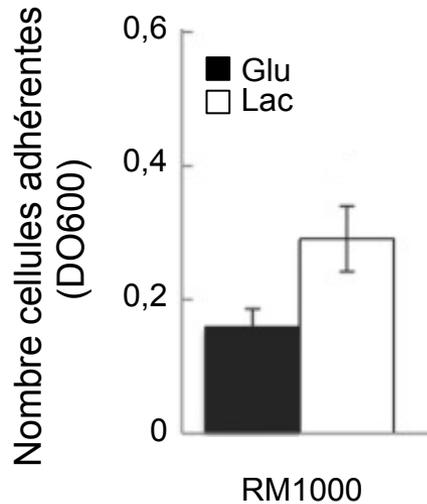
Arrêt de la sécrétion de HCO_3^-
Excès de protons H^+ , **abaissement du pH**

Diminution de la paO_2 et augmentation de la paCO_2

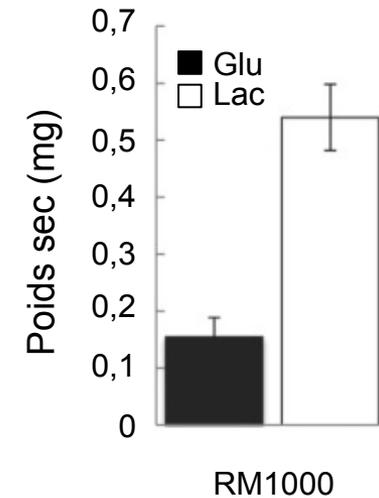
Élévation de la teneur en lactates (métabolisme des cellules épithéliales, production de lactate par les bactéries ou les neutrophiles)



Adaptation au microenvironnement - lactate



Adhérence au plastique



Biofilm

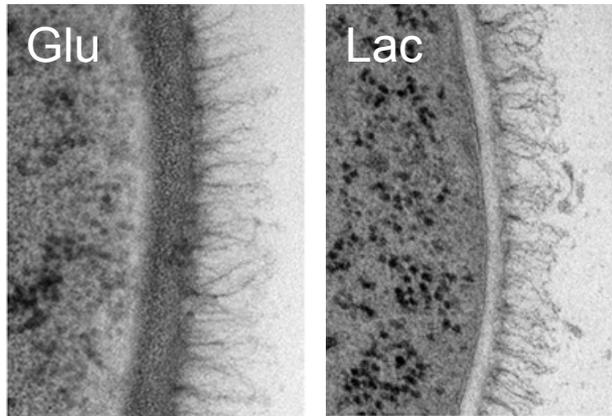
Candida albicans

Lactate vs. glucose comme source de carbone

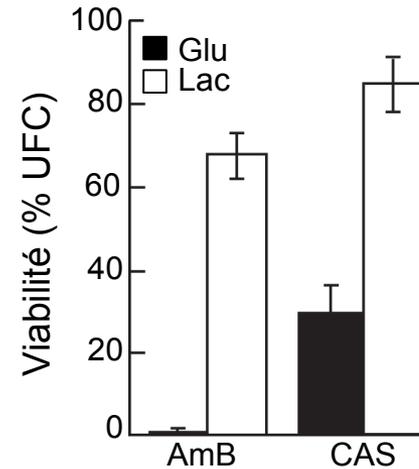
Impact sur le protéome

(protéines impliquées dans l'adhérence : Als2, Phr1, Sap9)

Adaptation au microenvironnement - lactate



Architecture de la paroi



Résistance aux antifongiques

Candida albicans

Lactate vs. glucose comme source de carbone

Diminution de la teneur de la paroi en mannanes, chitine, β -glucanes

Enquete environnementale



Scedosporium apiospermum



Exophiala dermatitidis

My dishwasher is trying to kill me! Deadly bacteria found in household appliances

By DAILY MAIL REPORTER
UPDATED: 12:02 GMT, 22 June 2011

Researchers found 62 per cent of dishwashers contained the fungi *Exophiala dermatitidis* and *E. phaeoauriformis* on the rubber band in the door. Both of the black yeasts are known to be dangerous to human health.



Beware the dishwasher: The moist and hot environment in a dishwasher serves as a perfect habitat for two types of dangerous fungi

Both *Exophiala* species displayed remarkable tolerance to heat, high salt concentrations, aggressive detergents and to both acid and alkaline water.

Détection d'une réponse immune

En cours d'évaluation :

β -glucanes et galactomannanes circulants

Numération de certaines sous-populations lymphocytaires T

Marqueurs diagnostiques déjà identifiés ou en cours d'étude

Catalase et dipeptidylpeptidase V - heat shock protein 70

Recherche d'anticorps sériques:

Dépistage par ELISA, puis confirmation par WB (intérêt dans la mucoviscidose ?)

Assessment of *Aspergillus* sensitization or persistent carriage as a factor in lung function impairment in cystic fibrosis patients

Fillaux *et al.*, Scand J Infect Dis, 2012

251 patients suivis à Toulouse pendant 12 ans (1995 – 2007) : la colonisation chronique (3 cultures positives) ou la sensibilisation (3 arcs de précipitation en IEP ou ES) est associée à une détérioration fonctionnelle

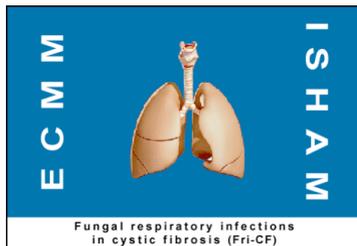
ECMM/ISHAM working group Fri-CF

En dépit de certaines avancées, de nombreuses questions demeurent concernant la signification clinique de l'isolement de ces champignons et leurs mécanismes pathogéniques, les modalités de contamination des patients, le diagnostic biologique des infections fongiques au cours de la mucoviscidose ou leur traitement.

Groupe de travail ECMM/ISHAM

Infections respiratoires fongiques au cours de la mucoviscidose

Coordonateurs: J.P. Bouchara, A. Borman et F. Symoens



1^{er} Meeting, 7 et 8 juin 2009

2nd Meeting, 1^{er} et 2 septembre 2011

3^{ème} Meeting, 5 et 6 juin 2014

Prochain meeting en 2017 en Espagne

jean-philippe.bouchara@univ-angers.fr



Merci de votre attention

