

**THÈSE DE DOCTORAT**

pour obtenir le grade de

**DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ PIERRE ET MARIE CURIE**

Spécialité : Biostatistique

Présentée par

Christopher LELEU

# Evaluation du risque lié à l'exposition aérienne à *Aspergillus fumigatus*

Soutenue le 26 septembre 2012 devant le jury composé de :

Mme le Professeur Chantal GUIHENNEUC-JOUYAU  
M. le Professeur Jean-Pierre GANGNEUX  
Mme Marie-Aline BLOCH  
M. le Professeur Christophe HENNEQUIN  
M. le Professeur Francis DEROUIN  
M. le Docteur Jean MENOTTI

Rapporteur  
Rapporteur  
Examineur  
Examineur  
Directeur de thèse  
Co-encadrant



*Cette thèse a été réalisée dans le cadre d'un contrat doctoral associant l'EHESP et l'UPMC*



*et effectuée dans le laboratoire de Parasitologie-Mycologie (EA 3520) de l'université Paris Diderot*





# Remerciements

Je tiens à adresser mes sincères remerciements au **Professeur Francis Derouin**, pour sa grande disponibilité, ses nombreux conseils et son encadrement au cours de tous ces projets très variés qui ont fait de cette thèse une expérience très enrichissante.

Je remercie mon co-encadrant, le **Docteur Jean Menotti**, pour toutes les choses que j'ai apprises à son contact (biologie moléculaire, identification mycologique, expérimentation animale, . . .) ; je retiendrai en particulier nos longues journées dans l'animalerie à "prendre soin" de nos souris.

Je souhaite également remercier le **Professeur Chantal Guihenneuc-Jouyaux** et le **Professeur Jean-Pierre Gangneux** de me faire l'honneur d'être les rapporteurs de cette thèse. Je remercie aussi **Mme Marie-Aline Bloch** et le **Professeur Christophe Hennequin** d'avoir accepté de faire partie de ce jury et d'examiner mon travail.

Je tiens à remercier l'ensemble de l'équipe du laboratoire de Parasitologie-Mycologie, EA 3520, qui m'a chaleureusement accueilli pendant ces trois années :

- Merci aux **Docteurs Annie Sulahian, Claudine Sarfati** et **Jean-François Garin** pour vos idées et vos suggestions lors de nos réunions qui m'ont permis de faire avancer des situations bloquées.
- Merci à **Pascale** pour toutes ces milliards de spores que l'on a produites et envoyées en fumée, à **Marie-France** pour son aide dans l'installation de certains logiciels particuliers, à **Christian** pour les litres de milieu Malt coulés et à tous les trois merci pour votre gentillesse.
- Merci à tous les étudiants qui ont planché en même temps que moi sur *Aspergillus* ou *Pneumocystis* : **Alexandra, Anissa, Chafia** et **Firas**, pour leur bonne humeur et les bons moments que l'on a passés ensemble. Je souhaite adresser un remerciement tout particulier à **Nga** pour avoir durant de nombreuses semaines pris un panier et être allée à la cueillette des champignons de l'hôpital avec et sans moi.

Je remercie également **M. Jean-Baptiste Denis** pour m'avoir accueilli à plusieurs reprises à l'INRA et m'avoir permis d'utiliser mes données expérimentales pour transformer mes connaissances a priori nulles en statistique bayésienne en une maîtrise postérieure suffisamment informative pour être publiée.

Je remercie toutes les personnes qui ont participé à l'étude *in vitro* :

- Merci au **Professeur Natalie Seta** et à **Mme Sophie Achard** pour leurs conseils avisés et leur soutien.
- Merci à **Charles Persoz** pour notre association usante mais significativement efficace et pour m'avoir fait découvrir  $\LaTeX$ .
- Merci à **Magali Fasseu** pour avoir aidé mes ARNm à s'exprimer.

Je souhaite adresser mes remerciements à toutes les personnes ayant contribué à la réussite de l'étude Transplant' Air qui s'est déroulée à l'hôpital Bichat :

- Merci au **Docteur Olivier Brugière**, au **Professeur Hervé Mal** et tout le service de pneumologie B pour avoir permis la réalisation de cette étude. Un merci particulier à **André** pour sa bonne humeur hebdomadaire et son idée d'écouvillonner les télés.
- Merci à tout le personnel du service de réanimation chirurgicale, et en particulier à **Isabelle Le Falher**, pour avoir répondu aux mêmes questions chaque semaine.
- Merci à l'unité d'hygiène (UHLIN) : au **Professeur Jean-Christophe Lucet** pour sa précieuse contribution lors de la mise en place de l'étude, au **Docteur Christine Bonnal** pour avoir pris le temps de me guider dans les services cliniques lors des premières semaines de suivi et pour avoir épluché les dossiers à la recherche de nos données manquantes, à **Wafaa** pour avoir permis la continuité du suivi lors de mes indisponibilités.
- Merci au **Docteur Sandrine Houzé** qui m'a guidé à travers le très intuitif système d'enregistrement des résultats de l'hôpital sur la piste des antigénémies aspergillaires et merci au **Docteur Christian Chochillon** pour les séances d'identification durant lesquelles j'ai beaucoup appris sur le règne fongique.
- Merci au **Docteur Pierre-Yves Boëlle** de m'avoir permis de découvrir l'enseignement et de m'avoir apporté son soutien pour l'analyse de l'étude.
- Merci au **Docteur Raphaël Porcher** pour son aide méthodologique lors de la réflexion sur la faisabilité de l'étude et sur la constitution de la base de données.
- Merci au **Docteur Laurent Massias** pour les nombreux tubes que j'ai récupéré.
- Merci à notre impacteur Air test Omega pour avoir aspiré l'air de l'hôpital tous les mardis en ma compagnie et avoir attendu la dernière semaine pour rendre son dernier souffle.

Je souhaite également remercier ma famille qui m'a toujours soutenu dans tout ce que j'entreprenais.

Et enfin, un grand merci à Stéphanie, qui partage ma vie, pour m'avoir encouragé et supporté chaque jour.

# Publications et communications

## Publications

• PERSOZ C <sup>1</sup>, LELEU C <sup>1</sup>, ACHARD S, FASSEU M, MENOTTI J, MENECEUR P, MOMAS I, DEROUIN F, SETA N. Sequential air-liquid exposure of human respiratory cells to chemical and biological pollutants. *Toxicol. Lett.* 2011 ; 207 : 53-59.

<sup>1</sup> Contribution équivalente des deux premiers auteurs.

• LELEU C, MENOTTI J, MENECEUR P, CHOUKRI F, SULAHIAN A, GARIN YJF, DENIS JB, DEROUIN F. Bayesian development of a dose-response model for *Aspergillus fumigatus* and invasive aspergillosis. *Risk Analysis*. **Article en révision** (révisions mineures).

• LELEU C, MENOTTI J, MENECEUR P, CHOUKRI F, SULAHIAN A, GARIN YJF, DEROUIN F. Efficacy of liposomal amphotericin B for prophylaxis of acute reactivation models of invasive pulmonary aspergillosis. *Mycoses*. **Article accepté**.

• LELEU C, BONNAL C, BRUGIÈRE O, CHOCHILLON C, MENOTTI J, HOUZÉ S, LUCET JC, DEROUIN F. Relationship between colonisation of lung transplant recipients by *Aspergillus* and fungal contamination of the hospital environment. **Article en cours de rédaction** (Revue ciblée : *Infection Control and Hospital Epidemiology*).

## Communication orale

• LELEU C, MENOTTI J, MENECEUR P, SULAHIAN A, DEROUIN F. Prophylactic efficacy of liposomal amphotericin B (L-AmB) in a new murine model of recurrent pulmonary aspergillosis following airborne exposure to *Aspergillus fumigatus* in immunosuppressed mice. 51<sup>th</sup> Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy (ICAAC), Chicago, 17-21 septembre 2011.

## Communications affichées

• LELEU C, CHOUKRI F, MENOTTI J, MENECEUR J, SULAHIAN A, DENIS JB, DEROUIN F. Relationship between airborne exposure to *Aspergillus fumigatus* and infection in a murine model of invasive aspergillosis : experimental assessment and Bayesian modeling. 5<sup>th</sup> Trends In Medical Mycology (TIMM), Valence, 5-8 octobre 2011. **ECMM young investigators travel award**.

• LELEU C, PERSOZ C, MENOTTI J, FASSEU M, ACHARD S, MENECEUR P, SETA N, DEROUIN F. Sequential exposure to biological and chemical contaminants : a new *in vitro* model on human respiratory cells. 23<sup>th</sup> International Society for Environmental Epidemiology (ISEE), Barcelone, 13-16 septembre 2011.

• PERSOZ C, LELEU C, ACHARD S, FASSEU M, MENOTTI J, MENECEUR P, DEROUIN, F, SETA N. *In vitro* repeated exposure to formaldehyde and *Aspergillus fumigatus* of human respiratory cells. 47<sup>th</sup> Eurotox, Paris, 28-31 août 2011.

• PERSOZ C, ACHARD S, LELEU C, MOMAS I, SETA N. Comparison of two *in vitro* models to assess the impact of environmental pollutants exposures on respiratory cells. 47<sup>th</sup> Eurotox, Paris, 28-31 août 2011.

# Sommaire

Introduction générale . . . . .	15
<b>I PREMIÈRE PARTIE : situation du sujet</b>	<b>17</b>
<b>1. Situation du sujet</b>	<b>19</b>
1.1. <i>Aspergillus fumigatus</i> . . . . .	19
1.1.1. Historique du genre <i>Aspergillus</i> . . . . .	19
1.1.2. Taxonomie du genre <i>Aspergillus</i> et de l'espèce <i>A. fumigatus</i> . . . . .	20
1.1.3. Morphologie . . . . .	21
1.1.4. Biotope . . . . .	22
1.2. Contamination fongique environnementale et exposition humaine . . . . .	22
1.2.1. Données générales . . . . .	22
1.2.2. Analyse des données françaises . . . . .	23
1.2.2.1. Milieu domestique . . . . .	23
1.2.2.2. Milieu hospitalier . . . . .	23
1.3. Conséquences pathologiques de l'exposition . . . . .	26
1.3.1. Pathogénèse . . . . .	26
1.3.2. Manifestations pathologiques chez le sujet immunocompétent . . . . .	26
1.3.2.1. Aspergilloses respiratoires allergiques . . . . .	27
1.3.2.2. Aspergillome . . . . .	28
1.3.3. Manifestations pathologiques chez le patient immunodéprimé . . . . .	28
1.4. Relation exposition - infection . . . . .	30
<b>Objectifs</b>	<b>31</b>
<b>II DEUXIÈME PARTIE : Exposé des travaux</b>	<b>33</b>
<b>1. Etude <i>in vitro</i></b>	<b>35</b>
1.1. Modèles d'exposition <i>in vitro</i> : résumé des données de la littérature. . . . .	35
1.1.1. Modèles cellulaires utilisés pour l'étude d' <i>Aspergillus fumigatus</i> . . . . .	35
1.1.2. Modèles cellulaires utilisés pour l'étude de polluants gazeux . . . . .	36
1.2. Objectifs . . . . .	37
1.3. Développement d'un modèle d'exposition à l'interface air-liquide . . . . .	38
1.3.1. Dispositif Vitrocell® systems . . . . .	38
1.3.2. Condition d'exposition . . . . .	38
1.3.3. Etudes préliminaires . . . . .	40
1.3.3.1. Maîtrise de la concentration d'exposition . . . . .	40
1.3.3.2. Evaluation des effets cellulaires de l'exposition à <i>Aspergillus fumigatus</i> . . . . .	40
1.4. Co-expositions spores d' <i>Aspergillus fumigatus</i> et formaldéhyde gazeux . . . . .	42
1.4.1. Protocole expérimental . . . . .	42
1.4.2. Principaux résultats . . . . .	43
1.5. Conclusion . . . . .	44
1.6. Article . . . . .	45



<b>2. Etude <i>in vivo</i></b>	<b>53</b>
2.1. Modélisation expérimentale et statistique de l'aspergillose invasive	54
2.1.1. Modèles expérimentaux d'aspergillose invasive	54
2.1.1.1. Choix de l'animal et du régime d'immunosuppression	54
2.1.1.2. Mode d'exposition	55
2.1.1.3. Evaluation de l'infection	56
2.1.2. Modélisation statistique et caractérisation du risque	57
2.1.3. Objectifs	58
2.1.4. Mise au point d'un modèle expérimental d'aspergillose invasive par aérosol	59
2.1.4.1. Choix des conditions expérimentales et du dispositif d'exposition	59
2.1.4.2. Protocole expérimental	60
2.1.5. Modélisation bayésienne de la relation dose-réponse	61
2.1.5.1. L'approche bayésienne	61
2.1.5.2. Développement des modèles pour l'aspergillose invasive expérimentale	62
2.1.6. Principaux résultats	65
2.1.6.1. Résultats expérimentaux	65
2.1.6.2. Modélisation de la dose-réponse	65
2.1.7. Conclusion	67
2.1.8. Article	67
2.2. Primo-infection vs réactivation	99
2.2.1. Contexte	99
2.2.2. Objectif	99
2.2.3. Contrôle et réactivation de l'infection aspergillaire	99
2.2.3.1. Cinétique de l'élimination des spores par des souris immunocompétentes	100
2.2.3.2. Réactivation de l'infection aspergillaire	100
2.2.4. Evaluation de l'efficacité de la chimioprophylaxie dans la prévention de l'aspergillose invasive	102
2.2.4.1. Choix de la molécule	102
2.2.4.2. Schémas prophylactiques	104
2.2.4.3. Résultats et discussion	105
2.2.5. Article	105
<b>3. Relation exposition-infection chez l'Homme</b>	<b>129</b>
3.1. Introduction - Situation du sujet	129
3.2. Matériel et méthodes	130
3.2.1. Organisation générale de l'étude	130
3.2.2. Inclusion et suivi clinique des patients	131
3.2.3. Suivi biologique	132
3.2.4. Définition des cas	132
3.2.5. Suivi de l'environnement	132
3.2.6. Analyse génotypique des isolats d' <i>Aspergillus</i>	133
3.2.7. Analyse statistique	133
3.3. Résultats	134
3.3.1. Caractéristiques des patients.	134
3.3.2. Suivi clinique et biologique des patients	135
3.3.3. Contamination de l'environnement	137
3.3.3.1. Descriptif de la flore fongique	137
3.3.3.2. Répartition des contaminations	138
3.3.3.3. Niveaux de contamination et relation air/surface	139
3.3.4. Analyse descriptive de la relation colonisation/environnement	140
3.3.4.1. Données chronologiques	140
3.3.4.2. Analyse génotypique	142
3.3.5. Analyse statistique	145
3.3.5.1. Analyse univariée	145

3.3.5.2. Analyse multivariée . . . . .	145
3.4. Discussion . . . . .	147
<b>III TROISIÈME PARTIE : Discussion générale</b>	<b>149</b>
<b>Références bibliographiques</b>	<b>156</b>
<b>ANNEXES</b>	<b>174</b>
<b>A1. Cahier d'observation de l'étude Transplant'Air</b>	<b>176</b>

# Liste des figures

1	Première représentation du genre <i>Aspergillus</i> . . . . .	19
2	Représentation d'une tête aspergillaire . . . . .	21
3	Spore d' <i>A. fumigatus</i> en microscopie électronique . . . . .	22
4	Processus de développement d'une aspergillose invasive chez un sujet immunodéprimé . . . . .	27
5	Module d'exposition Vitrocell®. . . . .	38
6	Schéma expérimental de l'exposition de cellules pulmonaires à un aérosol de spores fongiques. . . . .	39
7	Protocole expérimental de l'étude préliminaire. . . . .	40
8	Viabilité Cellulaire . . . . .	41
9	Production de cytokines après exposition à <i>A. fumigatus</i> . . . . .	42
10	Protocole expérimental de l'étude de co-exposition . . . . .	43
11	Production de cytokine après exposition au formaldéhyde et/ou à <i>Aspergillus fumigatus</i> . . . . .	44
12	Techniques d'exposition par aérosolisation . . . . .	56
13	Schéma expérimental de l'exposition de souris BALB/c à un aérosol de spores fongiques. . . . .	59
14	Protocole expérimental de l'exposition de souris BALB/c à un aérosol de spores fongiques. . . . .	60
15	Paradigme bayésien . . . . .	61
16	DAG du modèle basé sur la concentration dans le nébuliseur . . . . .	63
17	DAG du modèle basé sur la quantité de spores inhalées . . . . .	64
18	Dose-réponse basée sur la concentration dans le nébuliseur . . . . .	66
19	Dose-réponse basée sur la Quantité de Spores Inhalées . . . . .	66
20	Cinétique d'élimination des spores d' <i>Aspergillus fumigatus</i> . . . . .	100
21	Réactivation aspergillaire . . . . .	101
22	Coupe histologique de poumon . . . . .	101
23	Schémas prophylactiques . . . . .	104
24	Schéma général d'organisation de l'étude Transplant' Air. . . . .	131
25	Répartition des espèces fongiques . . . . .	137
26	Pourcentages de prélèvements positifs dans l'air et sur les surfaces . . . . .	138
27	Variation temporelle des concentrations de champignons filamenteux dans l'air . . . . .	139
28	Relation entre les contaminations fongiques de l'environnement . . . . .	140
29	Représentation séquentielle de la contamination de l'environnement . . . . .	141
30	Relation exposition-infection chez le singe, la souris et l'Homme . . . . .	153
31	Dispositif de génération de bioaérosol par soufflage . . . . .	154

# Liste des tableaux

I	Classification internationale du genre <i>Aspergillus</i> . . . . .	20
II	Contamination fongique des habitats (France) . . . . .	24
III	Contamination fongique du milieu hospitalier (France) . . . . .	25
IV	Modèles dose-réponse utilisés pour l'évaluation des risques microbiologiques. . . . .	58
V	Prophylaxie antifongique après infection par un aérosol de spores d' <i>Aspergillus</i> . . . . .	103
VI	Prophylaxie antifongique après après injection de spores d' <i>A. fumigatus</i> . . . . .	103
VII	Caractéristiques des patients à l'inclusion. . . . .	134
VIII	Caractéristiques des patients colonisés. . . . .	136
IX	Comparaison des niveaux de contamination fongique dans l'air . . . . .	139
X	Coefficients de corrélation entre la contamination fongique de l'air et des surfaces . . . . .	140
XI	Identification de souche d' <i>Aspergillus</i> retrouvées dans des prélèvements bronchiques . . . . .	143
XII	Comparaisons des séquences des isolats cliniques et de l'environnement . . . . .	144
XIII	Analyse univariée de la survenue d'une colonisation aspergillaire . . . . .	146
XIV	Analyse univariée de la survenue d'une colonisation aspergillaire . . . . .	146

# Liste des abréviations

<i>A. fumigatus</i>	<i>Aspergillus fumigatus</i>
<b>ABPA</b>	Aspergillose Broncho-Pulmonaire Allergique
<b>AI</b>	Aspergillose Invasive
<b>AQR</b>	Appréciation Quantitative du risque
<b>ANSES</b>	Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail
<b>CA</b>	Colonisation Aspergillaire
<b>DAG</b>	Directed Acyclic Graph
<b>ELISA</b>	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
<b>GM</b>	Galactomannane aspergillaire
<b>GRC</b>	Gelman et Rubin Criterion
<b>HEPA</b>	High Efficiency Particulate Air
<b>IL</b>	Interleukine
<b>L-AmB</b>	Amphotéricine B Liposomale
<b>LDH</b>	Lactate DésHydrogénase
<b>MCMC</b>	Méthode de Monte Carlo par Chaînes de Markov
<b>MCP-1</b>	Monocyte Chemoattractant Protein 1
<b>OMS</b>	Organisation Mondiale de la Santé
<b>OR</b>	Odds-Ratio
<b>RT-qPCR</b>	Reverse Transcription-quantitative Polymerase Chain Reaction
<b>UFC</b>	Unité Formant Colonie
<b>USEPA</b>	United States Environmental Protection Agency



# Introduction générale

La Qualité de l'Air Intérieur est une préoccupation majeure de santé publique, prise en compte sur le plan international par l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) (OMS, 2006) et national par l'Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail (ANSES).

L'air est en effet le véhicule d'un certain nombre de polluants gazeux, liquides ou solides d'origine naturelle ou produits par des activités humaines, mais aussi le véhicule de microorganismes dont certains peuvent avoir un effet pathogène chez l'Homme. Ce dernier groupe de contaminants définit l'aérobiocontamination.

Les champignons, principalement des moisissures, sont très largement représentés parmi les biocontaminants de l'air car nombre d'entre eux assurent leur reproduction par l'émission de grandes quantités de spores volatiles qui peuvent atteindre des concentrations de  $10^6$  à  $10^8$  spores/m<sup>3</sup> d'air en cas de pollution fongique majeure. Un certain nombre sont pathogènes pour l'Homme, par inhalation de spores le plus souvent, mais aussi par la production de mycotoxines. Ils sont responsables d'effets sanitaires très divers en fonction des espèces de moisissures, des types de populations exposées et de la durée d'exposition (OMS, 2009).

Le genre *Aspergillus* émerge par son ubiquité, sa forte représentation dans l'environnement et dans l'habitat et la grande diversité des manifestations cliniques qu'il peut induire, allant des phénomènes allergiques plus ou moins sévères jusqu'aux aspergilloses invasives gravissimes chez les immunodéprimés. C'est donc sur ce genre fongique et plus particulièrement sur l'espèce *Aspergillus fumigatus* (*A. fumigatus*) que nous avons centré notre travail, avec comme objectif principal de contribuer à l'évaluation du risque lié à l'exposition à ce champignon, notamment sur les terrains fragilisés.

Cette démarche s'intègre dans le cadre plus général de l'Appréciation Quantitative du Risque (AQR), telle qu'elle a été codifiée par l'OMS (Codex-Alimentarius, 1999) et appliquée dans plusieurs domaines de la santé publique, notamment en microbiologie des aliments, en aérobiologie et en toxicologie.

A notre connaissance, il n'existe pas d'exemple finalisé d'AQR concernant les champignons, bien que plusieurs de ses composantes soient bien définies pour certains d'entre eux.

Parmi les principaux obstacles à la finalisation d'une AQR sur les champignons de l'environnement, et sur le genre *Aspergillus* en particulier, figure la caractérisation de la relation entre l'exposition et l'infection.

C'est dans ce cadre que cette thèse a été construite, en tentant d'apporter quelques réponses grâce au développement de modèles expérimentaux originaux simulant le mieux possible l'exposition aérienne, et grâce à une étude observationnelle dans une population à risque élevé. Cet objectif était associé au souhait d'appliquer des méthodes d'analyses statistiques pouvant intégrer les nombreux paramètres qui interviennent dans l'aérobiocontamination.





**Première partie**

**Situation du sujet**



# Chapitre 1.

## Situation du sujet

---

### 1.1. *Aspergillus fumigatus*

#### 1.1.1. Historique du genre *Aspergillus*

Le nom *Aspergillus* apparaît pour la première fois en 1729 dans le livre du botaniste et mycologue italien Pier Antonio Micheli intitulé *Nova plantarum genera* (Micheli, 1729). Micheli choisit ce nom en référence à la forme du champignon qui ressemble au goupillon (aspergillum en latin) qu'il utilise lors des messes pour asperger des objets d'eau bénite. La figure 1 est la représentation qu'il en fait dans son ouvrage à partir d'expériences qu'il a menées dans son jardin et sur des morceaux de melon (Denning, 1998).

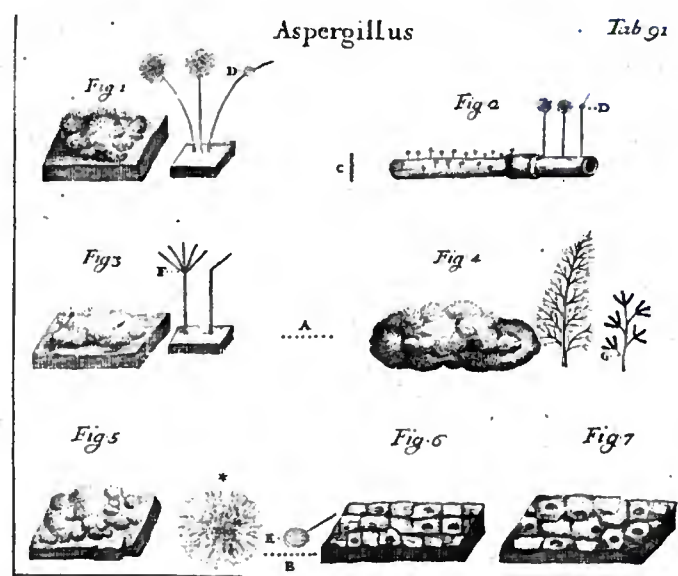


Figure 1 – Première représentation du genre *Aspergillus* (Extrait de Micheli, 1729)

Les connaissances sur le genre *Aspergillus* ne vont pas évoluer pendant près d'un siècle. Ce n'est qu'en

1809, que Link décrit pour la première fois les espèces *Aspergillus flavus*, *Aspergillus glaucus* et *Eurotium herbariorum* (Link, 1809). De Bary en 1854, démontrera qu'*Eurotium herbariorum* n'est autre que la forme sexuée d'*Aspergillus glaucus* (De Bary, 1854). Pendant ce même siècle, d'autres espèces seront découvertes parmi lesquelles *Aspergillus fumigatus* identifié pour la première fois par le botaniste allemand Fresenius en 1863 (Fresenius, 1863). Le nom *fumigatus* vient du latin "fumigo" qui signifie enfumer, en référence à la fumée que semble produire la culture de ce champignon et qui correspond probablement à l'émission de grandes quantités de spores.

### 1.1.2. Taxonomie du genre *Aspergillus* et de l'espèce *A. fumigatus*

La première classification du genre *Aspergillus* n'est proposée qu'en 1926 par Thom et Church (Thom et Church, 1926). Le genre regroupe alors 69 espèces réparties dans 11 groupes. De nouvelles classifications vont ensuite apparaître jusqu'à ce que Pitt propose en 1994 une classification qui est encore utilisée aujourd'hui (Pitt, 1994). Cette classification reprend la nomenclature de Raper et Fennell de 1965 (Raper et Fennell, 1965), ainsi que la division du genre en 6 sous-genres et 18 sections proposée par Gams et coll. en 1985 (Gams et coll., 1985). Le tableau I résume la classification du genre *Aspergillus*.

Tableau I – Classification internationale du genre *Aspergillus* (adapté de Gams et Christensen, 1985 et Raper et Fennel, 1965)

Sous-genre	Section	Groupes	Formes sexuées connues
<i>Aspergillus</i>	<i>Aspergillus</i>	<i>glaucus</i>	<i>Eurotium</i> , <i>Dichlaena</i>
	<i>Restricti</i>	<i>restrictus</i>	
<i>Fumigati</i>	<i>Fumigati</i>	<i>fumigatus</i>	<i>Neosartorya</i>
	<i>Cervini</i>	<i>cervinus</i>	
<i>Ornati</i>	<i>Ornati</i>	<i>ornatus</i>	<i>Warcupellia</i> , <i>Sclerocleista</i> , <i>Hemicarpenteless</i>
<i>Clavati</i>	<i>Clavati</i>	<i>clavatus</i>	
	<i>Nidulantes</i>	<i>nidulans</i>	<i>Emericella</i>
<i>Nidulantes</i>	<i>Versicolor</i>	<i>versicolor</i>	
	<i>Usti</i>	<i>ustus</i>	
	<i>Terrei</i>	<i>terreus</i>	
<i>Circumdati</i>	<i>Flavipedes</i>	<i>flavipedes</i>	<i>Fennellia</i>
	<i>Wentii</i>	<i>wentii</i>	
	<i>Flavi</i>	<i>flavus</i>	<i>Petromyces</i>
	<i>Nigri</i>	<i>niger</i>	
<i>Circumdati</i>	<i>Circumdati</i>	<i>ochraceus</i>	<i>Neoptromyces</i>
	<i>Candidi</i>	<i>candidus</i>	
	<i>Cremei</i>	<i>cremeus</i>	<i>Chaetosartorya</i>
	<i>Sparsi</i>	<i>sparsus</i>	

La place du genre *Aspergillus* au sein du règne fongique est discutée. En effet, les champignons sont classés selon leur mode de reproduction sexué (téleomorphe) ou asexué (anamorphe). Parmi le genre *Aspergillus*, environ 70 espèces possèdent un mode de reproduction sexué connu et sont classés comme Ascomycètes (reproduction par formation d'asques renfermant des ascospores). Elles possèdent donc deux noms : celui de la forme sexuée et celui de la forme anamorphe. Les autres *Aspergillus* (plus de 100 espèces) font partie des Deutéromycètes, champignons imparfaits n'ayant pas de reproduction sexuée connue.

*Aspergillus fumigatus* appartient au genre *Aspergillus* dont il définit le sous-genre *Fumigati* et la section *Fumigati*. Ayant un mode de reproduction sexué connu depuis 2008 (forme parfaite : *Neosartorya fumigata*) (O’Gorman et coll., 2009), il appartient à l’embranchement des *Ascomycètes*, où il est inclus dans le sous-embranchement des *Pezizomycotina*, dans la classe des *Eurotiomycetes*, dans la sous-classe des *Eurotiomycetidae*, dans l’ordre des *Eurotiales* et dans la famille des *Trichocomaceae* (Bennett, 2010).

### 1.1.3. Morphologie

En microscopie optique, *Aspergillus fumigatus* se caractérise par la présence d’un mycélium formé d’hyphes septés desquels poussent à angle droit les structures qui portent les conidies, appelées conidiophores. Le conidiophore est court, lisse, non cloisonné, incolore et se termine par une vésicule hémisphérique en forme de massue. Sur la partie supérieure de la vésicule, une rangée de phialides en forme de bouteille à col rétréci, densément groupées et disposées parallèlement à l’axe du conidiophore produisent les spores (ou conidies). Les conidies sont globuleuses, échinulées, de taille homogène (2 à 3  $\mu\text{m}$  de diamètre) et pigmentées en gris-vert à maturité.

L’ensemble (vésicule, phialides et conidies) forme une tête unisériée appelée tête aspergillaire qui est l’organe de fructification (Figure 2). Les conidies sont disséminées dans l’environnement par les mouvements du conidiophore et en présence de conditions favorables, elles germent pour former un nouveau mycélium. *A. fumigatus* croît rapidement sur gélose de Sabouraud ou gélose au Malt et donne en 48h à 37°C des colonies blanches puis gris-vert d’aspect poudreux avec la maturation des conidies.

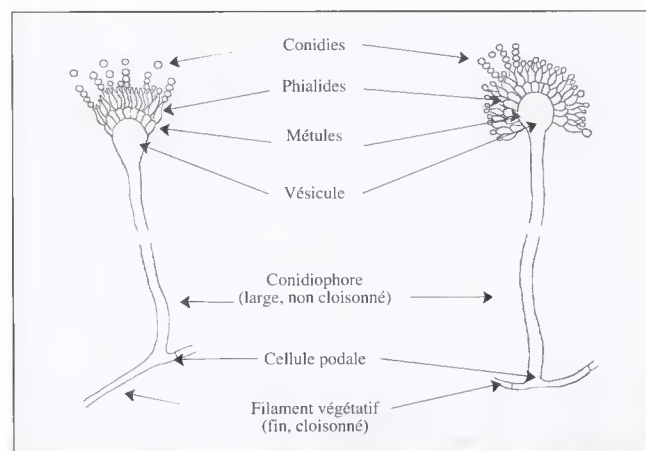


Figure 2 – Représentation d’une tête aspergillaire (extrait de Chabasse et coll., 2002.)

L’observation en microscopie électronique permet de visualiser la structure particulière des spores. Comme dans de nombreuses espèces fongiques, les spores sont recouvertes d’une fine couche de petits bâtonnets organisés en un réseau très serrés, appelés rodlets (Figure 3). L’analyse biochimique de ces structures a montré qu’elles étaient avant tout composées de protéines hydrophobes, regroupées sous le terme d’hydrophobines (Paris et coll., 2003) dont on pense qu’elles jouent un rôle dans les capacités de maintien des spores dans l’air (Beever et Dempsey, 1978). Chez *A. fumigatus* il a également été montré que la protéine RodA, constitutive des rodlets, était immunologiquement inerte, contribuant ainsi à la non reconnaissance des spores par les cellules de l’immunié (Aimanianda et coll., 2009).

Par ailleurs, les spores possèdent une paroi, majoritairement constituée d’un réseau tridimensionnel de polysaccharides ( $\alpha(1,3)$ -glucanes,  $\beta(1,3)$ -glucanes, chitine et galactomannane), et qui joue avant tout un rôle protecteur et de filtre (Latgé, 1999, 2007).

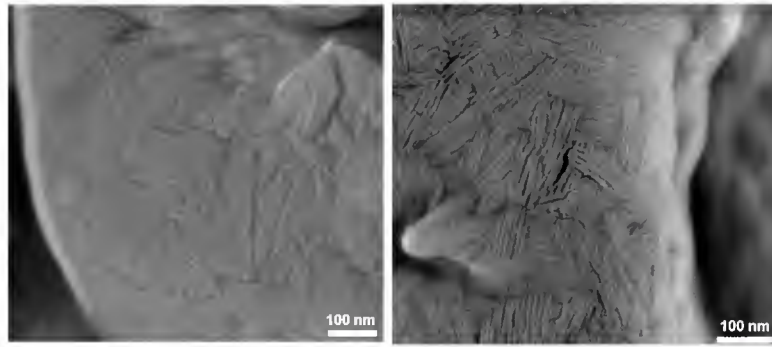


Figure 3 – Spore d'*A. fumigatus* en microscopie électronique, montrant la présence de rodlet (extrait de Paris et coll., 2003).

#### 1.1.4. Biotope

*Aspergillus fumigatus* est un champignon saprophyte ubiquitaire de l'environnement intervenant de façon importante dans le recyclage du carbone et de l'azote environnemental. On le retrouve naturellement dans le sol où il survit et se nourrit de débris organiques.

*Aspergillus fumigatus* est capable de croître à des températures que l'on retrouve dans l'environnement (15-25°C) ; il est également capable de se développer à des températures plus élevées (jusqu'à 55°C) et de survivre à 70°C. Sa température optimale de croissance étant 35-40°C il se développe facilement à la température du corps humain (Latgé, 1999).

## 1.2. Contamination fongique environnementale et exposition humaine

### 1.2.1. Données générales

Les moisissures sont ubiquitaires dans l'environnement et dans l'air, avec des représentations des genres et espèces fongiques très variables suivant les régions climatiques et les saisons ; les genres fongiques les plus souvent retrouvés sont *Cladosporium*, *Alternaria*, *Penicilium* et *Aspergillus* (Eduard, 2009; Gots et coll., 2003; Lacey et Crook, 1988).

Dans l'air extérieur, les concentrations de spores sont comprises entre moins de 20 et plus de 10<sup>5</sup> ufc/m<sup>3</sup> (Gots et coll., 2003). Il est admis, et cela paraît logique, que ces concentrations sont plus élevées dans les pays chauds et aux périodes chaudes de l'année dans les pays tempérés que dans les pays froids et en hiver (Pasanen, 2001). En environnement intérieur, la contamination fongique de l'air est le plus souvent inférieure à la contamination extérieure, en raison de la ventilation et par la simple sédimentation des spores (Meklin et coll., 2007). On observe cependant de très grandes variations suivant le niveau de salubrité, d'humidité et des conditions de ventilation des locaux. De plus, dans certains milieux industriels ou agricoles, la présence de moisissures est directement liée à l'activité professionnelle, pouvant générer des concentrations aériennes de spores particulièrement élevées (Lacey et Crook, 1988).

## 1.2.2. Analyse des données françaises

Dans ce paragraphe, nous avons souhaité limiter notre recherche bibliographique aux milieux "sensibles" que représentent les habitats insalubres et le milieu hospitalier, en raison des risques sanitaires qu'ils présentent. Nous avons également recherché des articles pour lesquels nous pouvions disposer d'une identification spécifique, afin de situer la part relative du genre *Aspergillus* et de l'espèce *A. fumigatus* dans l'aérocontamination fongique.

### 1.2.2.1. Milieu domestique

Les études environnementales sur la contamination fongique de l'air intérieur abordent cette question par différents points de vue, rendant les résultats bruts de concentrations fongiques difficiles à extraire et interpréter comparativement. En effet, l'expression des résultats et les techniques de prélèvement ne sont pas homogènes et donc pas toujours comparables.

Le tableau II résume les valeurs de 4 études environnementales réalisées dans des habitats français (Dassonville et coll., 2008, Bellanger et coll., 2009b, Roussel et coll., 2008, Reboux et coll., 2009). Les genres fongiques retrouvés majoritairement sont *Cladosporium*, *Penicillium*, *Aspergillus* et *Alternaria* avec des concentrations dans l'air qui varient de quelques ufc par m<sup>3</sup> à plusieurs centaines. L'espèce *A. fumigatus* n'est pas toujours identifiée ni quantifiée. Par contre, sa fréquence relative est rapportée dans 2 des 4 études : 3<sup>ème</sup> espèce d'*Aspergillus* la plus fréquente après *A. versicolor* et *A. glaucus* dans l'étude de Roussel et coll (Roussel et coll., 2008) et présent dans 20% des prélèvements dans l'étude de Reboux et coll. (Reboux et coll., 2009). L'étude de Roussel et coll. met en évidence le rôle joué par les facteurs environnementaux dans la contamination fongique de l'air des logements en associant significativement la contamination fongique totale de l'air intérieur et différentes caractéristiques du lieu d'habitation, comme la présence d'un chauffage électrique, l'absence de système de ventilation, l'odeur de moisi ou la situation du logement au rez-de-chaussée (Roussel et coll., 2008).

### 1.2.2.2. Milieu hospitalier

Quatre études sur la contamination fongique de l'air en milieu hospitalier sont présentées dans le Tableau III. Du fait de la présence de systèmes de ventilation et de filtration de ces bâtiments, les concentrations retrouvées sont nettement plus faibles que dans l'environnement domestique, et le plus souvent inférieures à 10 ufc/m<sup>3</sup>.

Les genres principalement retrouvés dans cet environnement sont *Penicillium*, *Cladosporium*, *Aspergillus* et *Alternaria*, mais aussi *Fusarium* ou *Trichoderma*. Une seule étude précise les concentration des différentes espèces d'*Aspergillus* (Sixt et coll., 2007) : *A. fumigatus* figure en 3<sup>ème</sup> position, après *A. hiratsukae* et *A. niger*. La contamination de l'eau de distribution a été retrouvée dans quelques études (Vesper et coll., 2007a, Warris et coll., 2001) mais non confirmée en France dans l'eau distribuée en milieu hospitalier (Gangneux et coll., 2002a, Kauffman-Lacroix et coll., 2008).

Tableau II – Contamination fongique des habitats (France)

Référence	Type d'étude	Espèces retrouvées	Concentrations dans l'air (ufc/m <sup>3</sup> )	Commentaires
<a href="#">Bellanger et coll., 2009b</a>	cas/témoins	<i>Cladosporium</i> <i>Penicillium</i> <i>A. versicolor</i>	72 - 592 1309 - 2350 341 - 618	Comparaison qPCR et culture fongique qPCR ++ : plus rapide et plus standardisable Habitats moisiss significativement plus contaminés
<a href="#">Dassonville et coll., 2008</a>	cohorte	<i>Cladosporium</i> <i>Penicillium</i> <i>Aspergillus</i> <i>Alternaria</i> Total Champignons	35 - 64 30 - 33 < 20 ; max = 648 < 20 ; max = 28 187 - 232	Concentrations intérieures en relation avec les concentrations extérieures
<a href="#">Reboux et coll., 2009</a>	cas/témoins	<i>Cladosporium</i> <i>Penicillium</i> <i>Aspergillus</i> Total champignon	20 - 63 30 - 100 63 - 92 250 - 500	Habitat des patients allergiques significativement plus contaminé que celui des témoins.
<a href="#">Roussel et coll., 2008</a>	environnementale	<i>Cladosporium</i> <i>Penicillium</i> <i>Aspergillus</i> <i>Alternaria</i>	72 - 196 215 - 229 54 - 232 1 - 3	Facteurs liés à une contamination fongique de l'habitat : humidité (mois), chauffage électrique, sans système de ventilation, avec dégâts des eaux et situé au rez-de-chaussée.



Tableau III – Contamination fongique du milieu hospitalier (France)

Référence	Type d'étude	Espèces retrouvées	Concentrations dans l'air (ufc/m <sup>3</sup> )	Commentaires
Alberti et coll., 2001	environnementale	<i>Aspergillus</i> <i>Chaetomium</i> <i>Penicillium</i> <i>Fusarium</i>	0,8 - 4	Relation entre la contamination fongique environnementale et l'incidence d'aspergillose invasive nosocomiale.
Brenier-Pinchart et coll., 2009	surveillance	<i>A. fumigatus</i> Total champignon	0 2 - 3	Variation saisonnière et relation avec paramètres météorologiques : température, % humidité et vitesse vent
Brenier-Pinchart et coll., 2011	surveillance	Flora fongique totale	139 spores/jour	Contamination de l'air extérieur est liée à la survenue d'aspergillose invasive
Fournel et coll., 2010	comparative travaux	<i>Aspergillus</i>	0.64 - 1.21	Concentrations identiques avant et pendant travaux
Gangneux et coll., 2006	comparative appareils	Total <i>Aspergillus</i> <i>Cladosporium</i> <i>Penicillium</i> <i>Alternaria</i>	5 - 70	Comparaison de rendement de capture de différents bioimpacteurs. Les archives de l'hôpital étaient l'endroit le plus contaminé.
Sautour et coll., 2009	surveillance	<i>Cladosporium</i> <i>Aspergillus</i> <i>Penicillium</i> <i>Alternaria</i> <i>Curvularia</i> <i>Fusarium</i> <i>Paecilomyces</i>	2,6 - 2,8 2,1 - 3,2 2,9 - 3,1 3,0 2,0 - 3,0 2,0 - 2,6 2,0 - 3,0	Variation saisonnière des concentrations Concentration d' <i>Aspergillus</i> plus importante en hiver mais constante dans le service d'hématologie au cours de l'année.
Sixt et coll., 2007	surveillance	<i>Aspergillus</i> <i>A. fumigatus</i> <i>Alternaria</i> <i>Penicillium</i> <i>Trichoderma</i>	2 4,61 - 6,74 2 - 3 4 - > 6,5 12 - > 100	Diminution de la contamination totale après la mise en place d'unités mobiles de traitement de l'air (Plasmair®)

### 1.3. Conséquences pathologiques de l'exposition

Les conséquences de l'exposition aux spores d'*Aspergillus* sont connues de longue date, certaines plus récemment en raison de l'émergence de formes graves chez les immunodéprimés.

#### 1.3.1. Pathogénèse

Chez le sujet sain, immunocompétent, l'immunité innée intervient au stade très précoce de l'infection (Balloy et Chignard, 2009; Dagenais et Keller, 2009). La première barrière de défense est l'épithélium respiratoire, doté de plusieurs types cellulaires tels que les cellules ciliées et les cellules sécrétrices de mucus. Les spores inhalées sont "piégées" dans le mucus et transportées, par battements ciliaires, vers la jonction oropharyngée où elles sont expectorées ou avalées, ce qui permet d'en éliminer un grand nombre. Cependant, certaines spores parviennent à pénétrer dans l'arbre respiratoire puis à gagner les alvéoles pulmonaires où elles sont confrontées aux pneumocytes de type I et de type II ainsi qu'aux macrophages résidents. La proximité du compartiment alvéolaire et des vaisseaux sanguins et lymphatiques va faciliter le recrutement de cellules immunocompétentes, via la sécrétion de médiateurs solubles, les cytokines, qui attirent les cellules effectrices sur le site de l'infection. Les macrophages éliminent les conidies par phagocytose tandis que les polynucléaires neutrophiles détruisent les conidies germantes ou les filaments.

Un déficit des moyens de défense, locale ou systémique, va conduire à une colonisation aspergillaire au niveau du sinus, des bronches ou des poumons (Desoubeaux et coll., 2010a). Elle peut être transitoire ou être le point de départ d'une infection pulmonaire invasive en cas de persistance du déficit immunitaire (Figure 4). Les principaux facteurs de risque à cette dissémination sont la neutropénie et l'administration prolongée de corticoïdes à dose élevée (Cordonnier et coll., 2006).

Sur le plan histopathologique, l'invasion fongique va induire initialement une nécrose de l'épithélium respiratoire. Les filaments mycéliens peuvent alors envahir de proche en proche le parenchyme voisin, entraînant l'apparition d'une alvéolite fibrineuse riche en filaments mycéliens. Les toxines nécrosantes sécrétées par les *Aspergillus* au cours de leur développement favorisent la dissémination fongique. L'infection peut s'étendre aux organes de voisinage, comme la plèvre ou le péricarde, par contiguïté, mais aussi à des organes situés à distance du foyer pulmonaire initial, par dissémination sanguine : l'atteinte vasculaire ouvre en effet la voie à une dissémination hémotogène de l'infection, ainsi qu'à la thrombose avec nécrose hémorragique, expliquant la fréquence des accidents hémorragiques (Bodey et Vartivarian, 1989; Gorelik et coll., 2000).

#### 1.3.2. Manifestations pathologiques chez le sujet immunocompétent

Chez les sujets immunocompétents, l'inhalation de spores d'*Aspergillus fumigatus* est, pour la majorité des cas, sans conséquence puisque le système immunitaire élimine les spores et neutralise leur évolution (Dagenais et Keller, 2009). Cependant, cette exposition peut provoquer des manifestations pathologiques dans deux catégories de patients, principalement : *i*) patients aux antécédents d'atopie ou de mucoviscidose qui développent préférentiellement des manifestations broncho-allergiques (Aspergillose Broncho-Pulmonaire Allergique, ou ABPA) et *ii*) patients ayant des antécédents pulmonaires (tuberculose, bronchopneumopathie chronique obstructive, emphysème et dilatation des bronches) avec un risque de formation d'aspergillome ou de formes nécrosantes de pneumonies (Gangneux et coll., 2008; Hogan et Denning, 2011).

Nous résumerons ci-dessous les principales présentations de l'aspergillose chez ces patients.

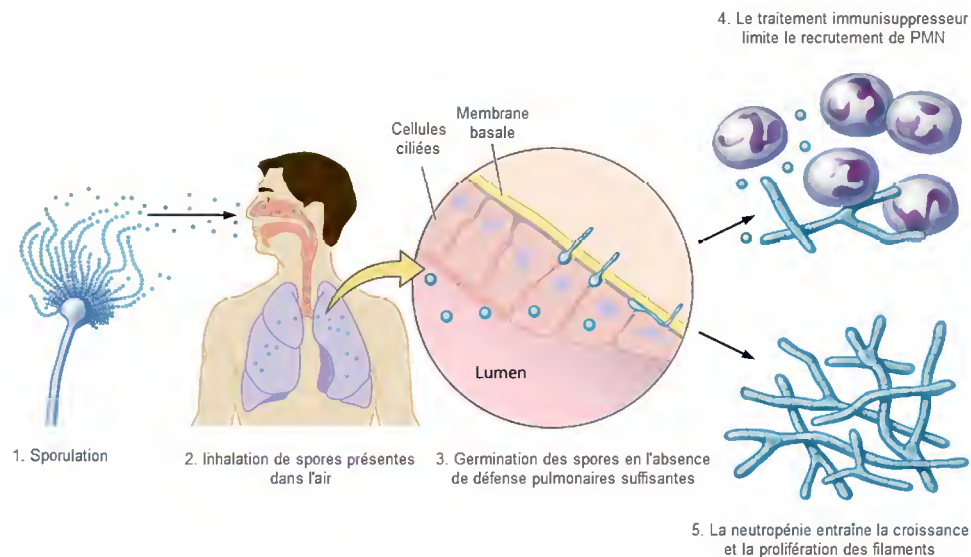


Figure 4 – Processus de développement d’une aspergillose invasive chez un sujet immunodéprimé (extrait de Dagenais et Keller, 2009)

### 1.3.2.1. Aspergilloses respiratoires allergiques

Les aspergilloses respiratoires allergiques correspondent à des manifestations d’hypersensibilité du tractus broncho-pulmonaire vis-à-vis d’antigènes aspergillaires, et surviennent habituellement sur un terrain atopique, à la faveur d’une colonisation du tractus respiratoire par des *Aspergillus* (Greenberger, 2003; Denning et coll., 2006; Agarwal et coll., 2006). Celle-ci est favorisée par l’exposition à de fortes concentrations aspergillaires (travail en cave, en atmosphère climatisée, manipulation de végétaux ou de grains moisiss, de compost...). Chez l’asthmatique, l’épuration aspergillaire est entravée par certaines anomalies rhéologiques du mucus bronchique ; de ce fait, une aspergillose allergique peut être observée même en l’absence de notion d’exposition à de fortes concentrations d’*Aspergillus* (Ikemoto, 1992).

L’aspergillose broncho-pulmonaire allergique (ABPA) est une manifestation sévère des aspergilloses respiratoires allergiques. Elle est particulièrement fréquente chez les patients atteints de mucoviscidose (Moss, 2010). Le tableau clinique typique associe des infiltrats pulmonaires récidivants, des épisodes de respiration sibilante avec fièvre et éosinophilie sanguine et une expectoration de moules brunâtres dont la mise en culture révèle la présence d’*A. fumigatus*. Les anomalies radiologiques sont essentiellement représentées par des infiltrats pulmonaires et des broncheectasies proximales (Neeld et coll., 1990). L’accumulation de mucus dans ces broncheectasies provoque souvent la formation de bronchocèles avec un aspect typique "en doigt de gant", bien visible par tomodensitométrie. Sur le plan biologique, l’association de mécanismes d’hypersensibilité de types I et III est démontrée par la présence quasi constante d’anticorps précipitants anti-aspergillaires et d’une hypersensibilité réaginique (élévation des IgE totales, détection d’IgE spécifiques anti-aspergillaires).

L’ABPA va évoluer sur plusieurs années. C’est initialement, une maladie intermittente, cortico-sensible, se manifestant par des poussées aiguës entrecoupées de rémissions parfois spontanées. A la faveur des récives et d’un traitement mal suivi ou trop tardif, elle évolue vers la formation de lésions de fibrose bronchique et parenchymateuse, insensibles aux corticoïdes et génératrices d’une insuffisance respiratoire grave (Moss, 2010).

La prise en charge de l’ABPA repose sur l’éviction à l’exposition lorsque celle-ci peut être identifiée et sur la corticothérapie par voie orale, qui permet de diminuer les réactions antigènes-anticorps ainsi que l’inflammation bronchique propice à l’entretien de la colonisation aspergillaire. La corticothérapie inhalée peut se concevoir dans le traitement d’entretien, afin de minimiser la posologie de la corticothérapie orale (Heininger et coll.,

1998). L'association à un traitement antifongique par itraconazole pourrait contribuer à l'amélioration de l'état clinique et à la diminution de la corticothérapie (Denning et coll., 1991, 2006). Le traitement par l'itraconazole est toutefois associé à 40% d'échecs thérapeutiques et d'effets indésirables ; le voriconazole ou le posaconazole sont des alternatives thérapeutiques potentielles qui pourraient améliorer le contrôle de l'asthme et réduire la sévérité de la pathologie (Chishimba et coll., 2012).

### 1.3.2.2. Aspergillome

L'aspergillome (ou "fungal ball") est une masse fongique qui se développe dans une cavité pulmonaire pré-existante, le plus souvent après une tuberculose (Klich, 2009). L'aspergillome est composé d'éléments fongiques, d'une matrice protéique, de cellules inflammatoires et de mucus. Une fois constitué, l'aspergillome ne grossit pas et n'entraîne pas d'envahissement pulmonaire. La lésion reste stable dans la majorité des cas, mais elle peut diminuer de taille ou disparaître spontanément sans traitement dans 10% des cas.

### 1.3.3. Manifestations pathologiques chez le patient immunodéprimé

Chez les patients immunodéprimés, l'aspergillose se caractérise par son caractère invasif et sa gravité. Les patients présentant une neutropénie prolongée sont les plus concernés notamment ceux atteints d'hémopathies malignes, en particulier lorsqu'ils reçoivent une allogreffe de moelle osseuse (Denning, 1998; Marr et coll., 2002; Marr, 2008). Cependant, 30 à 50% des aspergilloses invasives sont maintenant diagnostiquées chez des sujets non neutropéniques, avec une mortalité au moins aussi élevée que pour les patients d'hématologie. Parmi ceux-ci figurent les transplantés d'organe solide, les patients recevant des traitement immunosuppresseurs au long cours (corticoïdes notamment), et ceux atteints de maladies de système, et qui sont de plus en plus fréquemment traitées par des biothérapies immunosuppressives inhibant les réponses inflammatoires (anti-TNF, par exemple) (Gangneux et coll., 2008).

Dans une étude prospective récente concernant 12 hôpitaux universitaires français et regroupant 424 cas observés entre 2005 et 2007, 77,6% des patients présentaient une hémopathie maligne, dont 34,6% une leucémie aiguë, 21,6% un syndrome lymphoprolifératif chronique et 21,4% une allogreffe de cellules souches hématopoïétiques. Les autres patients présentaient une transplantation d'organe solide (8,7%), une tumeur solide (4,3%), une maladie systémique nécessitant l'administration de fortes doses de corticoïdes (4,6%) ou une pathologie respiratoire chronique (2,3%) (Lortholary et coll., 2011). Dans cette série, il faut remarquer l'absence de cas chez des patients atteints de SIDA, alors que cette complication peut survenir chez ces patients lorsque le taux de lymphocytes CD4 est  $< 50/\text{mm}^3$  (Lortholary et coll., 1993). Il semble cependant qu'on observe une émergence très récente de l'aspergillose invasive au cours du SIDA, chez les patients traités pour des affections malignes compliquant le SIDA (D. Costagliola, communication personnelle).

Les manifestations cliniques de l'aspergillose pulmonaire invasive sont souvent peu spécifiques, notamment à la phase initiale (Denning, 1998). Le tableau clinique habituel correspond à une pneumopathie aiguë infectieuse, souvent bilatérale, résistante aux antibiotiques (Marr et coll., 2002). La fièvre, supérieure à 38,5°C, est habituelle, mais son absence ne doit pas conduire à un rejet du diagnostic d'aspergillose pulmonaire invasive, surtout lorsqu'elle co-existe avec des signes respiratoires ou radiologiques persistants chez un patient neutropénique (Denning, 1998). La toux est parfois accompagnée d'une expectoration difficile. La dyspnée est fréquente. Plus évocatrices sont les hémoptysies et les douleurs thoraciques localisées ou diffuses, augmentées par la toux et l'inspiration (Reichenberger et coll., 2002). L'auscultation thoracique est pauvre, révélant des râles bronchiques.

La radiographie thoracique est peu sensible pour le diagnostic d'aspergillose pulmonaire invasive. Aux stades précoces, des infiltrats non spécifiques ou des lésions nodulaires peuvent être présents (Reichenberger et coll., 2002). Chez un patient neutropénique, ces lésions évoluent vers la nécrose avec formation de cavités, ou vers l'apparition d'un séquestre donnant un aspect de nodule surmonté d'un croissant gazeux. Cet aspect radiologique est inconstant, mais très évocateur d'aspergillose pulmonaire invasive, bien que n'étant pas totalement spécifique. Lorsque l'évolution est favorable, les signes radiologiques régressent en moyenne en 4 mois, laissant souvent des séquelles fibreuses.

L'examen tomодensitométrique du thorax est la méthode diagnostique la plus sensible pour détecter précocement le signe du halo, évocateur d'aspergillose pulmonaire invasive (Caillot et coll., 2001; Reichenberger et coll., 2002). Il s'agit d'une zone d'hyperdensité atténuée, correspondant au liseré hémorragique entourant la nécrose parenchymateuse nodulaire. Sa présence est fugace, au stade précoce de l'infection aspergillaire. Au cours de l'évolution, la tomодensitométrie thoracique permet d'objectiver plus précocement les excavations et l'aspect du "croissant clair gazeux" qui caractérise la lésion en fin de phase d'aplasie (Martino et Subirà, 2002; Marr, 2008) et permet en outre d'établir un bilan précis des lésions et d'une éventuelle atteinte vasculaire.

En l'absence de traitement, l'évolution est habituellement fatale à la suite d'une extension loco-régionale des lésions conduisant à une pneumopathie bilatérale hypoxémiante, ou d'une dissémination hémotogène avec apparition de localisations métastatiques viscérales (et notamment cérébrales), ou d'une hémoptysie massive par ulcération d'un gros vaisseau.

La guérison est toutefois possible, à condition qu'un traitement antifongique adapté soit institué rapidement et que la neutropénie puisse être corrigée. Le voriconazole est actuellement recommandé en traitement de première intention (Singh et Paterson, 2005; Marr, 2008) sur la base d'un essai clinique randomisé montrant sa supériorité sur le traitement par l'amphotéricine B (Herbrecht et coll., 2002). L'exérèse chirurgicale, quand elle est possible, peut concourir à la guérison (Moreau et coll., 1993). Les données françaises les plus récentes indiquent une mortalité de 44,8% 90 jours après le diagnostic (Lortholary et coll., 2011). Dans cette étude, un traitement initial incluant le voriconazole (seul ou en association) était associé à un moindre risque de décès.

Compte tenu de l'importance de la précocité du traitement, la simple suspicion d'aspergillose pulmonaire invasive chez un sujet neutropénique et/ou immunodéprimé doit entraîner la mise en route immédiate d'un traitement antifongique présomptif (Desoubeaux et coll., 2010c). C'est également pour cette raison que l'administration d'antifongiques à titre prophylactique peut être envisagée chez des patients à haut risque (Karthaus, 2011).

## 1.4. Relation exposition - infection

A de rares exceptions, les manifestations pathologiques de l'aspergillose sont consécutives à l'inhalation de spores, mais la relation quantitative entre l'exposition aux spores d'*Aspergillus fumigatus* et la survenue de ces manifestations reste mal caractérisée. Ceci peut s'expliquer d'une part par la difficulté à quantifier l'exposition dans les conditions naturelles, et d'autre part la difficulté à quantifier des effets dont nous avons pu voir la diversité d'expression, la complexité du diagnostic et les fortes interactions avec des facteurs liées à l'hôte.

La relation directe avec une exposition massive et/ou répétée est bien établie pour certaines manifestations allergiques de l'aspergillose survenant dans des contextes professionnels très exposés (Allmers et coll., 2000; Roussel et coll., 2012; Eduard, 2009). Mais cette relation peut être bien plus complexe, comme dans l'ABPA, qui est la conséquence d'interactions entre la colonisation fongique, les facteurs de prédisposition de l'hôte et sa réponse immune. L'hypersensibilité qui en résulte est, finalement, difficile à relier quantitativement et directement à un niveau d'exposition.

Une relation plus directe entre exposition et infection semble exister pour l'aspergillose invasive observée chez les patients immunodéprimés (Nolard, 1994; Anonyme., 2011; Anonyme-Canada., 2001). Cela a pu être montré de plusieurs façons :

- par l'étude des épidémies d'aspergillose invasive (Vonberg et Gastmeier, 2006), dont certaines sont directement la conséquence d'un pic d'aérocontamination fongique (Peláez et coll., 2012).
- par des études longitudinales mettant en évidence un lien entre aérocontamination fongique et incidence de l'aspergillose en milieu hospitalier (Alberti et coll., 2001; Arnow et coll., 1991; Brenier-Pinchart et coll., 2011).
- en montrant l'impact des mesures de réduction de la contamination fongique sur l'incidence de l'aspergillose (Arnow et coll., 1991; Sherertz et coll., 1987; Benet et coll., 2007; Araujo et coll., 2008).

Cependant, aucune de ces études n'a pu établir une relation quantitative entre exposition et incidence des cas. Tout au plus, une estimation d'un seuil de risque a pu être proposée, variant de  $10^{-3}$  ufc/m<sup>3</sup> à 25 ufc/m<sup>3</sup> suivant les études (Sherertz et coll., 1987; Ruiz-Camps et coll., 2010).

Plusieurs études expérimentales animales ont montré l'existence d'un lien quantitatif entre l'exposition et l'infection (Dixon et coll., 1989; Chiller et coll., 2002; Clemons et Stevens, 2005; Eduard, 2009; Kurup et Grunig, 2002) mais sans analyse mathématique ou statistique de ce lien. De plus, nombre de ces modèles comportent un mode d'inoculation très artificiel (voie intraveineuse ou intratrachéale) ne simulant que très imparfaitement les conditions naturelles d'exposition.

# Objectifs

Dans ce contexte, l'objectif principal de cette thèse est l'étude de la relation quantitative entre l'exposition aérienne à des spores d'*Aspergillus fumigatus* et les conséquences pathologiques associées.

Pour répondre à cet objectif, mon travail de thèse a été divisé en trois parties :

- Mise au point d'un système d'exposition *in vitro* de cellules pulmonaires à des aérosols de spores d'*Aspergillus fumigatus* et application à la modélisation de la relation entre exposition et réponse inflammatoire.
- Modélisation de la relation entre exposition aérienne à *A. fumigatus* et probabilité de survenue d'une aspergillose pulmonaire invasive chez la souris.
- Etude de la relation entre la contamination environnementale par des spores d'*Aspergillus* et la survenue de colonisations bronchiques chez les transplantés pulmonaires.





**Deuxième partie**

**Exposé des travaux**



# Chapitre 1.

## Etude *in vitro*

---

### 1.1. Modèles d'exposition *in vitro* : résumé des données de la littérature.

Le contact entre les spores d'*Aspergillus fumigatus* et la barrière épithéliale du système respiratoire est l'étape initiale et déterminante de l'infection et de la réponse immunitaire innée ou adaptative. De nombreuses équipes se sont donc attachées à l'étude des phases d'adhésion, de pénétration et d'élimination des spores par l'épithélium, mais aussi à celle des sécrétions de cytokines et autres biomarqueurs de la réponse cellulaire, en réponse à l'exposition aux spores fongiques. De nombreux modèles d'exposition ont été utilisés, dont la plupart reposent sur un contact spores-cellules en milieu liquide, qui permet de réaliser facilement l'analyse des sécrétions dans les surnageants de culture. Cependant, de nouveaux modes d'exposition par aérosolisation de spores pourraient permettre de reproduire en laboratoire des conditions d'exposition des cellules plus proches d'une exposition naturelle.

L'expérience que j'ai acquise au cours de mon Master sur un modèle d'interface air-liquide pour l'étude des polluants chimiques nous a permis d'envisager cette méthodologie pour l'étude d'*A. fumigatus*.

#### 1.1.1. Modèles cellulaires utilisés pour l'étude d'*Aspergillus fumigatus*

Les modèles utilisés pour l'étude des mécanismes cellulaires de défense contre *A. fumigatus* diffèrent sensiblement en fonction des types cellulaires étudiés et des objectifs recherchés. Dès 1970, Lehrer et Jan (Lehrer et Jan, 1970) exposent des leucocytes sanguins à des spores d'*Aspergillus fumigatus* pour évaluer l'effet de la phagocytose sur leur viabilité. Depuis, différentes cellules du sang ou du système immunitaire, tels que les macrophages (Diamond et coll., 1978; Dubourdeau et coll., 2006; Marr et coll., 2003), les polynucléaires neutrophiles (Bellocchio et coll., 2004) ou les cellules dendritiques (Morton et coll., 2011), ont été étudiées pour leur capacité d'élimination des spores d'*A. fumigatus* et de production de cytokines à la suite d'une exposition (Dagenais et Keller, 2009).

L'étude des cellules épithéliales s'est avérée indispensable en raison de leur implication dans le processus de l'immunité innée. Les spores d'*A. fumigatus* se développant au niveau des alvéoles pulmonaires, la lignée la plus couramment utilisée pour ces études est la lignée A549 (ATCC®, réf CCL-185) (Aleksееva et coll., 2009;

Bellanger et coll., 009a; DeHart et coll., 1997; Gauthier et coll., 2012; Wasylnka et Moore, 2003). Cette lignée provient de cellules épithéliales alvéolaires humaines prélevées chez un patient atteint d'un adénocarcinome pulmonaire (Lieber et coll., 1976) ; les cellules possèdent des caractéristiques morphologiques et biochimiques similaires à des pneumocytes de type II (Smith, 1977).

Les épithéliums bronchiques étant également impliqués dans la pathogenèse de l'aspergillose, des lignées de cellules bronchiques telles que HBE (Gauthier et coll., 2012; Oosthuizen et coll., 2011) et BEAS-2B (Fekkar et coll., 2012) ont également été utilisées par certaines équipes. Des modèles plus élaborés ont également été développés dans lesquels une double couche de cellules est cultivée simultanément, permettant ainsi d'évaluer l'interaction entre deux types cellulaires (Hope et coll., 2007).

Cependant, malgré leur bonne reproductibilité et leur facilité d'utilisation, les lignées cellulaires indifférenciées ne permettent qu'une analyse partielle de la fonction épithéliale et ne permettent pas d'étudier le rôle des cellules ciliées et des cellules sécrétrices de mucus, très impliquées dans l'élimination mécanique des spores. Pour analyser le rôle de ces cellules, des modèles de culture primaire de cellules nasales ou bronchiques (humaines ou animales) ont été développés, en particulier par l'équipe du CHU Henri Mondor à Paris (Botterel et coll., 2008; Khoufache et coll., 2010; Oosthuizen et coll., 2011; Singhal et coll., 2011). Ces cultures ont, cependant, l'inconvénient d'être très contraignantes à préparer et de dépendre de sources qui ne sont pas strictement reproductibles.

Quel que soit le type cellulaire utilisé, la culture doit être exposée aux spores fongiques. Dans toutes les publications présentées ci-dessus, les cellules sont exposées à des suspensions de spores en milieu liquide, pour assurer une bonne reproductibilité des conditions d'exposition et limiter la mortalité cellulaire. Les concentrations utilisées par les différents auteurs varient entre  $10^7$  et  $10^9$  spores/mL.

Malgré l'importance des informations qui ont pu être obtenues avec ces modèles, les conditions d'exposition restent très artificielles. De plus, les concentrations utilisées en milieu liquide sont particulièrement élevées et sans commune mesure avec celles qui peuvent être retrouvées au niveau alvéolaire, ce qui peut représenter un biais important dans l'analyse des réponses observées.

Pour ces différentes raisons, un modèle d'exposition cellulaire par un aérosol de spores d'*Aspergillus fumigatus* nous semble indispensable, de façon à nous rapprocher des conditions naturelles d'exposition.

### 1.1.2. Modèles cellulaires utilisés pour l'étude de polluants gazeux

A notre connaissance, aucun système d'exposition cellulaire utilisant des spores fongiques sous forme d'aérosol n'avait été publié avant que nos travaux ne soient réalisés (Persoz et coll., 2011). Pourtant, dans le domaine de la toxicologie environnementale, des méthodes permettant d'exposer des cultures cellulaires à des atmosphères composées d'un ou plusieurs polluants chimiques ont été décrites depuis plusieurs années.

Le premier modèle de culture cellulaire en interface air-liquide date de 1975 (Voisin et coll., 1975). Il s'agissait de macrophages alvéolaires de cobaye déposés sur des membranes celluloseuses permettant les échanges nutritifs entre la partie basale des cellules et un milieu de culture présent sous la membrane, la face apicale des cellules restant à l'air sans milieu de culture. Une évolution notable dans les conditions d'exposition de cellules à l'interface air-liquide a été la conception d'une chambre biphasique, close, pour le maintien de cellules épithéliales pulmonaires entre l'air et la phase liquide (Whitcutt et coll., 1988). Sur la base de cette technique, Tarkington et coll. ont développé en 1994 un système dynamique d'exposition directe de cellules épithéliales visant à maîtriser les paramètres de culture et d'exposition comme la concentration en CO<sub>2</sub>, la température et le flux de l'atmosphère arrivant sur les cellules (Tarkington et coll., 1994). Ce principe fut repris pour l'étude des effets du tabac sur les cellules de l'arbre respiratoire (Sun et coll., 1995), puis miniaturisé et commercialisé

sous le nom de Cultex en 1999 (Aufderheide et Mohr, 1999). Il existe aujourd'hui plusieurs modèles sur le marché (Bakand et Hayes, 2010; Berube et coll., 2009) mais les deux principaux sont distribués par les sociétés Cultex® et Vitrocell® Systems.

Depuis près de 20 ans ce type d'exposition a été utilisé pour l'étude de plusieurs polluants gazeux de l'environnement comme le NO<sub>2</sub> et l'O<sub>3</sub> (Ritter et coll., 2001), des gaz d'échappement diesel (Knebel et coll., 2002), de la fumée de tabac (Aufderheide, 2008), de certains Composés Organiques Volatiles (COV) comme le benzène, le toluène ou le formaldéhyde (Pariselli et coll., 2009), et pour l'évaluation de la toxicité des nanotubes de carbone (Bitterle et coll., 2006; Dekali et coll., 2010). La grande diversité des applications montre que ces modules sont simples d'utilisation et seraient facilement adaptables à tous les contaminants de l'air, chimiques ou biologiques, sous réserve de pouvoir générer des aérosols d'exposition dans des conditions reproductibles et sûres.

Faisant suite à une collaboration établie dès 2009 entre la société Vitrocell® et l'équipe de recherche "Epidémiologie Environnementale : Impact Sanitaire des Pollutions" de l'université Paris Descartes (EA 4064) dans lequel j'avais réalisé mon stage de master 2, notre laboratoire a pu bénéficier d'un appui technologique pour mettre en place un modèle d'exposition par les spores d'*Aspergillus fumigatus*.

Le développement d'un tel système d'exposition à l'interface air-liquide avait pour but de se rapprocher des conditions naturelles d'exposition et ainsi reproduire en laboratoire le premier contact entre des spores aérosolisées et des cellules épithéliales humaines.

## 1.2. Objectifs

**L'objectif principal** de nos travaux était la mise en place d'un modèle *in vitro* d'exposition à un aérosol de spores fongiques permettant d'étudier la réponse inflammatoire de cellules alvéolaires (lignée A549) exposées à des spores d'*Aspergillus fumigatus*.

De façon concomitante, l'étude de cofacteurs environnementaux pouvant intervenir dans la réponse inflammatoire des cellules était envisagée par la réalisation d'expositions séquentielles par *A. fumigatus* et par du formaldéhyde.

**Le deuxième objectif** était d'établir un modèle statistique résumant la relation entre la dose d'exposition et la réponse inflammatoire observée, incluant les différents paramètres du modèle expérimental.

### Condition de réalisation et modalités de présentation de nos résultats

Les travaux ont été réalisés en étroite collaboration avec le laboratoire de l'EA 4064, "Epidémiologie Environnementale : Impact Sanitaire des Pollutions", (Paris Descartes), sous la direction du Professeur Nathalie Seta et de Madame Sophie Achard. Les expérimentations ont été co-réalisées avec Charles Persoz (doctorant), en particulier pour les co-expositions avec le formaldéhyde.

Nous avons bénéficié de l'expertise de Monsieur Tobias Krebs, de la société Vitrocell® pour la conception du dispositif d'exposition.

Notre exposé détaillera le dispositif d'exposition, les conditions expérimentales, les travaux préliminaires à l'étude des expositions aux spores d'*Aspergillus*, puis résumera les principaux résultats des travaux publiés dans "Toxicology letter" <sup>1</sup> sur les effets interactifs des expositions séquentielles avec le formaldéhyde.

---

1. La publication "PERSOZ C, LELEU C, ACHARD S, FASSEU M, MENOTTI J, MENECEUR P, MOMAS I, DEROUIN F, SETA N. Sequential air-liquid exposure of human respiratory cells to chemicals and biological pollutants. *Toxicol. Lett.* 2011 ; 207 : 53-59." est reproduite en fin de ce chapitre.

### 1.3. Développement d'un modèle d'exposition à l'interface air-liquide

#### 1.3.1. Dispositif Vitrocell® systems

La Figure 5 présente le module Vitrocell® utilisé. Il permet d'exposer simultanément trois cupules (ou inserts) contenant les cultures cellulaires. Lorsque les inserts sont mis en place, la partie basale du tapis cellulaire repose sur une membrane de cellulose comportant des pores de 0,4 µm de diamètre permettant les échanges avec le milieu nutritif ; la partie apicale des cellules est exposée directement à l'air (contaminé ou non). Chaque insert est disposé dans une chambre et repose sur du milieu de culture. Des trompettes d'admission apportent le flux d'air à un débit contrôlé et constant à la surface du tapis cellulaire, puis des évacuations permettent la circulation de l'air. De plus, dans un compartiment indépendant, une circulation d'eau reliée à un bain-marie maintient l'ensemble à 37°C.

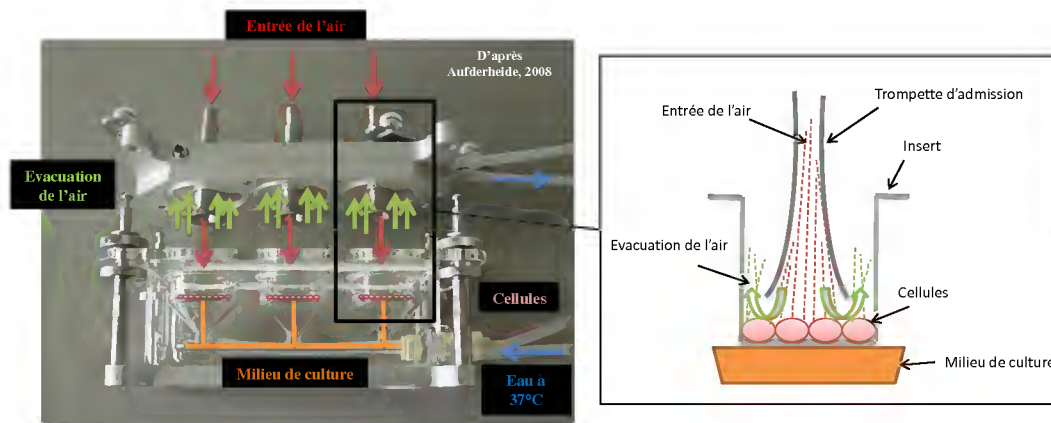


Figure 5 – Module d'exposition Vitrocell®.

#### 1.3.2. Condition d'exposition

Les cellules A549 n'étant pas des cellules différenciées, elles n'ont pas la capacité de rester sans milieu de culture sur leur face apicale pendant plus de 30 minutes. De ce fait, les cellules ont été cultivées de façon traditionnelle ("submergée") jusqu'à obtenir confluence cellulaire.

L'aérosolisation des spores d'*A. fumigatus* a été réalisée par un nébulisateur (BCI®) alimenté en air purifié sous pression à 2 bars par un compresseur (Jun Air®). L'aérosol de spores est dirigé vers le module d'exposition grâce à un ensemble de tubes en polypropylène raccordés de manière étanche. Une partie des spores est dirigée vers le tapis cellulaire grâce à une pompe à vide réglée sur un débit de 5mL/min. L'autre partie étant accumulée dans une enceinte hermétiquement close par un filtre HEPA. Le schéma du montage expérimental est présenté dans la Figure 6 ci-dessous :

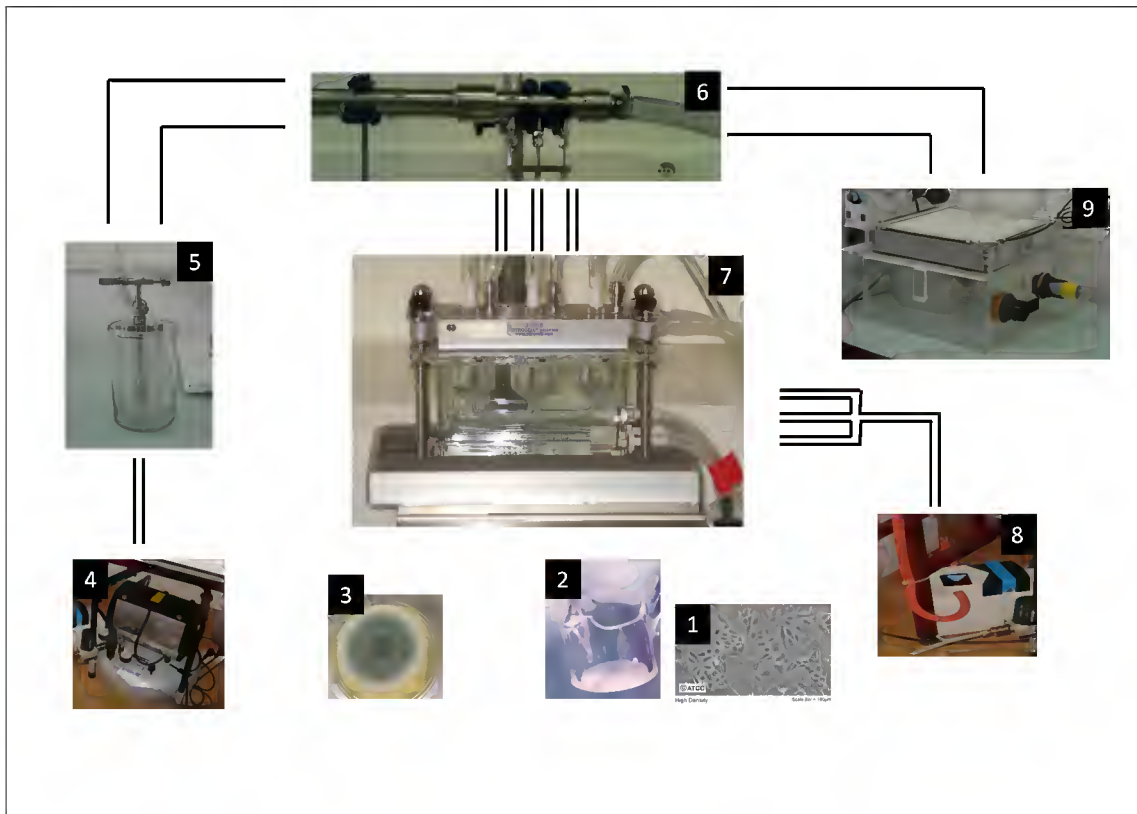


Figure 6 – Schéma expérimental de l'exposition de cellules pulmonaires à un aérosol de spores fongiques.

1. **Cellules** : lignée A549 (ATCC®, réf CCL-185) cultivée dans un milieu DMEM-F12 supplémenté avec 10% de SVF, 1% de L-Glutamine et 1% d'antibiotique (Penicilline + Streptomycine).
2. **Insert** : Cupule équipée d'une membrane permettant l'exposition de cellules à l'interface air-liquide.
3. **Spores** : la veille de l'exposition, les spores d'*Aspergillus fumigatus* de la souche CBS 144.89/DsRed (offerte par J.P. Latgé de l'Institut Pasteur, Paris) ont été obtenues par rinçage d'une culture sur milieu Sabouraud-Chloramphénicol. Après filtration, la concentration en spores de la suspension a été mesurée par comptage sur cellule de Malassez et ajustée à la concentration voulue.
4. **Compresseur** (Jun Air®) : réglé sur une pression de 2 bars, générant de l'air purifié sous pression pour la nébulisation.
5. **Nébuliseur** (Collison, BGI®) : dans cet appareil, l'air sous pression est injecté dans la suspension de spores, produisant ainsi un aérosol chargé en spores.
6. **Tube d'alimentation** : l'aérosol chargé en spores est dirigé vers les trois inserts utilisés lors de chaque expérimentation grâce à ce tube qui possède trois conduits reliés aux trompettes d'admission du module d'exposition.
7. **Module d'exposition** (Vitrocell®) : les spores sont aspirées dans le module grâce à une pompe à vide puis dirigées sur le tapis cellulaire par les trompettes d'admission présentées dans la Figure 6.
8. **Pompe à vide** : une pompe à vide est réglée sur un débit de 5mL/min pour aspirer l'air chargé en spores à l'intérieur du module d'exposition.
9. **Enceinte hermétique** : les spores aérosolisées et non utilisées sont récupérées dans une enceinte disposant d'un filtre HEPA, puis par aspiration avec un aspirateur à filtre absolu.

### 1.3.3. Etudes préliminaires

#### 1.3.3.1. Maîtrise de la concentration d'exposition

Une première étude préliminaire nous a permis de valider les conditions expérimentales de nébulisation et de connaître les concentrations de spores dans l'aérosol, à différents niveaux du dispositif.

Pour mesurer les concentrations de spores aérosolisées, des filtres de cellulose (Millipore®) ont été disposés sur le trajet du flux d'air chargé en spores à deux points de notre dispositif expérimental : *i*) au niveau de la sortie du tube d'alimentation pour connaître la concentration de spores dans l'air sortant du nébuliseur ; *ii*) au niveau des trompettes d'admission du module Vitrocell® pour évaluer la concentration d'exposition des cellules.

Plusieurs expérimentations réalisées à partir de suspensions de spores à la concentration de  $1 \cdot 10^8$  spores/mL nous ont permis de mesurer une concentration moyenne de  $2,2 \cdot 10^6$  spores/L à la sortie du tube d'alimentation et de  $8,0 \cdot 10^5$  spores/L dans le module d'exposition. Notre protocole expérimental exposant les cellules pendant 30 minutes à un débit d'air de 5mL/min, chaque insert est exposé à  $1,2 \cdot 10^5$  spores.

Nous avons pu vérifier que l'aérosol généré par notre nébuliseur contenait une majorité de spores non agrégées puisque l'utilisation d'un compteur de particule a permis d'établir que moins de 5% des particules présentes dans l'aérosol avaient un diamètre supérieur à  $5\mu\text{m}$ .

#### 1.3.3.2. Evaluation des effets cellulaires de l'exposition à *Aspergillus fumigatus*

##### a. Protocole expérimental

Nous avons évalué les effets cellulaires d'une exposition de 30 minutes à un aérosol de spores généré à partir d'une suspension de spores à la concentration de  $1 \cdot 10^8$  spores/mL (Figure 7). Un temps d'incubation ( $37^\circ\text{C}$ ) de 10 ou de 14h a été choisi sur les données de la littérature (Bellanger et coll., 009a; Balloy et coll., 2008) de façon à permettre les premières étapes de développement des spores, mais sans risquer un envahissement des cultures par les filaments fongiques. A la suite de cette incubation, les mesures suivantes ont été pratiquées :

- évaluation de la viabilité cellulaire par mesure de la LDH dans le milieu de culture
- dosage de la production de cytokines IL-6, IL-8 et MCP-1 par dosage ELISA dans le milieu de culture
- quantification de l'expression des ARNm codant pour les cytokines IL-6, IL-8 et MCP-1, par RT-qPCR (Fasseu et coll., 2010).

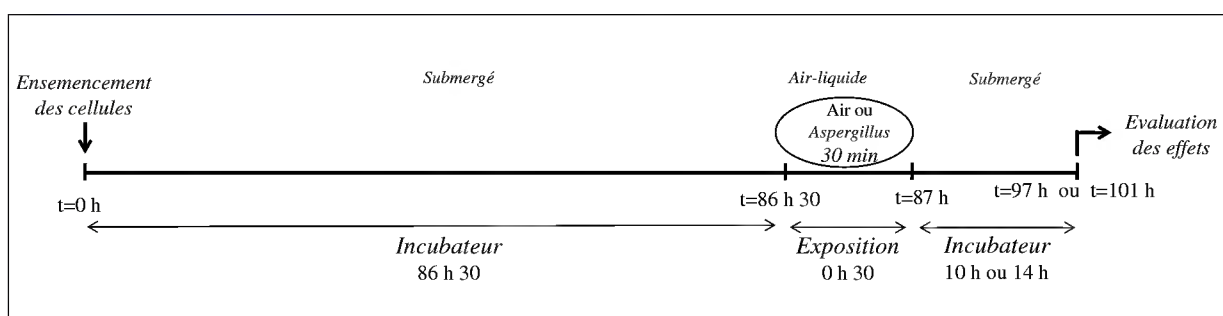


Figure 7 – Protocole expérimental de l'étude d'exposition des cellules A549 à un aérosol de spores d'*A. fumigatus*, comportant les phases suivantes :

- ensemencement des cultures en immersion
- préparation puis purification des spores d'*A. fumigatus*
- exposition pendant 30 minutes en interface air-liquide
- incubation à  $37^\circ\text{C}$  pendant 10 ou 14h
- mesure de la LDH et des cytokines dans le surnageant ; extraction des ARNm et RT-qPCR pour le dosage quantitatif des ARNm des cytokines



Le choix des cytokines IL-6, IL-8 et MCP-1 a été guidé par les données de la littérature (Balloy et Chignard, 2009). En effet ces cytokines sont produites par les cellules épithéliales et impliquées dans les mécanismes de défense immunitaire lors d'une infection aspergillaire : l'IL-8 est une cytokine avec un pouvoir d'attraction sur les polynucléaires neutrophiles (Bellanger et coll., 009a) ; l'IL-6 est une cytokine pro-inflammatoire impliquée dans la sécrétion de mucus (Zhang et coll., 2005) ; MCP-1 est une chimiokine qui a pour rôle d'attirer les macrophages (Schelenz et coll., 1999).

En parallèle des cellules exposées aux spores d'*A. fumigatus*, différentes cultures "témoin" ont été réalisées :

- des cellules exposées 30 minutes à de l'air pur dans le module d'exposition (notées Air).
- des cellules exposées à du TNF- $\alpha$  (2ng/mL) pendant le temps de post-exposition (notées TNF).
- des cellules non exposées (notées Incub).

## b. Résultats

L'exposition des cultures cellulaires pendant 30 minutes n'a pas entraîné d'altération cellulaire majeure sur les cellules A 549 dans la mesure où les dosages de LDH n'étaient pas significativement différents entre les cultures exposées à l'air et les cultures restées en immersion comme l'indique la Figure 8.

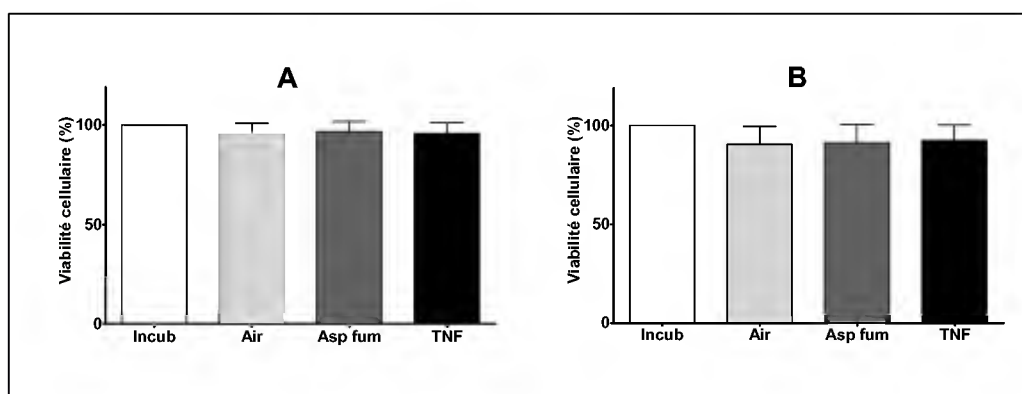


Figure 8 – Viabilité cellulaire de cellules A549 non exposées (Incub), exposées à de l'air (Air), exposées à des spores d'*Aspergillus fumigatus* (Asp) ou exposées à du TNF- $\alpha$  (TNF) évaluée par dosage de LDH dans le surnageant cellulaire 10h (A) ou 14h (B) après l'exposition.

Les mesures de production de cytokines IL-8 et MCP-1 et de leurs ARNm à la suite d'une exposition à l'air ou aux spores d'*Aspergillus fumigatus* suivie d'une incubation de 10 ou 14 heures sont présentés sur la Figure 9. Les résultats montrent que l'exposition aux spores d'*Aspergillus* n'entraînent pas de modification significative de la sécrétion de cytokines IL-8 et MCP-1, comparativement aux cellules exposées à de l'air. Les concentrations en IL-6 étant en dessous du seuil de détection, nous n'avons pas pu obtenir des données exploitables.

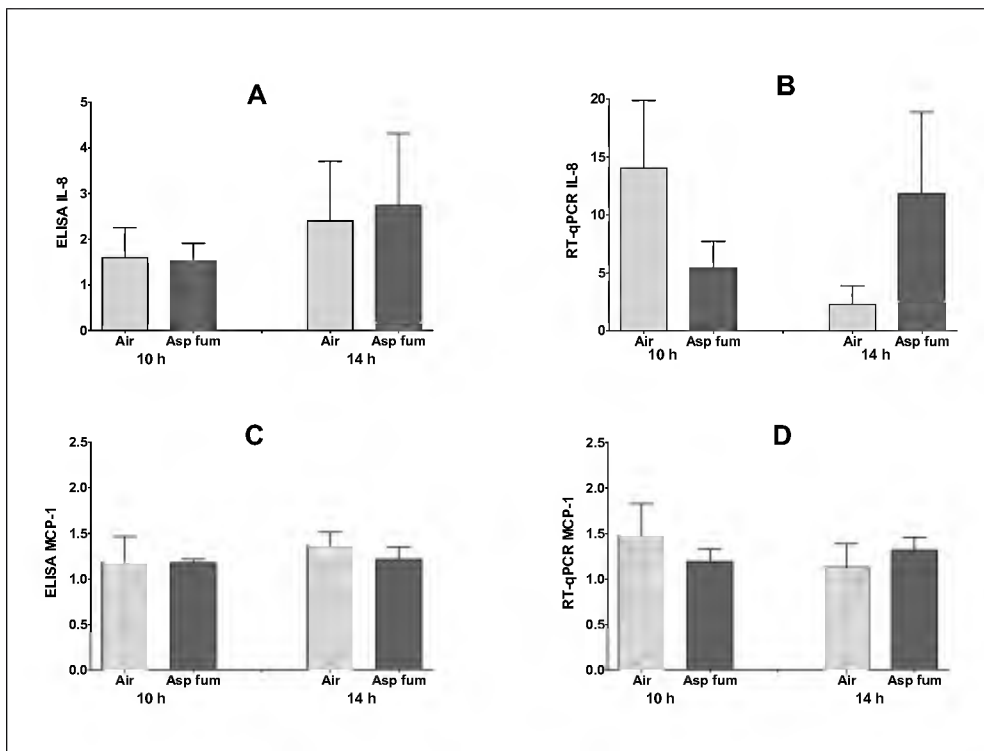


Figure 9 – Production de cytokines IL-8 et MCP-1 (A, C) et de leurs ARNm (B, D) à la suite d’une exposition à l’air ou à un aérosol de spores d’*A. fumigatus*.

Les mesures sont effectuées dans le surnageant par ELISA (cytokines) et dans les cellules par RT-qPCR (ARNm) après une incubation de 10 ou 14 heures. Chaque barre de l’histogramme représente la moyenne + sem pour 4 expérimentations.

## 1.4. Co-expositions spores d’*Aspergillus fumigatus* et formaldéhyde gazeux

En raison de l’absence d’effet constaté lors de l’exposition par *A. fumigatus*, nous avons souhaité explorer les conséquences d’une exposition séquentielle aux spores d’*Aspergillus* et à un polluant très répandu de l’environnement, le formaldéhyde, en émettant l’hypothèse d’une interaction délétère de la co-exposition par rapport à l’exposition simple.

La justification détaillée de cette étude ainsi que les conditions techniques de sa réalisation sont précisées dans l’article joint en fin de ce chapitre.

Nous nous limiterons à présenter le schéma expérimental et un extrait des résultats obtenus.

### 1.4.1. Protocole expérimental

Dans cette étude, une exposition séquentielle à du formaldéhyde gazeux puis à des spores d’*A. fumigatus* a été réalisée (Figure 10). Dans un premier temps, une première exposition de 30 minutes à l’interface air-liquide à du formaldéhyde gazeux d’une concentration de 50µg/m<sup>3</sup> a été effectuée. Les cellules ont ensuite été replacées à l’incubateur pendant 24h. Dans un deuxième temps, les mêmes cellules ont été exposées à un aérosol de spores d’*A. fumigatus* pendant 30 minutes puis incubées 10h avant de procéder aux mesures suivantes :

- évaluation de la viabilité cellulaire par mesure de la LDH dans le milieu de culture
- dosage de la production de cytokines IL-6, IL-8 et MCP-1 par dosage ELISA dans le milieu de culture
- quantification de l’expression des ARNm codant pour les cytokines IL-6, IL-8 et MCP-1, par RT-qPCR (Fasseu et coll., 2010)

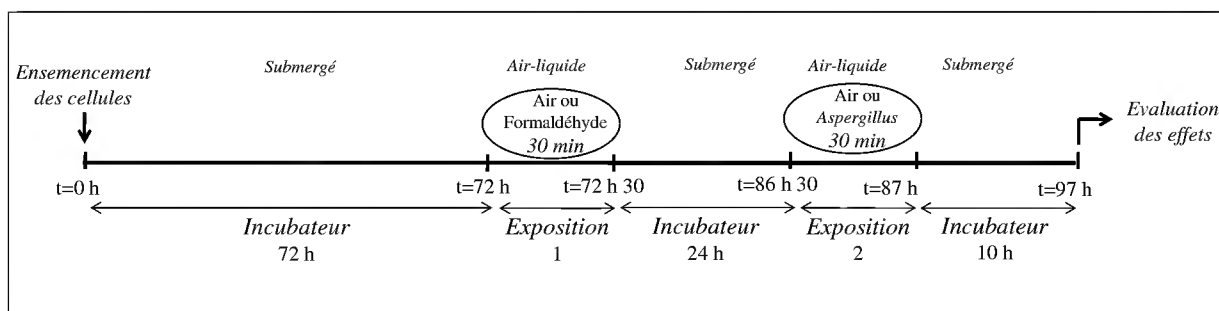


Figure 10 – Protocole expérimental de l'étude de co-exposition des cellules A549 à un aérosol de spores d'*A. fumigatus* et/ou à du formaldéhyde, comportant les phases suivantes :

- ensemencement des cultures en immersion
- génération de formaldéhyde gazeux
- exposition pendant 30 minutes en interface air-liquide
- incubation (24h)
- préparation puis purification des spores d'*Aspergillus fumigatus*
- exposition pendant 30 minutes en interface air-liquide
- incubation (10h)
- mesure de la LDH et des cytokines dans le surnageant ; extraction des ARNm et RT-qPCR pour le dosage quantitatif des ARNm des cytokines

Ce protocole faisant intervenir deux expositions séparées, trois groupes de cellules exposées ont été utilisées :

- des cellules exposées au formaldéhyde puis à de l'air (notées FA-Air)
- des cellules exposées à de l'air puis à des spores d'*A. fumigatus* (notées Air-Asp)
- des cellules exposées au formaldéhyde puis à des spores d'*A. fumigatus* (notées FA-Asp)

En parallèle des cellules exposées au formaldéhyde et/ou aux spores d'*A. fumigatus*, différentes cultures "témoin" ont été réalisées :

- des cellules exposées 2 x 30 minutes à de l'air pur dans le module d'exposition (notées Air-Air)
- des cellules exposées à du TNF- $\alpha$  liquide à 2ng/mL pendant le temps de post-exposition (notées TNF)
- des cellules non exposées (notées Incub)

#### 1.4.2. Principaux résultats

Les résultats de la co-exposition de cellules épithéliales A549 à deux contaminants de l'environnement (spores d'*A. fumigatus* et formaldéhyde) utilisés seuls ou en combinaison sont présentés dans la Figure 11. L'étude de la viabilité cellulaire n'a pas mis en évidence de dégradation du tapis cellulaire suite aux co-expositions formaldéhyde puis spores d'*A. fumigatus*. Par ailleurs, on peut constater que, dans nos conditions expérimentales, les productions et expression des cytokines IL-8 et MCP-1 par les cellules de la lignée A549 ne sont pas modifiées après une exposition à l'un, l'autre ou les deux agents. Le dosage de la cytokine IL-6 n'a pas permis d'être exploité du fait des faibles concentrations retrouvées.

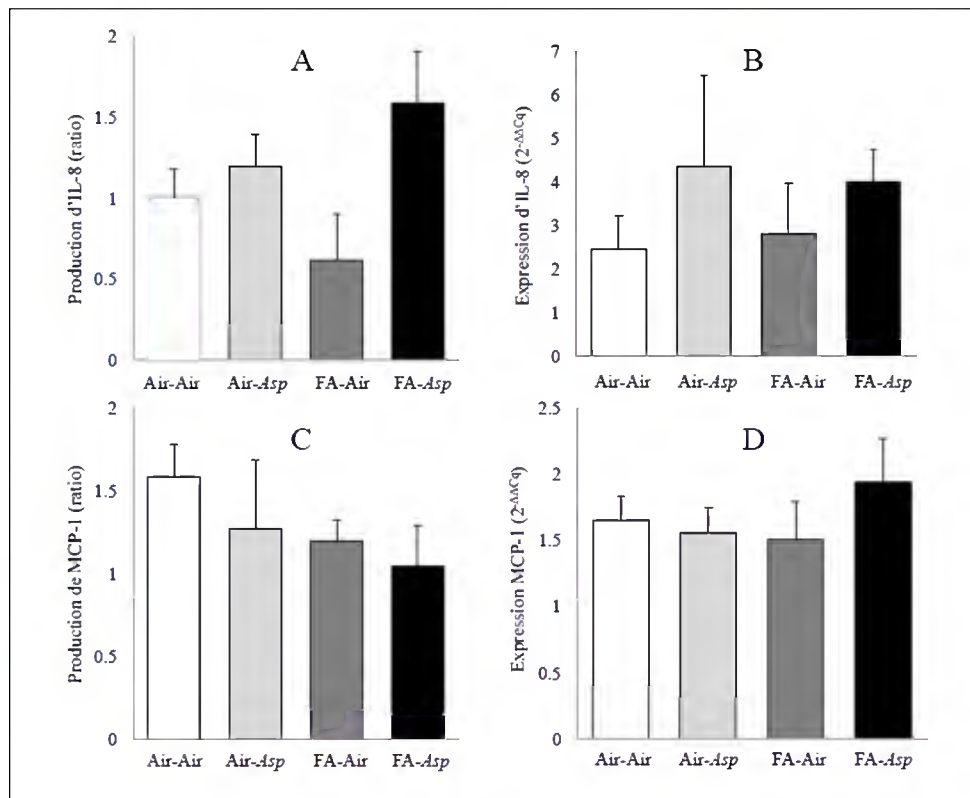


Figure 11 – Production de cytokines IL-8 et MCP-1 (A, C) et de leurs ARNm (B, D) à la suite d’une exposition au formaldéhyde et/ou à un aérosol de spores d’*A. fumigatus*. Les mesures sont effectuées dans le surnageant par ELISA (cytokines) et dans les cellules par RT-qPCR (ARNm) après 2 expositions à l’air (Air-Air), après une exposition au formaldéhyde puis à de l’air (FA-Air), après une exposition à de l’air puis à un aérosol de spores d’*A. fumigatus* (Air-Asp) ou après une exposition au formaldéhyde puis à un aérosol de spores d’*A. fumigatus* (FA-Asp). Chaque barre de l’histogramme représente la moyenne + sem pour 4 expérimentations.

## 1.5. Conclusion

Nos travaux ont conduit à la mise au point d’un système d’exposition cellulaire original à des aérosols de spores fongiques. Ce dispositif a été développé en utilisant des cellules de la lignée A549, connues pour être résistantes et d’utilisation aisée, mais aussi moins sensibles aux stimuli de leur environnement. Après exposition à des concentrations élevées de spores dans les inserts, nous n’avons pas observé de réponse cytokinique notable, comparativement aux cellules exposées à de l’air seul. Des concentrations plus élevées de spores n’ont pas été testées, considérant que les résultats qui seraient obtenus avec plus de  $8,0 \cdot 10^5$  spores/L dans le module d’exposition (correspondant à une aéroportation  $>10^8$  spores/m<sup>3</sup>) n’auraient plus grande signification physiopathologique.

En conséquence, l’étude de la relation exposition/effet que nous avons initialement envisagée n’a pas pu être réalisée.

Comparativement aux données de la littérature, ces résultats négatifs peuvent apparaître surprenants, dans la mesure où plusieurs équipes ont montré que l’exposition de cellules épithéliales à des spores d’*A. fumigatus* entraînait une augmentation de la production d’IL-8 (Bellanger et coll., 009a; Balloy et coll., 2008), d’IL-6 (Oosthuizen et coll., 2011) et de MCP-1 (Schelenz et coll., 1999).

Cette absence de réponse pourrait être liée à la particularité du mode d’exposition, dont nous nous sommes pourtant assurés qu’il conduisait à un contact spores/cellules et n’induisait pas de dommage cellulaire.

A la suite de ces résultats, nous nous sommes rapprochés de deux équipes de recherche maîtrisant la culture de

cellules bronchiques primaires de façon à envisager la répétition de ces travaux dans des systèmes cellulaires plus représentatif. L'équipe du Pr S. Bretagne (UMR BIPAR 956 ; CHU Henri Mondor) nous a formé à la culture de cellules issues de trachées de porc et le laboratoire de Physiopathologie et d'épidémiologie de l'insuffisance respiratoire (UMR-S 700, Mme. Pretolani, faculté Xavier Bichat à Paris), nous a montré la technique de mise en culture et de différenciation de cellules bronchiques humaines.

Cependant, ces nouvelles perspectives de développement ont été interrompues après quelques essais, en raison de la complexité technique des cultures primaires et de la nécessité d'une mise au point délicate et longue, incompatible avec le calendrier de travail programmé pour la thèse.

## **1.6. Article**



## Sequential air–liquid exposure of human respiratory cells to chemical and biological pollutants

Charles Persoz<sup>a,1</sup>, Christopher Leleu<sup>b,1</sup>, Sophie Achard<sup>a,\*</sup>, Magali Fasseu<sup>c</sup>, Jean Menotti<sup>b,d</sup>, Pascale Meneceur<sup>b</sup>, Isabelle Momas<sup>a</sup>, Francis Derouin<sup>b,d</sup>, Nathalie Seta<sup>a,e</sup>

<sup>a</sup> Université Paris Descartes, Laboratoire de Santé Publique et Environnement – EA 4064, Paris, France

<sup>b</sup> Université Paris Diderot, Sorbonne Paris Cité, EA 3520, Paris, France

<sup>c</sup> Centre de recherche Bichat-Beaujon, U773, Inserm, Paris, France

<sup>d</sup> AP-HP, Hôpital Saint-Louis, Parasitologie-Mycologie, Paris, France

<sup>e</sup> AP-HP, Hôpital Bichat, Biochimie, Paris, France

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 27 June 2011

Received in revised form 27 July 2011

Accepted 28 July 2011

Available online 5 August 2011

#### Keywords:

*In vitro*

Formaldehyde

*Aspergillus fumigatus*

Air–liquid interface

Sequential exposure

Inflammation

### ABSTRACT

Although indoor air has wide ranging effects on human health, the effects of environmental, chemical, and biological pollutants on the respiratory system are not fully understood. In order to clarify the health effects of airborne pollutant exposure, it would appear that toxicological evidence is needed to complement epidemiological observations to support by providing biological plausibility. The aim of this study is to manage air–liquid successive exposures to different pollutants such as a chemical pollutant (formaldehyde – FA), and a biological contaminant (*Aspergillus fumigatus* – *Asp*) using our *in vitro* model.

Human alveolar cells (A549) were exposed at the air–liquid interface in an exposure module, firstly to an environmental level of FA (50 µg/m<sup>3</sup>) (or air) for 30 min, and 14 h later to *Asp* (7 × 10<sup>8</sup> spores/m<sup>3</sup>) (or air) for 30 min. After 10 h post-incubation, cellular viability was assessed. Inflammation biomarkers (IL-8, MCP-1) were assayed by ELISA and by RT-PCR.

Whatever the conditions, no cytotoxic effect was observed. FA followed by air exposure did not induce modification of production and expression of cytokines, confirming results with a unique FA exposure. Air followed by *Asp* exposure tended to induce IL-8 expression whereas IL-8 production tended to increase after FA and *Asp* exposure compared to FA and air exposure. The reaction of cells to sequential exposure to FA and *Asp* was moderate. These results show the feasibility of our model for sequential exposures to different types of environmental pollutants, allowing using it for preliminary assessment of cellular activity modification induced by airborne contaminants.

© 2011 Elsevier Ireland Ltd. All rights reserved.

### 1. Introduction

Indoor air has important and wide ranging effects on human health and work efficiency, due to the fact that humans are permanently inhaling a complex mixture containing numerous pollutants of different types (Bernstein et al., 2004, 2008; Delfino, 2002).

The effects of environmental chemical and biological compounds and their association with human respiratory health, especially asthma, are still unclear (Dales et al., 2008; Delfino, 2002). For example, several studies have reported a relation between formaldehyde (FA) exposure at environmental level and asthma, asthma symptoms or airway inflammation (Rumchev et al., 2002; Wolkoff and Nielsen, 2010). This association is not clearly established, however, with discrepancy in the conclusions (Ezratty et al., 2007; Wolkoff and Nielsen, 2010). Similarly, as for FA (Dassonville et al., 2009), fungi as *Aspergillus* or *Penicillium* are frequently found in indoor environment (Dassonville et al., 2008) and numerous studies have reported an association between mold exposure in the home and asthma symptoms (Eduard, 2009) but some disagree on the consequences of exposure to fungal spores. For instance, one current child case–control study has reported asthma cases having significantly higher exposures to viable *Aspergillus* fungi (Jones et al., 2011), whereas Ege et al. (2011) reported recently that children living in a farm and exposed

\* Corresponding author at: Laboratoire de Santé Publique et Environnement – EA4064, Faculté de Pharmacie Université Paris Descartes, 4, avenue de l'Observatoire, 75006 Paris, France. Tel.: +33 1 53 73 97 28; fax: +33 1 43 25 38 76.

E-mail addresses: [charles.persoz@parisdescartes.fr](mailto:charles.persoz@parisdescartes.fr) (C. Persoz), [christopher.leleu@etu.upmc.fr](mailto:christopher.leleu@etu.upmc.fr) (C. Leleu), [sophie.achard@parisdescartes.fr](mailto:sophie.achard@parisdescartes.fr) (S. Achard), [magali.fasseu@inserm.fr](mailto:magali.fasseu@inserm.fr) (M. Fasseu), [jean.menotti@sls.aphp.fr](mailto:jean.menotti@sls.aphp.fr) (J. Menotti), [pascale.meneceur@univ-paris-diderot.fr](mailto:pascale.meneceur@univ-paris-diderot.fr) (P. Meneceur), [isabelle.momas@parisdescartes.fr](mailto:isabelle.momas@parisdescartes.fr) (I. Momas), [francis.derouin@sls.aphp.fr](mailto:francis.derouin@sls.aphp.fr) (F. Derouin), [nathalie.seta@parisdescartes.fr](mailto:nathalie.seta@parisdescartes.fr) (N. Seta).

<sup>1</sup> Both authors contributed equally to this work.

to a wider range of fungi than the reference group, were partly protected against asthma. This demonstrates the complexity of interaction between these pollutant exposures and induced respiratory health effects, and it would appear epidemiological studies need to be complemented by toxicological studies in order to fully understand the health effects of airborne pollutant exposure (Bernstein et al., 2004; Delfino, 2002).

Beside experimental toxicological studies traditionally based on complete animal tests, *in vitro* methods using cell culture technologies are currently being developed and implemented in modern toxicology (Bakand and Hayes, 2010). Indeed the 3Rs principles that promote alternatives to animal experimentation are now always encouraged, due notably to ethical reasons and cost (Balls, 2009).

Classical *in vitro* exposure methods of airborne contaminants, also called indirect or submerged exposure methods, consist of cell cultures exposed to test pollutants dissolved or suspended in culture medium, like particles collected by impaction or filtration methods, or gas dissolved by bubbling through buffered saline solution (Bakand and Hayes, 2010; BéruBé et al., 2009). These models however do not really reflect human exposure, and are not therefore suitable for gaseous pollutant testing.

Methods which better mimic the inhalation process and contact between epithelial cells and air are considered to be more relevant than the *in vitro* exposure methods above. Two main direct exposure approaches are available: the first is intermittent exposure (cells are exposed to gaseous compounds and culture medium at regular intervals using rocker platforms or rolling bottles), and the second is continuous exposure. In this latter case, cells cultured on an insert made of microporous membranes are continuously exposed to airborne pollutants on their apical side for a period of time, whilst their basolateral side is in contact with the culture media (Bakand and Hayes, 2010; BéruBé et al., 2009). Although certain tools have recently been developed to perform air–liquid exposure to environmental pollutants, most have been used for single period exposure to an unique pollutant at levels far above the environmental norm (Anderson et al., 2010; Bakand et al., 2006; Gminski et al., 2010; Koehler et al., 2010; Switala et al., 2010; Volckens et al., 2009). Indeed we ourselves previously developed such an *in vitro* model for formaldehyde single period exposure of lung epithelial cells (Persoz et al., 2010). However, in these experimental conditions, the pollutants studied were always chemical rather than microbiological. If we are to mimic real atmospheric exposure then cells must be exposed for longer, or more frequently, and to a variety of pollutants.

In this context, the aim of this study is to manage air–liquid successive exposures to different pollutants such as a chemical pollutant (formaldehyde – FA), and a biological contaminant (*Aspergillus fumigatus* – Asp) using our *in vitro* model. These, both known to be frequently simultaneously detected in domestic environments (Dassonville et al., 2008, 2009), were assessed on an epithelial respiratory cell line.

## 2. Methods

### 2.1. Chemicals and reagents

DMEM:F12 (50:50), fetal calf serum (FCS), glutamine, HEPES, penicillin–streptomycin and trypsin were purchased from Gibco via Invitrogen (WI, USA). Formaldehyde, TNF $\alpha$ , Tween 80 and saponin were obtained from Sigma–Aldrich (MO, USA). The LDH assay kit (K2054) was from Siemens and used with an automaton Dimension Vista 1500 (Siemens Healthcare Laboratories). The DuoSet kits for ELISA assays (DY208 and DY271) were produced by R&D Systems (MN, USA). Inserts and flasks for cell culture were provided from Greiner Bio-One (Germany).

### 2.2. Atmosphere generation and cell exposure device

The Vitrocell<sup>®</sup> device used for exposure experiments has been previously described by Persoz et al. (2010). Briefly, this device consists of three exposure

chambers which can hold three separate inserts. The module is equipped with a heated water jacket to keep cells and culture medium at a steady temperature of 37 °C. For both FA and Asp experiments, the test atmosphere was delivered on the cellular apical side at a flow rate of  $5 \pm 0.1$  mL/min.

FA atmosphere was generated as previously described (Persoz et al., 2010). The chosen dose for these experiments ( $50 \mu\text{g}/\text{m}^3$ ) has been formerly determined as the highest without any cytotoxicity (Persoz et al., 2010).

For experiment with *Aspergillus* spores (Asp), Asp atmosphere ( $7 \times 10^8$  spores/ $\text{m}^3$ ) was generated as follows. A genetically modified strain of *A. fumigatus* expressing a red fluorescent protein, DsRed (CBS 144.89/DsRed) (Vallon-Eberhard et al., 2008) was used, kindly provided by J.P. Latgé, Institut Pasteur, Paris, France. This strain was grown on Sabouraud–Chloramphenicol agar Petri dishes at 37 °C for 7 days. Then conidia were harvested by rinsing the culture with sterilized water containing 0.002% Tween 80. The collected suspension was centrifuged at  $3000 \times g$  for 15 min, then the pellet was resuspended in water containing 0.002% Tween 80 and filtered through a sterile sieve to eliminate remaining agar debris. The purified spore suspension was counted using a Malassez hemacytometer and adjusted to a final concentration of  $10^8$  conidia/mL. The viability of collected conidia was checked by subculture of serial dilutions of each conidial preparation.

The conidia suspension obtained was aerosolized using a Collison Nebulizer (BGI, USA) provided by compressed air at 2-bars pressure. In preliminary experiments, using a particle counter we checked that such conditions allowed generating an aerosol containing >70% of particles ranging between 1 and  $5 \mu\text{m}$ , i.e. comprising the 2.5–3  $\mu\text{m}$  size of *Aspergillus* spores. Less than 5% of particles >5  $\mu\text{m}$  were detected suggesting that few spores clustered during nebulization. The generated aerosol was connected to the Vitrocell<sup>®</sup> exposure device, resulting in exposure of the cellular apical side of cell culture.

In order to check the conidial concentration at the cell culture level, a sample of air was collected in the Vitrocell<sup>®</sup> inlet using a vacuum pump at a flow rate of 10 L/min during 1 min then passed through a 0.8 micron size filter (AAWP, Millipore). The filter was then incubated into 1 mL of saponin 2% during 15 min and vortexed to elute the collected conidia. These were enumerated in a Malassez hemacytometer. Three repeated measurements were performed for each exposure experiment.

### 2.3. Cell line, culture conditions and cell exposures

Human alveolar epithelial cells, A549 (CCL-185 purchased from ATCC, VA, USA) were cultured as previously described (Persoz et al., 2010). Cells (at the density of 20,000 cells per insert) were grown on inserts ( $1.13 \text{ cm}^2$ ). Passages of cells were between 3 and 15 for all experiments. Culture medium (DMEM:F12 supplemented with 10% FCS) was added on both sides; 300  $\mu\text{L}$  on the apical side, and 1000  $\mu\text{L}$  on the basolateral one, and incubated 72 h before experimentation at 37 °C and 5%  $\text{CO}_2$ . Just before exposure, culture medium was removed and replaced with DMEM:F12 medium supplemented with 1% FCS. Cells were then exposed at the air–liquid interface for 30 min to either air or pollutants. Fig. 1 summarizes the experimental protocols. Protocol A includes unique exposure to air or FA followed by 14 h post-incubation. Protocol B consisted of two sequential exposures of 30 min each (exposures 1 and 2): the first to air or FA and the second to air or Asp. In this case, a 10 h post-incubation followed the second exposure. Four experimental conditions were thus obtained as shown in Fig. 1 (protocol B).

Prior to each exposure the culture medium at the apical side was removed to allow a direct contact between the cells and the tested pollutants. After each exposure, 300  $\mu\text{L}$  of culture medium with 10% FCS were added at the apical side and cells were post-incubated for 14 h (exposure 1) and 10 h (exposure 2) at 37 °C, 5%  $\text{CO}_2$ . At the end of each post-incubation, culture medium was removed and stored at  $-20$  °C for cytokine assay and at 4 °C for LDH assay. The cell monolayer was used for RT-qPCR at the end of the experiment.

Control cells introduced at each experiment corresponded to cells cultured in submerged conditions without any exposure. Each experiment was realized four times in triplicates with an interval between two tests of one week.

### 2.4. Biological activity assessment

#### 2.4.1. Cell viability: LDH assay

Membrane integrity was determined by measuring the release of intracellular lactate dehydrogenase (LDH) into the supernatant medium. LDH was measured using an *in vitro* assay kit in which LDH oxidizes the substrate L-lactate buffered at a pH of 9.4 in the presence of  $\text{NAD}^+$  to yield pyruvate and  $\text{NADH}$ ,  $\text{H}^+$  which absorbs light at 340 nm. Concentrations were initially expressed as unity of consumed substrate per liter (U/L) and cellular viability, expressed as a %, was calculated with sample concentration and maximal LDH activity (positive control obtained by cell lysis after 2 h Triton X-100 1% treatment), each normalized on control cells concentration (Fischer et al., 2003). Control cell LDH concentration was  $25 \pm 4$  U/L ( $n=4$ ) and maximal activity was  $1652 \pm 237$  U/L ( $n=4$ ).

#### 2.4.2. Cytokine production: ELISA assay

Local cellular inflammation was assessed by quantification of Interleukin-8 (IL-8) and Monocyte Chemoattractant Protein 1 (MCP-1) concentrations in the apical culture supernatants of A549 cells using ELISA assay kits following the

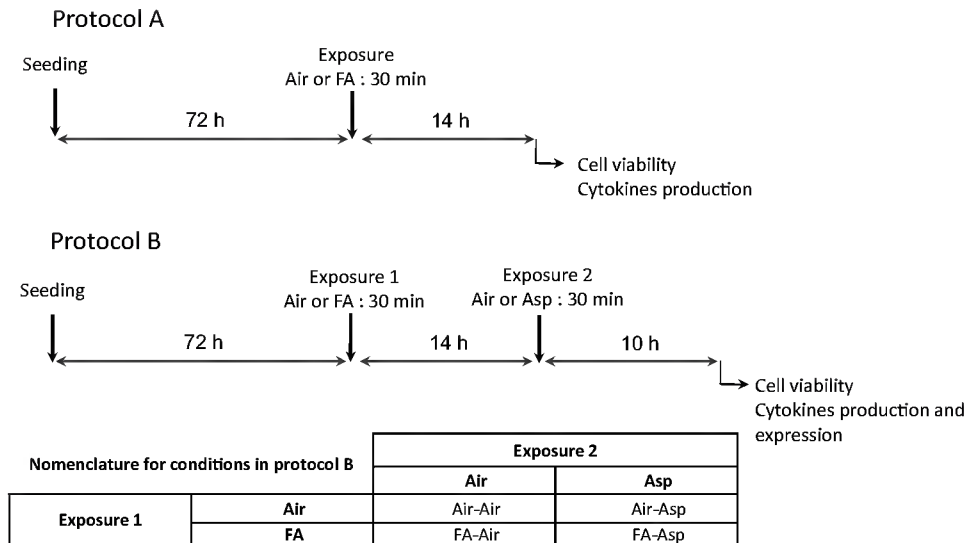


Fig. 1. Exposure protocol.

manufacturer's instructions as stated previously. Results were expressed as a ratio of cytokine production ( $\pm$  standard error) compared to the one of the control cells.

#### 2.4.3. Cytokine expression: RT-qPCR

mRNA extraction and purification were performed with Qiagen RNeasy<sup>®</sup> plus mini kit (Qiagen, Germany) according to the manufacturer's protocol for cultured cells. Samples were examined for concentration with the NanoDrop<sup>®</sup> ND-1000 Spectrophotometer (NanoDrop Technologies, USA) and for integrity with the RNA 6000 Nano LabChip<sup>®</sup> kit and Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies, USA). All the RNA Integrity Numbers of the samples were  $>7$ . RNA was then stored at  $-80^{\circ}\text{C}$  before further processing.

cDNA synthesis was performed using the cDNA verso<sup>®</sup> kit from Thermo Scientific according to the manufacturer's specifications. Reverse transcription products were amplified using a Thermal Cycler 2720 (Applied Biosystems). Primers for cytokines (*IL-8*: Hs00174103.m1, *MCP-1*: Hs00234140.m1) and reference genes (*GAPDH*: Hs99999905.m1, *B2M*: Hs00984230.m1, *HPRT1*: Hs01003267.m1) were obtained from Applied Biosystems. The real-time PCR run on the LightCycler<sup>®</sup> 480 Real-Time PCR System (Roche Applied Sciences, Basel, Switzerland). Each gene was tested in duplicate within the same PCR run on an additional 96-well plate. After being diluted by ten, cDNA (5  $\mu\text{L}$ ) from each reaction for all genes was added to a PCR reaction mix containing 1X TaqMan<sup>®</sup> Universal Master Mix II without Uracil-N-Glycosylase and 1  $\mu\text{L}$  Endogenous Control assay or Gene expression Assay in a 20  $\mu\text{L}$  reaction volume. Standard cycling conditions were used [ $95^{\circ}\text{C}$  for 10 min, ( $95^{\circ}\text{C}$  for 15 s,  $60^{\circ}\text{C}$  for 60 s)  $\times 40$  cycles].

The expression levels obtained were normalized against the reference gene, and changes in expression levels were given relative to the untreated controls. Data quantification normalization of expression of marker genes was achieved by normalization against a subset of three reference genes on the array that did not show significant changes in expression under our experimental conditions (*B2M* ( $\beta 2$ -microglobulin), *HPRT* (hypoxanthine phosphoribosyltransferase) and *GAPDH* (glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase)).

Stability of the 3 reference genes was assessed with the geNorm applet (<http://medgen.ugent.be/~jvdesomp/genorm/>). The Cq values were transformed to quantities using gene specific efficiencies, according to the geNorm manual. Gene expression stability (*M*) was calculated and the genes were ranked from best to worst, based on the *M* value. The gene with the highest *M*, i.e. the least stable gene, was then excluded in a stepwise fashion until the most stable genes were determined.

Cq, the quantification cycle number at which the amount of amplified target reaches a fixed threshold (Bustin et al., 2009), was determined (default threshold settings were used in all instances). The cycle number above which the Cq was considered as a false positive (cycle cutoff point) was set up at  $35 - 2^{-\Delta\Delta\text{Cq}}$  as calculated as described by Fasseu et al. (2010).

Results were expressed as arithmetic mean of  $2^{-\Delta\Delta\text{Cq}} \pm$  standard error of at least three independent experiments after normalization on the most stable gene in our experiments, *HPRT*.

#### 2.5. Statistical analysis

Statistical analyses were performed using R software version 2.12.2 ([www.r-project.org](http://www.r-project.org)). The difference between two conditions was considered using Student's *t*-test for cellular viability, cytokines production and cytokines expression. Results

were confirmed using nonparametric Mann-Whitney *U* test. Difference was significant when  $p < 0.05$ .

### 3. Results

#### 3.1. Design settings

To apply our *in vitro* model to sequential exposure to a chemical pollutant and molds, two limiting factors concerning post-exposure incubation time had to be taken into account: limiting the cell line growth to 24 h, and avoiding the germination of conidia.

In a preliminary work, conidia germination was monitored at different times after *Asp* exposure, and showed that an incubation time of 10 h resulted in germination and limited hyphal growth whereas a longer incubation time resulted in a deleterious fungal invasion of the culture (Supplementary data, Appendix A). We therefore considered 10 h as the maximal incubation time after *Asp* spore exposure and scheduled this exposure after FA exposure.

For the repeated exposure protocol, given cell confluence was reached after 24 h and maximum 10 h post-incubation after *Asp* exposure, post-incubation after chemical pollutant exposure, being the first exposure, had to be 14 h. We compared the results after the first exposure with our previous results, where experimental conditions were designed with 24 h of post-incubation after air-liquid exposure (Persoz et al., 2010). After 14 h post-incubation air-exposure induced an increase of  $42.6 \pm 6.9\%$  of IL-8 production compared to the control cells ( $p < 0.01$ ), and MCP-1 production was not modified, similar to exposure followed by 24 h post-incubation (Persoz et al., 2010). In the same way, FA did not significantly modify IL-8 (ratio to control cells =  $1.2 \pm 0.3$  vs.  $1.4 \pm 0.1$  for air) and MCP-1 (ratio =  $0.6 \pm 0.1$  vs.  $0.8 \pm 0.1$  for air) production by A549 cells after 14 h incubation. Although experimental post-incubation time was reduced, the cellular response was similar to that previously reported (Persoz et al., 2010).

#### 3.2. Sequential exposure

##### 3.2.1. Sequential exposure to air (Air-Air)

To validate sequential exposure, we first studied the cellular effects of repeated exposure to the same gas, air. The double exposure to air (Fig. 1, protocol B: Air-Air) did not impact cell viability and only slightly modified the inflammation parameters. Indeed Fig. 2 shows that cell viability (2A) and IL-8 hourly



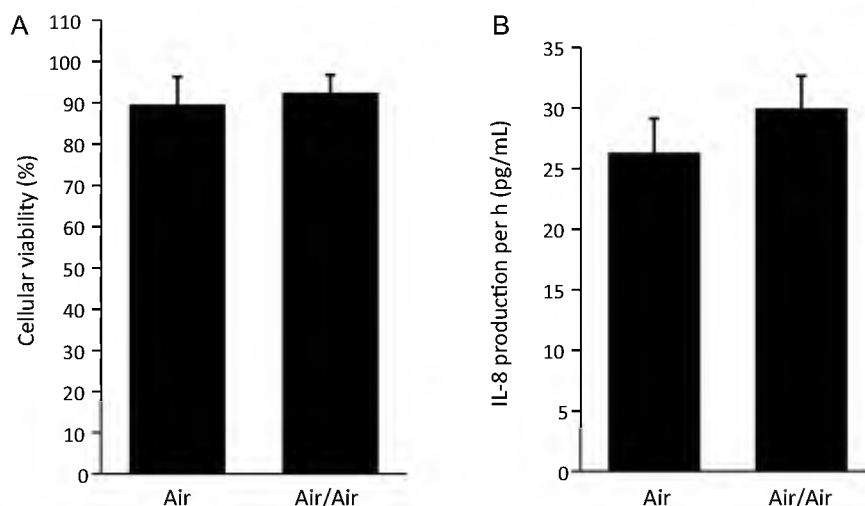


Fig. 2. Cell viability (A) and IL-8 production per hour (B) of A549 cells after a single or repeated exposure to air ( $n=4$ ).

production (2B) of A549 cells after one or two exposures to air were not modified by the number of exposures to air. Similarly IL-8 expression, evaluated by RT-qPCR, was not modified between one or two exposures ( $2^{-\Delta\Delta Cq} = 2.41 \pm 0.92$  vs.  $2.47 \pm 0.76$ , respectively). Considering MCP-1, the production of this cytokine was not modified by sequential air-exposure, but its expression was significantly increased ( $2^{-\Delta\Delta Cq} = 1.05 \pm 0.13$  vs.  $1.65 \pm 0.17$ ,  $p < 0.05$ , respectively after one and two exposures).

These results indicate that cells reacted to one or two air exposures in the same way.

### 3.2.2. Sequential exposure to air and *Aspergillus fumigatus* (Air–Asp, Fig. 3 light grey)

In order to represent a complex environmental exposure, we also exposed cells to a biological contaminant, spores of fungal species, *Asp*. Because of the limiting factors related to the use of such a pollutant and the duration of total incubation, cells were exposed to *Asp* as the second exposure pollutant, after an initial exposure to air. In our experimental conditions, cell viability at the end of experiment was not altered ( $96.2 \pm 3.7\%$  vs.  $92.4 \pm 1.9\%$  for Air–Air). IL-8 production did not change (Fig. 3A) and a slight but not significant trend was observed for IL-8 expression ( $p = 0.21$ ) (Fig. 3B) compared to Air–Air exposure. As regards MCP-1 the production in supernatant was unchanged in comparison to Air–Air exposure (Fig. 3C) and MCP-1 expression was not modified after *Asp*-exposure (Fig. 3D).

### 3.2.3. Sequential exposure to FA and Air (FA–Air, Fig. 3, dark grey)

A549 cells were next exposed, first to FA at  $50 \mu\text{g}/\text{m}^3$  and then to Air. At the end of experiment, no impact on viability was observed when we compared Air–Air and FA–Air ( $92.4 \pm 1.9\%$  and  $96.6 \pm 2.0\%$ , respectively). Results concerning the inflammatory response showed a decrease of production of IL-8 (Fig. 3A) and MCP-1 (Fig. 3C) but both were non-significant ( $p = 0.17$ ;  $p = 0.30$ ). The expression of these two cytokines was not modified (Fig. 3B and 3D).

Taking these results together, that is sequential exposure to air with or without another pollutant (Air–Air, Air–Asp and FA–Air), we confirmed that a second exposure did not induce deleterious or specific effects on A549 cell behavior.

### 3.2.4. Sequential exposure to FA and *Asp*: (FA–Asp, Fig. 3, black)

Finally, we tested the combination of exposures to FA and *Asp*, in order to study the synergic effects of a microbiological contaminant

on the inflammatory response caused by FA. This sequential exposure to FA and *Asp* (FA–Asp) did not alter cell viability ( $96.5 \pm 3.2\%$ ) when compared to FA–Air exposure ( $96.6 \pm 2.0\%$ ).

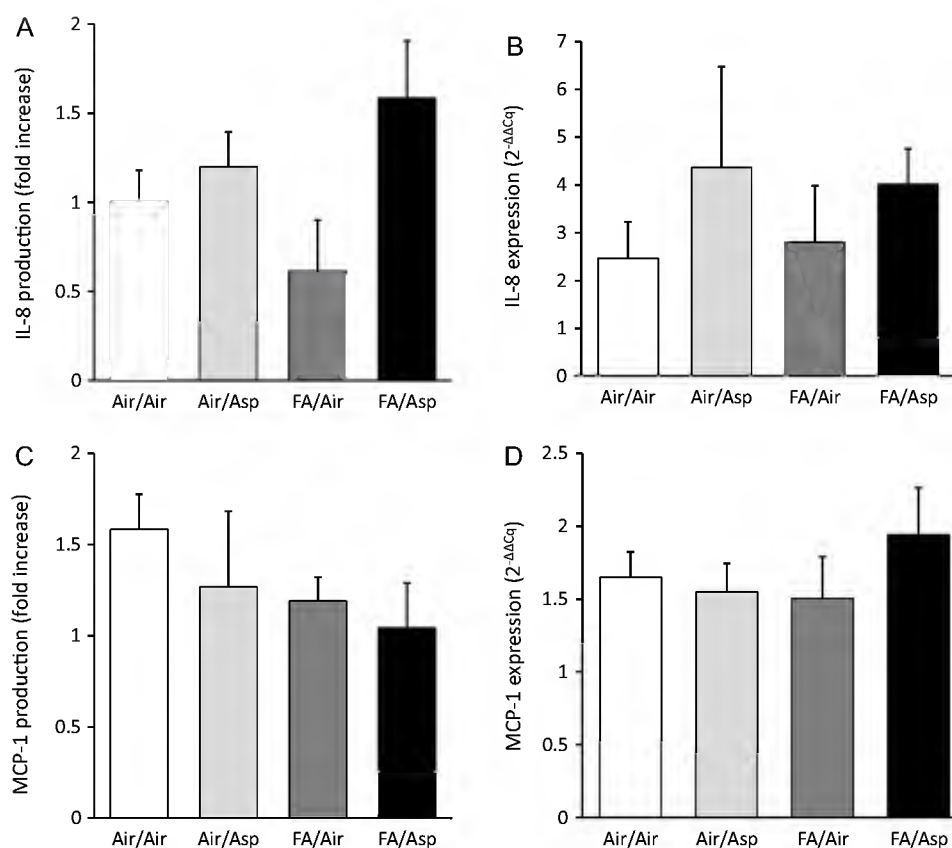
The reaction of cells to sequential exposure to FA and *Asp* was moderate. Indeed FA–Asp induced an increase, although this did not reach significance, of IL-8 production ( $p = 0.10$ ) when we compared these results with those obtained with FA–Air (Fig. 3A). A slight trend, but not significant, was also observed for the expression of this cytokine (Fig. 3B). Finally, production of MCP-1 tended to decrease whilst its expression tended to increase ( $p = 0.16$ ) (Fig. 3C and D).

## 4. Discussion

In industrialized countries, about 90% of our time is spent indoors where there are numerous pollutants, including chemical and biological contaminants, to which we are chronically exposed (Dales et al., 2008). The difficulties in representing environmental exposure *in vitro* are: (1) establishing the duration and repetition of exposure, (2) assessing the variety of real exposure, associating chemical, biological and physical compounds (Bernstein et al., 2008) and (3) selecting the chosen levels for tested pollutants.

In the present study, FA was chosen to typify chemical pollution: it is a major indoor air pollutant and targets mainly the respiratory tract (Wolkoff and Nielsen, 2010). The concentration of FA used in our experiments ( $50 \mu\text{g}/\text{m}^3$ ) was chosen according to levels typically observed in the domestic environment (Dassonville et al., 2009; Wolkoff and Nielsen, 2010). Environmental fungal contamination, on the other hand, was represented using the species *Aspergillus fumigatus*. This fungus is frequently found in the indoor environment (Dassonville et al., 2008; Horner et al., 2004) and it is known for its numerous respiratory health effects (Rogers, 2003). The concentration chosen for our study is typical of that found at the high end of concentrations in contaminated indoor environments (VandenBergh et al., 1999).

The use of these pollutants has been previously reported, although more often in submerged conditions (Bellanger et al., 2009; Kastner et al., 2011) which cannot be accurately compared to airborne levels. Some authors have reported FA or *Asp* atmosphere generation for *in vivo* studies, but levels were often high (Chandenier et al., 2009; Kuper et al., 2011). Some others using *in vitro* direct exposures such as Rager et al. (2011) and Pariselli et al. (2009) reported high FA concentrations ( $1240 \mu\text{g}/\text{m}^3$  and  $250 \mu\text{g}/\text{m}^3$  respectively) that were relevant compared to



**Fig. 3.** Production (A) and expression (B) of IL-8 and MCP-1 (C and D) by A549 cells for each condition of the exposure experimental protocol. Productions are presented as a ratio of unexposed cells and expressions are normalized on HPRT gene ( $n=4$ ).

occupational exposures, but far above the concentrations found in domestic environment (mainly  $<100 \mu\text{g}/\text{m}^3$ ) (Wolkoff and Nielsen, 2010). In this context, we paid very careful attention to the generation of realistic pollutant levels and to the checking of these levels in the exposure device.

Since environmental exposure is rarely a one-off event, we repeatedly exposed cells to FA and Asp in our cellular model. To the best of our knowledge, this is the first time that such an air–liquid sequential exposure has been performed. In addition, we made sure that our protocol overcame certain problems inherent in the design. We wanted to sequentially expose A549 cells to the two pollutants during a 24 h cycle after the first exposure, in order to maintain suitable conditions as previously defined (seeding and cellular monolayer growth) (Persoz et al., 2010). The choice of exposure sequence and duration of exposure to Asp was determined by kinetics of germination and hyphal development (Momany and Hernandez-Rodriguez, 2009). A 10 h exposure ensured close contact between epithelial cells and spores until the early stages of germination and hyphal growth. Maintaining cell culture over 10 h after spore exposure would however lead to uncontrolled fungal growth that could induce cellular damage and markedly bias the interpretation of the observed results. Considering this constraint FA exposure was performed before Asp.

Our purpose was to set up an *in vitro* model to assess the impact of repeated exposures to airborne pollutants at environmental levels on cell inflammation, and we therefore had to avoid any cytotoxic condition: whatever the conditions, no cytotoxic effect was observed. The biomarkers selected to study the inflammation response were two chemokines that play a major role in the inflammatory process of the respiratory tract, IL-8 and MCP-1, respectively neutrophil and monocyte chemoattractants (Chung, 2009). We assessed their production in apical supernatants during

post-incubation, as previously described (Persoz et al., 2010). In addition, we refined the study of inflammatory response to exposures by assessing the expression of these cytokines at the end of the exposure. Testing release as well as *de novo* synthesis helped to describe the early inflammatory response of the cells more completely.

The first issue in our experimental protocol was to make sure that the shortening of the first post-incubation time, from 24 h to 14 h, did not profoundly modify cellular response to gas exposure. For viability as well as cytokine production, we obtained an analogous response, and once again observed the increase of IL-8 production after air exposure and equivalent levels between air and FA exposures.

The second issue concerned the feasibility of repetitions, since cells exposed at the air–liquid interface undergo a certain degree of stress due to the air flow of exposure itself, this during even a single exposure (Persoz et al., 2010). Previous research into cell viability has shown that one exposure of 60 min induced cellular damages (Persoz et al., 2010), contrarily to two exposures of 30 min with an in-between period of 14 h. Considering cytokines, a second exposure to air did not induce a supplementary increase of IL-8 production or expression whereas MCP-1 production and expression, not modified after the first air exposure, were slightly increased after the second.

Results from the other exposure combination data led to the same conclusion: no cytotoxicity and no major stress. Indeed, when repeated exposures were performed with other compounds in addition to air, either FA or Asp, none induced cell toxicity. Although cellular response was always modest and indeed should be confirmed by further experiments, repeated exposure was feasible in our experimental conditions, with cells keeping their metabolic capacities.

The third and last issue dealt with the feasibility of cell exposure to fungal spores. To the best of our knowledge this is the first time that fungal contaminants have been used in air–liquid exposure experiments. Fungal conidia are usually in contact with respiratory cells by suspension (Bellanger et al., 2009; Berkova et al., 2006). Interestingly, *Asp* spore exposure coupled with prior air exposure was not cytotoxic, even after 10 h post-incubation and early hyphal development.

With regard to inflammation biomarkers, repeated exposure to FA combined with *Asp* did not strongly modify production or expression of both IL8 and MCP-1, even if some tendencies were observed. It could be due to an overtaking in biomarkers' time of expression. Our results differ from those reporting a major increase of IL-8 expression 8 h after exposure of A549 cells to *Aspergillus fumigatus* spores in submerged conditions (Bellanger et al., 2009). This difference could be due to the experimental conditions, especially airborne vs. submerged exposure, as well as to the exposure sequence used in our experiments.

We have previously shown that FA had no effect on A549 cells with TNF $\alpha$  post-sensitization whereas with pre-sensitization of this cytokine, FA induced increased IL-8 production (Persoz et al., 2010). The design we used in this study does in fact fit in with post-sensitization with *Asp* in the role of activator. Taken together, these results indicate that the time sequence of sensitization is an important parameter for A549 response to FA exposure. Finally, these results show that sequential exposure to different types of environmental pollutants can be modeled *in vitro* with concomitant assessment of deleterious effect on pulmonary cell viability and measurement of inflammatory cytokine response.

Whilst our *in vitro* model can be used for preliminary assessment of cellular activity modification induced by these airborne contaminants, it does however suffer from the classic limits of *in vitro* studies. With regard to the A549 cell line we used to model respiratory epithelial cells, the next step will be to assess the effects of the airborne pollutants used in this model on 3D reconstituted human epithelium models (Roggen et al., 2006). In addition, these types of *in vitro* model can be limited as they do not always take into account biological parameters such as surfactant (very important during fungal exposure *in vivo*), or cooperation between epithelial cells and immunity cells (dendritic cells, macrophages, ...), essential in the development of inflammatory pathogenesis. We cannot reproduce the complexity of physiology during *in vivo* inhalation exposure, although air–liquid exposure is one of the best adapted systems (BéruBé et al., 2009).

Finally, we suggest that this experimental approach allows a sequential approach of several pollutants, what confers its originality. It should be used for other pollutant combinations in order to assess the complexity of interactions between pollutants in the pulmonary cell sensitization processes.

## Funding

This work was supported by the French National Agency for Food, Environment and Occupational Health Safety (ANSES, EST-09-103). Charles Persoz received a doctoral grant from the French Environment and Energy Management Agency (ADEME), French School of Public Health and (EHESP) and Vigicell SAS and Christopher Leleu from Université Pierre et Marie Curie and EHESP.

## Acknowledgements

We thank Alexandra Vallon-Eberhard and Jean-Paul Latgé for the fluorescent DsRed strain of *Aspergillus fumigatus*.

## Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at doi:10.1016/j.toxlet.2011.07.028.

## References

- Anderson, S.E., Jackson, L.G., Franko, J., Wells, J.R., 2010. Evaluation of dicarbonyls generated in a simulated indoor air environment using an *in vitro* exposure system. *Toxicol. Sci.* 115, 453–461.
- Bakand, S., Hayes, A., 2010. Troubleshooting methods for toxicity testing of airborne chemicals *in vitro*. *J. Pharmacol. Toxicol. Methods* 61, 76–85.
- Bakand, S., Winder, C., Khalil, C., Hayes, A., 2006. An experimental *in vitro* model for dynamic direct exposure of human cells to airborne contaminants. *Toxicol. Lett.* 165, 1–10.
- Balls, M., 2009. The origins and early days of the three Rs concept. *Altern. Lab. Anim.* 37, 255–265.
- Bellanger, A.P., Million, L., Khoufache, K., Rivollet, D., Bièche, I., Laurendeau, I., Vidaud, M., Botterel, F., Bretagne, S., 2009. *Aspergillus fumigatus* germ tube growth and not conidia ingestion induces expression of inflammatory mediator genes in the human lung epithelial cell line A549. *J. Med. Microbiol.* 58, 174–179.
- Berkova, N., Lair-Fullerger, S., Féménia, F., Huet, D., Wagner, M.C., Gorna, K., Tournier, F., Ibrahim-Granet, O., Guillot, J., Chermette, R., Boireau, P., Latgé, J.P., 2006. *Aspergillus fumigatus* conidia inhibit tumour necrosis factor- or staurosporine-induced apoptosis in epithelial cells. *Int. Immunol.* 18, 139–150.
- Bernstein, J.A., Alexis, N., Bacchus, H., Bernstein, I.L., Fritz, P., Horner, E., Li, N., Mason, S., Nel, A., Oullette, J., Reijula, K., Reponen, T., Seltzer, J., Smith, A., Tarlo, S.M., 2008. The health effects of non-industrial indoor air pollution. *J. Allergy Clin. Immunol.* 121, 585–591.
- Bernstein, J.A., Alexis, N., Barnes, C., Bernstein, I.L., Bernstein, J.A., Nel, A., Peden, D., Diaz-Sanchez, D., Tarlo, S.M., Williams, P.B., 2004. Health effects of air pollution. *J. Allergy Clin. Immunol.* 114, 1116–1123.
- BéruBé, K., Aufderheide, M., Breheny, D., Clothier, R., Combes, R., Duffin, R., Forbes, B., Gaca, M., Gray, A., Hall, I., Kelly, M., Lethem, M., Liebsch, M., Merolla, L., Morin, J.P., Seagrave, J., Swartz, M.A., Tetley, T.D., Umachandran, M., 2009. *In vitro* models of inhalation toxicity and disease. The report of a FRAME workshop. *Altern. Lab. Anim.* 37, 89–141.
- Bustin, S.A., Benes, V., Garson, J.A., Hellems, J., Huggett, J., Kubista, M., Mueller, R., Nolan, T., Pfaffl, M.W., Shipley, G.L., Vandesompele, J., Wittwer, C.T., 2009. The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clin. Chem.* 55, 611–622.
- Chandenier, J., Bernard, S., Montharu, J., Bailly, E., Fétissou, F., de Monte, M., Desoubeaux, G., Diot, P., Richard-Lenoble, D., 2009. The utility of a nebulised intra-tracheal rat model of invasive pulmonary aspergillosis. *Mycoses* 52, 239–245.
- Chung, K.F., 2009. Cytokines. In: *Asthma and COPD*, 2nd ed. Academic Press, Oxford, pp. 327–341.
- Dales, R., Liu, L., Wheeler, A.J., Gilbert, N.L., 2008. Quality of indoor residential air and health. *CMAJ* 179, 147–152.
- Dassonville, C., Detaint, B., Barral, S., Bex-Capelle, V., Momas, I., 2008. Assessment and predictors determination of indoor airborne fungal concentrations in Paris newborn babies' homes. *Environ. Res.* 108, 80–85.
- Dassonville, C., Demattei, C., Laurent, A.M., Le Moullec, Y., Seta, N., Momas, I., 2009. Assessment and predictor determination of indoor aldehyde levels in Paris newborn babies' homes. *Indoor Air* 19, 314–323.
- Delfino, R.J., 2002. Epidemiologic evidence for asthma and exposure to air toxics: linkages between occupational, indoor, and community air pollution research. *Environ. Health Perspect.* 110, 573–589.
- Eduard, W., 2009. Fungal spores: a critical review of the toxicological and epidemiological evidence as a basis for occupational exposure limit setting. *Crit. Rev. Toxicol.* 39, 799–864.
- Ege, M.J., Mayer, M., Normand, A.C., Genuneit, J., Cookson, W.O., Braun-Fahrlander, C., Heederik, D., Piarroux, R., von Mutius, E., 2011. Exposure to environmental microorganisms and childhood asthma. *N. Engl. J. Med.* 364, 701–709.
- Ezratty, V., Bonay, M., Neukirch, C., Orset-Guillossou, G., Dehoux, M., Koscielny, S., Cabanes, P.A., Lambrozo, J., Aubier, M., 2007. Effect of formaldehyde on asthmatic response to inhaled allergen challenge. *Environ. Health Perspect.* 115, 210–214.
- Fasseu, M., Treton, X., Guichard, C., Pedruzzi, E., Cazals-Hatem, D., Richard, C., Aparicio, T., Daniel, F., Soule, J.C., Moreau, R., Bouhnik, Y., Laburthe, M., Groyer, A., Ogier-Denis, E., 2010. Identification of restricted subsets of mature microRNA abnormally expressed in inactive colonic mucosa of patients with inflammatory bowel disease. *PLoS One* 5, e13160.
- Fischer, D., Li, Y., Ahlemeyer, B., Krieglstein, J., Kissel, T., 2003. *In vitro* cytotoxicity testing of polycations: influence of polymer structure on cell viability and hemolysis. *Biomaterials* 24, 1121–1131.
- Gminski, R., Tang, T., Mersch-Sundermann, V., 2010. Cytotoxicity and genotoxicity in human lung epithelial A549 cells caused by airborne volatile organic compounds emitted from pine wood and oriented strand boards. *Toxicol. Lett.* 196, 33–41.
- Horner, W.E., Worthan, A.G., Morey, P.R., 2004. Air- and dustborne microflora in houses free of water damage and fungal growth. *Appl. Environ. Microbiol.* 70, 6394–6400.
- Jones, R., Recer, G.M., Hwang, S.A., Lin, S., 2011. Association between indoor mold and asthma among children in Buffalo, New York. *Indoor Air* 21, 156–164.

- Kastner, P.E., Casset, A., Pons, F., 2011. Formaldehyde interferes with airway epithelium integrity and functions in a dose- and time-dependent manner. *Toxicol. Lett.* 200, 109–116.
- Koehler, C., Ginzkey, C., Friehs, G., Hackenberg, S., Froelich, K., Scherzed, A., Burghartz, M., Kessler, M., Kleinsasser, N., 2010. Aspects of nitrogen dioxide toxicity in environmental urban concentrations in human nasal epithelium. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 245, 219–225.
- Kuper, C.F., van Oostrum, L., Ma-Hock, L., Durrer, S., Woutersen, R.A., 2011. Hyperplasia of the lymphoepithelium of NALT in rats but not in mice upon 28-day exposure to 15 ppm formaldehyde vapor. *Exp. Toxicol. Pathol.* 63, 25–32.
- Momany, M., Hernandez-Rodriguez, Y., 2009. Growth polarity. In: *Aspergillus fumigatus* and Aspergillosis. ASM Press, Washington, pp. 143–148.
- Pariselli, F., Sacco, M.G., Ponti, J., Rembges, D., 2009. Effects of toluene and benzene air mixtures on human lung cells (A549). *Exp. Toxicol. Pathol.* 61, 381–386.
- Persoz, C., Achard, S., Leleu, C., Momas, I., Seta, N., 2010. An *in vitro* model to evaluate the inflammatory response after gaseous formaldehyde exposure of lung epithelial cells. *Toxicol. Lett.* 195, 99–105.
- Rager, J.E., Smeester, L., Jaspers, I., Sexton, K.G., Fry, R.C., 2011. Epigenetic changes induced by air toxics: formaldehyde exposure alters miRNA expression profiles in human lung cells. *Environ. Health Perspect.* 119, 494–500.
- Roggen, E.L., Soni, N.K., Verheyen, G.R., 2006. Respiratory immunotoxicity: an *in vitro* assessment. *Toxicol. In Vitro* 20, 1249–1264.
- Rogers, C.A., 2003. Indoor fungal exposure. *Immunol. Allergy Clin. North Am.* 23, 501–518.
- Rumchev, K.B., Spickett, J.T., Bulsara, M.K., Phillips, M.R., Stick, S.M., 2002. Domestic exposure to formaldehyde significantly increases the risk of asthma in young children. *Eur. Respir. J.* 20, 403–408.
- Switalla, S., Knebel, J., Ritter, D., Krug, N., Braun, A., Sewald, K., 2010. Effects of acute *in vitro* exposure of murine precision-cut lung slices to gaseous nitrogen dioxide and ozone in an air–liquid interface (ALI) culture. *Toxicol. Lett.* 196, 117–124.
- Vallon-Eberhard, A., Makovitzki, A., Beauvais, A., Latgé, J.P., Jung, S., Shai, Y., 2008. Efficient clearance of *Aspergillus fumigatus* in murine lungs by an ultra-short antimicrobial lipopeptide, palmitoyl-lys-ala-DAla-lys. *Antimicrob. Agents Chemother.* 52, 3118–3126.
- VandenBergh, M.F., Verweij, P.E., Voss, A., 1999. Epidemiology of nosocomial fungal infections: invasive aspergillosis and the environment. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 34, 221–227.
- Volckens, J., Dailey, L., Walters, G., Devlin, R.B., 2009. Direct particle-to-cell deposition of coarse ambient particulate matter increases the production of inflammatory mediators from cultured human airway epithelial cells. *Environ. Sci. Technol.* 43, 4595–4599.
- Wolkoff, P., Nielsen, G.D., 2010. Non-cancer effects of formaldehyde and relevance for setting an indoor air guideline. *Environ. Int.* 36, 788–799.

## Chapitre 2.

### Etude *in vivo*

---

De nombreux modèles animaux ont été utilisés pour étudier les conséquences d'une exposition aux spores d'*A. fumigatus* sur l'appareil respiratoire (Eduard, 2009; Templeton et coll., 2010). Venant en complément des modèles *in vitro*, ils offrent la possibilité d'étudier les effets systémiques du pathogène en simulant l'aspergillose pulmonaire invasive chez l'immunodéprimé et les manifestations immuno-allergiques de l'aspergillose. Cependant, les possibilités de transposition dépendent de la qualité du modèle et des similitudes avec les conditions naturelles d'infection.

C'est dans ce contexte que nous avons mis au point un modèle expérimental d'aspergillose pulmonaire invasive chez la souris, en privilégiant une infection par aérosol. Ce modèle a ensuite été utilisé pour appréhender la relation entre l'exposition à différentes concentrations de spores d'*A. fumigatus* aérosolisées et la survenue d'aspergillose.

Une modélisation mathématique de cette relation a ensuite été réalisée, en intégrant les différents paramètres intervenants dans le modèle. Cette partie du travail a fait appel à la statistique bayésienne, en raison de la complexité des interactions entre les paramètres et le nombre limité de données.

Secondairement, la maîtrise du modèle expérimental d'infection primaire a permis d'explorer le concept de réactivation d'une infection latente, ou "réactivation", et proposer un second modèle animal simulant ce risque chez un hôte recevant un traitement immunosuppresseur. Finalement, ces développements méthodologiques ont permis d'étudier l'efficacité de la chimioprophylaxie par l'Amphotéricine B Liposomale (Ambisome®) dans les deux contextes expérimentaux.

Dans ce chapitre, nous résumerons brièvement les données de la littérature sur les modèles expérimentaux animaux d'aspergillose pulmonaire invasive et les outils de modélisation statistique utilisés pour la caractérisation du risque et de la relation exposition-infection, pour présenter ensuite le développement de nos travaux et leurs résultats.

## 2.1. Modélisation expérimentale et statistique de l'aspergillose invasive

### 2.1.1. Modèles expérimentaux d'aspergillose invasive

Plusieurs paramètres sont à prendre en compte dans la mise au point d'un modèle expérimental d'aspergillose, en particulier le choix de l'animal, le régime d'immunosuppression, le mode d'exposition et les modalités d'évaluation de l'infection (Patterson, 2005).

#### 2.1.1.1. Choix de l'animal et du régime d'immunosuppression

Différents animaux peuvent être utilisés pour l'étude expérimentale de l'aspergillose pulmonaire. Les plus courants sont la souris, le rat, le lapin et le cobaye (Clemons et Stevens, 2005). Ces animaux étant des mammifères, leur température corporelle et leur appareil respiratoire sont proches de ceux de l'Homme, permettant le développement d'une aspergillose pulmonaire comparable à celle qui est observée en pathologie humaine. Outre cette raison, chaque espèce possède ses propres avantages et inconvénients dans un cadre expérimental. Les petits rongeurs sont de loin les plus utilisés en raison de leur facilité de manipulation et d'entretien, de la multitude de lignées génétiquement définies disponibles et de leur faible coût. En premier lieu, la souris avec les avantages précités, mais l'inconvénient de devoir sacrifier l'animal pour caractériser et quantifier l'infection. Le développement de nouvelles méthodes d'imagerie devrait, à terme, permettre une évaluation quantitative sans sacrifier l'animal (Ibrahim-Granet et coll., 2010), mais le pouvoir de résolution actuel reste faible.

Le rat a également été utilisé dans de nombreuses études expérimentales sur la pathogénèse et la thérapeutique expérimentale de l'aspergillose (van de Sande et coll., 2008; McCulloch et coll., 2012). Son principal avantage se situe au niveau de la taille, qui autorise des prélèvements sanguins répétés, mais surtout permet d'utiliser des techniques d'aérosolisation intratrachéale simulant l'exposition aux spores (Chandenier et coll., 2009; Desoubeaux et Chandenier, 2012).

Les lapins sont utilisés pour leur grande taille qui permet d'effectuer des lavages broncho-alvéolaires et de pratiquer des examens d'imagerie (Petratis et coll., 2006), de pouvoir procéder à des prélèvements sanguins répétés (cathéter) et recueillir suffisamment de matériel biologique pour comparer les différentes méthodes d'évaluation de l'infection (Hope et coll., 2010; Francesconi et coll., 2006).

Les cobayes sont plus rarement utilisés mais privilégiés par certaines équipes (Vallor et coll., 2008; Kirkpatrick et coll., 2012).

Quelle que soit l'espèce utilisée, il est nécessaire d'administrer un traitement immunosuppresseur pour induire une aspergillose pulmonaire invasive chez l'animal. De très nombreux schémas d'immunodépression ont été proposés, la plupart reposant sur l'administration d'une molécule cytotoxique (moutarde à l'azote, cytarabine, cyclophosphamide, vinblastine...) induisant une neutropénie profonde, associée à un corticoïde (méthylprednisolone, acétate de cortisone, triamcinolone) à forte dose, cumulant ainsi les facteurs favorisant le développement d'une infection invasive. Actuellement, l'association la plus utilisée chez la souris est cyclophosphamide + acétate de cortisone, suivant un schéma thérapeutique bien codifié par Sheppard et coll (Sheppard et coll., 2004, 2006b).

Il est cependant possible d'induire une infection aspergillaire invasive par la seule neutropénie prolongée ou la seule administration de corticoïdes, ce qui conduit à des infections très différentes sur le plan histologique comme cela a été montré par Balloy et coll. (Balloy et coll., 2005). En effet, les auteurs observent une forte prolifération fongique, responsable des lésions chez les souris traitées par la vinblastine seule, alors que les souris traitées par les corticoïdes seuls présentent avant tout des manifestations immunopathologiques de pneumonie, rapidement fatale, mais sans grande prolifération fongique. Des observations similaires ont été faites chez le lapin (Berenguer et coll., 1995).

En fonction des objectifs de recherche, certaines équipes vont donc privilégier les modèles "neutropéniques", notamment chez le lapin, ou des modèles "mixtes" combinant neutropénie et l'immunodépression liée aux corticoïdes (principalement utilisés chez la souris, le rat et le cobaye).

### 2.1.1.2. Mode d'exposition

Le mode d'exposition est un paramètre essentiel dans le développement du modèle. On trouve dans la littérature deux catégories de mode d'exposition : les expositions à une suspension de spores ou les expositions à un aérosol de spores.

#### a. Exposition à une suspension de spores

Elle consiste en l'introduction de spores fongiques en suspension dans les voies aériennes de l'animal. Les quantités de spores utilisées dans ces modèles varient suivant les études entre  $10^6$  et  $10^7$  spores (Fekkar et coll., 2012; Appel et coll., 2010; Johnson et coll., 2005; Hohl et coll., 2005; Tansho et coll., 2006; Clemons et coll., 2011). L'exposition peut être réalisée au niveau des voies aériennes supérieures (instillation intranasale) (Fekkar et coll., 2012; Appel et coll., 2010; Johnson et coll., 2005), ou au niveau de la trachée (instillation intratrachéale) (Hohl et coll., 2005; Tansho et coll., 2006; Becker et coll., 2002). Par ces modalités d'infection, la concentration de l'inoculum est connue et reproductible. Ces voies d'exposition ont comme principal inconvénient de ne pas respecter les conditions naturelles d'exposition et d'instiller les spores sous forme d'une suspension en milieu liquide avec le risque de modifier la nature des premiers contacts spores/cellules et processus initiaux d'infection.

#### b. Exposition à un aérosol de spores

Contrairement aux modèles d'exposition par suspension de spores, les modèles d'exposition par aérosol de spores produisent des infections pulmonaires plus "physiologiques" et mieux réparties sur le plan histologique (Steinbach et coll., 2004). Les trois principales techniques d'exposition par inhalation sont présentées dans la Figure 12 :

- **Exposition nasale** : dans ces modèles développés par Piggott et Emmons en 1960, les animaux sont placés dans des compartiments individuels et maintenus dans une position favorisant l'inhalation d'un flux d'air chargé en spores. (Piggott et Emmons, 1960; Burrell, 1970; Schaffner et coll., 1982; Kothary et coll., 1984; Loebenberg et coll., 1992). La mise en suspension des spores d'*A. fumigatus* est produite par soufflage sur des cultures. Les animaux sont alors exposés à un nuage de spores très concentré pendant quelques minutes. Ce dispositif présente deux inconvénients majeurs : *i*) la concentration d'exposition n'est pas maîtrisée ; *ii*) les animaux sont maintenus dans une position qui n'est plus compatible avec l'éthique et la réglementation des études menées sur l'animal.
- **Chambre d'exposition** : ce type d'exposition a été proposé par Sidransky et coll. en 1959 (Sidransky et Friedman, 1959) puis amélioré par de nombreuses équipes (Ford et Friedman, 1967; Sheppard et coll., 2004; Steinbach et coll., 2004; Tolman et coll., 2009; Kirkpatrick et coll., 2012). Le principe de ce système est simple : les animaux sont regroupés dans une chambre d'exposition alimentée par un aérosol de spores. Les nuages de spores sont produits par soufflage ou par nébulisation/aérosolisation. La nébulisation consiste en l'introduction d'air sous pression dans une suspension de spores pour générer un aérosol de spores. La nébulisation est souvent réalisée à l'aide d'un nébuliseur de type "Collison" (BGI) (May, 1973) et la durée de l'exposition est comprise entre 30 et 60 minutes (Bakker-Woudenberg, 2003). L'une des principales critiques émises contre ce type d'exposition est la non maîtrise de la concentration d'exposition. Pour répondre à cette question certains protocoles prévoient le sacrifice de quelques

animaux juste après l'exposition, mais cette estimation obtenue par culture des poumons sur gélose peut être imprécise (Ford et Friedman, 1967; Vallor et coll., 2008).

- **Nébulisation intratrachéale** : un modèle de nébulisation intratrachéale a été développé chez le rat par l'équipe de Parasitologie-Mycologie du CHU de Tours (Chandenier et coll., 2009; Desoubieux et Chandenier, 2012). Dans ce modèle, l'exposition n'est pas naturelle, puisque l'aérosol de spores est instillé par une canule dans la trachée de l'animal, mais la répartition des spores est homogène dans les poumons et les spores sont en contact avec l'épithélium pulmonaire sous forme aérosolisée.

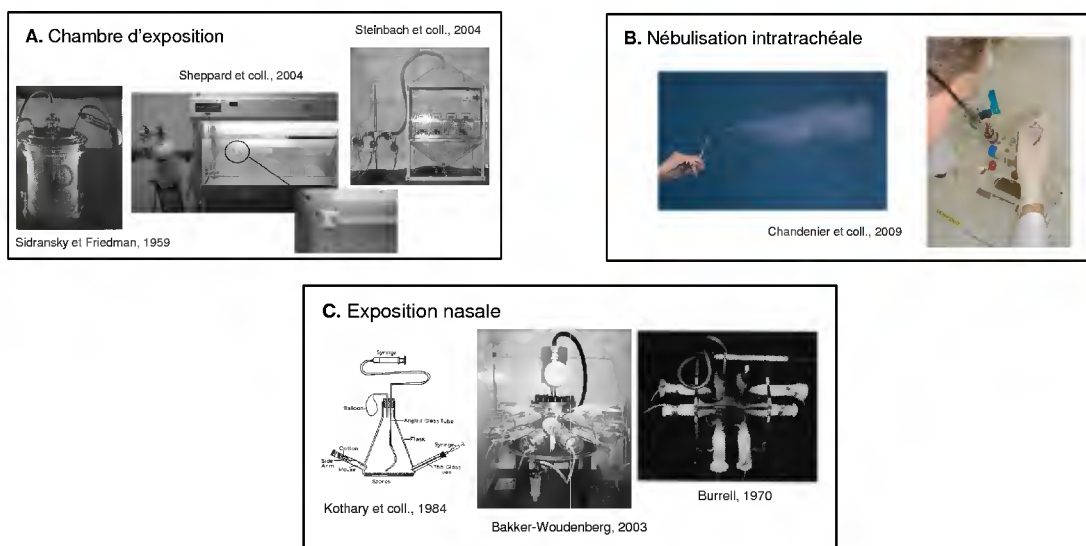


Figure 12 – Principales techniques d'exposition *in vivo* à un aérosol de spores. **A**-Exposition de plusieurs animaux dans une chambre d'exposition. **B**-Nébulisation intratrachéale des spores. **C**-Exposition des animaux dans des compartiments individuels.

### 2.1.1.3. Evaluation de l'infection

Le diagnostic d'aspergillose pulmonaire invasive chez l'animal peut être fait par différents moyens. L'étude histologique montrant les lésions invasives au niveau pulmonaire reste la référence, mais n'est pas applicable sur de grandes séries expérimentales. La culture d'un broyat de poumons et la quantification du nombre de colonies par gramme de tissu (ufc/g) est une méthode plus classique. Sa sensibilité peut cependant être affectée par la concentration du broyat de tissu, justifiant de réaliser les cultures sur 1 ou 2 dilutions.

La mesure de la concentration d'antigène galactomannane ou de 1,3- $\beta$ -D-glucane dans le sérum peut être proposée, en raison d'une bonne corrélation avec la charge fongique (Hope et coll., 2010; Wiederhold et coll., 2008). Le dosage de galactomannane peut aussi être réalisé dans le surnageant du broyat pulmonaire, en complément de la culture fongique (Vallor et coll., 2008).

Plus récemment les techniques de PCR en temps réel ont été proposées pour quantifier la charge fongique dans le tissu pulmonaire (Vallor et coll., 2008) ou le liquide de lavage alvéolaire (Lengerova et coll., 2012).

L'analyse des avantages/inconvénients respectifs de ces différentes méthodes a fait l'objet de quelques études comparatives, qui concluent sur la grande sensibilité de la PCR et du dosage d'antigène, mais recommandent d'utiliser 2 méthodes pour quantifier les charges fongiques (Sheppard et coll., 2006a, Vallor et coll., 2008).

Par ailleurs, des méthodes non invasives d'imagerie peuvent être utilisées chez les animaux d'assez grande taille (lapin, cobaye principalement). Elles sont en plein développement chez les petits animaux, grâce à l'utilisation de souches marquées (d'Enfert et coll., 2010).



### 2.1.2. Modélisation statistique et caractérisation du risque

Dans le domaine de l'Appréciation Quantitative des Risques (AQR), la caractérisation du risque est une étape intervenant après l'identification du danger et l'appréciation de ces effets. Elle permet de relier la probabilité d'infection à l'exposition par l'intermédiaire d'une relation de dose-réponse. Les données disponibles pour l'établissement de cette relation étant souvent très limitées, le recours à la modélisation est nécessaire. Pour cela, des modèles ont été développés en fonction des hypothèses liées au danger.

En microbiologie, les modèles les plus utilisés sont basés sur la théorie du "choc unique" ("single hit") (ONU, 2004). Cette théorie repose sur l'hypothèse qu'un seul microorganisme peut être à l'origine d'une infection. Cette théorie s'oppose à la théorie "à seuil" qui suppose la nécessité d'une "coopération" entre les microorganismes ingérés ou inhalés, faisant intervenir la notion de dose minimale infectante (Sanaa et Cerf, 2002). En considérant l'hypothèse du choc unique, la probabilité qu'un microorganisme (spore fongique) infecte un individu n'est pas nulle et est notée  $r$ . La probabilité inverse (de ne pas être responsable d'une infection) se calcule par :  $1 - r$ . En considérant l'indépendance entre les spores, la probabilité de ne pas être infecté lorsque l'on est exposé à 2 spores devient donc :  $(1 - r)^2$ . Et de même s'il s'agit de  $n$  spores :  $(1 - r)^n$ . Ainsi, on peut calculer la probabilité d'être infecté lorsque l'on est exposé à  $n$  spores par la formule :

$$P_{inf}(n; r) = 1 - \exp(1 - r)^n \quad (2..1)$$

A partir de cette formule de base, plusieurs types de modèles dose-réponse ont été développés (Tableau IV). Les modèles les plus utilisés sont le modèle exponentiel et le modèle bêta-Poisson qui sont basés sur l'hypothèse d'une distribution aléatoire des spores dans l'inoculum et suivant une distribution de Poisson. En considérant cette hypothèse, le modèle exponentiel est défini par la formule suivante (Teunis et Havelaar, 2000) :

$$P_{inf}(D; r) = 1 - \exp(-r.D) \quad (2..2)$$

où  $D$  est la dose moyenne inhalée et  $r$  la probabilité qu'une spore soit infectante. A partir de ce modèle à 1 paramètre (paramètre  $r$ ), un modèle plus flexible à 2 paramètres ( $\alpha$  et  $\beta$ ) a été proposé. Ce modèle prend en compte la variabilité de l'infection selon les organismes présents dans l'hôte en attribuant une distribution bêta au paramètre  $r$  du modèle exponentiel. Les paramètres de la loi bêta étant notés  $\alpha$  et  $\beta$ , on obtient alors le modèle bêta-Poisson exact (aussi appelé modèle Hypergéométrique) :

$$P_{inf}(D; \alpha, \beta) = 1 - {}_1F_1(\alpha, \alpha + \beta, -d) \quad (2..3)$$

La fonction hypergéométrique de Kummer  ${}_1F_1$  étant difficile à calculer, une approximation est usuellement réalisée en utilisant des valeurs  $\alpha$  et  $\beta$  telles que  $\alpha \ll \beta$  et  $\beta \gg 1$ . Cette approximation simplifie l'écriture du modèle bêta-Poisson qui devient :

$$P_{inf}(D; \alpha, \beta) \approx 1 - \left(1 + \frac{D}{\beta}\right)^{-\alpha} \quad (2..4)$$

Ce dernier modèle est le modèle bêta-Poisson approximé. Il est le plus utilisé dans les études de modélisation de dose-réponse en microbiologie comme le précise le livre référence dans le domaine écrit par Haas en 1999 (Haas et coll., 1999).

D'autres modèles de dose-réponse sont utilisés en microbiologie comme le rapporte le Tableau IV. Moon et coll. ont comparé en 2004 différents modèles en utilisant les nombreuses données de Teunis et coll. concernant l'exposition et l'infection à divers pathogènes (bactéries, virus et parasites) (Moon et coll., 2009; Teunis et coll.,

1996). Cette comparaison met en évidence que les modèles de dose-réponse à 2 paramètres reflètent au moins aussi bien l'incertitude que les modèles possédant 3 paramètres. Dans ce cas, et pour des raisons de simplicité de calculs, ils recommandent l'utilisation de modèles à 2 paramètres. Parmi ceux-ci, le modèle bêta-Poisson doit être privilégié, d'une part en raison de sa propension à fournir des intervalles plus étroits, et d'autre part parce qu'il dérive (comme le modèle exponentiel) de considérations biologiques.

Tableau IV – Modèles dose-réponse utilisés pour l'évaluation des risques microbiologiques. (Extrait de Moon et coll., 2004).

Nom	Modèle	
<b>1 paramètre</b>		
Exponentiel	$P(d; r) = 1 - \exp(-rd)$	$r > 0$
<b>2 paramètres</b>		
Beta-Poisson	$P(d; \alpha, \beta) = 1 - (1 + d/\beta)^{-\alpha}$	$\alpha > 0, \beta > 0$
Hypergéométrique	$P(d; \alpha, \beta) = 1 - {}_1F_1(\alpha, \alpha + \beta, -d)$	$\alpha > 0, \beta > 0$
Log-Normal	$P(d; \alpha, \beta) = \frac{1}{\sqrt{2\pi}} \int_{-\infty}^{(\ln(d)-\alpha)/\beta} \exp(-\frac{1}{2}t^2) dt$	$-\infty < \alpha < \infty, \beta > 0$
Log-Logistic	$P(d; \alpha, \beta) = 1/\{1 + \exp[-(\ln(d) - \alpha)/\beta]\}$	$-\infty < \alpha < \infty, \beta > 0$
Extreme-Value	$P(d; \alpha, \beta) = 1 - \exp[-\exp(\alpha + \beta \ln(d))]$	$-\infty < \alpha < \infty, \beta > 0$
<b>3 paramètres</b>		
Weibull-Gamma	$P(d; \alpha, \beta, \gamma) = 1 - (1 + d^\gamma/\beta)^{-\alpha}$	$\alpha > 0, \beta > 0, \gamma > 0$
Exponentiel-Gamma	$P(d; \alpha, \beta, \gamma) = 1 - \exp(-\gamma d)/(1 + d/\beta)^\alpha$	$\alpha > 0, \beta > 0, \gamma > 0$
Weibull-Exponentiel	$P(d; \alpha, \beta, \gamma) = 1 - \exp(-\alpha d^\gamma)/(1 + d^\gamma/\beta)$	$\alpha > 0, \beta > 0, \gamma > 0$
Shifted-Weibull	$P(d; \alpha, \beta, \gamma) = \begin{cases} 1 - \exp\{-(d - \alpha)/\beta\}^\gamma & d \geq \alpha \\ 0 & 0 < d < \alpha \end{cases}$	$d \geq \alpha$ $0 < d < \alpha$

### 2.1.3. Objectifs

Dans ce contexte, l'objectif de notre étude était double :

1. Développer un modèle expérimental d'aspergillose invasive comprenant une exposition par un aérosol de spores d'*Aspergillus fumigatus*.
2. Etablir un modèle de dose-réponse à partir des données expérimentales obtenues grâce au modèle expérimental développé.

## 2.1.4. Mise au point d'un modèle expérimental d'aspergillose invasive par aérosol

### 2.1.4.1. Choix des conditions expérimentales et du dispositif d'exposition

Nous avons opté pour un modèle "souris" (Balb/c) associant neutropénie et immunodépression par corticoïdes. Ce modèle est très largement utilisé et reproduit bien les aspects anatomopathologiques de l'aspergillose invasive chez l'homme (Rieg et coll., 2006; Vallor et coll., 2008; Tolman et coll., 2009). Le dispositif expérimental d'exposition, basé sur les travaux publiés par Sheppard (Sheppard et coll., 2004, 2006b), est présenté dans la Figure 13. Il se compose d'une chambre d'exposition en Plexiglass d'un volume de 32L (40 x 40 x 20 cm) dont la partie supérieure est composée d'un filtre HEPA (High Efficiency Particulate Air) autorisant un gros débit d'air et évitant ainsi toute surpression lors du soufflage de l'aérosol. La taille de la chambre d'exposition permet d'exposer un maximum de 24 souris. Afin de garantir une exposition équivalente de toutes les souris, celles-ci sont placées dans des petites cages alignées devant l'arrivée du flux d'air. Les spores sont nébulisées comme décrit dans le chapitre 1 (Etude *in vitro*), à l'aide d'air sous pression et un nébuliseur contenant une suspension de spores dont la concentration est connue. La concentration dans la chambre d'exposition est mesurée pendant les deux dernières minutes de l'expérimentation grâce à un préleveur d'air CIP-10M qui aspire l'air de la chambre (10L/min) et collecte les particules par impaction. Les spores sont recueillies dans 2ml d'eau stérile.

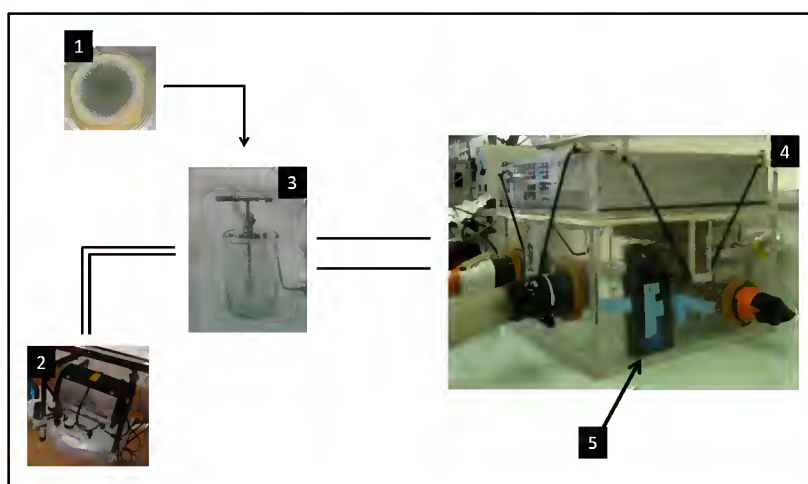


Figure 13 – Schéma expérimental de l'exposition de souris BALB/c à un aérosol de spores fongiques.

1. **Spores** : la veille de l'exposition, une suspension de spores d'*A. fumigatus* de la souche AF293 a été obtenue par lavage de cultures fongiques sur milieu Sabouraud-Chloramphénicol. Après filtration, la concentration est mesurée par comptage sur cellule de Malassez et ajustée à la concentration voulue.
2. **Compresseur** : un compresseur Jun Air® réglé sur une pression de 2 bars, génère de l'air purifié sous pression pour la nébulisation.
3. **Nébuliseur** : l'air sous pression est injecté dans la suspension de spores, produisant ainsi un aérosol chargé en spores.
4. **Chambre d'exposition** : la chambre d'exposition est une enceinte hermétiquement fermée qui dispose d'une entrée permettant l'arrivée de l'aérosol de spores et d'une sortie équipée d'un filtre HEPA pour ne pas libérer des spores dans l'environnement. Les souris sont disposées dans cette chambre pendant 1h.
5. **CIP-10M** : à la fin de l'exposition, l'air de la chambre est prélevé par un appareil de mesure, le CIP-10M, qui prélève l'air pendant 2 minutes à un débit de 10L/min.

#### 2.1.4.2. Protocole expérimental

Le protocole expérimental est présenté dans la Figure 14. Quinze expérimentations comprenant des groupes de 6 à 12 souris BALB/c ont été réalisées. Les souris ont été immunodéprimées par injection de cyclophosphamide (250mg/kg) et d'acétate de cortisone (200mg/kg) à J0 et à J6. Trois jours après la première immunosuppression, les souris ont été exposées pendant 1h à un aérosol de spores grâce au dispositif expérimental présenté en I.4.1. Les animaux ont été sacrifiés 13 jours après l'exposition. Au cours du sacrifice, les poumons ont été prélevés et broyés dans 2ml de PBS. Une moitié du broyat est étalée sur une gélose de Sabouraud-Chloramphénicol (pur et dilué au 1/10) et l'autre moitié a été centrifugée à 10 000g pendant 15 minutes. Le galactomannane aspergillaire (GM) a été dosé dans le surnageant par un test d'immuno-capture ELISA (Platelia™ Aspergillus Ag Kit - Bio-Rad).

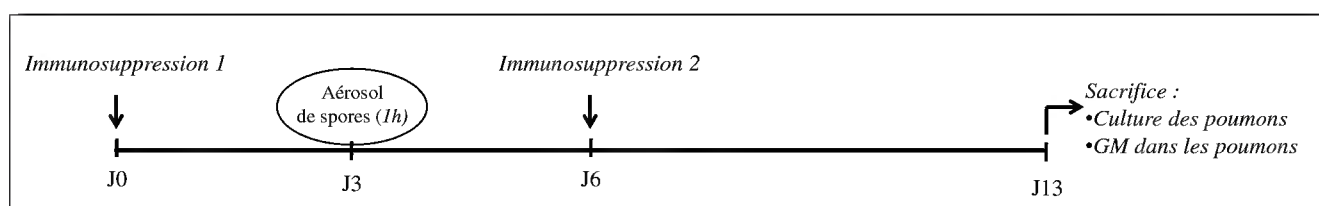


Figure 14 – Protocole expérimental de l'exposition de souris BALB/c à un aérosol de spores fongiques.

Les critères suivants ont été retenus pour considérer que les souris exposées présentaient une aspergillose invasive :

- culture fongique du poumon positive.
- et**
- valeur de GM dans le broyat pulmonaire supérieure à 0,4<sup>1</sup>.

Les souris mortes avant J13 et n'ayant pu être disséquées, ont été considérées comme infectées si la mort est survenue après J9. Ce critère a été retenu dans la mesure où aucune des 29 souris non exposées et ayant reçu le même traitement immunosuppresseur n'est morte. Les souris mortes avant J9 ont été considérées comme non infectées et mortes d'une autre cause que l'aspergillose (accidentelle le plus souvent).

1. Valeur seuil établie d'après l'étude de 63 souris non exposées dont les valeurs de GM étaient en moyenne de  $0,14 \pm 0,06$ .

## 2.1.5. Modélisation bayésienne de la relation dose-réponse

A partir des données expérimentales, une relation de dose-réponse a été modélisée. Pour cela, les modèles exponentiel et bêta-Poisson, ont été utilisés mais dans une approche bayésienne permettant de prendre en compte l'incertitude et la variabilité des nombreuses composantes du modèles. Ce choix méthodologique a été établi à la suite de nombreux échanges puis d'une collaboration avec Jean-Baptiste Denis (Unité Mathématiques et Informatique Appliquées, INRA, Jouy en Josas), qui nous a permis de bénéficier de son expérience dans l'évaluation des risques sanitaires liés à l'alimentation. Nous présenterons brièvement les principales caractéristiques de cette approche puis son application au modèle d'aspergillose invasive

### 2.1.5.1. L'approche bayésienne

L'approche bayésienne de la statistique est différente de l'approche classique. Par exemple, considérons un modèle statistique où la loi de probabilité  $P(y|\theta)$  qui génère les observations  $y$  est donnée par un modèle paramétrique particulier qui dépend d'un paramètre inconnu de dimension  $k$  :  $\theta \in \Theta \subset \mathbb{R}^k$ . En statistique classique, ce paramètre  $\theta$  est inconnu et fixé dans  $\Theta$ . En statistique bayésienne, le paramètre  $\theta$  est également inconnu, mais considéré comme aléatoire. Il est régi par une certaine loi de probabilité  $P(\theta)$  que l'on appelle loi *a priori* (supposée connue). Cette loi représente la connaissance de l'expérimentateur avant l'expérience. Elle est confrontée aux observations expérimentales afin de la réactualiser et obtenir une nouvelle loi de distribution de  $\theta$  conditionnellement aux observations :  $P(\theta|y)$ . Le principe est donc de corriger l'*a priori* que l'on a sur  $\theta$  par l'information apportée par  $y$ . Cette nouvelle loi de distribution de  $\theta$  représente désormais la connaissance sur le phénomène aléatoire étudié. Elle pourra être utilisée en tant que loi *a priori* dans une nouvelle expérimentation et confrontée aux nouvelles observations. Par contre, si peu d'information sont disponibles avant une expérimentation, une distribution peu informative (c'est-à-dire ayant une variance élevée) peut-être choisie. La figure 15 résume la démarche Bayésienne.

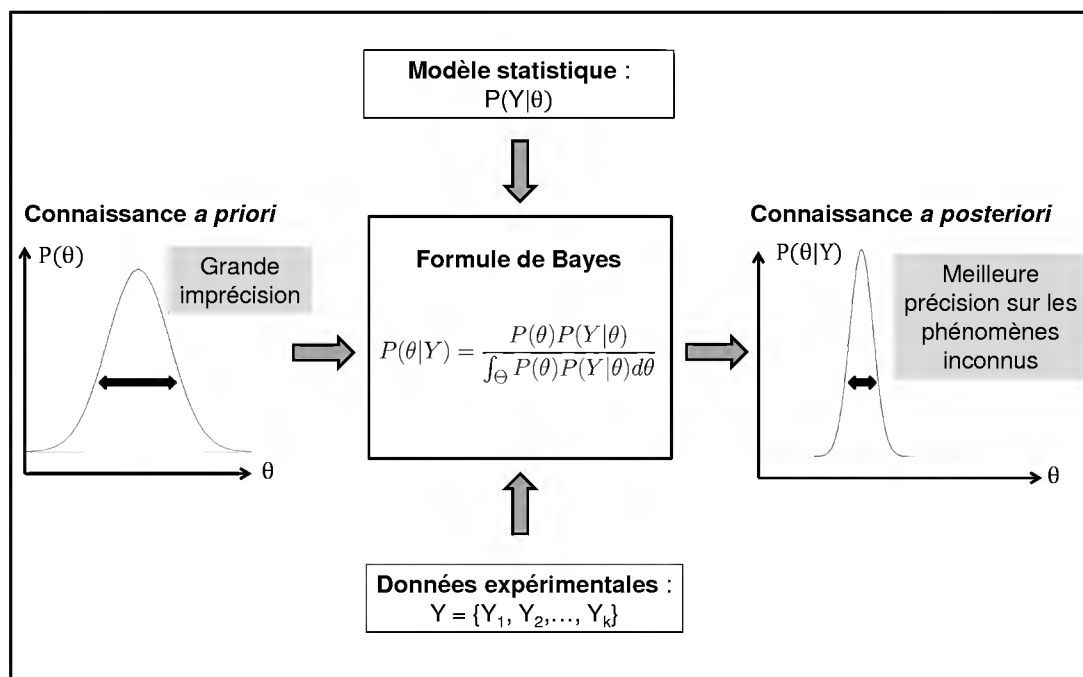


Figure 15 – Paradigme bayésien. D'après [Boreux et coll., 2010](#) . La distribution *a priori* du paramètre  $P(\theta)$  est confrontée aux observations expérimentales  $y$  au travers d'un modèle paramétrique  $P(y|\theta)$  en utilisant la formule de Bayes dans le but d'actualiser les connaissances sur le paramètre  $\theta$  et d'obtenir une distribution *a posteriori*  $P(\theta|y)$  plus précise des phénomènes aléatoires inconnus.

### 2.1.5.2. Développement des modèles pour l'aspergillose invasive expérimentale

A partir des distributions *prior*es et des données expérimentales, les distributions *posterior*es des paramètres du modèle ont été calculées en utilisant les méthodes de Monte Carlo par Chaînes de Markov (MCMC) qui sont des méthodes d'intégration numérique utilisant l'aléatoire et qui permettent d'approcher les distributions *a posteriori* des paramètres (et/ou hyperparamètres dans le cas d'un modèle hiérarchique). Dans notre étude, l'implémentation a été réalisée par JAGS 3.1.0 (Plummer, 2003) qui est un logiciel utilisant l'échantillonneur de Gibbs (Geman et Geman, 1984). Les résultats ont été analysés sous R 2.12.1 (www.r-project.org) en utilisant le package CODA (Plummer et coll., 2010).

Un million d'itérations ont été produites pour trois chaînes ayant des valeurs initiales différentes. Les 10 000 premières itérations servant de "période de chauffe" ont été éliminées. Les valeurs ont été retenues toutes les 100 itérations pour éviter les phénomènes d'auto-corrélation et obtenir un échantillon indépendant. La convergence des MCMC a été vérifiée par le critère de Gelman et Rubin (GRC) qui est estimé pour chacun des paramètres. Une valeur proche de 1 (inférieure à 1,1) a été retenue comme un signe de convergence.

#### a. Modèle basé sur la concentration de spores dans le nébuliseur

Dans une première étape, les modèles exponentiel et bêta-Poisson ont été utilisés en considérant la concentration de spores de la suspension nébulisée comme la dose d'exposition. Ce modèle simplifié permet de se baser sur une donnée facilement mesurable, tout en sachant que cette concentration ne représente qu'indirectement la quantité inhalée par la souris. La figure 16, présente les différentes composantes du modèle suivant un mode de représentation conventionnelle, le graphe orienté acyclique (pour Directed Acyclic Graph, ou DAG).

#### b. Modèle basé sur la quantité de spores inhalées par une souris

A partir du modèle précédent nous avons développé un modèle plus complet prenant en compte les différents paramètres du modèle expérimental. La dose d'infection est, dans ce modèle, la quantité de spores inhalées par une souris au cours d'une expérimentation. Cette quantité de spores est calculée à partir des paramètres respiratoires de la souris, de la viabilité des spores, de la durée d'exposition. Il intègre les résultats des mesures expérimentales permettant de relier la concentration dans le nébuliseur et la concentration des spores dans l'air de la chambre d'exposition. Le détail du modèle est présenté dans la Figure 17.

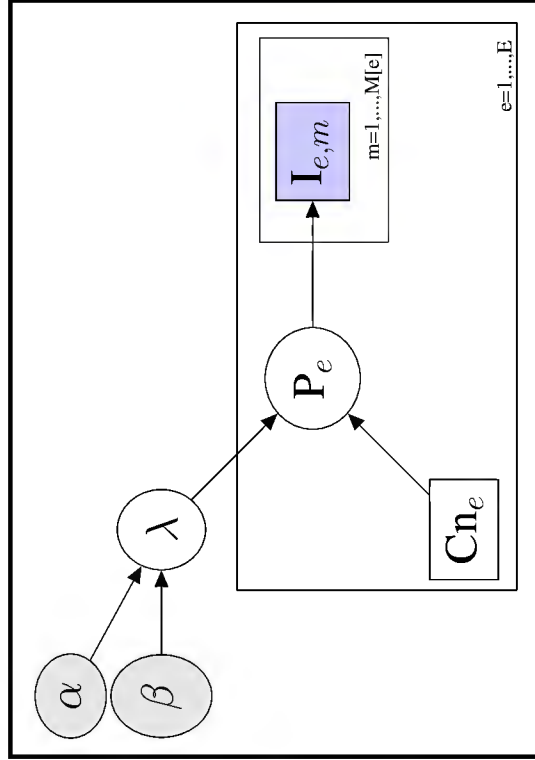
Le modèle exponentiel :

$$P_e = 1 - \exp(-\lambda \cdot Cn_e)$$

a été utilisé pour modéliser la relation entre la concentration de spores dans le nébuleuseur et la probabilité qu'une souris développe une aspergillose pulmonaire. Ce modèle comporte un seul paramètre,  $\lambda$ , qui représente la probabilité qu'une spore soit infectante. Une distribution *prior*e peu informative a été choisie pour  $\lambda$  :

$$\lambda \sim \text{beta}(0, 05; 10)$$

La dose d'exposition considérée par le modèle est la concentration de spores présente dans le nébuleuseur. Plusieurs doses ont été utilisées au cours des expérimentations avec le modèle expérimental présenté ci-dessus. Les concentrations utilisées ( $Cn_e$ ) sont comprises entre  $1,2 \cdot 10^4$  et  $6 \cdot 10^8$  spores/ml.



Le modèle  $\beta$ -Poisson :

$$P_e = 1 - \left(1 + \frac{Cn_e}{\beta}\right)^{-\alpha}$$

a été utilisé. Ce modèle à deux paramètres ( $\alpha$  et  $\beta$ ) est une évolution du modèle exponentiel dans lequel de la variabilité a été ajoutée au paramètre  $\lambda$  pour prendre en compte le fait que la probabilité que représente  $\lambda$  n'est pas la même pour toutes les spores et tous les hôtes. Utilisant la statistique bayésienne, le paramètre  $\lambda$  était déjà considéré comme variable dans le modèle exponentiel car sa distribution *prior*e était une bêta avec deux paramètres  $\alpha = 0,05$  et  $\beta = 10$ . Pour respecter l'idée du modèle bêta-Poisson, nous avons rendu encore plus aléatoire le paramètre  $\lambda$  en ne fixant pas les paramètres de la loi bêta qu'il suit :

$$\alpha \sim \text{uniforme}(0; 0, 11)$$

$$\beta \sim \text{uniforme}(0; 20)$$

10 jours après l'exposition les souris sont sacrifiées puis leurs poumons sont broyés afin de déterminer la présence d'une infection par culture et par dosage du galactomannane.

L'infection a été codée en 0 ou 1. Une souris prend la valeur 1 si les deux tests (culture fongique et GM) sont positifs ou la valeur 0 sinon. La distribution *prior*e choisie pour l'infection est donc une loi de Bernoulli :

$$I_{e,m} \sim \text{bernoulli}(P_e)$$

Figure 16 – Représentation sous forme de graphe orienté acyclique du modèle basé sur la concentration de spores dans le nébuleuseur. Les paramètres observés sont représentés par des rectangles tandis que les paramètres calculés par le modèle sont représentés par des cercles.

Comme pour le modèle basé sur la concentration de spores dans le nébuliseur (Figure 16), le modèle bêta-Poisson a été utilisé en ajoutant de la variabilité aux paramètres  $\alpha$  et  $\beta$  de la distribution de  $\lambda$ . Les distributions *prior*es suivies par ces deux paramètres sont les suivantes :

$$\alpha \sim \text{uniforme}(0; 1, 1)$$

$$\beta \sim \text{uniforme}(0; 20)$$

Le modèle exponentiel :

$$P_e = 1 - \exp(-\lambda \cdot QIS_e)$$

a été utilisé. La dose d'exposition est la Quantité Inhalée de Spores (QIS) par une souris. La probabilité qu'une spore inhalée par une souris soit infectante est représentée par le paramètre  $\lambda$ . Etant donné que cette probabilité est supérieure à la probabilité qu'une spore dans le nébuliseur soit infectante (cf. Figure 16), nous avons choisi une distribution *prior*e pour  $\lambda$  plus élevée :

$$\lambda \sim \text{beta}(0, 5; 10)$$

Dans ce modèle la dose d'exposition est la Quantité de Spores Inhalées par une souris ( $QIS_e$ ). Cette quantité de spores est calculée par la formule ci-dessous :

$$QIS_e = \nu \cdot \tau \cdot \theta \cdot \frac{10^{C_{c_e}}}{\rho}$$

- $\nu$  est la viabilité des spores nébulisées estimée en moyenne à  $65\% \pm 16$  (moyenne de 40 déterminations)
- $\tau$  est le volume d'air respiré par une souris par minute calculé à partir du nombre de mouvements respiratoires d'une souris par minute ( $\tau_1$ ) et du volume courant par mouvement respiratoire ( $\tau_2$ ) (données issues de la littérature)
- $\theta_e$  est la durée de chaque expérimentation (fixée à 60 minutes dans nos données)
- $\rho$  le rendement de l'appareil de mesure situé dans la chambre d'exposition. Les différentes distributions *prior*es utilisées sont les suivantes :

$$\nu \sim \text{uniforme}(0, 6; 0, 7)$$

$$\tau_1 \sim \text{normale}(267; 63, 5)$$

$$\tau_2 \sim \text{normale}(0, 14; 0, 03)$$

$$\tau = \tau_1 \cdot \tau_2 \cdot 10^{-3}$$

$$\theta = 60$$

$$\rho \sim \text{uniforme}(0, 55; 0, 75)$$

Les données d'infection utilisées dans ce modèle sont les mêmes que dans le modèle basé sur la concentration de spores dans le nébuliseur (Figure 16). Une souris prend la valeur 1 si les deux tests (culture fongique et GM) sont positifs ou la valeur 0 sinon. La distribution *prior*e choisie pour l'infection est donc une loi de Bernoulli :

$$I_{e,m} \sim \text{bernoulli}(P_e)$$

La concentration des spores dans la chambre d'exposition ( $C_{c_e}$ ) est calculée selon la formule suivante :

$$C_{c_e} = \mu \cdot C_{n_e}$$

où  $\mu$  est le coefficient de transformation entre la concentration de spores en solution et aérosolisées. Il tient compte des concentrations des spores mesurées dans le nébuliseur ( $C_n$ ) et dans l'air de la chambre d'exposition par le CIP-10M ( $C_m$ ),  $\mu$  a été déterminé à partir de :

- 15 expérimentations réalisées avec des souris ( $C_{n_e}$  et  $C_{m_e}$ )
- 9 expérimentations supplémentaires réalisées sans souris dans la chambre ( $C_{n_r}$  et  $C_{m_r}$ )

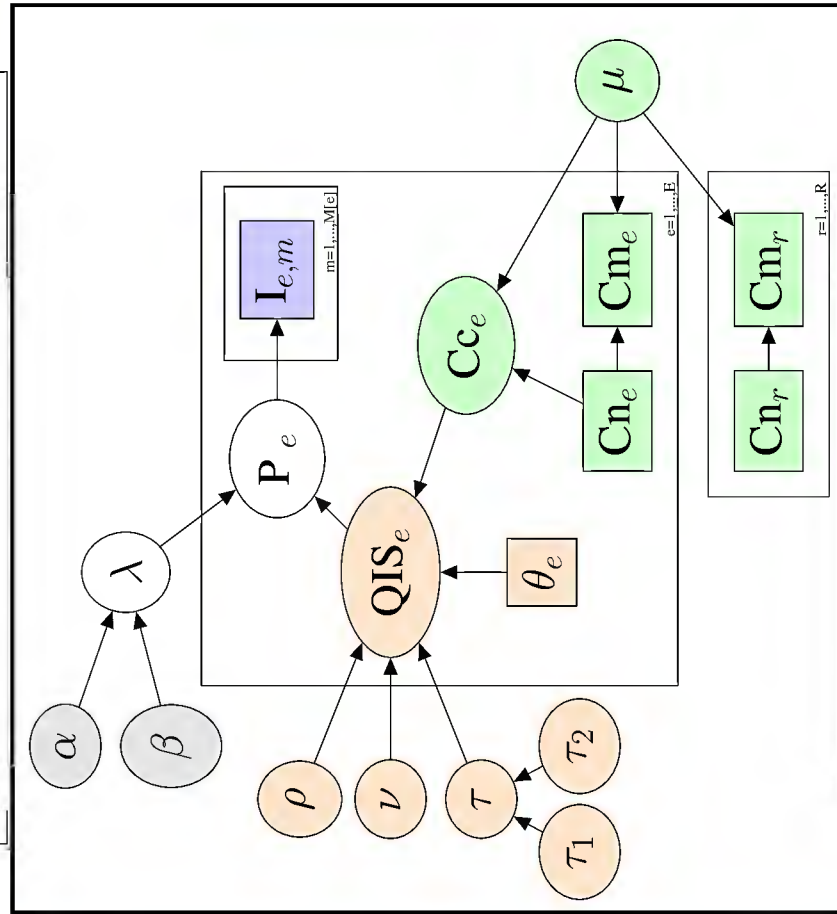


Figure 17 – Représentation sous forme de graphe orienté acyclique du modèle basé sur la quantité de spores inhalées par une souris. Les paramètres observés sont représentés par des rectangles tandis que les paramètres calculés par le modèle sont représentés par des cercles.



## 2.1.6. Principaux résultats

### 2.1.6.1. Résultats expérimentaux

- Les pourcentages de souris infectées en fonction de la concentration de spores utilisée dans le nébuliseur ont été déterminés (cf. Tableau II de l'article Risk Analysis) :

→ le nombre de souris infectées augmente avec l'augmentation de la concentration d'exposition.

→ aucune souris n'est infectée lorsque la concentration de spores est inférieure à  $10^8$  spores/ml.

→ un taux élevé et reproductible d'infection ( $>90\%$ ) est obtenu avec des concentrations supérieures à  $3,0 \cdot 10^8$  spores/ml.

- La cinétique de la concentration de spores dans l'air de la cage a été caractérisée (cf. Figure 4 de l'article Risk Analysis), montrant que celle-ci devient stable en quelques minutes. Cette observation était inattendue car la nébulisation était maintenue pendant 60 minutes, mais elle peut s'expliquer par l'absorption des spores par le filtre HEPA. Ceci nous a avantageusement permis d'obtenir une concentration stable pendant l'exposition et de limiter une cause de variabilité.

- 15 concentrations de spores dans l'air de la chambre d'exposition ont été mesurées en fin d'exposition pour différentes concentrations de spores dans la suspension nébulisée.

Ces données ont été utilisées pour la construction des distributions *posteriores* dans les deux configurations expérimentales, en évaluant comparativement les résultats obtenus avec le modèle exponentiel et le modèle bêta-Poisson.

### 2.1.6.2. Modélisation de la dose-réponse

#### a. Modèle basé sur la concentration de spores dans le nébuliseur

La relation dose-réponse obtenue grâce au modèle basé sur la concentration de spores dans le nébuliseur est présentée par la Figure 18. Les Figures 18.A et 18.B montrent respectivement les relations dose-réponse issues des modèles exponentiel et bêta-Poisson. Par définition, et du fait qu'elle comporte deux variables, on peut remarquer que la distribution *prior*e du modèle bêta-Poisson est plus large que celle du modèle exponentiel. Cependant, malgré cet apport de variabilité tenant compte de la relation entre l'hôte et le pathogène, la confrontation avec les données conduit à une distribution *postérieure* similaire pour les deux modèles. A partir de ces résultats, nous avons pu calculer la concentration de spores de la solution nébulisée nécessaire pour infecter 50% des souris à  $1,4 \cdot 10^8$  [ $CI_{95}$  :  $1,1 \cdot 10^8$  ;  $1,8 \cdot 10^8$ ] spores/ml pour les deux modèles.

#### b. Modèle basé sur la quantité de spores inhalées par une souris

La relation dose-réponse modélisée à partir de la quantité de spores inhalées par une souris est représentée dans la Figure 19. Comme pour le modèle basé sur la concentration de spores dans le nébuliseur, la distribution *prior*e du modèle bêta-Poisson (Figure 19.B) est plus large que celle du modèle exponentiel (Figure 19.A), mais les distributions *posteriores* sont très proches entre les deux modèles (les valeurs sont détaillées dans le tableau III de l'article Risk Analysis).

Dans ce modèle, la dose infectant 50% des souris a été calculée à  $1,8 \cdot 10^4$  [ $CI_{95}$  :  $0,7 \cdot 10^4$  ;  $3,6 \cdot 10^4$ ] spores viables inhalées.

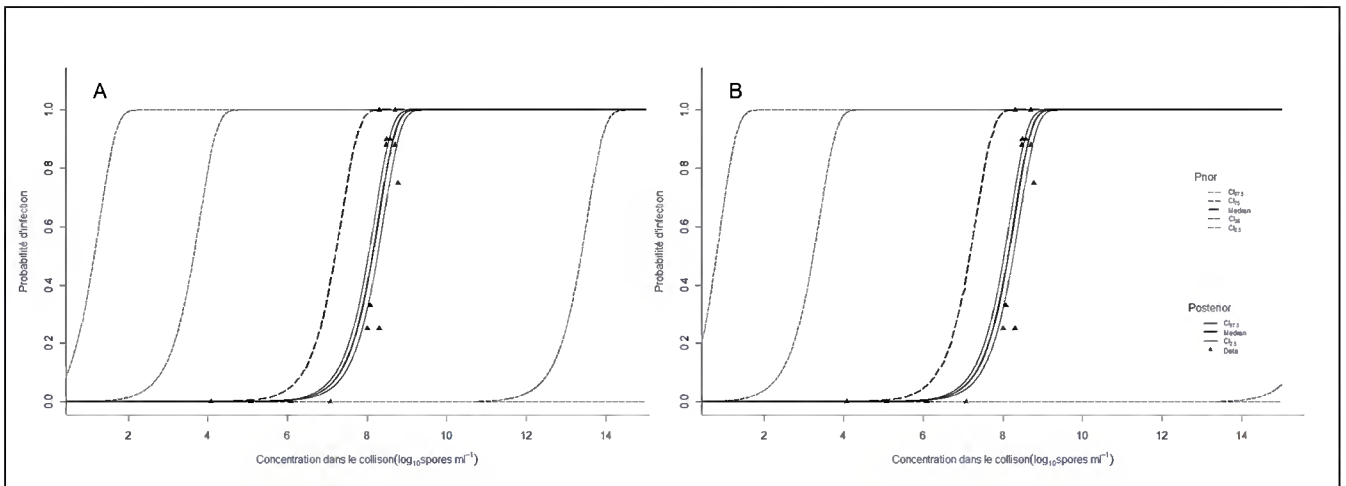


Figure 18 – Distributions *a priori* (Médiane, percentiles 2.5, 25, 75 et 97.5) et *a posteriori* (Médiane et percentiles 2.5 et 97.5) de la relation dose-réponse entre la concentration de spores dans le nébuliseur et la probabilité d’infection. **A**-Modèle exponentiel. **B**-Modèle bêta-Poisson.

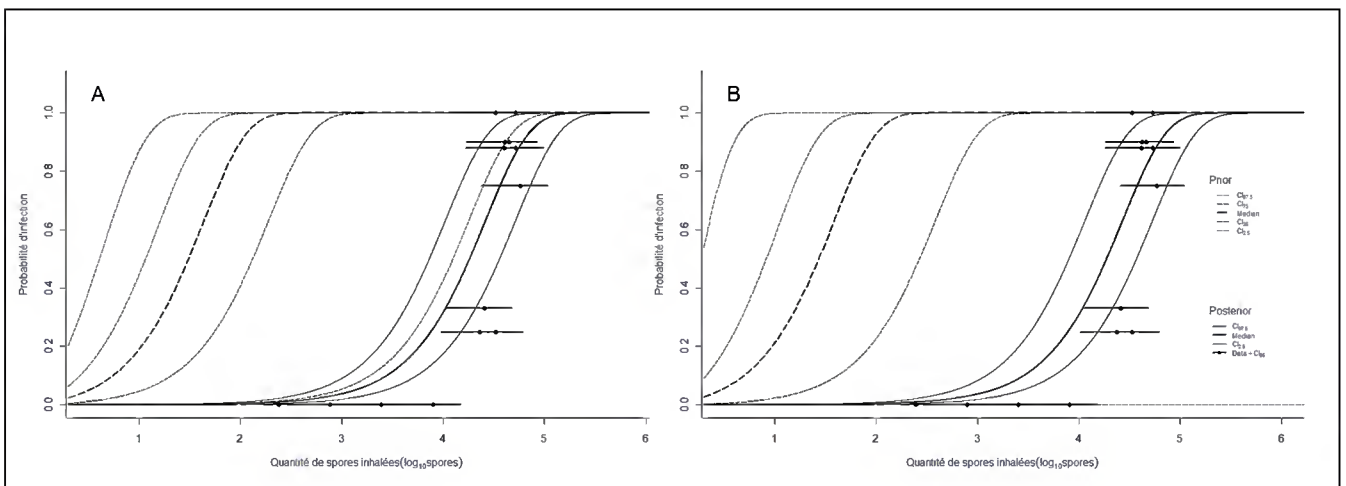


Figure 19 – Distributions *a priori* (Médiane, percentiles 2.5, 25, 75 et 97.5) et *a posteriori* (Médiane et percentiles 2.5 et 97.5) de la relation dose-réponse entre la Quantité de spores inhalées par une souris et la probabilité d’infection. **A**-Modèle exponentiel. **B**-Modèle bêta-Poisson.

### **2.1.7. Conclusion**

La modélisation expérimentale et statistique de l'aspergillose invasive est complexe car elle fait intervenir de nombreux paramètres, en particulier ceux qui sont liés à l'exposition. En permettant de prendre en compte cette complexité et d'intégrer l'incertitude et la variabilité des principaux paramètres intervenant dans l'infection, l'analyse bayésienne est tout à fait adaptée à cette modélisation. Il n'en demeure pas moins que les données expérimentales restent fondamentales pour faire évoluer le modèle et affiner ses estimations.

A partir des modèles animaux préalablement décrits dans la littérature, nous avons mis au point un modèle d'exposition de souris immunodéprimées à un aérosol de spores d'*A. fumigatus*. Ce dispositif expérimental a permis d'obtenir des infections pulmonaires validées, avec une bonne reproductibilité. Cette étape de base a pu être bien maîtrisée et standardisée au laboratoire, permettant d'aborder l'étude de la relation entre exposition et infection.

Les deux approches de modélisation que nous avons proposées se sont avérées complémentaires par les informations qu'elles apportent.

Le modèle basé sur la concentration de spores dans le nébuliseur permet de maîtriser les conditions expérimentales, en se basant sur une donnée facilement mesurable au laboratoire, sans avoir recours aux mesures dans l'air. Ceci permet d'assurer une bonne reproductibilité au modèle, et représente une étape préalable indispensable à toute étude fondamentale sur la pathogénie de l'aspergillose invasive ou de thérapeutique expérimentale. Le deuxième modèle a permis d'apprécier la relation entre la dose d'exposition et la survenue d'une aspergillose invasive. A notre connaissance, cette relation et les informations quantitatives qu'elle fournit sur la dose infectante n'avaient jamais été caractérisées dans des conditions proches des conditions naturelles d'infection et en utilisant une souche de référence.

### **2.1.8. Article**



**Bayesian development of a Dose-Response Model for  
*Aspergillus fumigatus* and invasive aspergillosis.**

Journal:	<i>Risk Analysis</i>
Manuscript ID:	RA-00014-2012.R1
Wiley - Manuscript type:	Original Research Article
Key Words:	<i>Aspergillus fumigatus</i>, Dose-response, Bayesian inference

SCHOLARONE™  
Manuscripts

Peer Review

1

**Decision Letter (RA-00014-2012.R1)**

**From:** mrg@rci.rutgers.edu

**To:** christopher.leleu@etu.upmc.fr

**CC:** haas@drexel.edu

**Subject:** Risk Analysis Manuscript Decision

**Body:** RA-00014-2012.R1

Bayesian development of a Dose-Response Model for *Aspergillus fumigatus* and invasive aspergillosis.

Dear Mr. Christopher Leleu,

After a careful review of your paper, I have concluded that minor revisions are necessary before it can be considered for publication. Please refer to the comments from the reviewers below, and submit the revised manuscript through manuscript central: (<http://mc.manuscriptcentral.com/riskanalysis>).

Sincerely,

Dr. Michael Greenberg  
Editor-In-Chief

2

3

1 **ABSTRACT**

2

3 Invasive aspergillosis (IA) is a major cause of mortality in immunocompromised hosts, most  
4 often consecutive to the inhalation of spores of *Aspergillus sp.* However, the relationship  
5 between *Aspergillus* concentration in the air and the probability of IA is not quantitatively  
6 known. In this study, this relationship was examined in a murine model of IA.  
7 Immunosuppressed Balb/c mice were exposed for 60 minutes at day 0 to an aerosol of *A.*  
8 *fumigatus* spores (Af293 strain). At day 10, IA was assessed in mice by quantitative culture  
9 of the lungs and galactomannan dosage. Fifteen separate nebulizations with varying spore  
10 concentrations ( $1.2 \times 10^4$  to  $6 \times 10^8$  spores.ml<sup>-1</sup>) were performed.

11 Rates of IA ranged from 0 to 100% according to spore concentrations. The dose-response  
12 relationship between the probability of infection and spore exposure was approximated  
13 using the exponential model and the more flexible beta-Poisson model. *Prior* distributions of  
14 the parameters of the models were proposed then updated with data in a Bayesian  
15 framework. Both models yielded very close *posterior* distributions for the main parameter of  
16 the model either when the exposure dose was the concentration in the nebulized  
17 suspension or was the estimated quantity of spores inhaled by a mouse during the  
18 experiment. In both models, the median infective dose was  $1.4 \times 10^8$  [CI<sub>95</sub>:  $1.1 \times 10^8$ - $1.8 \times 10^8$ ]  
19 spores.ml<sup>-1</sup> in the nebulizer suspension and  $1.8$ - $1.9 \times 10^4$  [CI<sub>95</sub>:  $0.7 \times 10^4$ - $3.7 \times 10^4$ ] inhaled  
20 spores. This study provides a dose-response parameter for quantitative assessment of the  
21 relationship between airborne exposure to the reference *A. fumigatus* strain and probability  
22 of IA in immunocompromised hosts.

23

24 **Keywords**

25 *Aspergillus fumigatus*, Aspergillosis, dose-response, mouse model, Bayesian inference

26

27

1 **1. INTRODUCTION**

2 *Aspergillus* is a very prevalent airborne fungal pathogen, causing a wide range of diseases  
3 in immunocompetent and immunocompromised patients (1). Approximately 200 different  
4 species of *Aspergillus* can be found in the environment. *Aspergillus* spp are commonly  
5 isolated from the soil, plant debris and indoor environment, including hospitals (2). They  
6 sporulate abundantly and release in air large amounts of microscopic conidia (syn. spores),  
7 the concentration of which can exceed  $10^6$  conidia/m<sup>3</sup> in damp or highly contaminated  
8 environments (3). Only few *Aspergillus* species are known to be pathogenic for man, among  
9 which *A. fumigatus* is responsible for approximately 90% of human infections (4).

10 The main portal of entry and site of infection for *A. fumigatus* is the respiratory tract (5).  
11 Depending on the status of the host's immune system, *Aspergillus* spp may cause a variety  
12 of pulmonary diseases, ranging from hypersensitivity allergic diseases in atopic patients to  
13 invasive pulmonary aspergillosis (IA) in profoundly immunocompromised patients. Inhalation  
14 of conidia by immunocompetent individuals has usually no or limited adverse effects (5).

15 The increasing incidence of IA in the last decades (1, 6), attested by the constant report of  
16 nosocomial outbreaks (7, 8) has become a major concern in terms of management of  
17 patients at risk and prevention of exposure (8-10). Host related risk factors for IA are well  
18 recognized, mainly prolonged neutropenia or neutrophil dysfunction, prolonged and high  
19 dose corticosteroid therapy, lung and bone marrow transplantation, hematologic malignancy  
20 and cytotoxic therapy (6). Environmental risk factors are those related to activities yielding  
21 high concentration of spores in the air. A recent review of 60 outbreaks of IA showed that  
22 most of them resulted from contamination of the air due to building activities in the hospital.  
23 Even reconstruction at sites remote from the patient's accommodation may increase the risk  
24 of infection (7, 8). In non epidemic situations, the relationship between environmental  
25 contamination and incidence of IA has been shown in some clinical studies (11-13). Some  
26 attempts were made to estimate a threshold concentration that could be related to a higher  
27 risk of IA, but there were major discrepancies in the estimates (11, 13, 14) and none of these  
28 studies allowed establishing a real quantitative relationship between exposure and infection.

1 Several experimental animal models have been developed to explore the pathogenesis of *A.*  
2 *fumigatus* and identify critical factors for the development of IA (3, 5, 15-18). However, we  
3 could not find in the literature sufficient information for estimating the parameters of the  
4 relationship between exposure and IA.

5 In this study, *in vivo* experiments were conducted in immunocompromised mice exposed to  
6 aerosols of *A. fumigatus* spores at various concentrations, then the relationship between  
7 exposure and occurrence of IA was statistically modeled through a Bayesian approach.

8

## 9 **2. MATERIALS and METHODS**

### 10 **2.1. Experimental aspergillosis**

#### 11 *2.1.1. Aspergillus strain and spore production*

12 The reference Af293 strain of *A. fumigatus* (19) was used for all experiments. It was grown  
13 on Sabouraud-Chloramphenicol agar Petri dishes at 28°C for 7 days. Conidia were then  
14 harvested by rinsing the culture with sterilized water containing 0.002% Tween 80. On the  
15 day before mice exposure, the collected suspension was centrifuged at 3000 g for 15 min,  
16 then the pellet was resuspended in water containing 0.002% Tween 80 and filtered through  
17 a sterile sieve to eliminate remaining agar debris. The purified spore suspension was  
18 counted using a Malassez hemacytometer and adjusted to the final required concentration  
19 for nebulization. Spores were aerosolized using a Collison Nebulizer (BGI, Waltham, MA,  
20 USA) provided by compressed air at a 2-bars pressure. Using a particle counter we checked  
21 that less than 5% of particles >5µm were detected in the aerosol, suggesting that very few  
22 spores clustered during nebulization. The generated aerosol was connected to an exposure  
23 chamber (40 x 40 x 20 cm) which upper part consists of a removable 40 x 40 x 5 cm high-  
24 efficiency particulate air (HEPA) filter (Camfil MEGALAM filter MD14, Camfil Farr, La  
25 Garenne Colombes, France).

26

27

28

1 *2.1.2. Characteristics of the fungal spore aerosol in the exposure chamber*

2 • Spore concentration

3 Since the spore concentration in the nebulizer only provided an indirect estimate of  
4 exposure, we examined the concentrations of spores in the aerosol chamber according to  
5 time and concentration in the nebulizing suspension. This was done separately of mice  
6 experiments, because repeated samplings would have markedly altered the spore  
7 concentration in the exposure chamber and the conditions of mouse exposure. In each  
8 experiment, 10 liters of air of the exposure chamber were sampled after a defined time of  
9 nebulization, using a CIP 10-M liquid sampler (Arelco, Fontenay-sous-bois, France) loaded  
10 with 1 ml of sterile water, then spores were enumerated in the collected material using a  
11 Malassez hemacytometer. One experiment was performed after 5 min of nebulization then  
12 repeated separately with the same spore suspension for 10, 20, 30, 45 and 60 minutes of  
13 nebulization. This experimental set was repeated 9 times with concentrations in the  
14 nebulizer ranging from  $1 \times 10^6$  to  $5 \times 10^7$  spores.ml<sup>-1</sup>.

15 A simple linear regression model was used to test time and concentration effect on the  
16 spore concentration in the exposure chamber. Statistical significance was accepted at  
17  $p < 0.05$ .

18 • Viability of spores

19 Spores collected into the exposure chamber were counted microscopically then cultured on  
20 Sabouraud-Chloramphenicol agar Petri dishes. The spore viability (%) was estimated as the  
21 ratio between the number of colonies and the number of spores.

22

23 *2.1.3. Mouse exposure to Aspergillus spores*

24 Animal experiments were performed in accordance with prevailing regulations regarding the  
25 care and use of laboratory animals from the European Commission (20). Experimental  
26 conditions were adapted from those described by Sheppard et al. (21, 22). Adult BALB/c  
27 female mice weighing 18-20g (Charles Rivers, Lyon, France) were immunosuppressed with  
28 a combination of cyclophosphamide 200 mg/kg and cortisone acetate 250 mg/kg



## Risk Analysis

1 administered prior to exposure at day-3 and post exposure at day+3. At day 0, each mouse  
2 was introduced into an individual wire-mesh cage (7 x 2 x 2 cm), and then placed into the  
3 exposure chamber. Fifteen experiments were performed with groups of 6 to 12 mice  
4 exposed for 60 minutes to aerosols generated from a spore concentration in the nebulizer  
5 ranging from  $1.2 \times 10^4$  to  $6 \times 10^8$  spores.m<sup>-1</sup>. Each experiment comprised 3 to 7  
6 immunosuppressed non-exposed control mice. From initiation to immunosuppression and  
7 until the end of the experiment, mice were housed under sterile conditions and received  
8 antibiotics in the drinking water (Doxycycline 1 mg/ml) to prevent bacterial infections.

9

### 10 2.1.4. Assessment of infection in mice

11 At day 10 post infection, mice were euthanized. The whole lung was collected aseptically  
12 then homogenized with a tissue grinder (Ultra Turrax, Staunfen, Germany) in 2ml of sterile  
13 PBS. One part of this homogenate (1ml) was plated onto Sabouraud-chloramphenicol Petri  
14 dishes for quantitative fungal culture and one part was centrifuged at 10,000g for 15 min.  
15 The *Aspergillus* galactomannan (GM) antigen was quantified in the supernatant fluid using a  
16 sandwich immunocapture ELISA technique (Platelia *Aspergillus* EIA, Bio-Rad, Marnes-la-  
17 Coquette, France). Results were considered positive if the index value was  $\geq 0.4$ , based on  
18 preliminary data ranging between 0.06 and 0.37 and showing a mean value ( $\pm$  sd) of 0.14 ( $\pm$   
19 0.06) in 63 non-infected mice (**Fig 1**). Based on these determinations, we considered that  
20 mice presenting both a positive lung culture and a positive antigen test had a proven IA.

21 In several experiments, some exposed mice died before day 10 and lungs could not be  
22 examined by culture or antigen. However, we considered that mice dying after day 6 had  
23 died from aspergillosis and not from drug toxicity since none of the 29 control mice receiving  
24 the same immunosuppressive drugs and unexposed to *Aspergillus* died (data cumulated  
25 from separate experiments).

26

27

28

## 1 **2.2. Analysis method**

### 2 *2.2.1. Statistical analysis*

3 A Bayesian approach was used to model the probability of infection (P) according to the  
4 spore exposure. The dose-response relationship between the probability of infection and the  
5 spore exposure was approximated using both the single parameter exponential model (23)  
6 and the two parameters beta-Poisson model, as previously ~~described~~ used for other  
7 airborne pathogens (24-27). The exponential dose-response model is given by :

$$8 \quad P(d) = 1 - \exp(-\lambda d)$$

9 where  $P(d)$  is the probability of IA at the dose  $d$ , and  $\lambda$  is the probability that one spore can  
10 initiate infection. The commonly invoked underlying assumptions of the exponential dose-  
11 response model are that organisms have independent and identical probability of causing  
12 the infection; and that organisms are Poisson distributed among replicate doses.

13 With the beta-Poisson model, an additional variability was introduced for  $\lambda$  to take into  
14 account the host-pathogen variability. In a Bayesian approach this consisted in introducing  
15 an additional variability, modeled by a hierarchy of two parameters  $\alpha$  and  $\beta$ , upon the  
16 distribution of  $\lambda$ .

17 From *priors* and experimental data, we calculated *posterior* distribution of the model  
18 parameters. Markov Chain Monte Carlo (MCMC) methods based on the Gibbs sampling  
19 algorithm implemented in JAGS 3.1.0 (28) were used to characterize the uncertainty and  
20 variability of the exposure model parameters. Results were analyzed with R 2.12.1 ([www.r-](http://www.r-project.org)  
21 [project.org](http://project.org)) and R package coda (29). We performed 1,000,000 iterations for each run of  
22 the MCMC algorithm. The first 10,000 iterations were discarded as the burn-in period. The  
23 output was then recorded one every 100 iterations to constitute an independent sample  
24 from the *posterior* distribution. The convergence of the MCMC was checked with the  
25 Gelman-Rubin criterion (GRC) (30): 3 chains were run with different initial values; the GRC  
26 was estimated for each parameter. A value close to 1 (under 1.1) is a sign of convergence.

27

1 2.2.2. Modeling the exposure dose (*d*)

2 The dose of exposure (*d*) was evaluated by two complementary ways: i) by using the  
 3 concentration that was measured in the nebulizer suspension; ii) by estimating the quantity  
 4 of spores inhaled by a mouse during the experiment. The first approach simulates the most  
 5 usual experimental conditions, *i.e.* measurement of the spore concentration in the nebulizing  
 6 suspension, but not in the aerosol because this determination cannot be performed in real  
 7 time and is subject to variations due to the performance of the sampler. The second is more  
 8 adapted to the natural conditions of infection and pathogenesis of IA.

9 • *Dose-response model based on the spore concentration in the nebulizer (model C)*

10 In this simple Bayesian network (**Fig 2.C**), we selected a beta distribution (0.05,10) as *prior*  
 11 for the unique parameter of the exponential model,  $\lambda$  (named  $\lambda_{exp}^C$  in this model) (**Table I**).  
 12 This distribution was not too restrictive because of the lack of information on spore  
 13 infectivity. The focus on lower probabilities was assumed because of the probable loss of  
 14 spores during the nebulization step, in the tubing and on the walls or filter of the exposure  
 15 chamber and because of the dispersion of spores in the chamber.

16 In the beta-Poisson model, a uniform distribution was assigned to the parameters  $\alpha^C$  and  $\beta^C$   
 17 that were chosen to extend the variability of  $\lambda$  (named  $\lambda_{\beta P}^C$  in this model) (**Table I**).

18 • *Dose-response model based on inhaled spores ( model Q)*

19 In this more complex network (**Fig 2.Q**), a modeled quantity of inhaled spores (*Q/S*) was  
 20 used as the dose. In the exponential model, a beta distribution was selected for  $\lambda$  (named  
 21  $\lambda_{exp}^Q$  in this model) to focus on low probabilities but not excluding higher probabilities since  
 22 we used immunocompromised animals. We assumed that the probability of one aerosolized  
 23 spore to be infective was markedly higher in this model than in the model based on *Cn* and  
 24 we chose a higher *prior* distribution for  $\lambda_{exp}^Q$  with a beta(0.5,10).

25 For the beta-Poisson model, a new uniform distribution was assigned to  $\alpha^Q$  and  $\beta^Q$  used to  
 26 estimate the variability of  $\lambda$  (named  $\lambda_{\beta P}^Q$  in this model) (**Table I**).

## Risk Analysis

1 In order to infer the  $QIS$ , several parameters were added to the model, of which the most  
2 important one was the actual (but unobserved) concentration in the exposure chamber  $C_c$ .  
3 This concentration can obviously be related to  $C_n$ , but the relationship between  $C_n$  and  $C_c$  is  
4 largely unknown, depending on the multiple physical factors that result in aerosolization of  
5 spores and in their dispersion into the chamber during nebulization. Therefore, we modeled  
6 this relationship as  $C_c = \mu \times C_n$ , and conducted several additional experiments to estimate  
7 the variability of  $\mu$ . Preliminary experiments showed that the count of particles in the  
8 chamber was a poor surrogate to estimate the spore concentration in the chamber.  
9 Therefore, we used concentrations of spores in the chamber ( $C_m$ ), as determined with the  
10 CIP-10M sampler, and estimated its variation during nebulization. One set of data was  
11 obtained from measurements performed at the end of each exposure experiment with mice  
12 ( $C_{m_e}$ ). The second set of data comes from the measurements performed on separate  
13 repeated experiments after 5 to 60 min of nebulization ( $C_{m_r}$ ), in order to characterize the  
14 kinetics of spore concentration in the chamber. Since those experiments were conducted  
15 with the CIP 10-M impactor, the efficiency of this biocollector ( $\rho$ ) to collect 2-3 micron  
16 particles (*i.e.* *A. fumigatus* spore size) was taken into account, using an estimated value of  
17 65% [55;75] as previously determined (31).

18 Additional parameters were introduced in the calculation of the  $QIS$ , as the viability of spores  
19 after nebulisation,  $v$ , the mice breathing volume,  $\tau$ , and the duration of the exposure,  $\theta$ . The  
20 viability of spores in the chamber was estimated at 65% ( $\pm 16$ ) from 40 separate  
21 determinations (**Fig 3**). From reference mice breathing parameters issued from the literature  
22 (32), a respiratory rate value of 267 ( $\pm 127$ ) breaths/min and a tidal volume value of 0.14 ( $\pm$   
23 0.06) ml were retained, assuming that these parameters remained in these ranges during  
24 the experiments (60 minutes).

25

26

27

### 1 3. RESULTS

#### 2 3.1. Experimental data

3 Data on the kinetics of spore concentrations in the exposure chamber are presented in  
4 **Fig 4**. For all nebulized concentrations, the spore concentration in the air of the chamber  
5 sharply increased between 0 and 5 min, reaching a plateau value that was maintained until  
6 60 min. Between 5 and 60 min a linear relationship between spore concentrations and time  
7 was observed, with slopes of the regression lines not significantly different from 0 ( $p=0.72$ ).  
8 Increasing the concentration of spores in the nebulizer had a significant effect on the  
9 concentration of spores in the exposure chamber ( $p<0.001$ ). This means that, at a given  
10 nebulizing concentration, the concentration in the exposure chamber was almost constant  
11 after 5 minutes. We assumed that this “plateau effect” was due to the fact that the upper  
12 part of the chamber was constituted by a large HEPA filter in which the spores were trapped  
13 as a consequence of the overpressure generated by the nebulization in the chamber. From  
14 this experiment, we assumed that the spore concentration at 60 min was a reasonable  
15 estimate of the concentration to which mice were actually exposed during all the  
16 experiment.

17 The results of experimental aspergillosis in mice are summarized in **Table II**. Rates of IA  
18 ranged between 0 and 100% according to the applied spore concentrations. For infective  
19 concentrations, the rate of IA increased with increasing concentration of spores in the  
20 nebulizer or in the exposure chamber.

21

#### 22 3.2. Models of dose-response

##### 23 3.2.1. Model based on the concentration in the nebulizer (model C)

24 In a first approach, the exponential dose-response model was used with the concentration in  
25 the nebulizer as the dose of exposure. **Table III** illustrates *prior* and *posterior* values of the  
26 parameter  $\lambda_{exp}^C$ . We obtained an informative *posterior* description for  $\lambda_{exp}^C$  from the relatively  
27 uninformative  $\text{beta}(0.05,10)$  *prior*. The median value and the 95% credible interval ( $CI_{95}$ ) of

## Risk Analysis

1  $\lambda_{exp}^C$  in the *posterior* distribution was estimated at  $5.0 \times 10^{-9}$  [CI<sub>95</sub>:  $3.8 \times 10^{-9}$ ;  $6.5 \times 10^{-9}$ ]. This  
2 distribution was used to draw the dose-response relationship between the concentration in  
3 the nebulizer and the probability of infection (**Fig 5.C<sub>exp</sub>**).

4 In the beta-Poisson dose-response model, the addition of  $\alpha^C$  and  $\beta^C$  resulted in a broad *prior*  
5 distribution of  $\lambda_{\beta P}^C$  compared to  $\lambda_{exp}^C$  but yielded a similar estimation of the *posterior*  
6 distributions with respect to the exponential model (**Table III**). The dose-response  
7 relationship obtained from these parameters is presented on **Fig 5.C<sub>βP</sub>**. Since the *prior*  
8 distribution of  $\lambda_{\beta P}^C$  was broader than the *prior* distribution of  $\lambda_{exp}^C$ , more variability was  
9 obtained in the *prior* distribution of the dose-response function as it is shown in the **Fig**  
10 **5.C<sub>exp</sub>** compared to **5.C<sub>βP</sub>**. Despite these *prior* differences, *posteriors* were almost identical  
11 in the two models.

12 Plotting the infection rates on the dose-response curves suggests a good fit between the  
13 *posterior* function and the experimental data for both exponential and beta-Poisson models  
14 (**Fig 5.C<sub>exp</sub>** and **5.C<sub>βP</sub>**). From these results, the concentration in the nebulizer necessary to  
15 infect 50% of mice was estimated at  $1.4 \times 10^8$  spores.ml<sup>-1</sup> in both models (**Table IV**). This  
16 result shows that most of the spores of the suspension were not infective for mice, probably  
17 because most of them are not aerosolized or are not inhaled by mice. However, the  
18 *posterior* distribution of  $\lambda_{exp}^C$  and the narrow credible interval of the dose response  
19 relationships obtained with this parameter indicate a low uncertainty, allowing to provide a  
20 good estimate of the rate of IA from a given spore concentration in the nebulizer.

21

### 22 3.2.2. Model based on quantity of inhaled spores (model Q)

23 In a second approach, the exponential model was applied with  $d$  as the quantity of inhaled  
24 spores ( $Q/S$ ). In this approach, the estimation of the actual concentration in the exposure  
25 chamber ( $C_c$ ) was a critical point. To assess this element we estimated the relationship  
26 between the concentration of spores in the nebulizer ( $C_n$ ) and the concentration that was  
27 measured in the exposure chamber ( $C_m$ ). Taking into account other parameters interfering

1 with the spore concentration, their viability and the mouse respiratory parameters, we could  
2 estimate  $\lambda_{exp}^Q$ , which *prior* and *posterior* distributions are presented on **Table III**. In the  
3 *posterior* distribution, the median value of  $\lambda_{exp}^Q$  was evaluated to  $3.8 \times 10^{-5}$  [CI<sub>95</sub>:  $1.9 \times 10^{-5}$  ;  
4  $5.1 \times 10^{-5}$ ]. Finally, a dose-response relationship based on *QIS* was obtained (**Fig 5.Q<sub>exp</sub>**).  
5 The modelisation of the dose-response relationship based on *QIS* was also performed using  
6 the beta-Poisson model. As for the model based on *Cn* a broader *prior* distribution was  
7 chosen for  $\lambda_{\beta P}^Q$ , but the *posterior* distribution was in the same range than in the exponential  
8 model. The median of  $\lambda_{\beta P}^Q$  was estimated at  $3.7 \times 10^{-5}$  [CI<sub>95</sub>:  $8 \times 10^{-5}$  ;  $9.0 \times 10^{-5}$ ]. *Prior* and  
9 *posterior* of dose-response curves are presented on **Fig 5.Q<sub>exp</sub>-Q<sub>βP</sub>**. As for the model based  
10 on *Cn*, the range of the *prior* distribution was wider in the beta-Poisson model than in the  
11 exponential model but the *posterior* distributions were almost similar in both models. The  
12 median infectious dose was approximated at  $1.8 \times 10^4$  inhaled spores in the exponential  
13 model and at  $1.9 \times 10^4$  in the beta-Poisson model (**Table IV**).

14

#### 15 **4. DISCUSSION**

16 Animal models of invasive aspergillosis have significantly contributed to improve our  
17 knowledge on pathogenesis and virulence of *Aspergillus*. They are also currently used for  
18 assessing the efficacy of antifungal drugs. However, the lack of standardization of these  
19 models has been highlighted, warranting improvement on several key aspects of  
20 experimental infections (5, 33). This includes standardization of the inoculum, giving  
21 advantage to aerosol exposure as a more “natural” mode of contamination which results in a  
22 more homogeneous pulmonary infection compared to intranasal instillation (16). Therefore,  
23 modeling the dose-effect relationship for *Aspergillus fumigatus* in an aerosol model of  
24 invasive aspergillosis was our main objective. For this purpose, we selected the reference  
25 and sequenced Af293 strain of *A. fumigatus* (19), the recommended aerosol route of  
26 exposure and we used a mouse model that combined neutropenia and corticoid  
27 administration, *i.e.* two co-morbidity factors for IA in immunocompromised patients. We paid

## Risk Analysis

1 a specific attention to exposure conditions, spore viability and estimation of the inhaled dose  
2 over the time period of exposure, and we used two methods to assess the fungal infection in  
3 the lungs of exposed mice.

4 Because the aerosol model is complex and comprises several interacting factors, a  
5 Bayesian approach was used to estimate the probability of infection according to the spore  
6 exposure. Markov Chain Monte Carlo (MCMC) simulations were used to characterize the  
7 uncertainty and variability of the exposure model parameter. Such an approach has already  
8 been used for estimating the dose-response relationship for waterborne and foodborne  
9 pathogens (34-37). Indeed, dose-response models based on data sets of experimental  
10 infections have already been developed for airborne pathogens, (24-27, 38), but, to our  
11 knowledge, not for airborne transmitted fungi like *Aspergillus*. The dose-response  
12 relationship between the probability of infection and spore exposure was approximated  
13 using the single parameter exponential model, assuming that organisms are Poisson  
14 distributed among replicate doses and have independent and identical probability of causing  
15 the infection. Such assumption is supported by the fact that spores were not aggregated in  
16 the suspension containing Tween and in the aerosol which granulometry did not exceed  
17 5 $\mu$ m. The beta-Poisson model, was also inferred in order to better account the intrinsic  
18 variability in host-spore interaction (39). In a Bayesian approach this consisted in introducing  
19 an additional variability, modeled by a hierarchy of two parameters  $\alpha$  and  $\beta$ , upon the  
20 distribution of  $\lambda$ . Compared to the exponential model, this resulted in higher variability of the  
21 distribution of the *prior* of  $\lambda$  (**Table III, Fig 5**).

22 Despite the marked difference in the variability range of the *priors*, both the exponential and  
23 beta-Poisson models yielded close *posterior* distribution of  $\lambda^C$  in the model where  $d$  was the  
24 concentration in the nebulized suspension and of  $\lambda^Q$  in the model using  $d$  as the estimated  
25 quantity of spores inhaled by a mouse during the experiment. Similarly, the two estimates of  
26 the concentration in the nebulizer and the two estimates of the amount of inhaled spores



## Risk Analysis

1 that yielded 50% of infections were very similar in the two models. Such similarity may be  
2 explained by the weight and the consistence of the data for the estimation of the *posterior*.  
3 Information obtained from our dose-response models has several implications, either as a  
4 practical support for experimental models of IA and for estimating the infectivity of inhaled  
5 spores of *Aspergillus*.  
6 Establishing the relationship between the spore concentration in the nebulizing suspension  
7 and the rate of IA has a very pragmatic application for experimental studies since the  
8 determination of a spore concentration in a liquid suspension is easy to determine, by  
9 contrast to a determination in an aerosol. The low credible interval of the dose response  
10 curve obtained with this parameter suggests that the determination of the spore  
11 concentration in the nebulizing suspension is reliably predictive for the rate of infection  
12 exposed mice.  
13 Modeling the relationship between the spore concentration in the nebulizing solution and in  
14 the aerosol then combining exposure parameters with spore viability and respiratory  
15 parameters allowed to establish a relationship between the amount of inhaled viable spores  
16 and the infection rate. This allowed estimating the cumulative exposure dose for infecting  
17 50% (ID<sub>50</sub>) of mice between  $6 \times 10^3$  and  $3.1 \times 10^4$  viable spores. In two other studies performed  
18 with an aerosol model, the challenge dose has been determined from the number of colony-  
19 forming units (CFU) recovered from the lungs (18, 21), but not in the aerosol. In one study,  
20 pulmonary challenges of  $2.2$  to  $2.9 \times 10^3$  were found infective in neutropenic and  
21 corticosteroid treated mice, *i.e.* the same drug regimen that in our study (21). This is  
22 compatible with our results, assuming that only part of the spores reached the lung tissues  
23 (40, 41). In the other study an infective dose of  $2.5 \times 10^5$  were constantly fatal for mice  
24 treated with high dose of cortisone acetate alone or combined with nitrogen mustard, but  
25 lower challenges were not reported (18).  
26 Attempting to extrapolate these experimental results to humans remain speculative,  
27 because of marked differences in the exposure conditions and in the respiratory system of  
28 mice and humans. A single exposure to a concentration of spores that would be in the range

## Risk Analysis

1 of those responsible for IA in immunocompromised mice is unlikely to occur, except in some  
2 rural or moist environments (3) or in case of accidental heavy air contamination (42).  
3 However, if we consider that the capacity of clearance of inhaled spores is impaired in  
4 immunocompromised patients (43), it is reasonable to consider a cumulative dose over  
5 time, rather than a single exposure, especially for patients with prolonged neutropenia and  
6 immunosuppressive therapy. In such hypothesis, a cumulative infective exposure could be  
7 reached within few hours or days in common environments.

8

### 9 **5. CONCLUSION**

10 This study provides new insights into the relationship between airborne exposure and  
11 probability of IA in immunocompromised hosts. Our estimate of the ID<sub>50</sub> of the Af293 strain  
12 of *A. fumigatus* provides a reference baseline value for aerosol infectivity of a strain which is  
13 sequenced (19) and is currently used for pharmacological and genetic studies (22, 44).  
14 Further studies could consider this value to estimate the higher or lower virulence of other  
15 strains, species or mutants. It could also be used to evaluate the host susceptibility to  
16 *Aspergillus*, for instance using animal model that closely mimics human diseases which  
17 increase the risk for aspergillosis, such as leukemia or stem cell transplantation (45-47). In  
18 that respect, the aerosol model is well adapted, proved to be reproducible in other hands  
19 (22) and could help to evaluate the fungal risk and susceptibility accounting to the  
20 underlying disease. These applications could benefit from the Bayesian statistical approach  
21 since the network and analysis scheme presented in this study can be readily adapted to  
22 these developments

23

24

25

1 **References**

- 2 1. Marr KA, Patterson T, Denning D. Aspergillosis. Pathogenesis, clinical manifestations,  
3 and therapy. *Infect. Dis. Clin. North Am.* 2002;16(4):875-894.
- 4 2. Sautour M, Sixt N, Dalle F, L'Ollivier C, Fourquenot V, Calinon C, Paul K, Valvin S,  
5 Maurel A, Aho S, Couillault G, Cachia C, Vagner O, Cuisenier B, Caillot D, Bonnin A.  
6 Profiles and seasonal distribution of airborne fungi in indoor and outdoor environments  
7 at a French hospital. *Sci. Total Environ.* 2009;407(12):3766-3771.
- 8 3. Eduard W. Fungal spores: a critical review of the toxicological and epidemiological  
9 evidence as a basis for occupational exposure limit setting. *Crit. Rev. Toxicol.*  
10 2009;39(10):799-864.
- 11 4. Soubani AO, Chandrasekar PH. The clinical spectrum of pulmonary aspergillosis.  
12 *Chest.* 2002;121(6):1988-1999.
- 13 5. Latgé JP. *Aspergillus fumigatus* and aspergillosis. *Clin. Microbiol. Rev.* 1999;12(2):310-  
14 350.
- 15 6. Zmeili OS, Soubani AO. Pulmonary aspergillosis: a clinical update. *QJM*  
16 2007;100(6):317-334.
- 17 7. Vonberg RP, Gastmeier P. Nosocomial aspergillosis in outbreak settings. *J. Hosp.*  
18 *Infect.* 2006;63(3):246-254.
- 19 8. Weber DJ, Peppercom A, Miller MB, Sickbert-Benett E, Rutala WA. Preventing  
20 healthcare-associated *Aspergillus* infections: review of recent CDC/HICPAC  
21 recommendations. *Med Mycol.* 2009;47 Suppl 1:S199-209.
- 22 9. Hajjeh RA, Warnock DW. Counterpoint: invasive aspergillosis and the environment-  
23 rethinking our approach to prevention. *Clin Infect. Dis.* 2001;33(9):1549-1552.
- 24 10. Pagano L, Akova M, Dimopoulos G, Herbrecht R, Drgona L, Blijlevens N. Risk  
25 assessment and prognostic factors for mould-related diseases in immunocompromised  
26 patients. *J. Antimicrob. Chemother.* 2011;66 Suppl 1:i5-14.

## Risk Analysis

- 1 11. Alberti C, Bouaklline A, Ribaud P, Lacroix C, Rousselot P, Leblanc T, Derouin F.  
2 Relationship between environmental fungal contamination and the incidence of invasive  
3 aspergillosis in haematology patients. *J. Hosp. Infect.* 2001;48(3):198-206.
- 4 12. Bénet T, Nicolle MC, Thiebaut A, Piens MA, Nicolini FE, Thomas X, Picot S, Michallet  
5 M, Vanhems P. Reduction of invasive aspergillosis incidence among  
6 immunocompromised patients after control environmental exposure. *Clin Infect. Dis.*  
7 2007;45(6):682-686.
- 8 13. Arnow PM, Sadigh M, Costas C, Weil D, Chudy R. Endemic and epidemic aspergillosis  
9 associated with in-hospital replication of *Aspergillus* organisms. *J. Infect. Dis.*  
10 1991;164(5):998-1002.
- 11 14. Sheretz RJ, Belani A, Kramer BS, Eifenbein GJ, Weiner RS, Sullivan ML, Thomas RG,  
12 Samsa GP. Impact of air filtration on nosocomial *Aspergillus* infections. Unique risk of  
13 bone marrow transplant recipients. *Am. J. Med.* 1998;83(4):709-718.
- 14 15. Templeton SP, Buskirk AD, Green BJ, Beezhold DH, Schmechel D. Murine models of  
15 airway fungal exposure and allergic sensitization. *Med. Mycol.* 2010;48(2):217-228.
- 16 16. Steinbach WJ, Benjamin DK Jr, Trasi SA, Miller JL, Schell WA, Zaas AK, Foster WM,  
17 Perfect JR. Value of an inhalation model of invasive aspergillosis. *Med. Mycol.*  
18 2004;42(5):417-425.
- 19 17. Dixon DM, Polak A, Walsh TJ. Fungus dose-dependent primary pulmonary aspergillosis  
20 in immunosuppressed mice. *Infect Immun.* 1989;57(5):1452-1456.
- 21 18. Schaffner A, Douglas H, Braude A. Selective protection against conidia by mononuclear  
22 and against mycelia by polymorphonuclear phagocytes in resistance to *Aspergillus*.  
23 Observations on these two lines of defense *in vivo* and *in vitro* with human and mouse  
24 phagocytes. *J. Clin. Invest.* 1982;69(3):617-631.
- 25 19. Nierman WC, Pain A, Anderson MJ, Wortman JR, Kim HS, Arroyo J, Berriman M, Abe  
26 K, Archer DB, Bermejo C, Bennett J, Bowyer P, Chen D, Collins M, Coulsen R, Davies  
27 R, Dyer PS, Farman M, Fedorova N, Fedorova N, Feldblyum TV, Fischer R, Fosker N,  
28 Fraser A, García JL, García MJ, Goble A, Goldman GH, Gomi K, Griffith-Jones S,

## Risk Analysis

- 1 Gwilliam R, Haas B, Haas H, Harris D, Horiuchi H, Huang J, Humphray S, Jiménez J,  
2 Keller N, Khouri H, Kitamoto K, Kobayashi T, Konzack S, Kulkarni R, Kumagai T, Lafon  
3 A, Lafton A, Latgé J-P, Li W, Lord A, Lu C, Majoros WH, May GS, Miller BL, Mohamoud  
4 Y, Molina M, Monod M, Mouyna I, Mulligan S, Murphy L, O'Neil S, Paulsen I, Peñalva  
5 MA, Pertea M, Price C, Pritchard BL, Quail MA, Rabinowitsch E, Rawlins N,  
6 Rajandream M-A, Reichard U, Renauld H, Robson GD, Rodriguez de Córdoba S,  
7 Rodríguez-Peña JM, Ronning CM, Rutter S, Salzberg SL, Sanchez M, Sánchez-  
8 Ferrero JC, Saunders D, Seeger K, Squares R, Squares S, Takeuchi M, Tekaia F,  
9 Turner G, Vazquez de Aldana CR, Weidman J, White O, Woodward J, Yu J-H, Fraser  
10 C, Galagan JE, Asai K, Machida M, Hall N, Barrell B, Denning DW. Genomic sequence  
11 of the pathogenic and allergenic filamentous fungus *Aspergillus fumigatus*. *Nature*  
12 2005;438(7071):1151–1156.
- 13 20. European Commission. European Convention for the protection of vertebrate animals  
14 used for experimental and other scientific purposes. 1986.
- 15 21. Sheppard DC, Rieg G, Chiang LY, Filler SG, Edwards JE Jr, Ibrahim AS. Novel  
16 inhalational murine model of invasive pulmonary aspergillosis. *Antimicrob. Agents*  
17 *Chemother.* 2004;48(5):1908-1911.
- 18 22. Sheppard DC, Graybill JR, Najvar LK, Chiang LY, Doedt T, Kirkpatrick WR, Bocanegra  
19 R, Vallor AC, Patterson TF, Filler SG. Standardization of an experimental murine model  
20 of invasive pulmonary aspergillosis. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2006;50(10):3501-  
21 3503.
- 22 23. Haas CN, Rose JB, Gerba CP. Quantitative microbial risk. John Wiley & Sons, Inc. New  
23 York: 1999.
- 24 24. Bartrand TA, Weir MH, Haas CN. Dose-response models for inhalation of *Bacillus*  
25 *anthracis* spores: interspecies comparisons. *Risk Anal.* 2008;28(4):1115-1124.
- 26 25. Watanabe T, Bartrand TA, Omura T, Haas CN. Dose-Response Assessment for  
27 Influenza A Virus Based on Data Sets of Infection with its Live Attenuated Reassortants  
28 . *Risk Anal.* 2012;32(3):555-65.

## Risk Analysis

- 1 26. Tamrakar SB, Haluska A, Haas CN, Bartrand TA. Dose-response model of *Coxiella*  
2 *burnetii* (Q fever). Risk Anal. 2011;31(1):120-128.
- 3 27. Teske SS, Huang Y, Tamrakar SB, Bartrand TA, Weir MH, Haas CN. Animal and  
4 human dose-response models for *Brucella* species. Risk Anal. 2011;31(10):1576-1596.
- 5 28. Plummer M. JAGS: A Program for Analysis of Bayesian Graphical Models Using Gibbs  
6 Sampling. Proceedings of the 3rd International Workshop on Distributed Statistical  
7 Computing (DSC 2003). 2003 March 20-22;Vienna, Austria.
- 8 29. Plummer M, Best N, Cowles K, Vines K. CODA: Output analysis and diagnostics for  
9 MCMC. [Internet]. 2010. Available from: <http://CRAN.R-project.org/package=coda>.
- 10 30. Gelman A, Rubin DB. Inference from iterative simulation using multiple sequences. Stat  
11 Sci 1992;7(4):457-511.
- 12 31. Görner P, Fabriès J-F, Duquenne P, Witschger O, Wrobel R. Bioaerosol sampling by a  
13 personal rotating cup sampler CIP 10-M. J Environ Monit 2006;8(1):43-48.
- 14 32. Braun A, Ernst H, Hoymann HG, Rittinghausen S. Chapter 14 - Respiratory Tract. In:  
15 The Laboratory Mouse. London: Academic Press; 2004 p. 225-243.
- 16 33. Patterson TF. The future of animal models of invasive aspergillosis. Med. Mycol.  
17 2005;43 Suppl 1:S115-119.
- 18 34. Williams MS, Ebel ED, Vose D. Framework for microbial food-safety risk assessments  
19 amenable to Bayesian modeling. Risk Anal. 2011;31(4):548-565.
- 20 35. Messner MJ, Chappell CL, Okhuysen PC. Risk assessment for *Cryptosporidium*: a  
21 hierarchical Bayesian analysis of human dose response data. Water Res.  
22 2001;35(16):3934-3940.
- 23 36. Teunis P, Van den Brandhof W, Nauta M, Wagenaar J, Van den Kerkhof H, Van Pelt W.  
24 A reconsideration of the *Campylobacter* dose-response relation. Epidemiol. Infect.  
25 2005;133(4):583-592.
- 26 37. Teunis P, Takumi K, Shinagawa K. Dose response for infection by *Escherichia coli*  
27 O157:H7 from outbreak data. Risk Anal. 2004;24(2):401-407.

## Risk Analysis

- 1 38. Armstrong TW, Haas CN. A quantitative microbial risk assessment model for  
2 Legionnaires' disease: animal model selection and dose-response modeling. Risk Anal.  
3 2007;27(6):1581-1596.
- 4 39. Teunis PF, Havelaar AH. The Beta Poisson dose-response model is not a single-hit  
5 model. Risk Anal. 2000;20(4):513-520.
- 6 40. Hatch TF. Distribution and deposition of inhaled particles in respiratory tract. Bacteriol  
7 Rev 1961;25:237-240.
- 8 41. Heyder J. Deposition of inhaled particles in the human respiratory tract and  
9 consequences for regional targeting in respiratory drug delivery. Proc Am Thorac Soc  
10 2004;1(4):315-320.
- 11 42. Bouza E, Peláez T, Pérez-Molina J, Marín M, Alcalá L, Padilla B, Muñoz P, Adán P,  
12 Bové B, Bueno MJ, Grande F, Puente D, Rodríguez MP, Rodríguez-Crélixems M, Vigil  
13 D, Cuevas O. Demolition of a hospital building by controlled explosion: the impact on  
14 filamentous fungal load in internal and external air. J. Hosp. Infect. 2002;52(4):234-242.
- 15 43. Park SJ, Mehrad B. Innate immunity to *Aspergillus* species. Clin. Microbiol. Rev.  
16 2009;22(4):535-551.
- 17 44. Rieg G, Spellberg B, Schwartz J, Fu Y, Edwards JE Jr, Sheppard DC, Ibrahim AS.  
18 Antifungal prophylaxis is effective against murine invasive pulmonary aspergillosis.  
19 Antimicrob. Agents Chemother. 2006;50(8):2895-2896.
- 20 45. BitMansour A, Brown JMY. Prophylactic administration of liposomal amphotericin B is  
21 superior to treatment in a murine model of invasive aspergillosis after hematopoietic cell  
22 transplantation. J. Infect. Dis. 2002;186(1):134-137.
- 23 46. Hartigan AJ, Kallal LE, Hogaboam CM. CCR7 impairs hematopoiesis after  
24 hematopoietic stem cell transplantation increasing susceptibility to invasive  
25 aspergillosis. Blood 2010;116(24):5383-5393.
- 26 47. Fortier JM, Graubert TA. Murine models of human acute myeloid leukemia. Cancer  
27 Treat. Res. 2010;145:183-196.
- 28 .

Risk Analysis

	Description (and Unit)	Prior distribution or mathematical formula		Table I. Definition parameters and variables of the model and their prior distribution s.	
<b>Model based on the concentration in the nebulizer</b>					
$\lambda_{exp}^C$	Probability for one spore being infective in the exponential model.	Beta(0.05;10)	4	* $I^C$ , $I^Q$ , $Cm_e$ and $Cm_r$ are observed and then used to build the posterior distribution.	
$\lambda_{BP}^C$	Probability for one spore being infective in the beta-Poisson model	Beta( $\alpha^C$ ; $\beta^C$ )			
$\alpha^C$	Alpha parameter of the beta distribution for $\lambda_{BP}^C$ .	Uniform(0;0.11)	7		
$\beta^C$	Beta parameter of the beta distribution for $\lambda_{BP}^C$ .	Uniform(0;20)			
$P^C$	Probability for a mouse to develop invasive aspergillosis	$1 - \exp(-\lambda^C \cdot Cn)$	9		
$I^C *$	Infection of a mouse after exposure: 1 if myco and GM are positive and 0 otherwise.	Bernoulli( $P^C$ )			
$Cn_e^C$	Concentration of spores in the nebulizer ( $\log_{10}(\text{spores.ml}^{-1})$ )	Observed			
<b>Model based on the Quantity of Inhaled Spores</b>					
$\lambda_{exp}^Q$	Probability for one spore being infective in the exponential model.	Beta(0.5;10)	12		
$\lambda_{BP}^Q$	Probability for one spore being infective in the beta-Poisson model	Beta( $\alpha^Q$ ; $\beta^Q$ )			
$\alpha^Q$	Alpha parameter of the beta distribution for $\lambda_{BP}^Q$ .	Uniform(0;1.1)	15		
$\beta^Q$	Beta parameter of the beta distribution for $\lambda_{BP}^Q$ .	Uniform(0;20)			
$P^Q$	Probability for a mouse to develop invasive aspergillosis	$1 - \exp(-\lambda^Q \cdot QIS)$	17		
$I^Q *$	Infection of a mouse after exposure: 1 if myco and GM are positive and 0 otherwise.	Bernoulli( $P^Q$ )			
QIS	Quantity of Inhaled Spores (spores)	$v \cdot \tau \cdot \theta \cdot 10^{C_e/\rho}$	19		
$Cc$	Calculated concentration of spores in the exposure chamber ( $\log_{10}(\text{spores.L}^{-1})$ )	$Cn \cdot \mu$			
M	Coefficient of the relationship between $Cn$ and $Cm$	Uniform(0.2;0.7)			
N	Viability of the spores after nebulization	Uniform(0.60;0.70)			
$\tau_1$	Respiratory rate of a mouse ( $\text{breath.min}^{-1}$ )	Normal(267;63.5)			
$\tau_2$	Tidal volume of a mouse ( $\text{ml.breath}^{-1}$ )	Normal(0.14;0.03)			
$\tau$	Mice breathing volume (L)	$\tau_1 \cdot \tau_2 \cdot 10^{-3}$			
$\rho$	CIP-10 sampler efficiency	Uniform(0.55;0.75)			
$\theta_e$	Duration of the experiment (minutes)	60			
$Cn_e^C$	Concentration of spores in the nebulizer in experiments with mice ( $\log_{10}(\text{spores.ml}^{-1})$ ).	Observed			
$Cm_e *$	Concentration of spores in the air of the exposure chamber measured at the end of the experiment with mice ( $\log_{10}(\text{spores.l}^{-1})$ ).	Normal( $Cn_e^C \cdot \mu$ ; 11)			
$Cn_r$	Concentration of spores in the nebulizer in experiments without mice ( $\log_{10}(\text{spores.ml}^{-1})$ ).	Observed			
$Cm_r *$	Concentration of spores in the air of the exposure chamber measured sequentially in experiments without mice ( $\log_{10}(\text{spores.l}^{-1})$ ).	Normal( $Cn_r \cdot \mu$ ; 11)			



## Risk Analysis

Experiment number	Nb. of exposed mice	Spore concentration ( $\log_{10}$ )		Experimental observations			Invasive aspergillosis	
		Measured in the nebulizer ( $C_{n_e}$ ) spores.ml <sup>-1</sup>	Measured in the air of the chamber at the end of the experiment ( $C_{m_e}$ ) spores.l <sup>-1</sup>	Nb. of deaths (>J6) <sup>§</sup>	Nb. of positive cultures	Nb. of positive GM*	Nb. of infected mice**	%
1	6	4.08	0.00	1 (0)	2	0	0	0
2	6	5.08	0.00	0	4	0	0	0
3	6	6.08	2.00	0	1	0	0	0
4	6	7.08	3.60	0	0	0	0	0
5	8	8.00	3.20	0	2	2	2	25
6	6	8.08	3.78	0	2	3	2	33
7	8	8.30	3.93	2 (2)	5	0	2	25
8	12	8.30	4.45	0	12	12	12	100
9	8	8.48	4.60	1 (1)	6	7	7	88
10	10	8.49	5.60	3 (3)	6	7	9	90
11	10	8.57	4.65	3 (2)	7	7	9	90
12	8	8.70	4.18	2 (1)	6	6	7	88
13	12	8.70	4.65	8 (8)	4	4	12	100
14	8	8.70	5.35	1(0)	7	7	7	88
15	8	8.78	4.45	3 (1)	5	5	6	75

1  
2 **Table II.** Experimental aspergillosis in mice. Rates of Invasive Aspergillosis according to spore concentrations in the nebulizer ( $\log_{10}$ ) and in the  
3 air of the exposure chamber (determined after 60 min of exposure).

4 \* Positive GM values: mean=4.0, sd=2.3, range [0.4;6]

5 § Dead mice were not evaluable for culture of GM

6 \*\* The diagnosis criteria for invasive aspergillosis, was a positive culture and a positive GM determination on the lung homogenate, or death  
7 after day 6

8

Risk Analysis

A. Prior	Exponential model					Beta-Poisson model				
	0.025	0.25	Median	0.75	0.975	0.025	0.25	Median	0.75	0.975
Model C										
$\lambda^C$	$1.8 \times 10^{-35}$	$2.9 \times 10^{-14}$	$4.3 \times 10^{-8}$	$1.6 \times 10^{-4}$	$5.3 \times 10^{-2}$	$2.2 \times 10^{-165}$	$6.1 \times 10^{-17}$	$4.6 \times 10^{-8}$	$4.0 \times 10^{-4}$	$1.3 \times 10^{-1}$
$\alpha^C$	-	-	-	-	-	$2.9 \times 10^{-3}$	$2.8 \times 10^{-2}$	$5.6 \times 10^{-2}$	$8.2 \times 10^{-2}$	$1.1 \times 10^{-1}$
$\beta^C$	-	-	-	-	-	$5.1 \times 10^{-1}$	$5.1 \times 10^0$	$1.0 \times 10^1$	$1.5 \times 10^1$	$1.9 \times 10^1$
Model Q										
$\lambda^Q$	$5.6 \times 10^{-5}$	$5.3 \times 10^{-3}$	$2.3 \times 10^{-2}$	$6.6 \times 10^{-2}$	$2.3 \times 10^{-1}$	$1.3 \times 10^{-17}$	$2.6 \times 10^{-3}$	$2.6 \times 10^{-2}$	$9.6 \times 10^{-2}$	$7.8 \times 10^{-1}$
$\alpha^Q$	-	-	-	-	-	$2.8 \times 10^{-2}$	$2.8 \times 10^{-1}$	$5.6 \times 10^{-1}$	$8.3 \times 10^{-1}$	$1.1 \times 10^0$
$\beta^Q$	-	-	-	-	-	$5.2 \times 10^1$	$5.1 \times 10^0$	$1.0 \times 10^1$	$1.5 \times 10^1$	$1.9 \times 10^1$

B. Posterior	Exponential model					Beta-Poisson model				
	0.025	0.25	Median	0.75	0.975	0.025	0.25	Median	0.75	0.975
Model C										
$\lambda^C$	$3.8 \times 10^{-9}$	$4.5 \times 10^{-9}$	$5.0 \times 10^{-9}$	$5.5 \times 10^{-9}$	$6.5 \times 10^{-9}$	$3.8 \times 10^{-9}$	$4.6 \times 10^{-9}$	$5.0 \times 10^{-9}$	$5.5 \times 10^{-9}$	$6.5 \times 10^{-9}$
$\alpha^C$	-	-	-	-	-	$1.1 \times 10^{-2}$	$3.9 \times 10^{-2}$	$6.2 \times 10^{-2}$	$8.4 \times 10^{-2}$	$1.1 \times 10^{-1}$
$\beta^C$	-	-	-	-	-	$6.9 \times 10^{-1}$	$5.4 \times 10^0$	$1.1 \times 10^1$	$1.5 \times 10^1$	$1.9 \times 10^1$
Model Q										
$\lambda^Q$	$1.9 \times 10^{-5}$	$3.0 \times 10^{-5}$	$3.8 \times 10^{-5}$	$5.1 \times 10^{-5}$	$5.1 \times 10^{-5}$	$1.8 \times 10^{-5}$	$2.9 \times 10^{-5}$	$3.7 \times 10^{-5}$	$4.8 \times 10^{-5}$	$9.0 \times 10^{-5}$
$\alpha^Q$	-	-	-	-	-	$3.1 \times 10^{-2}$	$1.2 \times 10^{-1}$	$2.2 \times 10^{-1}$	$3.4 \times 10^{-1}$	$7.1 \times 10^{-7}$
$\beta^Q$	-	-	-	-	-	$1.2 \times 10^0$	$6.6 \times 10^0$	$1.2 \times 10^1$	$1.6 \times 10^1$	$2.0 \times 10^1$

1  
2  
3  
4  
5

**Table III.** Comparison of exponential and beta-Poisson models. Distribution of the *prior* (A) and the *posterior* (B) of  $\lambda^C$ ,  $\alpha^C$ ,  $\beta^C$ ,  $\lambda^Q$ ,  $\alpha^Q$  and  $\beta^Q$  are indicated with the median, the quartiles and the 2.5 and 97.5 percentiles.  $\alpha$  and  $\beta$  are only used in the beta-Poisson model.

Risk Analysis

	Exponential model					Beta-Poisson model				
	0.025	0.25	Median	0.75	0.975	0.025	0.25	Median	0.75	0.975
Model C ( $\times 10^6$ )	1.1	1.3	1.4	1.5	1.8	1.1	1.3	1.4	1.5	1.8
Model Q ( $\times 10^4$ )	0.7	1.4	1.8	2.3	3.6	0.8	1.4	1.9	2.4	3.7

1  
2 **Table IV.** Estimates of the 50% infective doses ( $d$ ) with the Exponential and the beta-Poisson models, with “ $d$ ” as concentration of spores in the  
3 nebulizer ( $Cn$ ) or “ $d$ ” as the quantity of spores inhaled by a mouse during the experiment ( $Q/S$ ).  
4

## Figure legends

### Figure 1:

Distribution of GM values in normal Balb/c mice (n=63).

**Figure 2:** Directed acyclic graph describing the two presentations of the model according to

**Table I.** Data are denoted by rectangles and unknown random variables are denoted by ellipses.

**C.** Model based on the concentration in the nebulizer,  $Cn_e^C$ . For each experiment  $e$ ,  $\lambda^C$  is the parameter of the exponential dose-response model,  $\alpha^C$  and  $\beta^C$  (shaded ellipses) are the two parameters of the beta-Poisson model,  $P_e^C$  is the probability of infection and  $I_{e,s}^C$  is the occurrence of infection of each mouse  $m$ .

**Q.** Model based on the Quantity of Inhaled Spores,  $QIS_e$ . For each experiment  $e$ ,  $\lambda^Q$  is the parameter of the model,  $\alpha^Q$  and  $\beta^Q$  (shaded ellipse) are the two parameters of the beta-Poisson model.  $P_e^Q$  is the probability of infection,  $I_{e,s}^Q$  is the occurrence of infection of each mouse  $m$ .  $QIS$  is estimated from  $\rho$  (the efficiency of the CIP-10 sampler),  $\theta_e$  (the duration of the experiment),  $\nu$  (the viability of nebulized spores),  $\tau$  (mice breathing parameters with the tidal volume,  $\tau_1$ , and the respiratory rate,  $\tau_2$ ) and  $Cc_e$  (the actual concentration in the exposure chamber).  $Cc_e$  depends on,  $Cn_e^Q$  (the concentration in the nebulizer and  $\mu$  which is the link between  $Cn_e^Q$  and  $Cm_e$  (the measured concentration in the exposure chamber at the end of the experiment).  $\mu$  is also calculated from  $Cn_r$  (concentration in the nebulizer) and  $Cm_r$  (concentration in the exposure chamber) in repeated experiments without mice.

**Figure 3.** Viability of spores in the exposure chamber assess by fungal culture of spores collected with the CIP-10M (n=40, mean=65%, sd=16).

## Risk Analysis

**Figure 4.** Concentration of spores in the exposure chamber without mice according to time (means are represented by dots and  $CI_{95}$  by vertical bars).

Several experiments were performed with the following concentrations in the nebulizer ( $Cn_r$ ,  $\log_{10}(\text{spores.ml}^{-1})$ ): 6.0 (open square,  $n=1$ ), 6.7 (black square,  $n=3$ ), 7.0 (open circle,  $n=1$ ) and 7.7 (black circle,  $n=4$ ).

**Figure 5 .**Dose-response relationship between exposure to *Aspergillus fumigatus* spores and probability of invasive aspergillosis. *Prior* (dotted lines with median in bold,  $CI_{50}$  and  $CI_{95}$ ) and *posterior* (solid lines with median in bold and  $CI_{95}$ ) are presented for the models based on  $Cn$  ( $C_{exp}$  and  $C_{\beta P}$ ) and on QIS ( $Q_{exp}$  and  $Q_{\beta P}$ ). Experimental data ( $Cn_e$ , ▲ ) or calculated distribution ( $QIS_e$ , median ● with  $CI_{95}$  — ) are plotted.

# Risk Analysis

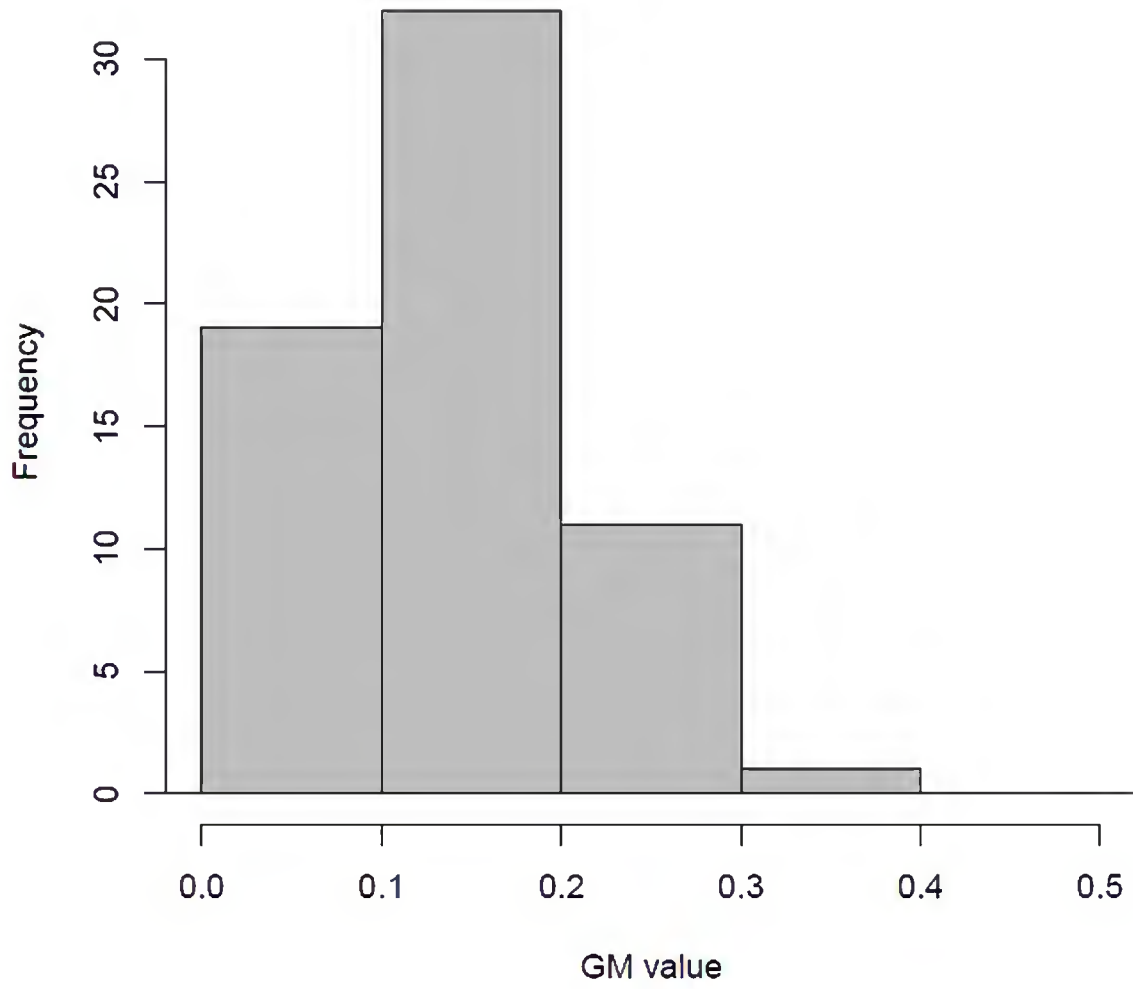


Figure 1.

Risk Analysis

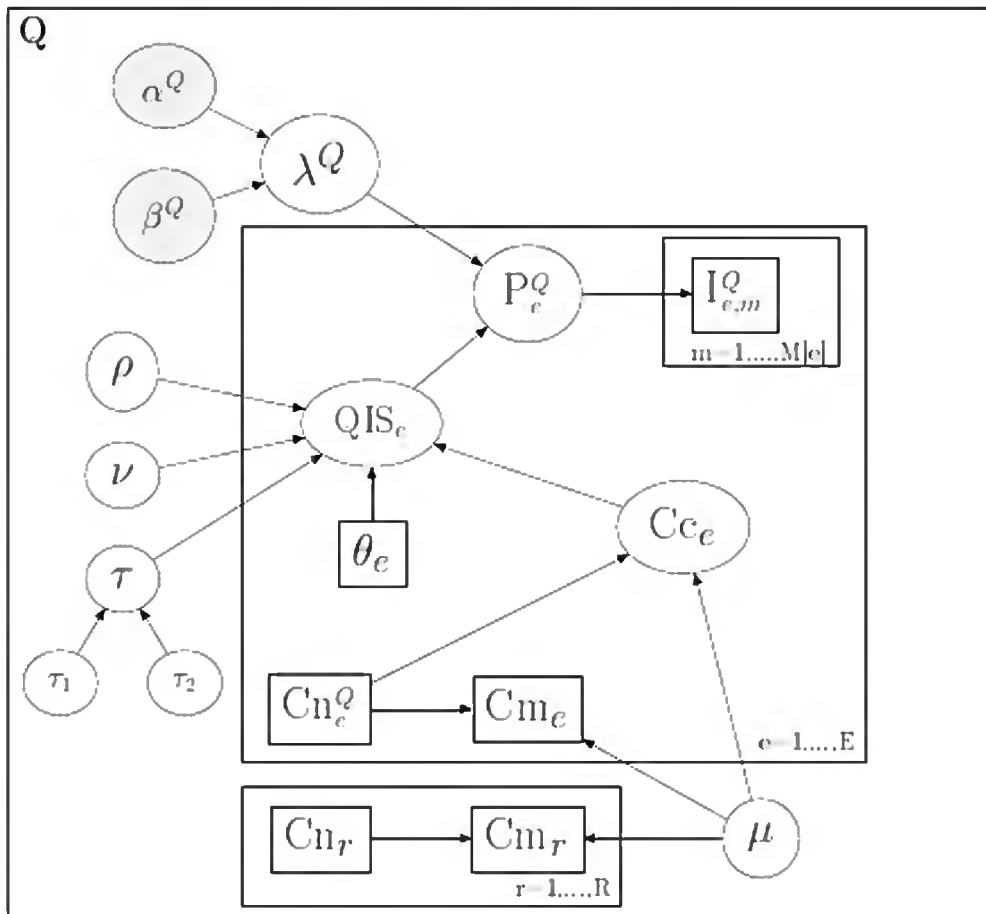
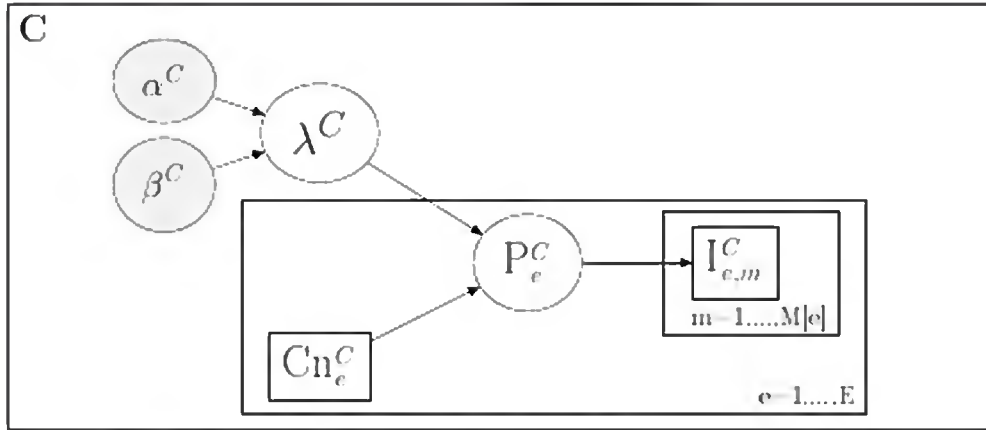


Figure 2.

# Risk Analysis

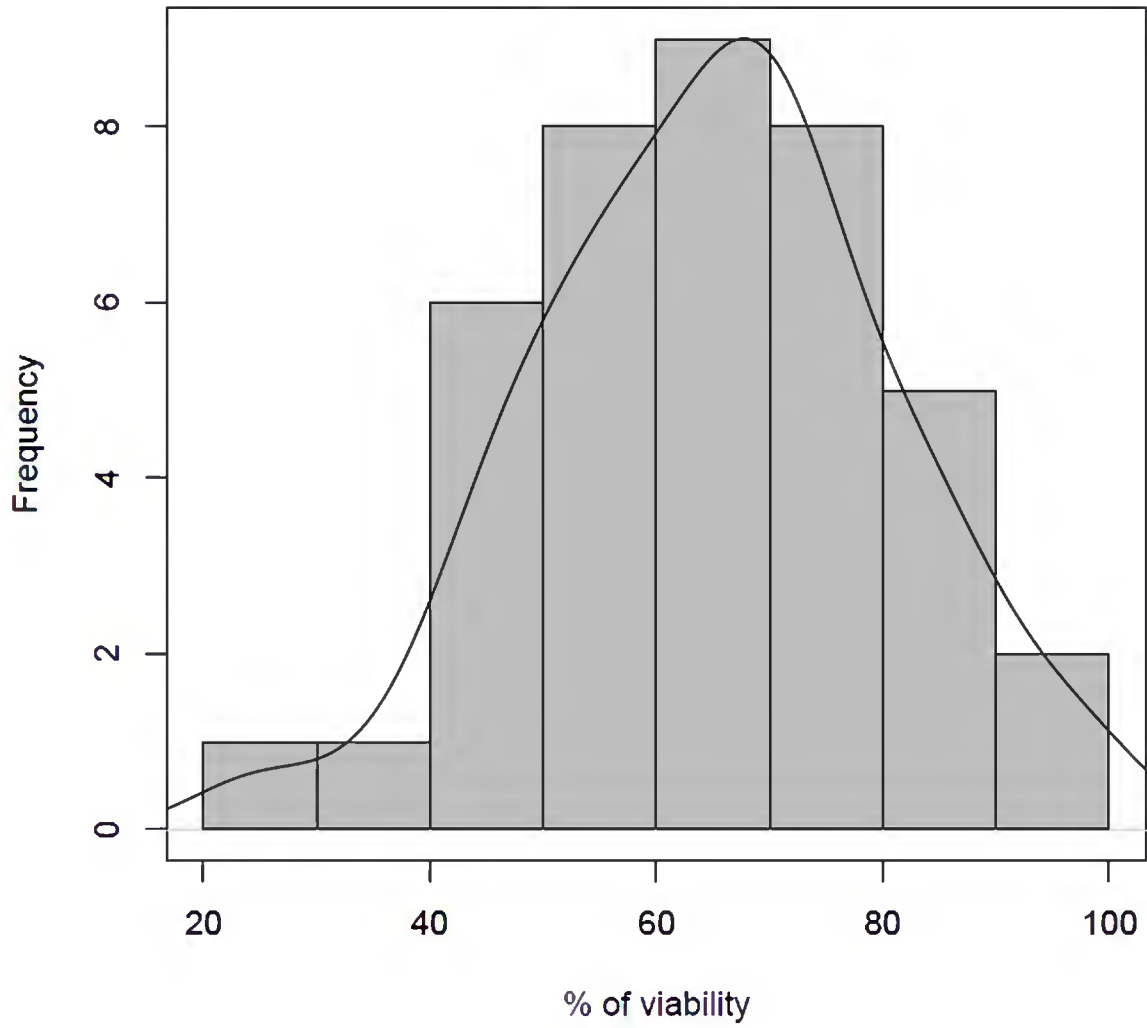


Figure 3.



# Risk Analysis

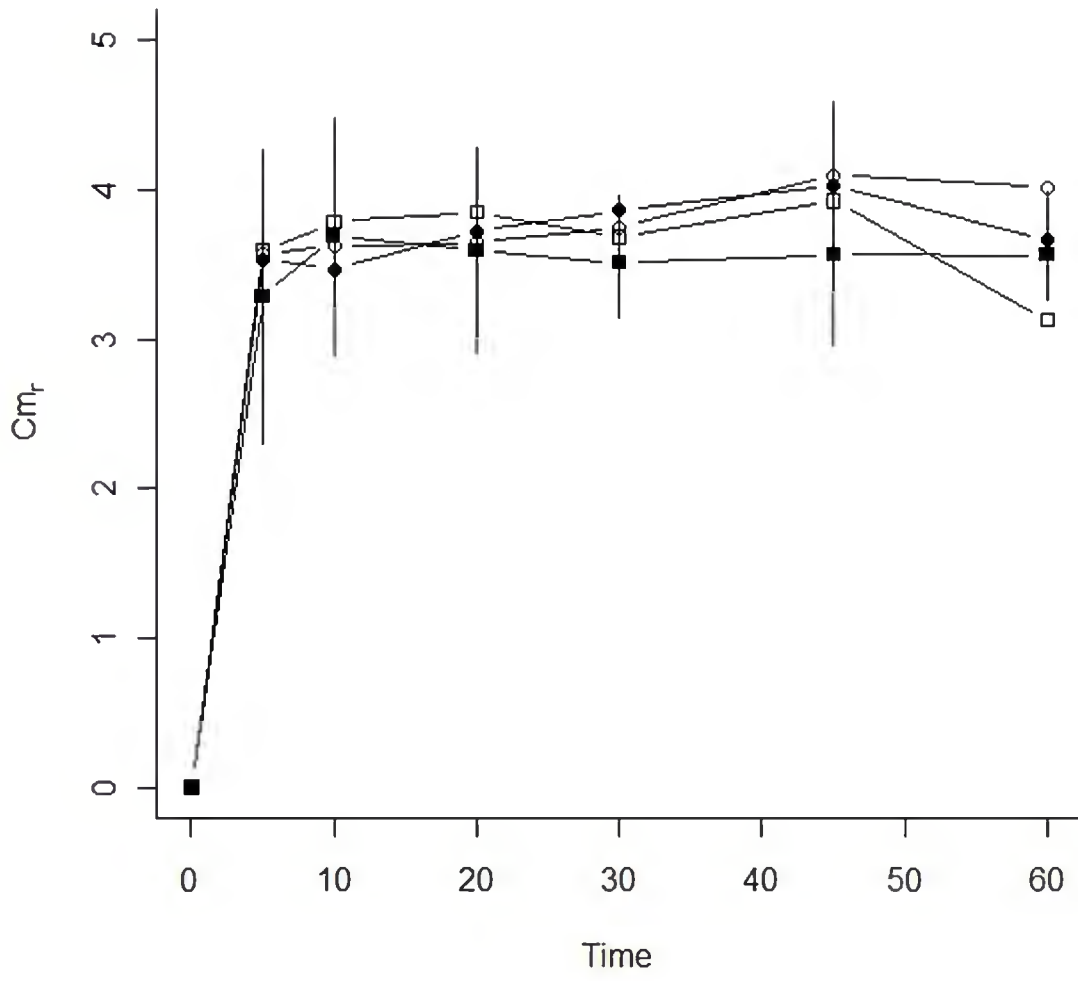


Figure4

### Risk Analysis

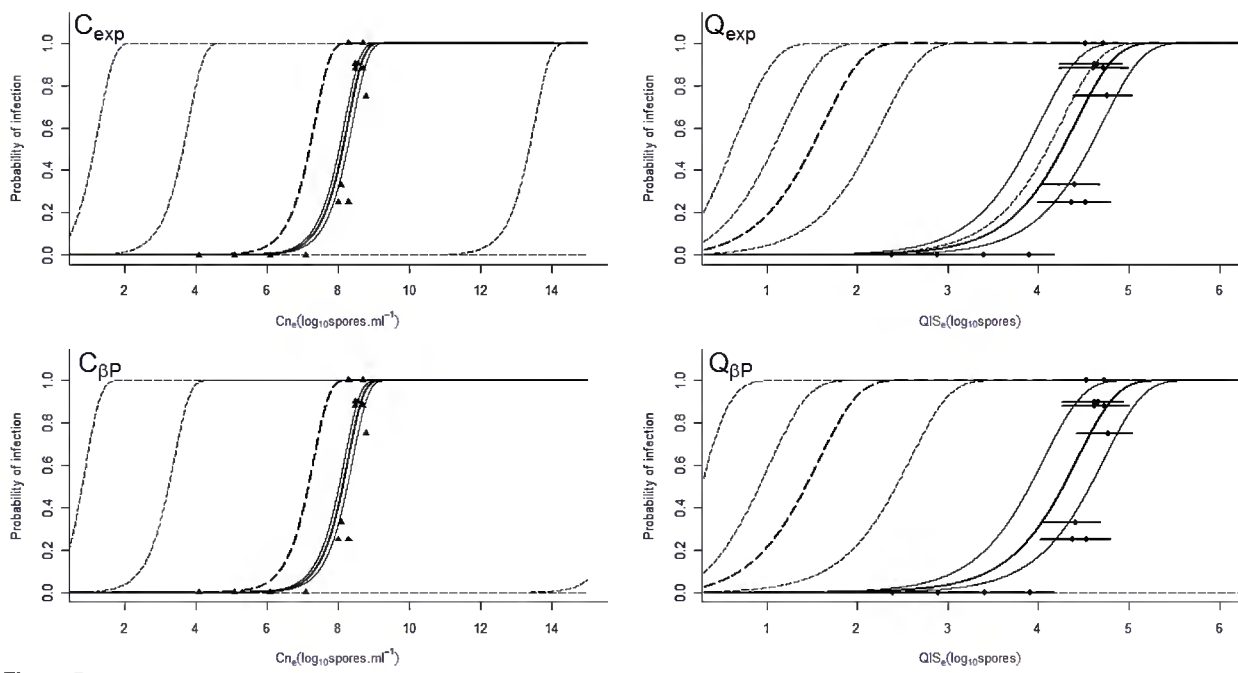


Figure 5.

## 2.2. Primo-infection vs réactivation : application pharmacologique

### 2.2.1. Contexte

L'aspergillose pulmonaire invasive est le plus souvent considérée comme étant la conséquence d'une exposition à des spores d'*Aspergillus*, suivie d'une dissémination favorisée par un déficit immunitaire. Il est cependant admis qu'un certain nombre de cas seraient plutôt la conséquence d'une réactivation d'un portage ou d'une colonisation latente, lors de la mise en place d'un traitement immunosuppresseur. Cette hypothèse physiopathologique n'est pas clairement établie chez l'Homme, mais elle peut être fortement suspectée chez les patients présentant une aspergillose invasive alors qu'ils ont toujours été maintenus dans un environnement protégé (Hajjeh et Warnock, 2001; Nicolle et coll., 2011). Elle s'appuie également sur la grande fréquence de la contamination de l'environnement par *Aspergillus*, avec une très forte probabilité d'exposition des patients avant leur phase d'immunodépression.

La prise en compte de ces deux modalités physiopathologiques a évidemment des conséquences importantes en terme de prévention, dans la mesure où seule la chimioprophylaxie par des antifongiques peut espérer contrôler le risque de réactivation alors que la prévention de la primo-infection/dissémination relève avant tout d'une prévention de la contamination.

De très rares publications font état de modèles d'aspergillose pulmonaire par réactivation pouvant simuler ce qui est observé chez les patients recevant des traitements immunosuppresseurs. Il existe, à notre connaissance, un modèle chez la souris dans lequel l'inoculum est administré par voie intra-trachéale chez des souris cortisonées, non neutropéniques (Nawada et coll., 1996) et un modèle complexe chez le rat, associant infection intra-trachéale, et séquences d'immunodépression (diète protéique et corticoïdes) (Niki et coll., 1991). Ces modèles montrent qu'il est possible d'induire la réactivation d'une aspergillose latente, mais restent assez éloignés de la situation clinique par la voie d'inoculation et par le fait que les animaux ne sont pas neutropéniques. Seule l'étude de Niki et coll. fait l'objet d'une application pharmacologique très limitée.

### 2.2.2. Objectif

Dans ce contexte, et compte tenu de notre expérience dans la réalisation d'infections aspergillaires par aérosol, l'objectif de notre étude était double :

- réaliser un modèle de réactivation faisant suite à une exposition antérieure à un aérosol de spores d'*A. fumigatus*
- évaluer l'efficacité prophylactique d'un antifongique de référence dans ce modèle, comparativement au modèle de primo-infection

### 2.2.3. Contrôle et réactivation de l'infection aspergillaire

Le modèle de réactivation a consisté à exposer des souris immunocompétentes à un aérosol de spores d'*A. fumigatus* puis à les immunodéprimer par injection de cyclophosphamide et acétate de cortisone. Ce schéma expérimental vise à simuler la situation d'un patient hospitalisé et recevant un traitement immunosuppresseur alors qu'il a été exposé à des spores fongiques avant son arrivée à l'hôpital.

Dans un premier temps, une étude de cinétique de l'élimination des spores chez des souris immunocompétentes a permis de choisir le délai post-exposition pour initier la phase d'immunosuppression. Dans un deuxième temps, les expérimentations de réactivation ont été effectuées.

### 2.2.3.1. Cinétique de l'élimination des spores par des souris immunocompétentes

Pour connaître la cinétique d'élimination des spores dans les poumons. Dix-huit souris Balb/c immunocompétentes ont été exposées à J0 à un aérosol de spores d'*A. fumigatus* à la concentration de  $5 \cdot 10^8$  spores/mL. Trois souris ont été sacrifiées à J3, J5, J10, J14, J21 et J28 ; les poumons ont été prélevés, et broyés pour déterminer la charge fongique et le taux de galactomannane (GM) pulmonaire.

Les résultats sont présentés dans la Figure 20. On peut voir une diminution rapide de la charge fongique détectable puisque dès J10 aucune colonie n'est observée. Le taux de GM pulmonaire apparaît, dans cette expérimentation, comme un mauvais marqueur de l'infection puisqu'il demeure positif (>0,40) jusqu'à J14. A la suite de ces résultats, nous avons choisi de commencer le traitement immunosuppresseur 10 jours après l'exposition.

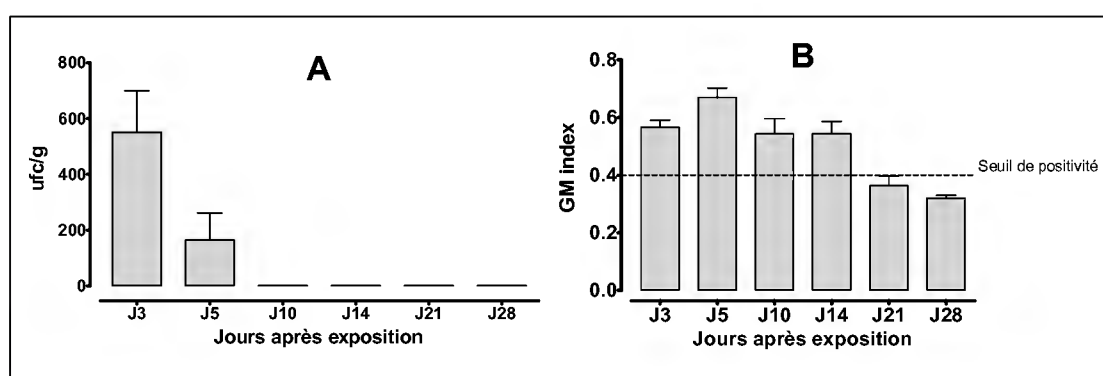


Figure 20 – Cinétique d'élimination d'*Aspergillus* dans les poumons de souris Balb/c immunocompétentes exposées à un aérosol de spores d'*A. fumigatus* à J0. Evaluation par la mesure de la charge fongique pulmonaire (A) et le taux de GM dans les poumons (B).

### 2.2.3.2. Réactivation de l'infection aspergillaire

Pour la mise au point du modèle de réactivation aspergillaire, 10 souris Balb/c immunocompétentes ont été exposées à un aérosol de spores d'*A. fumigatus* pendant 1h puis maintenues sans traitement pendant 10 jours. A partir de J10, un traitement hebdomadaire par cyclophosphamide (250mg/kg) et acétate de cortisone (200 mg/kg) a été introduit pour immunodéprimer les souris. Trois et 4 semaines après l'exposition (J21 et J28), 5 souris ont été sacrifiées afin de prélever leurs poumons. Un lobe pulmonaire a été utilisé pour effectuer des coupes histologiques tandis que les autres lobes ont été broyés dans 2mL de PBS. 1ml de broyat de poumon a été mis en culture sur milieu gélosé Sabouraud-Chloramphénicol pour évaluer la charge fongique et 1mL a été utilisé pour doser le taux de GM pulmonaire.

Les résultats présentés dans la Figure 21 montrent une réactivation chez 20% des souris à J21 et 100% des animaux 4 semaines après l'exposition. La détermination du taux de GM pulmonaire montre des valeurs élevées chez les souris fortement infectées mais reste faible chez les souris dont les charges fongiques sont basses.

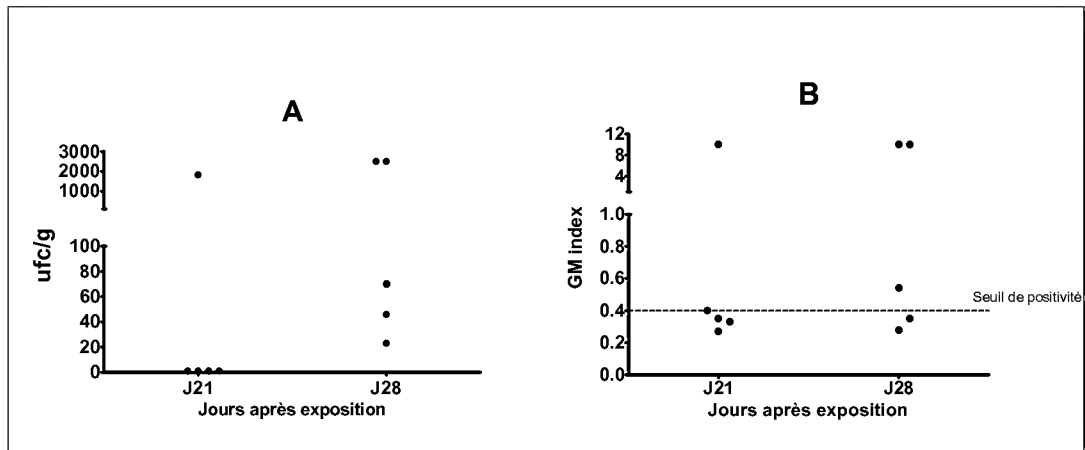


Figure 21 – Réactivation aspergillaire chez des souris Balb/c exposées à un aérosol de spores d’*A. fumigatus* à J0 et sacrifiées à J21 ou J28. La réactivation est évaluée par la charge fongique (A) et le dosage du GM pulmonaire (B).

Les coupes histologiques (Figure 22) confirment les résultats précédents par la présence de foyers infectieux et de filaments aspergillaires.

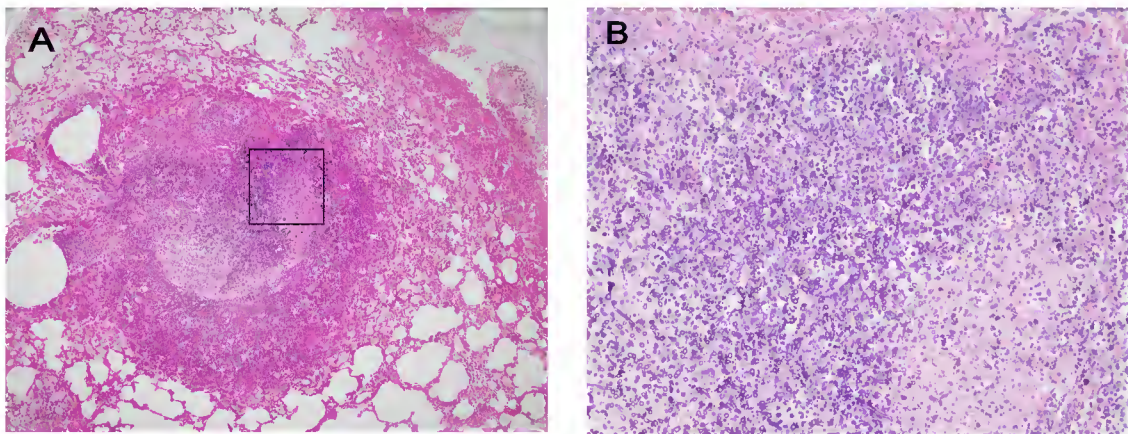


Figure 22 – Coupe histologique de poumon présentant une réactivation aspergillaire. A : coloration par l’hémaltoxyline éosine (x100) montrant une volumineuse lésion au centre nécrotique. B : coloration par le PAS (x400) montrant la présence de nombreux filaments d’*Aspergillus*.

## **2.2.4. Evaluation de l'efficacité de la chimioprophylaxie dans la prévention de l'aspergillose invasive de primo-infection ou de réactivation**

### **2.2.4.1. Choix de la molécule**

Les tableaux V et VI montrent que la plupart des études pré-cliniques de prophylaxie sont faites sur des modèles d'infection massive par instillation intra-nasale et que seules quelques-unes sont effectuées après exposition par aérosol. Aucune étude n'a été réalisée dans un modèle de réactivation.

On note également une grande diversité de protocoles, avec, souvent, des administrations répétées qui "encadrent" la date d'exposition.

Les résultats obtenus ont été examinés en prévision de nos travaux que nous souhaitons centrer sur l'évaluation de l'efficacité d'une seule dose, administrée le jour de la mise en place d'un traitement immunosuppresseur. Avec cette contrainte, il apparaît que peu de molécules sont éligibles aux vues des études expérimentales publiées : l'amphotéricine B sous forme liposomale, efficace à 1 ou 2 doses dans 2 études ([Lewis et coll., 2008](#); [Rieg et coll., 2006](#)), la micafungine ([Lewis et coll., 2008](#)) et la caspofungine ([Rieg et coll., 2006](#)).

En première intention, nous avons retenu l'amphotéricine B sous forme liposomale pour les raisons suivantes :

- sa concentration élevée et durable dans les poumons ([Gangneux et coll., 1996](#); [Olson et coll., 2006](#); [Smith et coll., 2007](#))
- la possibilité d'administration par voie intrapéritonéale, plus reproductible et maniable que la voie orale requise pour le posaconazole
- la bonne tolérance de doses élevées ([Olson et coll., 2006](#)), qui nous a permis de choisir la dose de 15 mg/kg.

Tableau V – Etudes de la prophylaxie antifongique après infection par uns aérosol de spores d'*Aspergillus*

Référence	Animal	<i>Aspergillus</i>	Molécule <sup>1</sup>	Voie <sup>2</sup>	Dose	Date, durée	Survie	Charge fongique
Cacciapuoti et coll., 2000	CF1 cortisone	<i>A. fum.</i> , <i>A. fla</i>	POSA	p.o.	0,025-25	J-1 à J7	100% à 10 et 25 mg/kg	↘ ↗
			ITRA	p.o.	0,025-25	J-1 à J7	NS	
Hoeben et coll., 2006	ICR cortisone	<i>A. fla</i>	ITRA	Aer, p.o.	30x3j	J-1 à J-6	Max 60% avec aérosol vs 0% PO	
	Balb/c neutro	<i>A. fum</i>	L-AmB	i.v.	5	-6h ou -6 + -24h	Améliorée si 2 doses	
Rieg et coll., 2006					15	J-1 et/ou J-2	Tendance à la protection	
					15	J-1 ET J-2	100% vs 50% témoins	↗
			ABLc	i.v.	7,5	J-4 et J-1	75% vs 25% témoins	↗
			AmB	i.v.	7,5	J-4 et J-1	NS	
			CAS	i.v.	1	J-4 et J-1	NS	
					1	J-4 et J-1	NS	
						-6h 1 dose	88% vs 25% témoins	↘
Tolman et coll., 2009	Balb/c neutro	<i>A. fum</i>	VORICO	Aer	6 mg/mL	J-2 - J7	60-90% vs 30 AmB depuis J1	NS

Tableau VI – Etudes de la prophylaxie antifongique après infection par voir intranasale ou intraveineuse par *Aspergillus*.

Référence	Animal	Infection	Molécule <sup>1</sup>	Voie <sup>2</sup>	Dose	Date, durée	Survie	Charge fongique
Allen et coll., 1994	Souris	Intranasale	L-AmB	ND	ND	ND	Prolongée avec fort inoculum	↘ 80%-100%
			AmB	ND	ND	ND	Prolongée avec fort inoculum	↘ 0%-100%
BitMansour et coll., 2000	Lapin neutro	i.v.	ANIDU	iv	1, 5	J-4 à J3	5 mg : 85%, 1mg : 40%, témoin : 0%	↘
Lewis et coll., 2002	Balb/c neutro	Intranasale	ITRA	ITRA(p.o.)	ITRA(50x3)	ITRA(J-3)	ITRA : 0 ; AmB : 60%	ITRA+AmB
			AmB	AMB(i.p.)	puis AmB	AmB(J1-J4)	ITRA+AmB : 0-20%	>
Lewis et coll., 2008	Balb/c neutro	Intranasale	L-AmB	i.p.	5, 10, 20	J-1 (1 dose)	Antagonisme	AmB seul
			MICA	i.p.	5, 10, 20	J-1 (1 dose)	80-90% vs 0% témoin	↘ ↗
Peiraitiene et coll., 2001	Lapin neutro	Intranasale	POSA	p.o.	2, 6, 20	J-4 à J12	90% vs 0% témoin	↘ ↗
			ITRA	p.o.	2, 6 20	J-4 à J12	25% vs 0% témoin	NS
Roberts et coll., 2000	Lapin neutro	i.v.	ANIDU	iv	5, 10	J-2 à J6	100% protection (id. AmB 1mg/kg)	↘

1. ABLc : Amphotericin B Liposomal Complex ; AmB : Amphotericin B ; ANIDU : Anidulafungine ; CAS : Caspofungine ; ITRA : Itraconazole ; L-AmB : Liposomal-Amphotericin B ; POSA : Posaconazole ; VORICO : Voriconazole

2. Aer : aérosol ; i.p. : intra-péritonéale i.v. : intra-veineuse ; p.o. : per os

### 2.2.4.2. Schémas prophylactiques

L'efficacité d'une seule dose de L-AmB administrée de façon prophylactique a été évaluée dans nos deux modèles d'infection aspergillaire (Figure 23). L'évaluation de l'efficacité d'une administration complémentaire a été réalisée uniquement dans le protocole de primo-infection. Dans ce modèle, nous avons également évalué l'efficacité d'une prophylaxie administrée chez un hôte immunodéprimé exposé à un aérosol de spores, de façon à simuler la situation d'une prophylaxie administrée suite à une exposition accidentelle, telle qu'elle peut survenir en cas de rupture de flux ou de travaux hospitalier mal protégés.

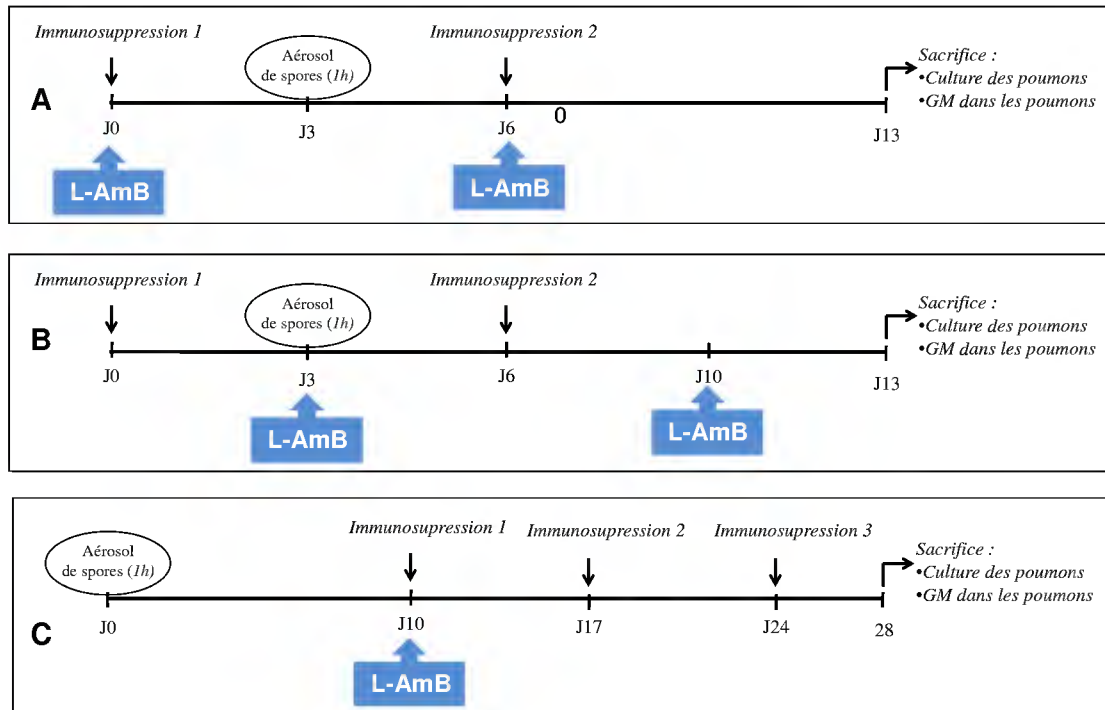


Figure 23 – Schémas prophylactiques. A-Traitement L-AmB lors de la mise sous traitement immunosuppresseur. B-Traitement L-AmB au moment d'une exposition à des spores fongiques. C-Traitement L-AmB lors de la mise sous immunosuppresseurs dans un protocole de réactivation.

Dans toutes les expérimentations, l'évaluation de l'efficacité a été effectuée de façon comparative avec des souris immunodéprimées, exposées mais non traitées. Des souris immunodéprimées non exposées, traités ou non traités, ont servi de témoins expérimentaux de la toxicité intrinsèque du traitement immunosuppresseur. Compte tenu des limites de taille du dispositif expérimental d'exposition et de la production de spores, des lots de 10 souris ont été utilisés dans les bras "traités" et "non traités", et de 5 souris pour les témoins "non exposés". L'évaluation de l'efficacité de la prophylaxie a été évaluée sur les paramètres suivants :

- survie à J13 (modèle de primo-infection) ou J28 (modèle réactivation)
- charge fongique quantifiée par rétroculture du broyat pulmonaire (mêmes dates)
- taux de GM dans le broyat de tissu pulmonaire (mêmes dates)



### 2.2.4.3. Résultats et discussion

Dans le modèle de primo-infection, nos résultats montrent qu'une seule injection de L-AmB administrée le jour du début de l'immunodépression (soit 3 jours avant l'exposition) ne permet pas de diminuer significativement la charge fongique et le taux de GM dans les poumons par rapport à des souris non traitées. Une seconde administration s'est avérée nécessaire pour obtenir un effet significatif sur les charges fongiques pulmonaires mais pas sur le taux de GM.

Par contre, une simple administration de L-AmB le jour de l'exposition permet une réduction significative des charges fongiques et du taux de GM (Figure 1.B de l'article).

Dans le modèle de réactivation, nos résultats montrent qu'une seule administration de L-AmB effectuée au moment de l'immunosuppression, soit 10 jours après l'exposition a un effet significatif sur le taux de réactivation et sur la charge pulmonaire à J28, comparativement aux souris non traitées.

Ces résultats montrent que l'efficacité prophylactique de L-AmB est fonction des schémas d'administration et d'exposition.

Transposé dans un cadre clinique, on peut considérer que des administrations répétées sont nécessaires lorsque la prophylaxie est administrée de façon empirique devant un risque potentiel d'exposition. Par contre, une seule administration pourrait s'avérer suffisante pour prévenir la survenue d'une aspergillose invasive chez un patient ayant été exposé, à condition que cette administration soit faite rapidement après l'exposition. Cette situation est rare, dans la mesure où l'exposition fongique est rarement identifiée, mais elle s'est présentée récemment à l'hôpital Saint-Louis lors d'une contamination importante de l'air d'un service d'hématologie, consécutive à une contamination des circuits de ventilation.

La preuve de l'efficacité d'une seule injection de L-AmB à prévenir ou limiter sensiblement le risque de réactivation d'une infection préalablement acquise est une donnée nouvelle dont les retombées cliniques seraient à évaluer. Cette prophylaxie pourrait par exemple être proposée chez les patients ayant un portage d'*Aspergillus* dans les voies aériennes supérieures et devant recevoir un traitement immunosuppresseur.

### 2.2.5. Article



**Efficacy of Liposomal amphotericin B for prophylaxis of acute or reactivation models of invasive pulmonary aspergillosis**

Journal:	<i>Mycoses</i>
Manuscript ID:	MYC-OA-2012-151.R1
Manuscript Type:	Original Article
Date Submitted by the Author:	22-Aug-2012
Complete List of Authors:	LELEU, Christopher; Université Paris Diderot, Sorbonne Paris Cité,, EA 3520 Parasitology-Mycology MENOTTI, Jean; APHP, St-Louis Hospital,, Parasitology-Mycology MENECEUR, Pascale; Université Paris Diderot, Sorbonne Paris Cité,, EA 3520, Parasitology-Mycologie CHOUKRI, Firas; Université Paris Diderot, Sorbonne Paris Cité,, EA 3520 SULAHIAN, Annie; Université Paris Diderot, Sorbonne Paris Cité,, EA 3520 GARIN, Yves; APHP, St-Louis Hospital,, Parasitology-Mycology DEROUIN, Francis; APHP, St-Louis Hospital, Parasitology-Mycology
Keywords:	Aspergillosis, Aspergillus fumigatus, Ambisome, antifungal activity, antigen test, immunodeficiency

SCHOLARONE™  
Manuscripts

# Mycoses

## 30 ABSTRACT

31

32 **Background** The efficacy of antifungal prophylaxis for prevention of invasive aspergillosis  
33 (IA) may depend on whether IA results from recent inhalation of spores or reactivation of  
34 latent colonization.

35 **Objectives** Compare the efficacy of liposomal amphotericin-B (LAmB) for prophylaxis in  
36 acute and reactivation models of IA.

37 **Methods** In the acute model, mice immunosuppressed from day 0 were challenged at d3  
38 with an aerosol of *A.fumigatus*. LAmB (15 mg.kg<sup>-1</sup>) was administered at d0 or at challenge. In  
39 the reactivation model, naïve mice exposed to *A.fumigatus* remained untreated until  
40 clearance of spores from the lungs, then immunosuppressed to induce reactivation. A single  
41 LAmB dose was administered at start of immunosuppression.

42 **Results** In the acute model, a single administration of LAmB at start of immunosuppression  
43 was not effective, but an additional administration resulted in a significant decrease in lung  
44 fungal burden (p<0.05 vs controls). A significant prophylactic efficacy was observed when  
45 LAmB was administered once at challenge (p<0.01). In the reactivation model, a single  
46 LAmB administration at start of immunosuppression significantly reduced both reactivation  
47 rate and fungal burden versus controls (p<0.01).

48 **Conclusions** Our results show that the conditions under which IA develops and timing of  
49 administration of LAmB were determinant variables for prophylactic efficacy.

50

51

# Mycoses

## 52 INTRODUCTION

53 Invasive aspergillosis is a major cause of morbidity and mortality in immunocompromised  
54 patients, especially in those with underlying haematological malignancies [1, 2]. The primary  
55 route of human infection is the inhalation of airborne conidia, followed by conidial deposition  
56 in the bronchioles or alveolar spaces. In healthy individuals, *Aspergillus* conidia and  
57 germinating hyphae are destroyed by macrophages and neutrophils recruited at the site of  
58 infection [3]. In patients with prolonged neutropenia and corticosteroid-induced  
59 immunosuppression, there is a risk of developing IA, as a result of impaired clearance  
60 capacity of host immune defences.

61 The incubation period between exposure and IA is largely unknown. The occurrence of  
62 outbreaks of IA after documented environmental contamination by *Aspergillus* spores and  
63 the reduction of IA incidence when patients at risk are maintained in protected environments  
64 argues in favour of occurrence of IA directly consequent to exposure to *Aspergillus* conidia  
65 [4-6]. However, sporadic cases of IA still occur, most frequently after hospital discharge and  
66 more rarely in the very early phase of admission [1, 7, 8]. Since *Aspergillus* spores are  
67 ubiquitous in the community environment, it is likely that these patients have been previously  
68 exposed to *Aspergillus* conidia and might have been colonized with *Aspergillus* before they  
69 entered the hospital. The reactivation of spores present in pulmonary alveoli following  
70 immunosuppressive therapy could explain the early occurrence of IA in these patients.  
71 Similarly, cases occurring after hospital discharge could be consequent to new exposure to  
72 *Aspergillus* conidia but may also follow reactivation of dormant colonization at the onset of  
73 immunosuppressive conditions [9, 10].

74 Although the hypothesis of reactivation following colonization has not been demonstrated, it  
75 remains a plausible pathophysiologic mechanism to consider. Few studies have been  
76 designed to simulate reactivation of latent aspergillosis. To our knowledge, one mouse model  
77 and one rat model combining intratracheal infection then corticosteroid therapy have been  
78 published [11, 12]. In both studies, the inoculum was administered intratracheally, either as a  
79 spore suspension or agarose beads containing conidia. After a lag period without treatment,

## Mycoses

80 the recurrence of aspergillosis occurred following administration or re-introduction of  
81 immunosuppressive drugs, and was assessed by fungal titration and histopathology. In one  
82 study, a single administration of aerosolized amphotericin B two days before exposure was  
83 found to reduce the mortality due to recurrences [12]. Despite their performance and  
84 originality, these models have some limitations, mainly because of the artificial or complex  
85 mode of infection.

86 Based on previous experience and recommendations on preclinical studies in animal models  
87 of invasive aspergillosis [13, 14], we developed a new model of reactivation IA following  
88 airborne exposure to *A. fumigatus* and then compared the prophylactic efficacy of LAmB in  
89 this model and in a model of acute IA in neutropenic mice, in order to determine if the  
90 efficacy of antifungal prophylaxis could depend on whether IA results from recent inhalation  
91 of spores or reactivation.

92

### 93 MATERIALS AND METHODS

94 ***Aspergillus* strain and preparation of the inoculum.** The reference Af293 strain of *A.*  
95 *fumigatus* [15] was used for all experiments. It was grown on Sabouraud-chloramphenicol  
96 agar Petri dishes at 28°C for 7 days. Conidia were then harvested by rinsing the culture with  
97 sterilized water containing 0.002% Tween 80. The day before mouse exposure, the collected  
98 suspension was centrifuged at 3000 g for 15 min, and then the pellet was resuspended in  
99 water containing 0.002% Tween 80, filtered through a sterile sieve to eliminate remaining  
100 agar debris and stored at +4°C. On the day of exposure, the purified spore suspension was  
101 counted using a Malassez hemacytometer and adjusted to the final required concentration  
102 for nebulization.

103

104 **Animals** Adult BALB/c female mice weighing 18-20g (Charles Rivers, Lyon, France) were  
105 used and housed under sterile conditions throughout the experiments. Experimental  
106 protocols involving mice have been approved by the animal care and use committee of the  
107 Paris-Diderot University, and all investigations were performed in accordance with prevailing

## Mycoses

108 regulations regarding the care and use of laboratory animals from the European Commission  
109 [16].

110

111 **Animal challenge** Spores were aerosolized using a Collison Nebulizer (BGI, Waltham, MA,  
112 USA) provided by compressed air at a 2-bar pressure. Using a particle counter we had  
113 previously checked that less than 5% of particles  $>5\mu\text{m}$  were detected in the aerosol (data  
114 not shown), suggesting that very few spores clustered during nebulization. The generated  
115 aerosol was connected to an exposure chamber (40 x 40 x 20 cm) the upper part of which  
116 consisted of a removable 40 x 40 x 5 cm high-efficiency particulate air (HEPA) filter (Camfil  
117 MEGALAM filter MD14, Camfil Farr, La Garenne Colombes, France). Each mouse was  
118 introduced into an individual wire-mesh cage, and then placed into the exposure chamber.  
119 Groups of up to 24 mice were simultaneously exposed for 60 minutes to aerosols generated  
120 from a spore concentration in the nebulizer ranging from 3 to  $5 \times 10^8$  spores. $\text{mL}^{-1}$ .

121 All mice experiments were performed using this range of spore concentration. The  
122 corresponding inoculum dose, *i.e.* number of viable spores inhaled by each mouse, was  
123 estimated to be between  $4.0 \times 10^4$  and  $5.2 \times 10^4$  spores/mouse. These estimates were  
124 calculated using a previously developed Bayesian model describing the relationship between  
125 the concentration of spores in the nebulizer suspension and in the air of the exposure  
126 chamber [17], and taking into account the respiratory parameters of mice and the spore  
127 viability in the air of the exposure chamber. This viability was estimated at  $65\% \pm 16$  from 40  
128 separate quantitative fungal cultures performed on air samples collected in the exposure  
129 chamber using a CIP 10-M liquid sampler (Arelco, Fontenay-sous-bois, France) (data not  
130 shown).

131

132 **Drugs** All immunosuppressive agents were prepared on the day of use. Cyclophosphamide  
133 (Baxter, Maurepas, France) was dissolved in sterile saline ( $25 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ ) and administered  
134 intraperitoneally (IP) ( $250 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ ). Cortisone acetate (Sigma) was suspended at  $20 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$   
135 in PBS containing 0.02% Tween 80 and then administered by subcutaneous injection (200

## Mycoses

136 mg.kg<sup>-1</sup>). Liposomal amphotericin B, Ambisome® (Gilead Sciences, Boulogne France)  
137 (LAmB 50 mg) was reconstituted in 12 ml of sterile water, diluted 1:2 in sterile 5% dextrose  
138 water and then administrated IP at a dosage of 15 mg.kg<sup>-1</sup>.

139

### 140 **Experimental models**

#### 141 **Model of acute IA**

142 Experimental conditions were adapted from those described by Sheppard *et al.* [18-19].  
143 Balb/c mice received a combination of cyclophosphamide 250 mg.kg<sup>-1</sup> and cortisone acetate  
144 200 mg.kg<sup>-1</sup> at day 0 and were exposed to the aerosol of spores 3 days later. A second  
145 administration of cyclophosphamide 250 mg.kg<sup>-1</sup> and cortisone acetate 200 mg.kg<sup>-1</sup> was  
146 given at day 6 and mice were sacrificed at day 13 for fungal burden assessment.

147

#### 148 **Reactivation model**

149 In an initial experiment 28 Balb/c mice were exposed to the aerosol of *A. fumigatus* spores,  
150 and then randomly allocated to 2 groups. In one group of 18 mice, 3 mice were sacrificed at  
151 days 3, 5, 10, 14, 21 and 28 post exposure to follow the kinetics of fungal clearance in the  
152 lungs of immunocompetent mice. The second group of 10 mice was immunosuppressed  
153 from day+10 post-exposure in order to induce reactivation. This date was selected on the  
154 basis of the known delay of clearance of spores following exposure [20]. The selected  
155 immunosuppressive regimen was cyclophosphamide 250 mg.kg<sup>-1</sup> plus cortisone acetate 200  
156 mg.kg<sup>-1</sup> administered weekly for 3 weeks. Five mice from this group were sacrificed at day 21  
157 and at day 28 post-exposure for fungal burden assessment.

158 For both models, mice were housed under sterile conditions and received antibiotics in the  
159 drinking water (doxycycline 1 mg.mL<sup>-1</sup>) from the initiation of immunosuppression to the end of  
160 the experiment.

161

162 **Treatment** The prophylactic efficacy of LAmB administered at the start of  
163 immunosuppression was examined in the setting of acute and reactivation IA. The efficacy of

## Mycoses

164 LAmB administered immediately after fungal exposure of immunocompromised mice was  
165 also examined in the acute model.

166 Each treatment and untreated control group comprised 8 to 10 mice. Each experiment  
167 comprised non-fungal exposed mice receiving immunosuppressive drugs plus LAmB (3  
168 mice) or immunosuppressive drugs alone (3 mice).

169

170 **Assessment of infection in mice** Lungs of euthanized mice were collected and weighed  
171 aseptically, then homogenized with a tissue grinder (Ultra Turrax, Staunfen, Germany) in 2ml  
172 of sterile PBS. One half of this homogenate (1ml) was plated onto Sabouraud-  
173 chloramphenicol Petri dishes (undiluted and diluted at 1:10) for quantitative fungal culture  
174 and the other half was centrifuged at 10,000 g for 15 min. The *Aspergillus* galactomannan  
175 (GM) antigen was quantified in the supernatant fluid using a sandwich immunocapture ELISA  
176 technique (Platelia *Aspergillus* EIA, Bio-Rad, Marnes-la-Coquette, France). Based on  
177 previous experiments (unpublished) showing a mean index value of  $0.14 \pm 0.06$  in 63 non-  
178 infected mice, results were considered positive if the index value was  $\geq 0.4$ . When the GM  
179 index was over the maximum standard value, a GM value of 10 was used for statistical  
180 analysis.

181 In the reactivation model experiments, one part of a lung lobe was collected at sacrifice to  
182 perform histopathological examination using periodic acid-Schiff (PAS) and Haematoxylin-  
183 eosin (HE) staining.

184

185 **Statistical analysis** Statistical analyses were performed with Graph Pad Prism, version 5.04  
186 (Graph Pad Software, Inc, San Diego, CA). Mann-Whitney U-test or ANOVA were used for  
187 single or multiple comparisons of fungal burdens and GM values between groups. Statistical  
188 significance was noted at  $p < 0.05$ .

189

190

191



## Mycoses

### 192 RESULTS

#### 193 Model of acute IA (Figure 1)

194 Four experiments were performed with this model, using the same exposure conditions (**Fig.**  
195 **1**). Among 32 untreated control mice (pool from the 4 separate experiments with 8 mice in  
196 each group) 28 were alive at d13 (4 accidental deaths). 92.8% (26/28) were infected, as  
197 assessed by fungal culture of the lungs, with a mean fungal burden of  $7,803 \pm 1,813$  CFU.g<sup>-1</sup>.  
198 Consistently, 100% of mice (including those with a negative culture) had a positive GM value  
199 (i.e. >0.4) (mean =  $6.01 \pm 0.79$ ). Fungal burdens and GM values were not significantly  
200 different between the experiments (ANOVA, p=0.25 and p=0.43 respectively). All mice that  
201 had not been challenged with *Aspergillus* but had received immunosuppressive drugs were  
202 culture-negative and presented a negative GM index (n=12, mean  $0.16 \pm 0.03$ ).

203

204 **Reactivation model** The kinetics of fungal clearance in the lungs of naïve Balb/c mice  
205 exposed to the aerosol challenge is presented in **Fig. 2** (identified by the open symbols, 3  
206 mice at each date). Fungal cultures of lungs were positive in all mice sacrificed at day 3 and  
207 day 5 post exposure (mean  $500 \pm 149$  and  $163 \pm 98$  CFU.g<sup>-1</sup> respectively) and negative  
208 thereafter. Galactomannan levels in lung homogenates increased from day 3 (mean 0.57),  
209 reached a maximum value at day 5 (mean 0.67), remained positive until day 14, and then  
210 returned below the threshold value of 0.4 by day 21. In mice receiving cyclophosphamide  
211 and cortisone acetate from day 10, (**Fig. 2**, close symbols, n=10) no death was recorded at  
212 the time of sacrifice. The reactivation rate was 20% at day 21 and 100% at day 28, with a  
213 mean fungal burden of  $367 \pm 367$  CFU.g<sup>-1</sup> and  $1336 \pm 601$  CFU.g<sup>-1</sup> respectively and GM  
214 values of  $2.27 \pm 1.93$  and  $4.23 \pm 2.35$  respectively. Histopathological examination of lung  
215 sections from two heavily infected mice showed large focal lesions consisting of a central  
216 necrotic abscess surrounded by a cellular infiltrate and containing numerous fungal filaments  
217 (**Fig. 3**).

218

219

## Mycoses

### 220 **Efficacy of LAmB prophylaxis in the model of acute IA**

#### 221 *Administration of LAmB at initiation of immunosuppression*

222 In 2 separate experiments (16 mice each), LamB prophylaxis was administered at initiation of  
223 immunosuppression, *i.e.* 3 days before challenge. Thirty mice were alive at day 13 (2  
224 accidental deaths). Results were pooled with respect to the non-significant difference  
225 between fungal burdens and GM values in uninfected controls between the 2 experiments. A  
226 single dose of LAmB, 15 mg.kg<sup>-1</sup> resulted in a non-significant decrease in fungal burden (**Fig.**  
227 **4A**) or GM level compared to untreated mice (**Table I**). A second administration of LAmB  
228 resulted in a significant decrease in fungal burden compared to untreated mice ( $p < 0.05$ ), but  
229 a non-significant decrease in GM values (**Table I**)

#### 230 • *Administration of LAmB after fungal exposure of immunocompromised mice*

231 This was assessed in 2 separate experiments (16 mice each, 31 alive at day13) attempting  
232 to simulate the benefit of LAmB administration following an incidental exposure to *A.*  
233 *fumigatus* spores. A single administration of LAmB after exposure resulted in a significant  
234 decrease in the lung fungal burden and GM index compared to untreated controls ( $p < 0.01$  for  
235 both comparisons) (**Fig.4B, Table I**). In mice receiving a second injection of LAmB 7 days  
236 later, fungal burden remained significantly lower than in untreated controls, as for GM index  
237 values ( $p < 0.05$  for both comparisons), but were not significantly different to those of mice  
238 receiving a single dose (**Fig.4B, Table I**).

239

### 240 **Efficacy of LAmB prophylaxis in the reactivation model**

241 In this model, the prophylactic efficacy of LAmB was examined in one experiment, with a  
242 single administration of 15 mg.kg<sup>-1</sup> given on the first day of immunosuppression, *i.e.* 10 days  
243 post exposure. At that time, all immunocompetent mice had cleared their spores as assessed  
244 by negative culture, except for one mouse presenting a low fungal burden (25 CFU.g<sup>-1</sup>).  
245 Three out of 10 mice died in the untreated control group and 1 out of 10 in the group of mice  
246 receiving LAmB prophylaxis. At sacrifice (*i.e.* 28 days post exposure and 18 days since  
247 starting immunosuppression), 7/7 (100%) of challenged but untreated immunosuppressed

## Mycoses

248 mice had positive lung cultures with a mean fungal burden of  $1,094 \pm 497$  CFU.g<sup>-1</sup> (**Fig. 5**)  
249 and 4/7 were GM positive. In comparison, 4/9 mice receiving LAmB did reactivate (44%), as  
250 assessed by positive lung cultures (with fungal burdens lower than 25 CFU.g<sup>-1</sup> in 3 of 4 mice)  
251 and positive GM determinations. For both the incidence of infection and the fungal burden,  
252 the difference was significant compared to untreated controls ( $p < 0.01$ ). A reduction in GM  
253 levels was noted in treated mice compared to untreated mice but the difference was not  
254 statistically significant (**Table I**).

255 None of the unchallenged control mice died from side effects of immunosuppressive drugs  
256 and none had positive lung cultures or positive GM indices at day 28.

257

### 258 **DISCUSSION**

259 Despite marked progress in the diagnosis and treatment of fungal infections, IA remains  
260 a concern because of the increasing numbers of patients at risk [1], its high mortality rate in  
261 transplant patients [21] and the occurrence of nosocomial outbreaks. Indeed, preventive  
262 measures based on environmental protection proved effective for reducing the incidence of  
263 aspergillosis during hospitalization [22], especially during the first few weeks after  
264 transplantation. However, environmental contamination remains unpredictable or undetected  
265 in most reported outbreaks [4], supporting the administration of preventive prophylaxis to  
266 high-risk patients who may become exposed to *Aspergillus*. Cases of IA also frequently  
267 occur after hospital discharge, suggesting other risk factors than exposure during periods of  
268 risk. The risk of reactivation of dormant conidia has been suggested [23] but its contribution  
269 to the pathogenesis and incidence of IA has not been characterized [24]. Assuming such a  
270 risk for *Aspergillus* seems reasonable considering its similarity with pathogenetic  
271 mechanisms proposed for many other opportunistic infections occurring in  
272 immunocompromised patients. If one assumes such a risk does exist, this could have direct  
273 consequences in terms of prophylaxis, which could therefore be considered for at-risk  
274 patients previously exposed to *Aspergillus* conidia.

## Mycoses

275 In this context, we re-examined the experimental protocols that are used for assessing  
276 prophylaxis in animal models, trying to focus on the putative context of occurrence of IA in  
277 immunocompromised hosts. In the proposed experimental model, the aerosol challenge with  
278 *A. fumigatus* conidia was proposed as a more realistic model of contamination compared to  
279 intratracheal inoculation, resulting in a more homogeneous pulmonary infection than  
280 intranasal instillation [25]. We therefore developed a new murine model of IA, consisting of  
281 inducing the reactivation of a previously acquired latent infection. After challenge, the  
282 clearance of spores from the lung of exposed mice (as assessed by negative fungal culture)  
283 was observed within 10 days, as previously reported in immunocompetent mice [20]. A high  
284 rate of reactivation was induced after repeated administration of corticosteroid plus  
285 cyclophosphamide, resulting in an increase in fungal burden in lung with massive focal  
286 necrotic lesions, similar to those observed by Sheppard *et al.* [19] in the aerosol model of  
287 primary IA.

288 Using this reactivation model, as well as an aerosol model of acute IA, we examined the  
289 efficacy of prophylaxis by LAmB. We preferred the IP rather than IV administration of LAmB  
290 since mice were already injected twice a week for immunosuppression. However, the high  
291 dose that was administered ( $15 \text{ mg.kg}^{-1}$ ) attenuated the risk to underestimate the efficacy of  
292 LAmB due to a lower concentration in lungs following IP compared to IV administration [26].  
293 Indeed, the choice of LAmB is debatable in regard to other drugs proposed for prophylaxis in  
294 humans [27-28], but it was used as the test drug in our models, since amphotericin B  
295 remains a reference antifungal drug and the liposomal formulation is better tolerated than  
296 conventional amphotericin B, with limited toxicity at high dosage [29]. In addition, we found  
297 minimal and discrepant information in the literature on the prophylactic efficacy of LAmB  
298 administered IP or IV in animal models. In neutropenic Balb/c mice inoculated intranasally by  
299  $2.5 \times 10^6$  conidia of *A. fumigatus*, Lewis *et al.* [30] showed that a single administration of  
300 LAmB one day before exposure was protective and significantly reduced fungal burden in  
301 lungs compared to untreated controls. By contrast, in a similar neutropenic model in which  
302 mice were challenged by an aerosol of *A. fumigatus* conidia, Reig *et al.* [31] found that two

## Mycoses

303 doses of  $7.5 \text{ mg.kg}^{-1}$  given 1 or 2 days prior to infection significantly improved survival, but a  
304 single-dose of  $15 \text{ mg.kg}^{-1}$  administered 1 or 2 days prior to infection resulted only in a trend  
305 towards improved survival compared to untreated controls. However, when mice were  
306 infected 3 days after a single dose of LAmB at  $15 \text{ mg.kg}^{-1}$ , a worsening effect on survival was  
307 observed [31].

308 In the model of acute IA, we confirmed the efficacy of a single administration of LAmB  
309 administered to mice that were already immunocompromised at the time of challenge, a  
310 situation that aimed to simulate the prevention following a documented or probable incidental  
311 exposure to *Aspergillus* in patients. By contrast, prophylaxis started empirically at initiation of  
312 immunosuppression, *i.e.* simulating the prevention of a putative exposure occurring later on,  
313 was less effective unless a second dose of LAmB was administered during the  
314 immunosuppressive phase. This supports the need for repeated administration to maintain a  
315 protective effect over time. In humans, repeating treatment could be more effective but could  
316 be associated with a higher adverse event rate and could also have an impact on cost.  
317 Administration of aerosolized LAmB could be an effective alternative, as evidenced in several  
318 experimental studies [32-34] and because this route of administration is associated with  
319 fewer side effects in humans [35-36].

320 In the reactivation model, in which airborne exposure followed by delayed but prolonged  
321 administration of immunosuppressive drugs resulted in a high rate of recurrences, our  
322 experiments aimed to simulate the prophylaxis of reactivation IA in immunosuppressed  
323 patients previously exposed or colonized by *Aspergillus*. This innovative model demonstrated  
324 that a single administration of LAmB given at initiation of immunosuppression markedly  
325 reduced the rate and severity of relapses occurring 3 weeks later, while immunosuppression  
326 was maintained. One should note that the GM determinations in this model were not as  
327 discriminative as fungal culture in identifying reactivation and to separate controls and  
328 treatment groups, possibly due to a persistent background level of GM following the primary  
329 exposure.

## Mycoses

330 Overall our results confirm that not only the exposure conditions but also the  
331 pathogenesis of IA (*i.e.* acute vs reactivation) are key factors to consider for preclinical  
332 assessment of drug prophylaxis. Our ability to simulate in mouse models the conditions of IA  
333 in humans provided useful information on the potential benefits and limitations of this  
334 preventive approach. The benefit of a single administration of LAmB was clearly shown in the  
335 case of immediate administration following exposure to spores, as may occur in patients  
336 during hospital building work, for example. Furthermore, benefit for long term prevention of  
337 reactivation of dormant infection which could occur for *Aspergillus* as for other opportunistic  
338 microorganisms in immunocompromised patients, was also demonstrated. Other antifungal  
339 drugs used for prophylaxis of IA in neutropenic patients, such as posaconazole, would also  
340 benefit of a similar evaluation in these models.

341

### 342 **ACKNOWLEDGMENTS.**

343 The authors declare that they have no conflict of interest.

344 This work was supported by a grant from Gilead France, and Christopher Leleu was  
345 supported by a doctoral grant from Université Pierre et Marie Curie and EHESP (Ecole des  
346 Hautes Etudes en Santé Publique, Rennes, France).

347 We thank Olivier Thibaudeau for preparing histopathological sections.

348

349 We thank Pr. Stéphane Bretagne for helpful discussions throughout the study and careful  
350 review of the manuscript.

351

352

### 353 **CONFLICT OF INTEREST**

354 The authors declare that they have no conflict of interest.

355

356

357

## Mycoses

### REFERENCES

- 358  
359  
360  
361  
362  
363  
364  
365  
366  
367  
368  
369  
370  
371  
372  
373  
374  
375  
376  
377  
378  
379  
380  
381  
382  
383  
384  
385  
386  
387  
388  
389  
390  
391  
392  
393  
394  
395  
396  
397  
398  
399  
400  
401  
402  
403  
404  
405  
406  
407  
408  
409  
410  
411
1. Lortholary O, Gangneux JP, Sitbon K, Lebeau B, de Monbrison F, Le Strat Y *et al.* Epidemiological trends in invasive aspergillosis in France: the SAIF network (2005-2007). *Clin Microbiol Infect* 2011; **17**: 1882-9.
  2. Segal BH. Aspergillosis. *N Engl J Med* 2009; **360**: 1870-84.
  3. Dagenais TR, Keller NP. Pathogenesis of *Aspergillus fumigatus* in invasive aspergillosis. *Clin Microbiol Rev* 2009; **22**: 447-65.
  4. Vonberg RP, Gastmeier P. Nosocomial aspergillosis in outbreak settings. *J Hosp Infect* 2006; **63**: 246-54.
  5. Peláez T, Muñoz P, Guinea J, Valerio M, Giannella M, Klaassen CH *et al.* Outbreak of invasive aspergillosis after major heart surgery caused by spores in the air of the intensive care unit. *Clin Infect Dis* 2012; **54**: 24-31.
  6. Nicolle MC, Benet T, Vanhems P. Aspergillosis: nosocomial or community-acquired? *Med Mycol* 2011; **49**: S24-9.
  7. Hajjeh RA, Warnock DW. Counterpoint: invasive aspergillosis and the environment--rethinking our approach to prevention. *Clin Infect Dis* 2001; **33**: 1549-52.
  8. Neofytos D, Horn D, Anaissie E, Steinbach W, Olyaei A, Fishman J *et al.* Epidemiology and outcome of invasive fungal infection in adult hematopoietic stem cell transplant recipients: analysis of Multicenter Prospective Antifungal Therapy (PATH) Alliance registry. *Clin Infect Dis* 2009; **48**: 265-73.
  9. Mikulska M, Raiola AM, Bruno B, Furfaro E, Van Lint MT, Bregante S *et al.* Risk factors for invasive aspergillosis and related mortality in recipients of allogeneic SCT from alternative donors: an analysis of 306 patients. *Bone Marrow Transplant* 2009; **44**: 361-70.
  10. Gavalda J, Len O, San Juan R, Aguado JM, Fortun J, Lumbreras C *et al.* Risk factors for invasive aspergillosis in solid-organ transplant recipients: a case-control study. *Clin Infect Dis* 2005; **41**: 52-9.
  11. Nawada R, Amitani R, Tanaka E, Niimi A, Suzuki K, Murayama T *et al.* Murine model of invasive pulmonary aspergillosis following an earlier stage, noninvasive *Aspergillus* infection. *J Clin Microbiol* 1996; **34**: 1433-9.
  12. Niki Y, Bernard EM, Edwards FF, Schmitt HJ, Yu B, Armstrong D. Model of recurrent pulmonary aspergillosis in rats. *J Clin Microbiol* 1991; **29**: 1317-22.
  13. Patterson TF. The future of animal models of invasive aspergillosis. *Med Mycol* 2005; **43**: S115-9.
  14. Clemons KV, Stevens DA. Animal models of *Aspergillus* infection in preclinical trials, diagnostics and pharmacodynamics: What can we learn from them? *Medical Mycology* 2006; **44**: S119-S126.
  15. Nierman WC, Pain A, Anderson MJ, Wortman JR, Kim HS, Arroyo J *et al.* Genomic sequence of the pathogenic and allergenic filamentous fungus *Aspergillus fumigatus*. *Nature* 2005; **438**: 1151-6.
  16. European Commission. European Convention for the protection of vertebrate animals used for experimental and other scientific purposes. 1986
  17. Leleu C, Choukri F, Menotti J, Meneceur P, Sulahian A, Denis J-B *et al.* Relationship between airborne exposure to *Aspergillus fumigatus* and infection in a murine model of invasive aspergillosis: experimental assessment and Bayesian modeling. 5th Trends In Medical Mycology (TIMM), Valencia, Spain, October 5-8<sup>th</sup>, 2011. Abstract No 137, *Mycoses* 2011; **54**: S112.
  18. Sheppard DC, Graybill JR, Najvar LK, Chiang LY, Doedt T, Kirkpatrick WR *et al.* Standardization of an experimental murine model of invasive pulmonary aspergillosis. *Antimicrob Agents Chemother* 2006; **50**: 3501-3.
  19. Sheppard DC, Rieg G, Chiang LY, Filler SG, Edwards JE Jr, Ibrahim AS. Novel inhalational murine model of invasive pulmonary aspergillosis. *Antimicrob Agents Chemother* 2004; **48**: 1908-11.
  20. Schaffner A, Douglas H, Braude A. Selective protection against conidia by mononuclear and against mycelia by polymorphonuclear phagocytes in resistance to *Aspergillus*.

## Mycoses

- 412 Observations on these two lines of defense *in vivo* and *in vitro* with human and mouse  
413 phagocytes. *J Clin Invest* 1982; **69**: 617-31.
- 414 21. Baddley JW, Andes DR, Marr KA, Kontoyiannis DP, Alexander BD, Kauffman CA, *et al.*  
415 Factors associated with mortality in transplant patients with invasive aspergillosis. *Clin Infect*  
416 *Dis* 2010; **50**:1559-67.
- 417 22. Bénét T, Nicolle MC, Thiebaut A, Piens MA, Nicolini FE, Thomas X *et al.* Reduction of  
418 invasive aspergillosis incidence among immunocompromised patients after control of  
419 environmental exposure. *Clin Infect Dis* 2007; **45**: 682-6.
- 420 23. Martino R, Lopez R, Sureda A, Brunet S, Domingo-Albós A. Risk of reactivation of a  
421 recent invasive fungal infection in patients with hematological malignancies undergoing  
422 further intensive chemo-radiotherapy. A single-center experience and review of the literature.  
423 *Haematologica* 1997; **82**: 297-304
- 424 24. Barnes PD, Marr KA. Risks, diagnosis and outcomes of invasive fungal infections in  
425 haematopoietic stem cell transplant recipients. *Br J Haematol* 2007; **139**: 519-31.
- 426 25. Steinbach WJ, Benjamin DK Jr, Trasi SA, Miller JL, Schell WA, Zaas AK *et al.* Value of  
427 an inhalational model of invasive aspergillosis. *Med Mycol* 2004; **42**: 417-25.
- 428 26. Chang T, Olson JA, Proffitt RT, Adler-Moore JP. Differences in tissue drug  
429 concentrations following intravenous versus intraperitoneal treatment with amphotericin B  
430 deoxycholate or liposomal amphotericin B. *Med Mycol.* 2010; **48**:430-5.
- 431 27. Maertens J, Marchetti O, Herbrecht R, Cornely OA, Flückiger U, Frère P *et al.* European  
432 guidelines for antifungal management in leukemia and hematopoietic stem cell transplant  
433 recipients: summary of the ECIL 3--2009 update. *Bone Marrow Transplant* 2011; **46**: 709-18.
- 434 28. Karthaus M. Prophylaxis and treatment of invasive aspergillosis with voriconazole,  
435 posaconazole and caspofungin: review of the literature. *Eur J Med Res* 2011; **16**: 145-52.
- 436 29. Olson JA, Adler-Moore JP, Schwartz J, Jensen GM, Proffitt RT. Comparative efficacies,  
437 toxicities, and tissue concentrations of amphotericin B lipid formulations in a murine  
438 pulmonary aspergillosis model. *Antimicrob Agents Chemother* 2006; **50**: 2122-31.
- 439 30. Lewis RE, Albert ND, Kontoyiannis DP. Efficacy of single-dose liposomal amphotericin B  
440 or micafungin prophylaxis in a neutropenic murine model of invasive pulmonary aspergillosis.  
441 *Antimicrob Agents Chemother.* 2008; **52**: 4178-80.
- 442 31. Rieg G, Spellberg B, Schwartz J, Fu Y, Edwards JE Jr, Sheppard DC *et al.* Antifungal  
443 prophylaxis is effective against murine invasive pulmonary aspergillosis. *Antimicrob Agents*  
444 *Chemother* 2006; **50**: 2895-6.
- 445 32. Kirkpatrick WR, Najvar LK, Vallor AC, Wiederhold NP, Bocanegra R, Pfeiffer J *et al.*  
446 Prophylactic efficacy of single dose pulmonary administration of amphotericin B inhalation  
447 powder in a guinea pig model of invasive pulmonary aspergillosis. *J Antimicrob Chemother*  
448 2012; **67**: 970-6.
- 449 33. Gavaldà J, Martín MT, López P, Gomis X, Ramírez JL, Rodríguez D *et al.* Efficacy of  
450 nebulized liposomal amphotericin B in treatment of experimental pulmonary aspergillosis.  
451 *Antimicrob Agents Chemother* 2005; **49**: 3028-30.
- 452 34. Allen SD, Sorensen KN, Nejdil MJ, Durrant C, Proffit RT. Prophylactic efficacy of  
453 aerosolized liposomal (AmBisome) and non-liposomal (Fungizone) amphotericin B in murine  
454 pulmonary aspergillosis. *J Antimicrob Chemother* 1994; **34**: 1001-13.
- 455 35. Rijnders BJ, Cornelissen JJ, Slobbe L, Becker MJ, Doorduyn JK, Hop WC *et al.*  
456 Aerosolized liposomal amphotericin B for the prevention of invasive pulmonary aspergillosis  
457 during prolonged neutropenia: a randomized, placebo-controlled trial. *Clin Infect Dis* 2008;  
458 **46**: 1401-8.
- 459 36. Morello E, Pagani L, Coser P, Cavattoni I, Cortelazzo S, Casini M *et al.* Addition of  
460 aerosolized deoxycholate amphotericin B to systemic prophylaxis to prevent airways invasive  
461 fungal infections in allogeneic hematopoietic SCT: a single-center retrospective study. *Bone*  
462 *Marrow Transplant* 2011; **46**: 132-6.
- 463



## Mycoses

464 Table 1 : Acute and reactivation models of invasive aspergillosis: mean value  $\pm$  SEM of galactomannan levels (index) in lung homogenates of  
 465 mice treated prophylactically with LAmB 15 mg.kg<sup>-1</sup> and untreated controls.  
 466

	Number of mice	Mean $\pm$ SEM	Significance vs untreated mice
<b>Acute model</b>			
LAmB prophylaxis at initiation of immunosuppression*			
- Untreated	15	5.87 $\pm$ 1.07	-
- single dose	15	4.43 $\pm$ 1.0	NS
- 2 doses	15	3.57 $\pm$ 0.92	NS
LAmB prophylaxis at exposure*			
- Untreated	13	6.17 $\pm$ 1.20	-
- single dose	16	1.49 $\pm$ 0.58	p<0.01
- 2 doses	15	2.79 $\pm$ 0.82	p<0.05
<b>Reactivation model</b>			
Untreated mice (sacrificed at day 28)	7	4.49 $\pm$ 1.95	-
LAmB prophylaxis at initiation of immunosuppression (sacrificed at day 28)	9	1.45 $\pm$ 1.07	NS

467  
 468 \* Cumulative data from 2 experiments

469

470

## Mycoses

### 471 Legend to figures

472

473 **Figure 1.** Acute invasive aspergillosis model. Experimental design and fungal burdens in the  
474 lungs of immunocompromised mice 10 days after an aerosol challenge of *A. fumigatus*  
475 spores (4 separate experiments). Lines indicate the mean fungal burdens.

476

477 **Figure 2.** Reactivation model of invasive aspergillosis. Experimental design and fungal  
478 burdens (CFU.g<sup>-1</sup>) in the lungs of mice after an aerosol challenge of *A. fumigatus* spores  
479 (day 0).

480 Sequential determinations post exposure in immunocompetent mice (open symbols, dotted  
481 lines for mean): at day + 3, 5, 10, 12, 21 and +28 (3 mice at each date).

482 Reactivation in immunosuppressed mice (close symbol, solid lines for mean): determination  
483 at day + 21 and day+ 28 post exposure in mice that were immunosuppressed with  
484 cyclophosphamide + cortisone acetate at day +10, +17 and +24 (5 mice at each date).

485

486 **Figure 3** Tissue sections of lungs of immunosuppressed Balb/c mice presenting with  
487 reactivation of aspergillosis.

488 **3A:** HES staining (x100) showing a large lesion with a central necrotic area surrounded with  
489 a cellular infiltrate;

490 **3B:** PAS stain (x400) showing numerous hyphal sections.

491

492 **Figure 4** Efficacy of LAmB (15 mg.kg<sup>-1</sup>) administered for prophylaxis of acute invasive  
493 aspergillosis after an aerosol challenge of *A. fumigatus* spores.

494 The experimental design and the fungal burdens (CFU.g<sup>-1</sup>) in controls and treatment groups  
495 are shown, combining the results of two independent experiments (open or close symbol).

496 Lines indicate the mean fungal burdens.

## Mycoses

497 **4A:** Prophylaxis started at initiation of immunosuppression (day 0) with subsequent fungal  
498 exposure (day 3); 1 dose administered at day 0 or 2 doses of LAmB administered at day 0  
499 and day 6. Mice were sacrificed at day 13, *i.e.* 10 days post exposure (15 mice in each  
500 group).

501 **4B:** Prophylaxis given at the same time as fungal exposure (day 3) to mice with established  
502 immunosuppression; 1 dose of LAmB administered at day 3 or 2 doses of LAmB  
503 administered at day 3 and day 10. Mice were sacrificed at day 13, *i.e.* 10 days post exposure  
504 (16 mice with 1 dose, 13 with two doses).

505 \*  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.01$

506

507 **Figure 5.** Efficacy of a single dose of LAmB ( $15 \text{ mg.kg}^{-1}$ ) for prophylaxis of reactivation of  
508 aspergillosis (IA).

509 To induce reactivation IA, mice previously exposed to an aerosol of *A. fumigatus* were  
510 immunosuppressed 10 days after exposure with cyclophosphamide + cortisone acetate,  
511 administered weekly for 3 weeks. A single dose of LAmB was administered IP on the first  
512 day of immunosuppression.

513 Mice were sacrificed 18 days after starting immunosuppression *i.e.* 28 days after exposure.

514 Fungal burdens in lungs ( $\text{CFU.g}^{-1}$ ) at day +28 are shown for immunocompromised mice,  
515 either treated with LAmB (open circles  $n=7$ ) or untreated (close circles,  $n=9$ ) and for  
516 *Aspergillus* exposed immunocompetent mice (IC, open square,  $n=4$ ), as control for the  
517 absence of reactivation in non immunocompromised mice. Lines indicate the mean fungal  
518 burdens.

519 \*\*  $p < 0.01$

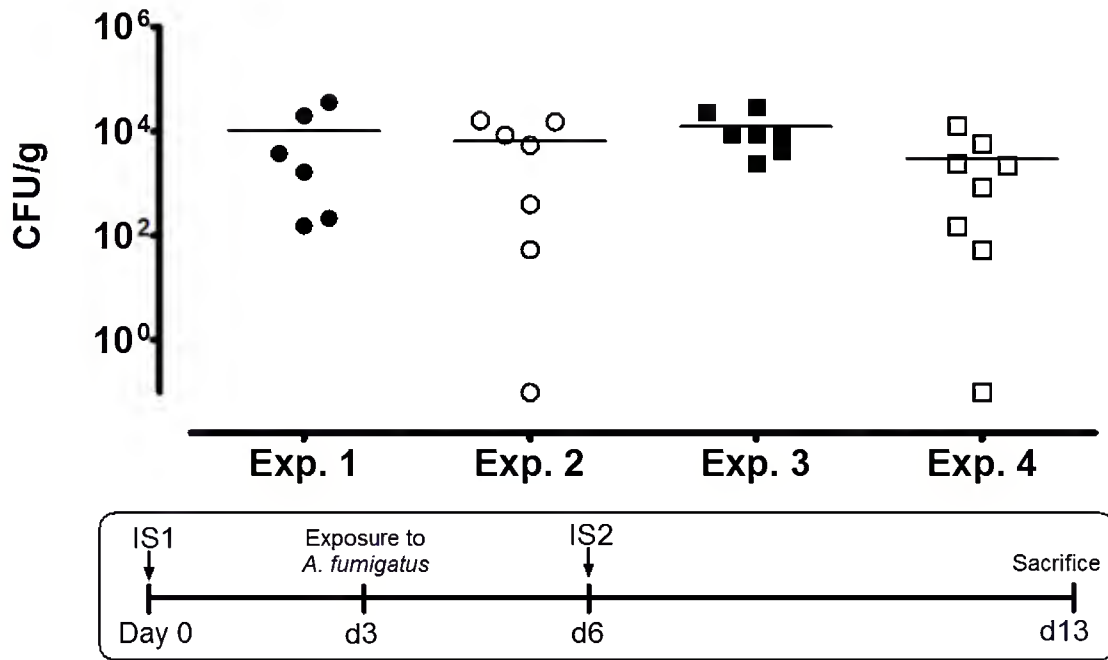
520

521

522

# Mycoses

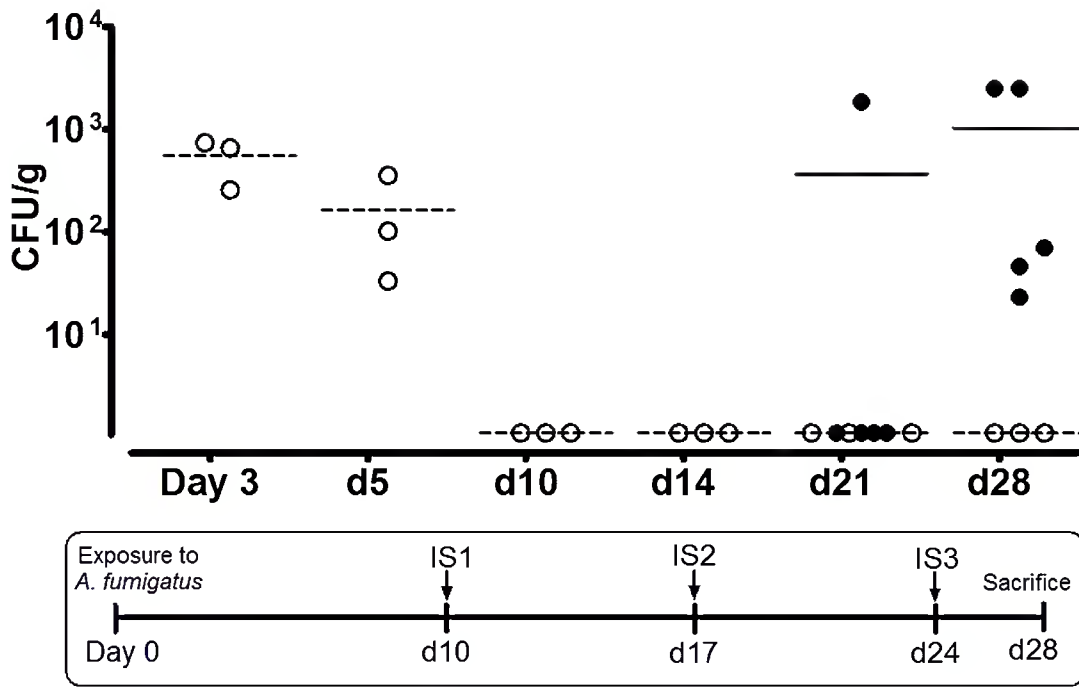
523 Figure 1



524

# Mycoses

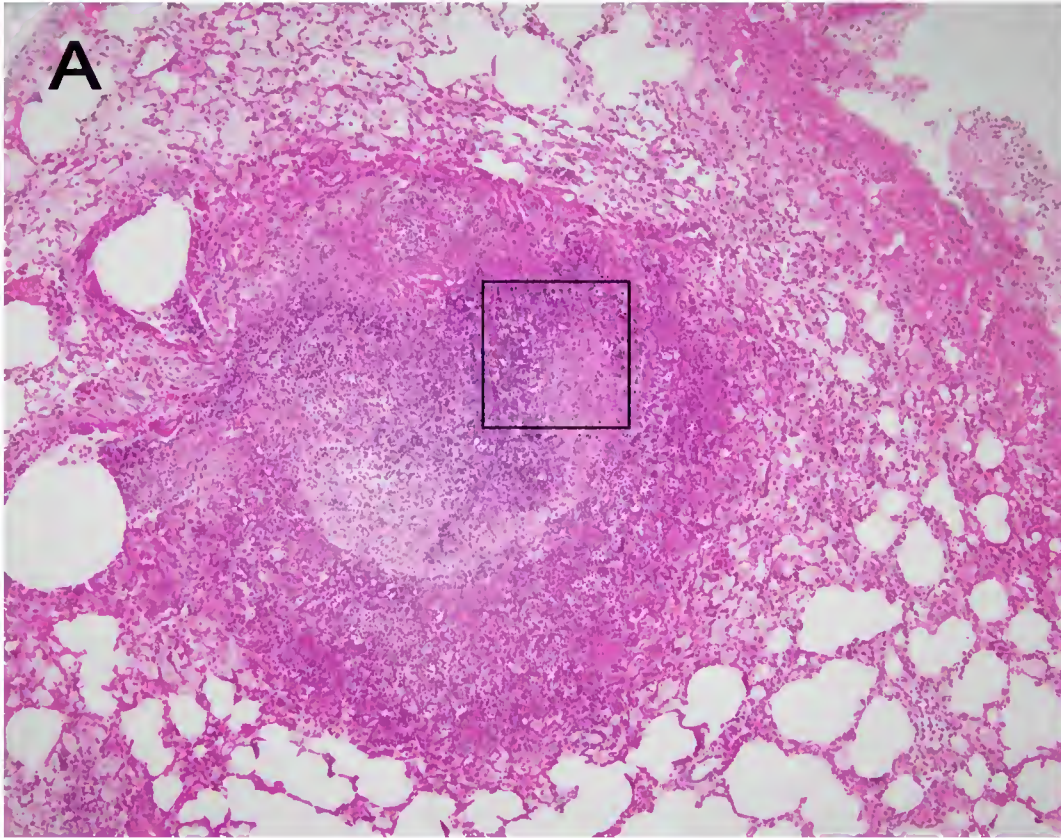
525 Figure 2



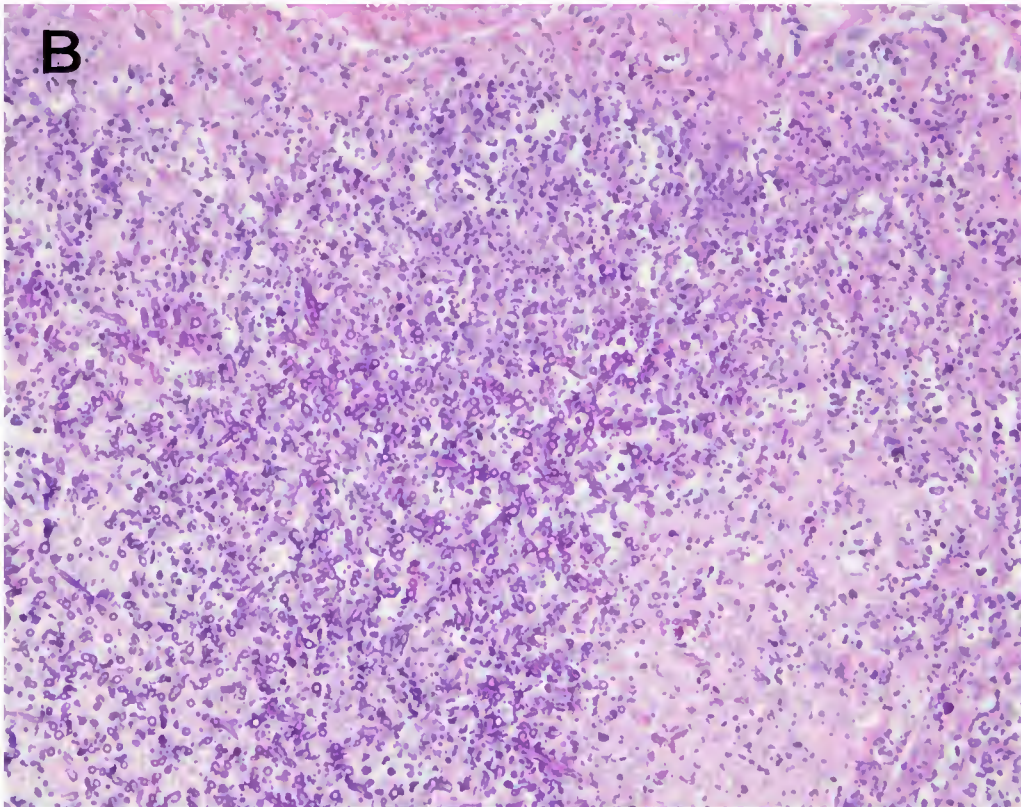
526  
527  
528

# Mycoses

529 **Figure 3**



530  
531

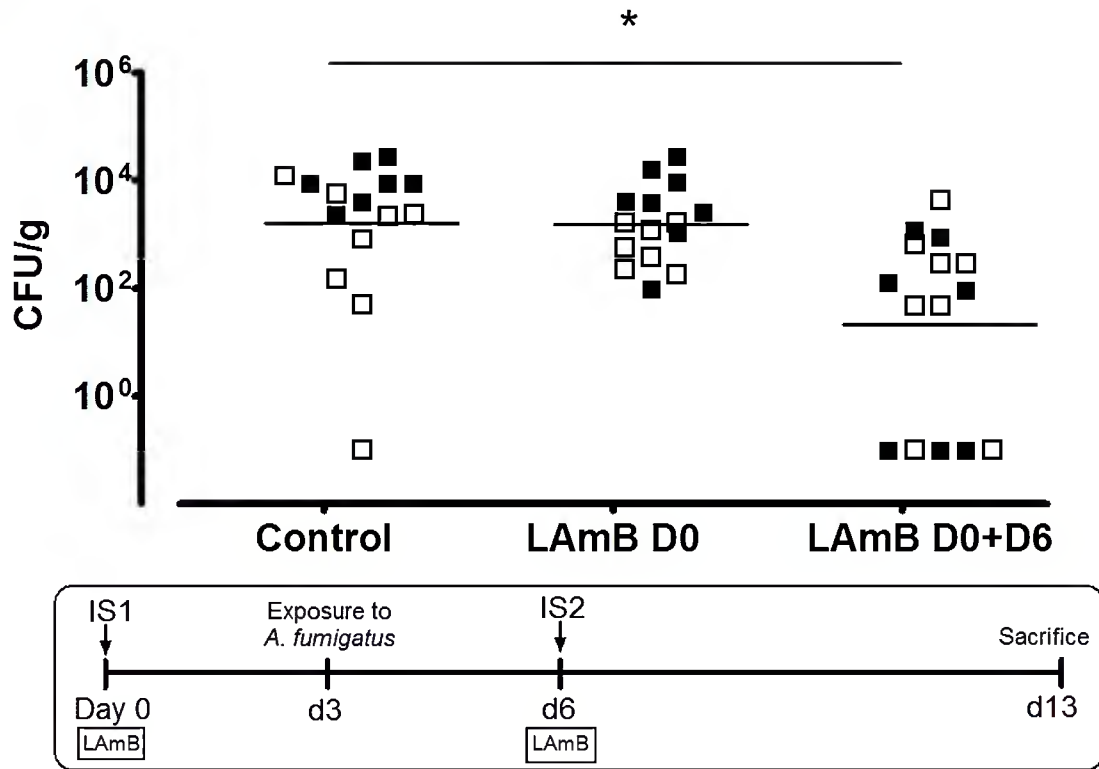


532  
533

# Mycoses

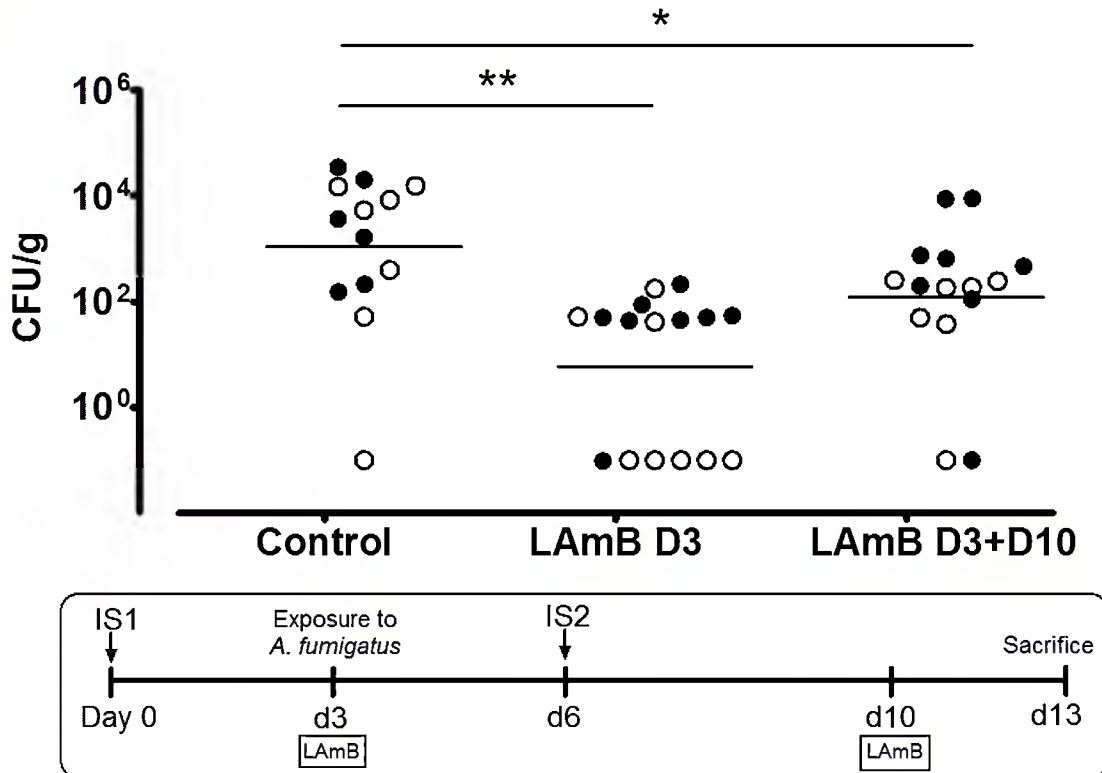
534 Figure 4

**A**



535

**B**

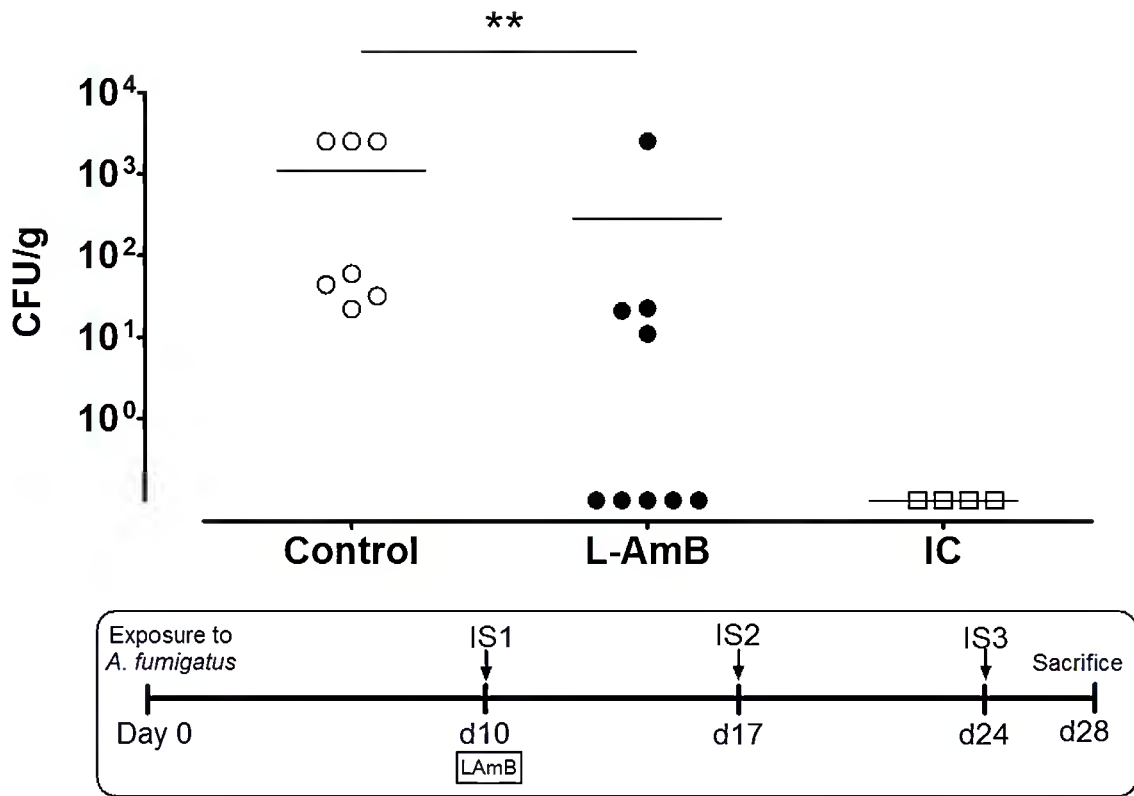


536

537

# Mycoses

538 Figure 5



539



## Chapitre 3.

# Relation exposition-infection chez l'Homme : étude chez les transplantés pulmonaires

---

### 3.1. Introduction - Situation du sujet

S'il est acquis que les malades neutropéniques représentent le groupe le plus exposé à l'aspergillose pulmonaire invasive, les transplantés d'organe solide représentent un groupe à risque important pour les infections aspergillaires, invasives ou non. Les différentes revues de la littérature portant sur ce sujet convergent sur les différences des niveaux de risque et d'incidence en fonction du type de transplantation. En regroupant les différentes formes cliniques d'aspergillose, Denning rapporte une incidence comprise entre 19 et 26% chez les patients recevant une transplantation pulmonaire ou cardio-pulmonaire, alors qu'elle est, suivant les études, de 1,5 à 10% dans les transplantations hépatiques et de 0,5 à 10% dans les transplantations rénales et cardiaques (Denning, 1998). En ne prenant en considération que les formes invasives, Paterson et Singh en 1999 puis en 2005 indiquent des incidences plus faibles, en moyenne de 6% dans les transplantations pulmonaires, 5,2% dans les transplantations cardiaques, 2% dans les transplantations hépatiques et 0,7% dans les transplantations rénales (Paterson et Singh, 1999; Singh et Paterson, 2005).

L'évolution de l'infection diffère également en fonction du type de transplantation, avec un risque majeur de dissémination chez les transplantés hépatiques (50-60% des cas) et plus modéré chez les transplantés pulmonaires (20-35%). Cependant, dans tous les cas, la mortalité dans les formes déclarées d'aspergillose invasive est très élevée, comprise entre 68 et 87% (Singh et Paterson, 2005; Silveira et Husain, 2010).

Chez les transplantés pulmonaires, l'aspergillose revêt des caractéristiques particulières, liées à la nature de l'organe transplanté (Solé et Salavert, 2005, 2008) :

- La fréquence de la colonisation de l'arbre respiratoire, comprise entre 22 et 85% suivant les études (Gangneux et coll., 2008; Solé et Salavert, 2005; Silveira et Husain, 2010), est plus souvent retrouvée dans les 6 premiers mois post-transplantation. Associée ou non à une infection, la colonisation se traduit par une augmentation de mortalité à 5 et 10 ans (Iversen et coll., 2007) et est associée à un risque 11

fois plus élevé de survenue de bronchiolite oblitérante (Weigt et coll., 2009; Silveira et Husain, 2010). Dans une étude portant sur 151 patients, dont 69 ont été colonisés (46%), seule la colonisation dans les 6 premiers mois s'est avérée être un facteur de risque significatif de survenue d'aspergillose invasive (Cahill et coll., 1997). Dans cette même étude, la colonisation par une autre espèce qu'*A. fumigatus* n'a jamais été associée à une aspergillose invasive.

- La diversité des manifestations cliniques de l'aspergillose (Gangneux et coll., 2008; Silveira et Husain, 2010), dont la trachéobronchite aspergillaire nécrosante pseudo-membraneuse, de survenue précoce qui peut atteindre plus spécifiquement les anastomoses bronchiques (Kramer et coll., 1991), et la bronchiolite oblitérante, survenant plus tardivement après transplantation.
- Le risque significativement plus élevé d'infection fongique invasive chez les receveurs dont le poumon explanté était infecté par *Aspergillus* (Vadnerkar et coll., 2010).
- Le risque lié à la colonisation du poumon natif, en cas de transplantation unilatérale.
- Le risque potentiellement accru d'aspergillose en cas de co-infection avec le cytomégalovirus (Solé et Salavert, 2005; Cahill et coll., 1997).

Il faut enfin souligner certaines autres particularités des transplantés pulmonaires, par rapport aux patients d'hématologie :

- une prise en charge dans des environnements habituellement peu ou non protégés,
- des mesures de prévention mal évaluées,
- un classement étiologique (nosocomial ou communautaire) et diagnostique difficile, car ces cas ne correspondent pas bien aux critères internationaux adoptés pour les patients d'hématologie (De Pauw et coll., 2008).

Dans ce contexte et tenant compte tenu d'une recrudescence des cas de colonisation par *Aspergillus* et de cas d'aspergillose invasive chez les transplantés pulmonaires à l'hôpital Bichat en 2009 (C. Bonnal, Unité d'Hygiène, communication personnelle), nous avons entrepris une étude prospective de la colonisation fongique après transplantation pulmonaire en la couplant avec une étude mycologique de l'environnement proche des patients, dans le but d'évaluer la relation entre la contamination environnementale hospitalière et l'incidence des colonisations ou autres manifestations cliniques de l'aspergillose.

Intitulée Tranplant'Air, cette étude a été conduite entre avril 2010 et juin 2012. L'inclusion a débuté en avril 2010 et le dernier patient suivi a quitté l'hôpital en décembre 2011. L'analyse des données et l'étude génotypique des isolats ont été réalisées entre janvier et juin 2012 ; cette dernière reste à compléter pour les isolats d'*A. fumigatus*.

## 3.2. Matériel et méthodes

### 3.2.1. Organisation générale de l'étude

L'étude a été réalisée dans l'unité de transplantation pulmonaire du service de pneumologie de l'hôpital Bichat (Dr. O. Brugière) en collaboration avec l'unité d'hygiène hospitalière (UHLIN) (C. Bonnal, W. Guerinot, J.C. Lucet), les services de réanimation médicale et chirurgicale (M. Wolf, P. Montravers), le Laboratoire de parasitologie-mycologie (S. Houzé, C. Chochillon) et le Département de biostatistique et informatique médicales de l'hôpital Saint-Louis (R. Porcher). Nous avons également bénéficié du support méthodologique du Dr. Pierre-Yves Boëlle (Unité : "Épidémiologie, Systèmes d'Information, Modélisation", INSERM UMR-S 707, hôpital Saint-Antoine).

L'étude a consisté, à partir d'avril 2010, en un suivi prospectif des patients transplantés pulmonaires hospitalisés, depuis le jour de l'intervention jusqu'à la fin de leur hospitalisation (Figure 24). Ce suivi comportait un volet environnemental, avec la recherche d'une contamination fongique par des prélèvements hebdomadaires dans la chambre du patient et un volet bio-clinique, avec la recherche hebdomadaire d'une colonisation/infection par *Aspergillus* ou par d'autres champignons filamenteux.

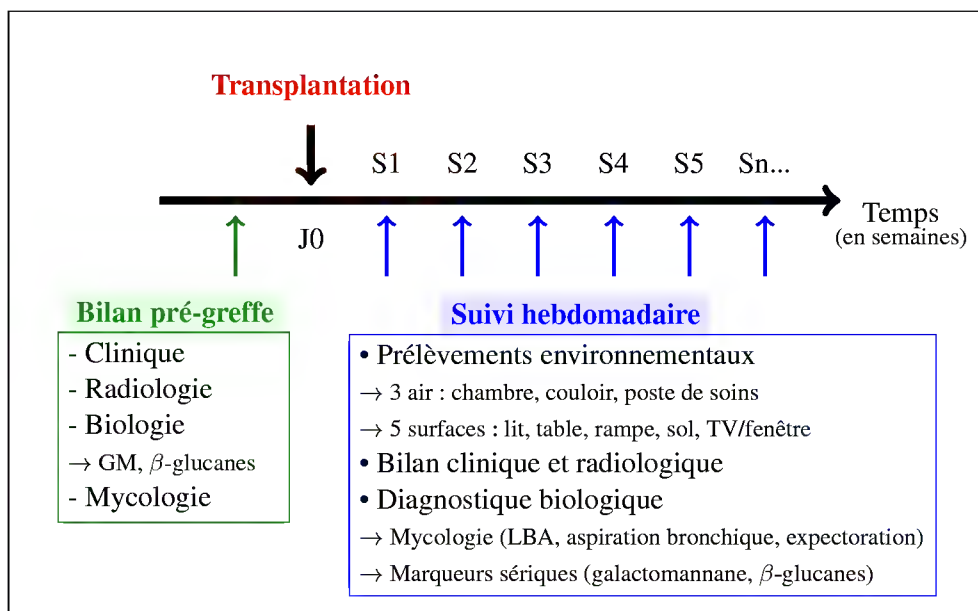


Figure 24 – Schéma général d'organisation de l'étude Transplant' Air.

Toutes les données cliniques, biologiques et environnementales recueillies ont été anonymisées, saisies sur un cahier d'observation et enregistrées dans une base de données (Access® 2007).

Le protocole d'étude, comportant le formulaire d'information des patients sur la réalisation de prélèvements d'air dans leur environnement, a été approuvé par le comité d'Evaluation de l'Ethique des projets de Recherche Biomédicale du GHU Nord de l'APHP (CEERB) en date du 21 mai 2010.

### 3.2.2. Inclusion et suivi clinique des patients

Tous les patients consécutifs recevant une transplantation pulmonaire ont été inclus de façon prospective entre avril 2010 et septembre 2011.

Un bilan pré-greffe a été réalisé, comportant les caractéristiques des patients, les antécédents médicaux (notamment d'infection fongique), le type de transplantation, les caractéristiques du donneur, la sérologie aspergillaire réalisée dans les mois ou semaines précédant la transplantation.

Après greffe, les données suivantes ont été recueillies chaque semaine dans les services cliniques : *i*) signes cliniques, radiologiques, endoscopiques en relation avec une manifestation possible de l'aspergillose *ii*) les principaux traitements immunosuppresseurs, antibiotiques et antifongiques administrés et, *iii*) tout évènement pouvant modifier la susceptibilité du patient au risque aspergillaire.

### 3.2.3. Suivi biologique

Le suivi biologique a été initié dès le jour de la transplantation et poursuivi de façon hebdomadaire (ou plus en cas de suspicion clinique ou radiologique d'aspergillose) jusqu'à la sortie du patient de l'hôpital.

Un examen mycologique a été réalisé sur tous les prélèvements bronchiques ou alvéolaires (LBA, aspiration ou expectoration), associant : examen direct, ensemencement mycologique sur milieu Sabouraud-Chloramphenicol, identification (champignons filamenteux, levures) et, en cas d'identification d'un *Aspergillus*, le souchage des isolats et leur congélation sur bille.

Une recherche d'antigène galactomannane (GM) a été réalisée dans le sérum par la technique Platelia *Aspergillus* (BioRad, Marnes-la coquette, France). Les échantillons de sérum et de LBA ont été conservés congelés pour une recherche ultérieure de  $\beta$ -D glucane.

Il n'a pas été possible d'obtenir de prélèvements sur le poumon explanté, ni sur le greffon.

### 3.2.4. Définition des cas

Les critères de diagnostic ont été établis d'après les définitions données dans plusieurs articles de référence sur l'aspergillose chez les transplantés pulmonaires (Solé et Salavert, 2005, 2008; Singh et Paterson, 2005; Iversen et coll., 2007). Ils ont été soumis pour approbation à l'avis du Pr. O. Lortholary (Service des Maladies infectieuses, hôpital Necker, Paris).

- La colonisation aspergillaire (CA) a été définie par l'identification d'*Aspergillus* (ou d'un autre champignon filamenteux) par culture d'un prélèvement broncho-pulmonaire, en l'absence d'éléments en faveur d'une aspergillose invasive pulmonaire ou trachéobronchique (examen tomodensitomérique et/ou endoscopie). La colonisation a été considérée comme probable lorsqu'une seule expectoration ou aspiration était positive par culture et que l'examen direct était négatif ou non fait. Elle était considérée comme certaine lorsque qu'une seule expectoration ou aspiration était positive par culture et par l'examen direct ou lorsque deux expectorations ou aspirations consécutives étaient positives par culture ou qu'un seul LBA était positif par culture
- Le diagnostic d'aspergillose trachéobronchique ou d'infections anastomotique a été retenu sur l'isolement d'*Aspergillus* en culture d'un prélèvement broncho-pulmonaire, avec la preuve histopathologique d'une invasion tissulaire, ou la présence d'une nécrose, ou d'une ulcération ou de pseudomembranes à la fibroscopie.
- Le diagnostic d'aspergillose pulmonaire invasive (API) a été considérée comme probable sur l'association de signes cliniques, radiologiques et scannographiques évoquant une infection fongique invasive du poumon et l'isolement d'*Aspergillus* dans des prélèvements respiratoires. Elle a été considérée comme certaine si la preuve histopathologique de l'infection par *Aspergillus* a été apportée sur une biopsie chirurgicale.
- L'aspergillose a été considérée comme disséminée lorsque l'infection par *Aspergillus* de deux organes ou plus non contigus a été documentée histopathologiquement.

### 3.2.5. Suivi de l'environnement

Depuis le jour de la transplantation et pendant toute la période d'hospitalisation, des prélèvements ont été faits chaque semaine dans l'environnement du patient et dans les circulations du service proches de la chambre. Des prélèvements d'air ont été effectués dans la chambre du patient, le couloir desservant immédiatement la chambre et le poste de soin du service (réanimation ou pneumologie). Chaque prélèvement a été réalisé sur

un impacteur Air Test Omega (LCB, France) en collectant 500 litres d'air (5 minutes à 100L/min) sur gélose Malt-Chloramphénicol.

Des prélèvements de surfaces ont été réalisés dans la chambre du patient par écouvillonnage humide. Chaque semaine, 5 surfaces ont été prélevées : le bord du lit, la table mobile, la rampe d'éclairage et d'alimentation en fluide médicaux, le sol et la télévision. Les chambres du service de réanimation n'étant pas équipées de télévision ce dernier point de prélèvement a été remplacé par le rebord de la fenêtre. Pour chaque prélèvement une zone de 30cm<sup>2</sup> a été écouvillonnée.

Les prélèvements ont été incubés à 27°C pendant 3 à 5 jours. Les colonies ont été comptées et les espèces fongiques ont été identifiées par examen microscopique au bleu de lactophénol. Les souches des principaux champignons pathogènes (*Aspergillus* notamment) ont été conservées congelés pour génotypage éventuel.

### 3.2.6. Analyse géotypique des isolats d'*Aspergillus*

Un typage moléculaire par séquençage multi-locus a été effectué sur les colonies d'*Aspergillus* appartenant à la même section retrouvées à la fois dans des prélèvements cliniques et environnementaux. En première intention, notre analyse comparative n'a porté que sur les espèces autres que *A. fumigatus*, pour 2 raisons : *i*) l'extrême diversité des souches au sein de l'espèce *fumigatus* (Chazalet et coll., 1998; Leenders et coll., 1996) et *ii*) la plus forte probabilité de mettre en évidence une identité de souche pour des espèces moins fréquemment isolées chez l'Homme.

La procédure d'analyse a comporté une étape de broyage mécanique dans des microtubes contenant des billes de verre (Sigma, St Quentin Fallavier, France) à l'aide du Tissue Lyser (Qiagen, Hilden, Allemagne), puis une extraction d'ADN a été réalisée en utilisant le QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen) suivant les instructions du fabricant. A partir de l'ADN extrait de chaque échantillon, trois régions ont ensuite été amplifiées sur le thermocycler Applied Biosystems 9700 (Applied Biosystems, Foster City, Californie, USA) :

- le locus ITS 1 et 2, à l'aide des amorces ITS1 (5'-TCC GTA GGT GAA CCT GCG G-3') et ITS4 (5'-TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC-3') (White et coll., 1990)
- le gène de la  $\beta$ -tubuline, à l'aide des amorces bt2a (5'-GGT AAC CAA ATC GGT GCT GCT TTC-3') et bt2b (5'-ACC CTC AGT GTA GTG ACC CTT GGC-3') (Glass et Donaldson, 1995)
- le gène de l'actine, à l'aide des amorces Act512F (5'-ATG TGC AAG GCC GGT TTC GC-3') et Act783R (5'-TAC GAG TCC TTC TGG CCC AT-3') (Hong et coll., 2005)

Chaque mélange réactionnel comprenait 2 mM de MgCl<sub>2</sub>, 0,2 mM de chaque dNTP, 0,5  $\mu$ M de chaque amorce et 1,25 U de Red Diamond Taq polymérase (Eurogentec, Seraing, Belgique).

Après révélation sur gel d'agarose, les produits de PCR ont été purifiés à l'aide du QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen) et le séquençage a été réalisé par la méthode des didésoxynucléosides triphosphates fluorescents. Les séquences ont été alignées à l'aide du logiciel Clustalw (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>) et la recherche de séquences homologues dans la base de données nucléotidiques nr de GenBank a été réalisée en utilisant le logiciel Nucleotide Basic Local Alignment Search Tool (BLASTn) (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>).

### 3.2.7. Analyse statistique

L'analyse statistique des données environnementales a comporté une comparaison des fréquences de prélèvements positifs (air, surfaces) dans les services de réanimation et de pneumologie. Elle a été réalisée à l'aide d'un test du  $\chi^2$  en considérant un prélèvement positif dès lors qu'une colonie était présente en culture.

L'analyse descriptive des caractéristiques des 44 patients en fonction de leur statut de colonisation a été réa-

lisée à l'aide d'un test exact de Fisher pour les variables catégorielles et un test U de Mann-Whitney pour les variables continues.

Un test de Pearson a été utilisé pour analyser la corrélation entre la contamination moyenne hebdomadaire de l'air et des surfaces des services de réanimation et de pneumologie.

La relation entre la contamination fongique environnementale et la survenue de colonisation a été réalisée en prenant en compte les cas de colonisation certaines et probables. Compte tenu de la répétition hebdomadaire des données cliniques, biologiques et environnementales pour chaque patient, et donc de l'existence de données appariées, l'analyse des relations entre l'incidence des cas de colonisation aspergillaire et ces variables a été effectuée à l'aide de modèles de régressions logistiques intégrant des équations d'estimations généralisées (GEE) (Liang et Zeger, 1986) en utilisant une matrice des corrélations de type Auto-Regressive d'ordre 1 (AR-1).

Les variables pour lesquelles un degré de signification inférieur à 20% a été retrouvé dans l'analyse univariée ont été inclus dans une analyse multivariée. Un risque d'erreur de première espèce de 0,05 a été retenu dans cette analyse.

L'ensemble des analyses a été réalisée à l'aide du logiciel SAS 9.1.3 (SAS® Institute, Cary, Inc).

### 3.3. Résultats

#### 3.3.1. Caractéristiques des patients.

Quarante-quatre patients transplantés pulmonaires ont été inclus de façon consécutive entre mai 2010 et septembre 2011 et ont été suivis chaque semaine durant toute la période d'hospitalisation suivant la transplantation. Leurs principales caractéristiques à l'inclusion sont présentées dans le Tableau VII.

Tableau VII – Caractéristiques des patients à l'inclusion.

Caractéristiques individuelles		Facteurs de risque	
<b>Age moyen</b> (en années $\pm$ sd (range))	55 $\pm$ 9 (31-69)	<b>Fumeur</b>	
<b>Sexe</b>		Oui	35
Femme	11	Non	9
Homme	33	<b>Diabète</b>	
<b>Type de greffe</b>		Oui	7
Mono-pulmonaire	26	Non	35
Bi-pulmonaire	18	Non renseigné	2
<b>Anticorps anti-Aspergillus avant greffe</b>		<b>Infection à CMV</b>	
Positif	2	Positif	26
Négatif	26	Négatif	12
Non renseigné	16	Non renseigné	6
<b>Pathologie sous-jacente*</b>		<b>Divers</b>	
Emphysème pulmonaire	19	Durée moyenne de l'intervention	299 $\pm$ 167
Fibrose pulmonaire	23	(en minutes $\pm$ sd (range))	(60-810)
Déficit en $\alpha$ -1-antitrypsine	5		
BPCO	6		
Autre	6		

\* Certains patients ont deux pathologies sous-jacentes

Dès le jour de la transplantation, tous les patients ont reçu un traitement immunosuppresseur, consistant en l'administration de *i*) corticoïdes (0,5mg/kg/jour) pendant 3 mois, avec une diminution progressive (jusqu'à 7,5 mg/jour) pendant 3 à 6 mois ; *ii*) ciclosporine (taux plasmatique : 800-1000 ng/ml) puis tacrolimus (taux plasmatique résiduel : 7-12ng/ml).

Tous les patients ont reçu une prophylaxie par antibiotique à partir du jour de greffe, associant céphalosporine (Kefandol®) et les antibiotiques adaptés aux germes retrouvés en pré-opératoire sur les prélèvements obtenus par fibroscopie et sur les expectorations.

Si le statut CMV du patient était positif, une prophylaxie antivirale à valganciclovir (Rovalcyte®) a été administrée. Dans le cas contraire, une prophylaxie anti-Herpès par valaciclovir (Zelitrex®) a été administrée.

Un traitement antifongique par fluconazole (Triflucan®) a été administré à 21 patients en raison de colonisation bronchique à *Candida*.

### 3.3.2. Suivi clinique et biologique des patients

La durée moyenne d'hospitalisation après la transplantation a été de 10 semaines, avec des valeurs extrêmes comprises entre 3 et 30 semaines. La moyenne du temps d'hospitalisation dans les services a été de  $4,5 \pm 4,5$  semaines en réanimation et  $5,25 \pm 4,2$  semaines en pneumologie.

8 patients sont décédés pendant leur hospitalisation, mais aucun décès n'avait de lien direct ou indirect avec la survenue d'une aspergillose ou d'une colonisation fongique.

Au cours du suivi, aucun patient n'a présenté de forme invasive d'aspergillose.

Douze patients (27%) ont présenté une colonisation fongique transitoire (certaine : 3, probable : 9), sans aucune manifestation clinique, radiologique ou endoscopique associée. Leurs caractéristiques cliniques et biologiques sont présentées sur le tableau VIII.

La colonisation est survenue entre 1 et 13 semaines après la transplantation (médiane = 5 semaines) ; elle a duré de 1 à 2 semaines suivant les cas. Dans 4 cas, elle est survenue pendant que le patient était hospitalisé en réanimation et dans 8 cas lorsqu'il était hospitalisé en pneumologie.

Le diagnostic de colonisation a été effectué sur des aspirations bronchiques pour les 12 patients colonisés. Les espèces fongiques suivantes ont été identifiées par culture : *Aspergillus fumigatus* (6 cas), *Aspergillus niger* (3 cas), *Aspergillus section Nidulantes* (1 cas), *Aspergillus section Usti* (1 cas) et un *Aspergillus sp.* non indentifié. Le dosage de GM effectué la semaine de la colonisation était négatif chez 11 patients. Chez un patient (n° 32), l'index GM était à 0,5 (confirmé à 1,29 et 0,79 sur 2 autres prélèvements), sans signe clinique ou radiologique associé. Chez un autre patient (n° 25), un taux élevé de GM a été observé dans les semaines suivant la colonisation, sans signe clinique ni radiologique d'accompagnement. Ces 2 patients ont été traités par voriconazole. Parmi les 11 autres patients colonisés, seuls 4 d'entre eux ont reçu un traitement antifongique par voriconazole. La comparaison des caractéristiques à l'inclusion entre les patients colonisés et non colonisés n'a pas mis en évidence de lien significatif entre l'âge, le sexe, le type de transplantation, la pathologie sous-jacente et la survenue d'une colonisation (test exact de Fisher,  $p > 0,20$  pour toutes les variables).

De même aucun lien n'a été trouvé entre la colonisation et les facteurs de risques potentiels tels que tabac, diabète, infection à CMV et sérologie aspergillaire ( $p > 0,20$  pour toutes les variables).

Tableau VIII – Caractéristiques cliniques et mycologiques des patients colonisés

N° patient	Type de transplantation	Pathologie sous-jacente	Jour de colonisation post-greffe	Service d'hospitalisation	Durée de la colonisation (en semaine)	Espèce fongique identifiée par culture	Galactomannane dans le serum (index)*
2	Bi-pulmonaire	Emphysème	33	Réanimation	1	<i>Aspergillus fumigatus</i>	0,36
3	Bi-pulmonaire	Emphysème	35	Pneumologie	2	<i>Aspergillus section Nidulantes</i>	0,16
6	Mono-pulmonaire	Fibrose	91	Pneumologie	1	<i>Aspergillus fumigatus</i>	<0,10
11	Mono-pulmonaire	Emphysème	21	Pneumologie	1	<i>Aspergillus fumigatus</i>	0,19
14	Mono-pulmonaire	Fibrose	32	Pneumologie	1	<i>Aspergillus niger</i>	0,20
22	Mono-pulmonaire	Fibrose	69	Pneumologie	1	<i>Aspergillus fumigatus</i>	<0,10
23	Mono-pulmonaire	Fibrose	8	Réanimation	2	<i>Aspergillus fumigatus</i>	<0,10
25	Bi-pulmonaire	Emphysème/BPCO	6	Réanimation	2	<i>Aspergillus niger</i>	0,22
26	Mono-pulmonaire	Fibrose	49	Pneumologie	1	<i>Aspergillus section Usti</i>	<0,10
32	Bi-pulmonaire	Emphysème	69	Pneumologie	1	<i>Aspergillus sp.</i>	<b>0,5</b>
34	Mono-pulmonaire	Emphysème	14	Réanimation	1	<i>Aspergillus fumigatus</i>	0,18
36	Bi-pulmonaire	Emphysème	38	Pneumologie	1	<i>Aspergillus niger</i>	0,32

\* prélèvement le plus proche de la date de mise en évidence de la colonisation



### 3.3.3. Contamination de l'environnement

#### 3.3.3.1. Descriptif de la flore fongique

Le suivi mycologique de l'environnement des 44 patients inclus a été intégralement réalisé suivant le protocole prévu, représentant 198 séries de prélèvement dans le service de réanimation et 231 dans le service de pneumologie.

Parmi les 11 766 colonies retrouvées dans les prélèvements effectués dans le service de réanimation (Figure 25.A), 50,7% appartenaient au genre *Penicillium*, 11,3% au genre *Aspergillus*, 4,8% au genre *Cladosporium*, 2,7% au genre *Alternaria* et 1,8% au genre *Geotrichum*. 28,7% des colonies ont été identifiées comme appartenant à d'autres genres fongiques parmi lesquels : *Ulocladium*, *Chaetomium*, *Scopulariopsis*, *Acremonium*, *Fusarium*, *Mucor*, *Rhizopus*, *Trichoderma* ou *Paecilomyces*. Les 1 328 colonies du genre *Aspergillus*, ont fait l'objet d'un examen microscopique plus avancée pour identifier l'espèce. *Aspergillus fumigatus* est la 2<sup>ème</sup> espèce la plus fréquente (15,8%) après les *Aspergillus* de la section *Nidulantes* (39,3%) et devant les espèces *A. niger* (6,9%), ceux de la section *Usti* (4,8%) et *A. flavus* (3,5%). *A. terreus*, *A. clavatus* ou *A. versicolor* représentaient moins de 1% des colonies d'*Aspergillus*. 29,7% des espèces d'*Aspergillus* n'ont pu être identifiées.

Dans le service de pneumologie (Figure 25.B), 31 758 colonies ont été dénombrées. 34,2% appartenaient au genre *Penicillium*, 18,8% au genre *Aspergillus*, 5,7% au genre *Cladosporium*, 3,0% au genre *Alternaria* et 1,4% au genre *Chaetomium*. 29% des colonies observées appartenaient à d'autres genres : *Ulocladium*, *Geotrichum*, *Scopulariopsis*, *Acremonium*, *Fusarium*, *Mucor*, *Rhizopus*, *Trichoderma*. L'observation microscopique de 5 962 colonies du genre *Aspergillus* ont permis d'identifier 49,9% d'*Aspergillus* de la section *Nidulantes*, 12,4% d'*A. niger*, 8,8% d'*Aspergillus* de la section *Usti*, 5,8% d'*A. fumigatus* et 3,5% d'*A. flavus*. Les autres espèces d'*Aspergillus* (*A. terreus*, *A. clavatus*, *A. versicolor*,...) représentaient moins de 1% des *Aspergillus*. 22,0% d'*Aspergillus* n'ont pas pu être identifiés.

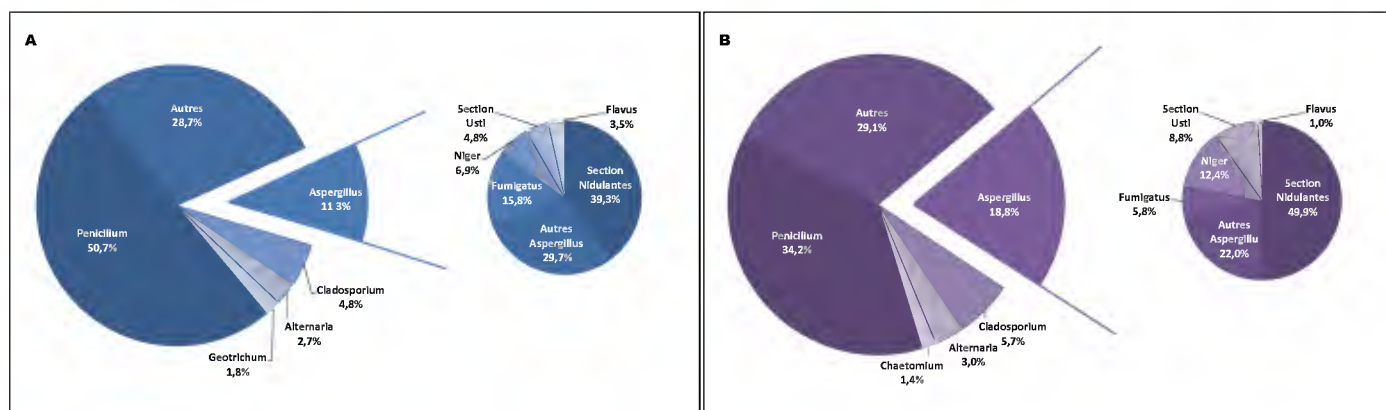


Figure 25 – Répartition des espèces fongiques et des espèces d'*Aspergillus* dans les services de réanimation (A) et de pneumologie (B).

### 3.3.3.2. Répartition des contaminations

La fréquence des prélèvements positifs (au moins une colonie) dans les unités de réanimation et dans le service de pneumologie est présentée dans la Figure 26. La proportion de prélèvements de l'environnement positifs est significativement plus grande dans le service de pneumologie que dans le service de réanimation ( $p < 0.001$ ), que ce soit dans l'air (398/594 *versus* 644/693,  $p < 0.001$ ) ou sur les surfaces (452/993 *versus* 667/1155,  $p < 0.001$ ). Par contre, aucune différence n'est observée concernant la fréquence de prélèvements positifs à *A. fumigatus* entre les deux services.

- Dans le service de réanimation, les prélèvements d'air dans le couloir et dans le poste de soins sont positifs dans respectivement 79% et 67% des cas, tandis que les prélèvements dans l'air de la chambre le sont dans 55%. L'air des chambres des patients transplantés est significativement moins souvent contaminé que l'air du reste du service ( $p < 0.001$ ). Dans ces trois localisations, *A. fumigatus* est retrouvé dans 6,5 à 11,6% des prélèvements.

Parmi les 5 surfaces prélevées, la rampe d'alimentation en fluides médicaux est la plus fréquemment contaminée (81% des prélèvements) tandis que le lit et la table sont les surfaces les moins souvent positives ( $p < 0.001$ ).

La fréquence d'isolement d'*A. fumigatus* reste faible, comprise entre 1 et 1,5% des prélèvements.

- Dans le service de pneumologie, les prélèvements d'air réalisés dans la chambre, le couloir ou le poste de soins sont positifs dans respectivement 93, 92 et 94% des cas.

Parmi les prélèvements de surface, la rampe est le point de prélèvement le plus fréquemment contaminé (86%). La fréquence de prélèvements positifs sur les télévisions à tube cathodique étaient de 87% alors qu'elle n'était que de 52% sur les télévisions numériques ( $p < 0.001$ ), introduites dans le service en août 2010.

*A. fumigatus* a été retrouvé dans 12 à 14% des prélèvements d'air, mais dans moins de 2% des prélèvements de surface (0,4 à 1.7%).

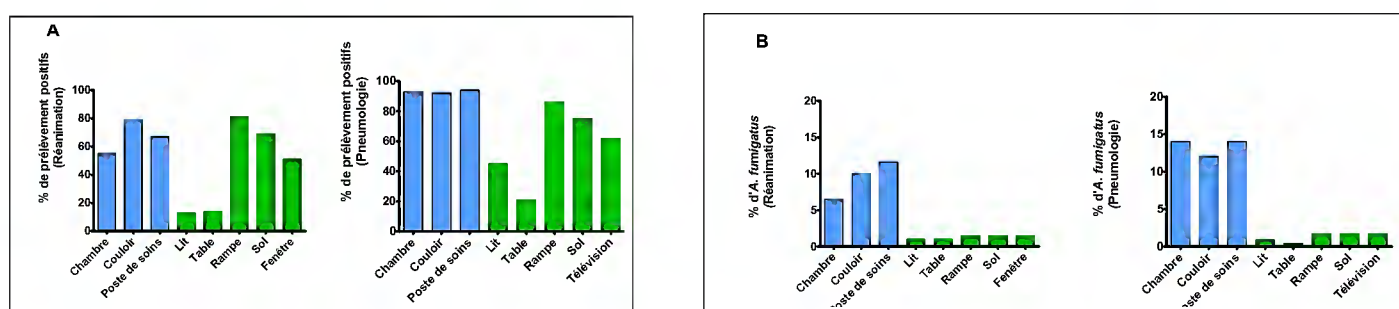


Figure 26 – Pourcentage de prélèvements positifs dans l'air (en bleu) et sur les surfaces (en vert) dans les services de réanimation et de pneumologie concernant la flore totale (sans levure) (A) et l'espèce *A. fumigatus* (B).

### 3.3.3.3. Niveaux de contamination et relation air/surface

#### a. Niveaux de contamination

En considérant l'ensemble des prélèvements réalisés dans l'air (chambre du patient, couloir desservant directement la chambre et poste de soins du service), la contamination fongique totale moyenne du service de réanimation ( $4,6 \text{ ufc/m}^3 \pm 6,8$ ) est significativement plus faible que celle retrouvée dans le service de pneumologie ( $15,8 \text{ ufc/m}^3 \pm 24,2$ ) ( $p < 0,001$ ) (Tableau IX). La même différence a été retrouvée pour les concentrations d'*Aspergillus* ( $p < 0,001$ ). Par contre, aucune différence significative n'a été mise en évidence entre les concentrations moyennes d'*A. fumigatus* dans l'air des deux services (0,3 contre  $0,4 \text{ ufc/m}^3$ ).

Tableau IX – Comparaison des niveaux de contamination fongique dans l'air des services de réanimation et de pneumologie (exprimés en  $\text{ufc/m}^3$ ) pour l'ensemble des champignons filamenteux, les champignons du genre *Aspergillus* et l'espèce *A. fumigatus*.

	Réanimation			Pneumologie			p
	moy	sd	range	moy	sd	range	
Flore fongique totale	4,6	6,8	[0-88]	15,8	24,2	[0-326]	< 0,001
<i>Aspergillus</i>	0,8	1,8	[0-18]	2,7	5,0	[0-77]	< 0,001
<i>A. fumigatus</i>	0,3	0,9	[0-12]	0,4	1,0	[0-20]	0,23

Les représentations chronologiques des concentrations moyennes de champignons filamenteux retrouvées dans l'air des services de réanimation et de pneumologie permettent de visualiser l'évolution de la contamination au cours du suivi de l'étude Transplant'Air (Figure 27). La contamination de fond retrouvée dans l'air d'un service bénéficiant d'un traitement d'air à 99% (service de réanimation) est plus faible que celle du service de pneumologie dont l'air n'est traité qu'à 95%. Cette analyse visuelle montre l'existence de pics de contaminations qui ne se produisent pas aux mêmes périodes dans les deux services : en juillet 2011 en réanimation et à l'automne 2010, en mars 2011 et pendant l'été 2011 pour le service de pneumologie. Durant ces pics de contamination les concentrations de champignons filamenteux retrouvées dans l'air ont atteint les valeurs maximales de  $88 \text{ ufc/m}^3$  dans le service de réanimation et  $326 \text{ ufc/m}^3$  dans le service de pneumologie. Les concentrations maximales d'*Aspergillus* et d'*A. fumigatus* retrouvées étaient respectivement de 18 et  $12 \text{ ufc/m}^3$  dans le service de réanimation et de 77 et  $20 \text{ ufc/m}^3$  dans le service de pneumologie.

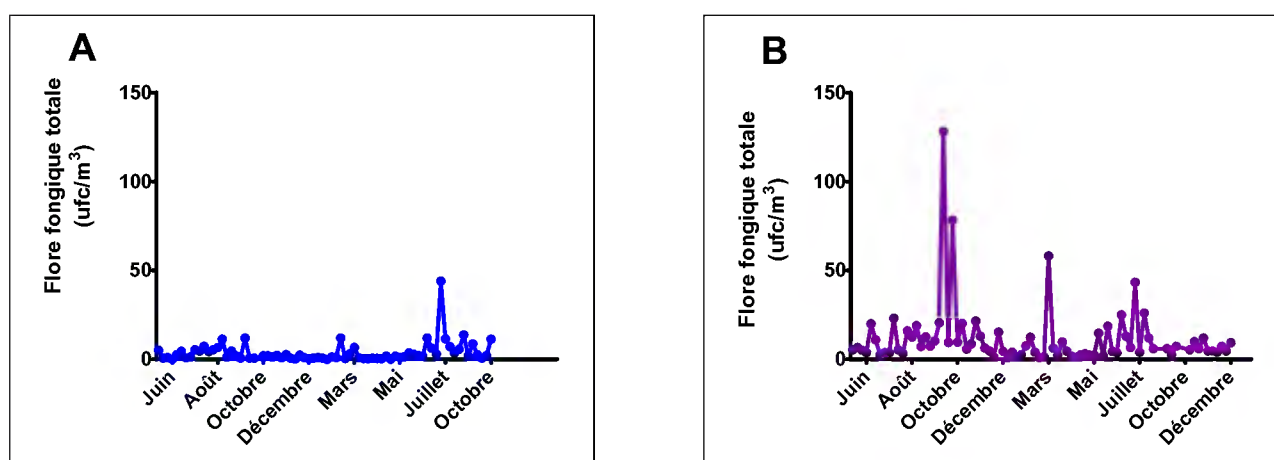


Figure 27 – Variation temporelle des concentrations moyennes de champignons filamenteux dans l'air des services de réanimation (A) et de pneumologie (B).

## b. Relation air/surface

La relation entre la contamination de l'air et celle des surfaces ainsi que les relations entre les différents types de contamination (flore fongique totale, *Aspergillus* et *A. fumigatus*), ont été étudiées sur l'ensemble des données disponibles. Les différentes corrélations ( $R^2$ ) et leur significativité (test de Pearson) sont indiqués dans le Tableau X.

- une corrélation faible mais significative a été retrouvée entre la contamination de l'air et celle des surfaces pour la flore fongique totale (Figure 28.A) mais pas pour les *Aspergillus* ou *A. fumigatus*.
- une corrélation faible mais significative a également été retrouvée entre :
  - la flore fongique totale et la contamination par *Aspergillus* dans l'air (Figure 28.B)
  - les contaminations par *Aspergillus* et par *A. fumigatus* dans l'air (Figure 28.C)

Tableau X – Coefficients de corrélation ( $R^2$ ) entre la contamination fongique moyenne de l'air ( $\log_{10}(\text{ufc}/\text{m}^3)$ ) et des surfaces ( $\log_{10}(\text{nb de colonies sur les 5 surfaces})$ ) pour les 86 semaines de suivi.

	Air						Surfaces					
	Flore fongique		<i>Asp.</i>		<i>A. fum</i>		Flore fongique		<i>Asp.</i>		<i>A. fum</i>	
	$R^2$	$p$	$R^2$	$p$	$R^2$	$p$	$R^2$	$p$	$R^2$	$p$	$R^2$	$p$
<b>Air</b>												
Flore fongique	-	-	<b>0,17</b>	<b>&lt;0,001</b>	0,02	NS	<b>0,11</b>	<b>0,002</b>	0,03	NS	0,002	NS
<i>Aspergillus</i>	-	-	-	-	<b>0,30</b>	<b>&lt;0,001</b>	-	-	0,02	NS	0,01	NS
<i>A. fumigatus</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,01	NS

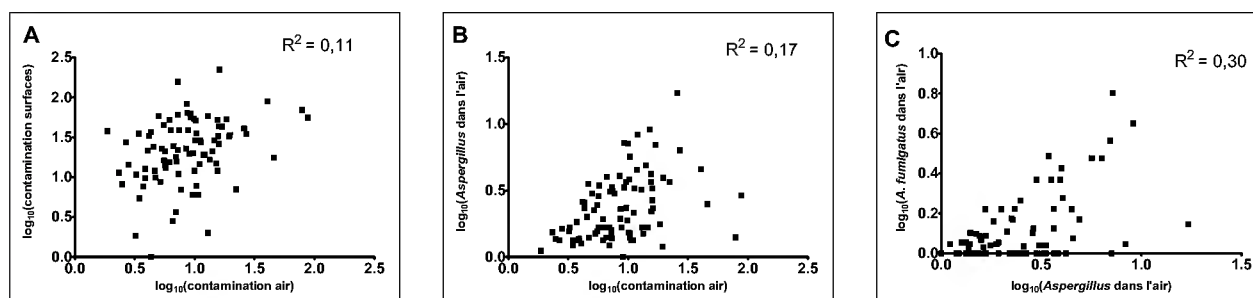


Figure 28 – Relation entre la contamination fongique globale de l'air et des surfaces (A), la flore fongique totale et la contamination par *Aspergillus* dans l'air (B), les contaminations par *Aspergillus* et par *A. fumigatus* dans l'air (C).

### 3.3.4. Analyse descriptive de la relation colonisation/environnement

#### 3.3.4.1. Données chronologiques

La représentation séquentielle des données mycologiques sur les prélèvements bronchiques (culture et dosages de galactomannanes) et dans l'environnement nous a permis d'effectuer une première estimation visuelle des liens temporels entre colonisation et contamination de l'air et des surfaces. Pour 1 patient, aucun lien n'était apparent alors que pour 11 patients, *Aspergillus* a été mis en évidence dans l'environnement à des dates proches de celles du diagnostic de colonisation. Dans 5 cas, il s'agissait d'espèces autres que *A. fumigatus*, faisant suspecter un lien direct avec la contamination environnementale (Figure 29). Dans ces cas, les isolats cliniques et environnementaux ont fait l'objet d'une étude génotypique.

**Patient 3**

N° semaine Service	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8
	Réanimation							
	Pneumologie							

Pvt bronchique	Cand	Cand	Cand	Cand	sect.Nid	sect.Nid	Cand	Cand
Valeur GM	0,38	0,20	0,13	0,34	0,16	0,22	0,23	0,20

Chambre	**	**	****	****	*	**	*	*
Couloir	*	*	*****	*****	**	*****		*
Poste de soins	*	*	*	*	*	***	***	*

Lit	*		*****	*****	***	***	****	****
Table	*		*****	*****	*****	*****		****
Rampe	*		*****	*****	*****	*****	*	**
Sol			*****	*****	*****	*	*	*
Fenêtre/TV			*****	*****	*****	*****	*****	*****

**Patient 25**

N° semaine Service	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8
	Réanimation							

Pvt bronchique	Cand	Amig	NF	Cand	Cand	Cand	Cand	Cand
Valeur GM	0,22	0,18	0,11	6,43	7,77	6,60	4,55	2,00

Chambre	*****	*****	*****	**	*	*****	***	*
Couloir	**	**	*****	*****	*	*****	***	*
Poste de soins	*****	*****	**	*	*	*	*	*

Lit	*	*	*	*				
Table	**	**	*	*	*	*		
Rampe	*****	*****	*****	*****	*	*****	*	*
Sol	*	*	*****	*****	*	*	*	*
Fenêtre/TV	*****	*****	*****	*	*	*	*	*

**Patient 36**

N° semaine Service	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10
	Pneumologie							

Pvt bronchique	Cand	Cand	Cand	Amig	Cand	Cand	NF	Cand
Valeur GM	0,12	0,34	0,12	0,32	1,19	0,84	0,10	1,42

Chambre	*	*	*	*	**	**	*	*
Couloir	**	*	*	*	*****	*****	*	*
Poste de soins	*	*	*	*	*****	*****	*	*

Lit	*	*	*	*	*	*	*	*
Table	*	*	*	*	*	*	*	*
Rampe			*	*	*****	*	*****	*****
Sol			*	*	*	*	*****	*
Fenêtre/TV	*	*	*	*	*	*	*	*

**Patient 14**

N° semaine Service	S1	S2	S3	S4	S5	S6
	Pneumologie					

Pvt bronchique	Cand	Cand	NF	Cand	Amig	Cand
Valeur GM	0,22	0,20	0,10	0,32	0,20	0,21

Chambre		**	*****	*****	***	*****
Couloir	*	*	*	*	**	*****
Poste de soins		**	**	**	*	***

Lit	*	*	*	*	*	***
Table			*	*	*	***
Rampe	*	*	*	*	*****	*****
Sol	*****	*****	*	*	*****	*****
Fenêtre/TV	*	*	*	*	*	*****

**Patient 26**

N° semaine Service	S5	S6	S7	S8	S9	S10	S11	S12
	Pneumologie							

Pvt bronchique	Cand	sect. Usti	CSD	NF	Cand	Cand	Cand	Cand
Valeur GM	0,12	<0,1	<0,1	<0,1	0,12	0,34	0,16	1,18

Chambre	*****	*	*	*	***	*	*	*
Couloir	*****	*	*	*	*	*	*	*
Poste de soins	*	*	**	*	*	*	*	*

Lit				*				*
Table				*				*
Rampe	*	**	**	*	*	*****	*****	*****
Sol	*****	*	**	*	*	*	*	*****
Fenêtre/TV		*	*	*	*	*	*	*

**Légende :**

Espèces identifiées		Niveaux de contamination (ufc/prélevement)	
Prelevement ou antigene positif	*	*	[0 ; 5]
Même espèce que le prelevement bronchique	*	**	[5 ; 10]
<i>Aspergillus fumigatus</i>	*	***	[10 ; 15]
Autres <i>Aspergillus</i> + <i>Fusarium</i> + <i>Mucorales</i>	*	****	[15 ; 20]
Autres champignons filamenteux	*	*****	> 20
Non Fait	NF		

Figure 29 – Représentation séquentielle de la contamination de l’environnement dans les semaines qui précèdent et suivent la survenue d’une colonisation par *Aspergillus niger*, *Aspergillus sect. Nidulantes* ou *Aspergillus section Usti*.

### 3.3.4.2. Analyse génotypique

Le typage moléculaire a permis de préciser les identifications morphologiques pour 1 *Aspergillus* de la section *Nidulantes* identifié comme *A. sydowii* et pour 1 *Aspergillus* de la section *Usti* identifié come *A. calidoustus*. Les *A. niger* ont été confirmés dans leur identification (Tableau XI).

L'analyse génotypique comparative a permis de différencier clairement les isolats cliniques et environnementaux dans 2 cas et de conclure à une probable identité des isolats dans 3 cas (Tableau XII) :

- Une souche d'*Aspergillus sydowii* isolée chez le patient 3 présente un typage moléculaire identique à celui de 3 isolats environnementaux (chambre, poste de soins et TV) pour les gènes de la bêta-tubuline et de l'actine. La seule différence porte sur une base de la séquence ITS. Il n'est pas exclu que cette délétion/insertion ait pu survenir chez une souche donnée, d'autant que cette espèce possède une reproduction sexuée.
- De même, une souche d'*Aspergillus niger* isolée chez le patient 25 possède une séquence ITS identique et un gène de la bêta-tubuline présentant une différence d'une base par rapport à une souche environnementale.
- Une souche d'*Aspergillus calidoustus* isolée chez le patient 26 possède des séquences ITS, bêta-tubuline et actine identique à celles d'un isolat de l'environnement proche du patient.

Sans que l'on puisse l'affirmer totalement, l'identité entre ces souches cliniques et environnementales, est probable devant la forte homologie des séquençages multi-locus.

Tableau XI – Identification par culture et par génotypage de souche d'*Aspergillus* retrouvées dans des aspirations bronchiques.

N° patient	Date	Identification par culture	Identification par génotypage					
			ITS		$\beta$ -tubuline		Actine	
			Souche	% ident	Souche	% ident	Souche	% ident
3-a	02/06/2010	Section <i>Nidulantes</i>	<i>A. sydowii</i> CBS 595.65 (AB267812.1)	99	<i>A. sydowii</i> CBS 595.65 (EF428373.1)	100	<i>Emeri. nidulans</i> CBS 492.65 (AB476783.1)	84
3-b	04/06/2010	Section <i>Nidulantes</i>	<i>Emeri. nidulans</i> DHMJ15 (JN986767.1)	100	<i>Emeri. nidulans</i> CBS 589.65 (AB524358.1)	100	<i>Emeri. nidulans</i> CBS 492.65 (AB476783.1)	100
14	04/10/2010	<i>Aspergillus niger</i>	<i>A. niger</i> CBS 12049 (AY585553.1)	100	<i>A. niger</i> CBS 12049 (AY585553.1)	99	<i>Aspergillus niger</i> (AY704271.1)	100
25-a	25/01/2011	<i>Aspergillus niger</i>	<i>A. niger</i> CBS 113.33 (EF094826.1)	99	<i>A. niger</i> CBS 113.33 (EF094826.1)	99	<i>Aspergillus niger</i> (AY704271.1)	100
25-b	27/01/2011	<i>Aspergillus niger</i>	<i>A. niger</i> CBS 113.33 (EF094826.1)	99	<i>A. niger</i> CBS 113.33 (EF094826.1)	99	<i>Aspergillus niger</i> (AY704271.1)	100
26	16/03/2011	Section <i>Usti</i>	<i>A. calidoustus</i> CBS 113228 (EF591739.1)	99	<i>A. calidoustus</i> CBS 121601 (FJ624456.1)	100	<i>A. calidoustus</i> CBS 112452 (EF591705.1)	100
36	23/05/2011	<i>Aspergillus niger</i>	<i>A. niger</i> CBS 55465 (AY585554.1)	100	<i>A. niger</i> CBS 55465 (AY585553.1)	99	<i>Aspergillus niger</i> (AY704271.1)	100

Tableau XII – Comparaison des séquences ITS,  $\beta$ -tubuline et actine entre des isolats cliniques d'*Aspergillus* et des souches de la même espèce retrouvées aux mêmes dates ( $\pm$  2 semaines) dans l'environnement. Les résultats sont exprimés par comparaison avec l'isolat clinique en précisant, pour les séquences très proches, le nombre de bases différentes.

N° patient	Identification par culture	Date	Lieu de prélèvement	Comparaison clinique/environnement	
				ITS	$\beta$ -tubuline Actine
	Section <i>Nidulantes</i>	01/06/2010	Couloir	3	0
	<b>Section <i>Nidulantes</i></b>	<b>01/06/2010</b>	<b>PS</b>	<b>1*</b>	<b>0</b>
	Section <i>Nidulantes</i>	15/06/2010	TV	1*	2
	Section <i>Nidulantes</i>	15/06/2010	Couloir	3	0
3-a	Section <i>Nidulantes</i>	15/06/2010	PS	3	1
	Section <i>Nidulantes</i>	15/06/2010	Rampe	3	1
	<b>Section <i>Nidulantes</i></b>	<b>01/06/2010</b>	<b>PS</b>	<b>1*</b>	<b>0</b>
	Section <i>Nidulantes</i>	22/06/2010	Couloir	3	1
	<b>Section <i>Nidulantes</i></b>	<b>22/06/2010</b>	<b>TV</b>	<b>1*</b>	<b>0</b>
	<i>A. niger</i>	28/09/2010	Chambre	D	D
14	<i>A. niger</i>	28/09/2010	Sol	D	D
	<i>A. niger</i>	05/10/2010	Rampe	D	D
25-a	<i>A. niger</i>	18/01/2011	TV	D	D
et	<b><i>A. niger</i></b>	<b>08/02/2011</b>	<b>Couloir</b>	<b>0</b>	<b>1*</b>
25-b	<i>A. niger</i>	08/02/2011	PS	D	D
	Section <i>Usti</i>	15/03/2011	Rampe	D	D
26	Section <i>Usti</i>	22/03/2011	Sol	3	2
	<b>Section <i>Usti</i></b>	<b>29/03/2011</b>	<b>Rampe</b>	<b>0</b>	<b>0</b>
	<i>A. niger</i>	17/05/2011	Chambre	D	D
36	<i>A. niger</i>	17/05/2011	Couloir	D	D
	<i>A. niger</i>	24/05/2011	TV	D	D

\* 1 base en moins au sein d'une séquence répétée

PS = Poste de Soins

D = nombreuses différences



### 3.3.5. Analyse statistique

Dans le but d'établir un lien éventuel entre la contamination fongique de l'environnement d'un patient transplanté pulmonaire et la survenue d'une colonisation aspergillaire, nous avons émis l'hypothèse que seule une exposition fongique antérieure ou contemporaine à la colonisation pouvait en être responsable. Notre analyse n'a donc porté que sur les données de suivi allant de l'inclusion jusqu'à la semaine de survenue de la colonisation. Cette analyse a ainsi été réalisée sur un total de 359 semaines correspondant à 181 semaines en réanimation et 178 semaines en pneumologie.

#### 3.3.5.1. Analyse univariée

En raison des répétitions des mesures hebdomadaires effectuées chez le même patient, un modèle GEE a été choisi. Dans une première analyse univariée, aucune association au seuil de 20% n'a pu être mise en évidence entre les différentes variables caractérisant le séjour (service d'hospitalisation du patient et présence de Plasmair® dans la chambre) et la survenue de colonisation.

Dans un deuxième temps, l'analyse univariée entre la contamination de l'air et des surfaces par des champignons filamenteux, des *Aspergillus* ou des *A. fumigatus* la semaine de la colonisation (S0) et la semaine précédant la colonisation (S-1) a été réalisée. Les degrés de signification et les OR obtenus avec leurs intervalles de confiance à 95% sont présentés dans le Tableau XIII. Les variables ayant un degré de signification inférieur à 20% sont les suivantes :

- présence la semaine la colonisation (S0) de : champignons dans l'air, d'*Aspergillus* dans l'air de la chambre, d'*A. fumigatus* sur les surfaces.
- présence la semaine précédant la colonisation (S-1) de : champignons sur la table, *Aspergillus* sur le lit, *Aspergillus* sur les surfaces, *A. fumigatus* sur les surfaces.

Elles ont été sélectionnées pour l'analyse multivariée.

#### 3.3.5.2. Analyse multivariée

L'analyse multivariée a été réalisée selon la méthode pas à pas descendante qui consiste en un retrait des variables les moins contributives au modèle jusqu'au seuil de signification de 15%. Les OR et leurs intervalles de confiance à 95% ainsi que le degré de signification des variables retenues dans le modèle final sont présentés dans le Tableau XIV.

L'analyse multivariée montre une association significative entre la présence d'*A. fumigatus* sur les surfaces et la survenue d'une colonisation aspergillaire dans la même semaine ( $p=0,04$ ). Cette association semble assez forte puisque l'Odds-Ratio est de 6, mais avec un large intervalle de confiance.

D'autres facteurs environnementaux tendent à être associés avec la survenue d'une colonisation :

- la présence d'*Aspergillus* dans l'air de la chambre la semaine de la colonisation ( $p=0,11$ )
- la contamination fongique de la table ( $p=0,05$ ) et la présence d'*Aspergillus* sur le lit ( $p=0,07$ ), la semaine précédant la colonisation

Plus étonnamment, la présence de champignon dans l'air est associée à la colonisation avec un OR de 0,12. Bien que n'atteignant pas la significativité, ce résultat paraît aberrant et pourrait être dû à la rareté des prélèvements négatifs, que le hasard semble avoir associé à l'absence de colonisation.

Tableau XIII – Analyse univariée par GEE de la survenue d’une colonisation aspergillaire en fonction de la contamination fongique de l’environnement la semaine de la colonisation (S0) ou la semaine précédant la colonisation (S-1).

	S0			S-1		
	<i>p</i>	OR	IC <sub>95%</sub>	<i>p</i>	OR	IC <sub>95%</sub>
<b>Présence de champignons filamenteux</b>						
<b>Air*</b>	<b>0,07</b>	<b>0,22</b>	<b>[0,04-1,12]</b>	0,50	0,48	[0,06-4,01]
Chambre	0,57	0,70	[0,21-2,38]	0,52	1,65	[0,35-7,80]
Couloir	0,83	0,84	[0,17-3,96]	0,72	0,76	[0,15-3,61]
Poste de soins	0,876	1,13	[0,24-5,29]	0,90	1,10	[0,23-5,24]
<b>Surfaces**</b>	0,43	0,43	[0,05-3,56]	0,41	0,41	[0,05-3,46]
Lit	0,28	1,90	[0,59-6,12]	0,38	1,75	[0,50-6,14]
Table	0,93	0,94	[0,20-4,39]	<b>0,10</b>	<b>2,91</b>	<b>[0,82-10,30]</b>
Rampe	0,46	2,16	[0,27-17,08]	0,39	0,55	[0,14-2,13]
Sol	0,79	1,19	[0,31-4,52]	0,64	0,74	[0,21-2,60]
Fenêtre/TV	0,49	1,54	[0,45-5,22]	0,58	1,43	[0,41-4,97]
<b>Présence d’<i>Aspergillus</i></b>						
<b>Air*</b>	0,74	1,23	[0,36-4,16]	0,64	0,75	[0,22-2,50]
Chambre	<b>0,15</b>	<b>2,34</b>	<b>[0,74-7,45]</b>	0,28	1,94	[0,58-6,49]
Couloir	0,40	0,56	[0,15-2,12]	0,53	1,48	[0,44-4,95]
Poste de soins	0,57	1,40	[0,44-4,52]	0,69	0,76	[0,20-2,92]
<b>Surfaces**</b>	0,55	1,46	[0,43-1,93]	<b>0,10</b>	<b>3,69</b>	<b>[0,78-17,34]</b>
Lit	0,81	1,28	[0,16-10,39]	<b>0,09</b>	<b>4,01</b>	<b>[0,80-20,08]</b>
Table	0,47	2,17	[0,26-17,99]	0,32	2,95	[0,34-25,26]
Rampe	0,49	1,50	[0,47-4,74]	0,63	1,34	[0,40-4,49]
Sol	0,47	1,63	[0,43-6,21]	0,35	1,92	[0,49-7,45]
Fenêtre/TV	0,78	1,21	[0,32-4,58]	0,80	0,82	[0,17-3,89]
<b>Présence d’<i>A. fumigatus</i></b>						
<b>Air*</b>	0,49	0,58	[0,12-2,70]	0,55	0,63	[0,13-2,95]
<b>Surfaces**</b>	<b>0,14</b>	<b>3,29</b>	<b>[0,67-16,01]</b>	<b>0,10</b>	<b>3,79</b>	<b>[0,76-18,91]</b>

\* total des 3 prélèvements d’air

\*\* total des 5 prélèvements de surfaces

Tableau XIV – Analyse multivariée par GEE de la survenue d’une colonisation aspergillaire en fonction de la contamination fongique de l’environnement la semaine de la colonisation (S0) ou la semaine précédant la colonisation (S-1).

	OR	IC <sub>95%</sub>	<i>p</i>
<b>Air</b>			
Champignon (S0)	0,12	[0,01-1,36]	0,08
<i>Aspergillus</i> dans la chambre (S0)	2,9	[0,77-10,72]	0,11
<b>Surface</b>			
<i>A. fumigatus</i> sur les surfaces (S0)	<b>6,0</b>	<b>[1,04-34,86]</b>	<b>0,04</b>
Champignon sur la table (S-1)	3,8	[0,99-15,00]	0,05
<i>Aspergillus</i> sur le lit (S-1)	5,0	[0,90-28,69]	0,07

### 3.4. Discussion

Plusieurs études ont montré une association entre la survenue d'épidémies d'aspergillose et la réalisation de travaux, en relation avec la remise en suspension de spores fongiques dans l'environnement (Arnou et coll., 1991; Vonberg et Gastmeier, 2006; Peláez et coll., 2012). Par contre, peu d'études ont abordé la relation entre la contamination de l'environnement et l'incidence de l'aspergillose en dehors de tout contexte épidémique. Nous avons pu établir cette relation lors d'une étude réalisée sur 4 années dans des services d'hématologie de l'hôpital Saint-Louis (Alberti et coll., 2001), en montrant un lien direct et causal entre la contamination de l'air et surtout des surfaces par *Aspergillus* ou par d'autres champignons filamenteux et l'incidence de l'aspergillose invasive en hématologie. Cependant d'autres études réalisées en hématologie (Rupp et coll., 2008; Hospenthal et coll., 1998; Lee et coll., 2012) ou en réanimation (Mahieu et coll., 2000) n'ont pas retrouvé cette relation, peut être en relation avec la durée limitée de ces études et le fait que la plupart ne comportaient qu'un suivi de l'aérocontamination.

A notre connaissance, aucune étude prospective et longitudinale n'a été réalisée chez les transplantés pulmonaires, alors que ces patients ont un risque élevé d'infection ou de colonisation aspergillaire (Solé et Salavert, 2009).

Le suivi prospectif longitudinal que nous avons réalisé chez 44 transplantés pulmonaires sur une durée moyenne de 10 semaines a permis d'observer 12 cas de colonisation (27% des patients), confirmant le risque élevé de colonisation dans les premières semaines suivant la transplantation (Solé et Salavert, 2009; Silveira et Husain, 2010). Conformément aux données de la littérature, *A. fumigatus* était l'espèce la plus représentée (50% des cas), devant *A. niger* et les *Aspergillus* de la section *Nidulantes*. L'analyse génotypique de ces *Aspergillus* de cette section a permis d'identifier *A. calidoustus* et *A. sydowii*, espèces préalablement identifiées dans des cas de colonisation chez des transplantés pulmonaires (Weigt et coll., 2009) et pouvant être, pour *A. calidoustus*, responsables de formes invasives chez les transplantés d'organe (Pappas et coll., 2010; Panackal et coll., 2006).

Aucun des patients colonisés n'a ultérieurement développé d'infection pulmonaire invasive ni de complication bronchique locale, mais le recul de l'étude ne nous permet pas d'évaluer les conséquences à terme de cette colonisation. Le dosage des galactomannanes dans le sérum, négatif chez presque tous les patients au moment du diagnostic mycologique n'a pas permis de suspecter une diffusion tissulaire de l'infection et n'a pas été contributif au diagnostic de colonisation, rejoignant ainsi des observations antérieures (Luong et coll., 2011; Husain et coll., 2007).

L'analyse des caractéristiques des patients n'a pas mis en évidence d'association significative entre la survenue d'une colonisation et l'un des facteurs individuels (age, sexe, type de transplantation, ...) ni avec aucun facteur de risque connu.

Le suivi mycologique de l'environnement proche des patients pendant toute leur période d'hospitalisation post-greffe nous a apporté des informations sur la nature, la fréquence et la distribution de cette contamination en fonction des services et au sein même des services cliniques.

Les services de réanimation disposent d'un système de traitement d'air en flux turbulent, assurant une filtration de 95% à 99%, d'un taux de soufflage et de renouvellement d'air assurant une surpression des chambres par rapport aux zones de soins, et des zones de soins par rapport au couloir extérieur. Les débits d'air et les surpressions y sont cependant faibles : au mieux 6-8 vol/h et 3 Pa. En pneumologie, la ventilation est effectuée avec une filtration à 85% opacimétrique. Cette différence de traitement d'air se traduit logiquement par des niveaux

plus élevés de contamination dans le service de pneumologie, mais celle-ci reste importante dans le service de réanimation avec plus de 67% de prélèvements d'air et 93% de prélèvements de surface positifs. Comparés aux données de la littérature sur la contamination fongique en milieu hospitalier (Fournel et coll., 2010; Sautour et coll., 2009; Brenier-Pinchart et coll., 2009), les taux observés sont élevés et traduisent en partie la vétusté des locaux.

L'analyse mycologique montre une large prédominance d'espèces fongiques courantes de l'environnement hospitalier (Sautour et coll., 2009; Sixt et coll., 2007; Gangneux et coll., 2006) et considérées comme non pathogènes, mais *A. fumigatus* est retrouvé dans 0,4 à 14% des prélèvements d'air ou de surfaces de ce service. A noter la fréquence de la contamination de surfaces des rampes d'alimentation en fluide médicaux, observation préoccupante en raison de la proximité de la tête du patient.

Dans les services de pneumologie, l'écologie fongique ne diffère pas sensiblement de celle observée en réanimation, avec cependant une forte contamination de surface des télévisions à tubes cathodiques, qui peut s'expliquer par un effet électrostatique. Cet effet semble s'atténuer avec les téléviseurs numériques de nouvelle génération.

L'analyse de la relation entre la contamination fongique environnementale et la survenue d'une colonisation a été réalisée à l'aide d'un modèle de régression logistique par GEE. Dans ce modèle de régression, les corrélations entre des données sont traitées séparément dans une matrice de corrélation. Plusieurs formes de matrice de corrélation sont disponibles et nous avons opté pour une matrice de type auto-régressive d'ordre 1. Dans ce type de matrice, plus les mesures sont éloignées dans le temps plus leur corrélation est faible. Notre schéma d'étude étant défini avec un pas de temps fixe de 1 semaine, ce type de matrice de corrélations semblait adapté. L'analyse multivariée a permis de mettre en évidence une association significative entre la survenue d'une colonisation et la présence d'*A. fumigatus* sur les surfaces de la chambre (OR=6, p=0.04). De façon très convergente, nous observons une tendance forte entre la colonisation et la présence d'une contamination fongique de surface et d'une contamination par *A. fumigatus* du lit du patient la semaine précédente (p=0.05 et 0.07 respectivement). Ces données confirment des observations antérieures sur la relation directionnelle entre la contamination fongique des surfaces et l'incidence de l'aspergillose invasive en hématologie (Alberti et coll., 2001; Menotti et coll., 2007). Associé aux observations faites sur les corrélations entre les contaminations air/surface, flore totale/*Aspergillus* et *Aspergillus/A. fumigatus*, cela justifie pleinement la recommandation d'effectuer un suivi mycologique de l'air et de surfaces dans les services accueillant des patients à risque aspergillaire (Gangneux et coll., 2002b).

L'analyse génotypique a confirmé ce risque, en montrant une similitude entre des souches de l'environnement et de plusieurs souches obtenues aux mêmes dates dans des prélèvements cliniques. Il est à noter que les 4 espèces responsables des colonisations, sont avant tout des espèces de l'environnement, mais qu'elles sont potentiellement pathogènes chez l'Homme, y compris *A. sydowii* (Wanqing et coll., 2004), avec un risque de résistance aux antifongiques pour *A. calidoustus* (Kanafani et Perfect, 2008). Ce constat pourrait être renforcé par l'analyse des isolats cliniques et environnementaux d'*A. fumigatus* (en cours) et l'utilisation du typage des régions microsatellites pour mieux affirmer les homologies entre souches. Cependant une telle technique n'a, à notre connaissance, été mise au point que pour *A. fumigatus* et *A. flavus*. (Bart-Delabesse et coll., 2001; Hadrich et coll., 2010) et reste à développer pour d'autres espèces. Des techniques moléculaires basées sur la spectrométrie de masse pourraient à l'avenir s'avérer très performantes pour ce type d'analyse discriminante (Bille et coll., 2011; Del Chierico et coll., 2012).

**Troisième partie**

**Discussion générale**



# Discussion générale

L'analyse de risques, dont l'Appréciation Quantitative du Risque (AQR) fait partie, est une démarche très structurée dont chacune des étapes peut être un support de recherche, que ce soit dans le domaine de la biologie fondamentale, de l'épidémiologie, de la clinique et de l'analyse statistique.

Appliquée dans de nombreux domaines en Santé Publique, elle s'étend de plus en plus vers l'estimation des risques infectieux mais avec un nombre d'applications encore limité pour les infections aéroportées.

Cette limitation peut avoir plusieurs causes : *i*) la difficulté à quantifier l'exposition en raison du caractère très ponctuel des mesures d'aérocontamination et, *ii*) la complexité de la modélisation de la relation dose-réponse, qui doit intégrer de nombreux paramètres liés à l'environnement, la survie du microorganisme et la réceptivité de l'hôte.

L'étude quantitative du risque de survenue d'aspergillose invasive liée à une exposition à *Aspergillus fumigatus* nous a cependant semblé réalisable, au moins sur le plan expérimental, dans la mesure où il est possible de réaliser des infections invasives chez l'animal, que la production de la forme infectante (spores) est facile au laboratoire et que des moyens de diagnostics sensibles sont disponibles pour caractériser l'infection.

L'originalité de notre apport repose sur le fait que nous nous sommes rapprochés le plus possible des conditions naturelles d'infection, en utilisant un modèle de contamination par exposition à un aérosol de spores d'*Aspergillus fumigatus*. En standardisant suffisamment les conditions d'aérosolisation et d'exposition, cela nous a permis d'entreprendre, du moins chez l'animal, une modélisation de la relation exposition/infection sur des bases plus "physiologiques". Une revue de la littérature nous a montré qu'une telle démarche n'avait encore été jamais réalisée et que l'estimation de la dose infectante chez la souris n'était évaluée qu'indirectement, avec de nombreux biais, après sacrifice des animaux à la fin de l'exposition (Vallor et coll., 2008). Notre contribution fut également originale sur les modalités d'exploitation des données, en proposant une analyse intégrée des différents paramètres intervenant dans l'exposition et l'infection. L'analyse bayésienne que nous avons appliquée à nos données expérimentales a non seulement permis de prendre en compte la variabilité et l'incertitude de chacun des paramètres mais aussi de proposer une structure modulable pouvant répondre à différents types de questionnements. Le modèle "simple" basé sur la relation entre la suspension utilisée pour la nébulisation et l'infection chez la souris en est un exemple : ce modèle s'adapte parfaitement aux conditions expérimentales de laboratoire et peut répondre aux besoins des expérimentateurs, souhaitant simplement réaliser un modèle d'infection expérimental avec une probabilité de réussite satisfaisante.

La sophistication du modèle a permis d'intégrer les paramètres liés à l'inhalation et à la viabilité des spores fongiques dans l'air. Ce dernier modèle a permis d'obtenir une estimation de la dose infectante comprise entre 1,8 et  $1,9 \cdot 10^4$  spores viables inhalés par souris, ce qui nous semble être un ordre de valeur plausible et transposable dans des conditions naturelles d'exposition.

La confrontation de notre démarche d'analyse avec celles appliquées à l'étude de la relation exposition/infection pour d'autres pathogènes aérotransmis nous a conduit à plusieurs remarques, ainsi qu'à de nouvelles orientations de recherche pour compléter et améliorer notre modèle.

- Des modèles dose-réponse ont été développés pour les différentes catégories d'agents infectieux, dont les bactéries, avec *Coxiella burnetii* (Tamrakar et coll., 2011), *Legionella* (Armstrong et Haas, 2007), *Brucella* (Teske et coll., 2011), *Mycobacterium tuberculosis* (Jones et coll., 2009), *Bacillus anthracis* (Bartrand et coll., 2008; Mayer et coll., 2011), les virus, avec *Coronavirus* (Watanabe et coll., 2010), et plus rarement les champignons, avec *Coccidioides immitis* (Nicas et Hubbard, 2002). La plupart reposent, comme dans notre modèle, sur des données expérimentales chez l'animal (taux d'infection ou mortalité) et utilisent avant tout les modèles exponentiel et bêta-Poisson par une méthodologie statistique "classique". Quelques études ont utilisé des données issues d'infection expérimentale chez des volontaires sains, infectés par des souches microbiennes atténuées (Watanabe 2012, Watanabe 2010), mais cette approche n'est pas envisageable pour l'aspergillose.
- L'étude plus approfondie des faibles doses, telle qu'elle a été réalisée pour *Legionella* (Armstrong et Haas, 2007) et l'évaluation des risques en cas d'exposition cumulée, abordée pour *Coccidioides immitis* (Nicas et Hubbard, 2002) et pour *Bacillus anthracis* (Mayer et coll., 2011) pourraient avoir des applications pour *Aspergillus* dont les concentrations aériennes sont faibles en milieu hospitalier. Techniquement, ce type d'étude pourrait être réalisé au laboratoire dans nos conditions d'exposition ; elle permettrait de déterminer si, pour un même nombre total de spores inhalées, une exposition unique et massive s'associe à une probabilité d'infection supérieure à des expositions répétées.
- Plusieurs études ont abordé la question fondamentale de la variabilité de la relation exposition/infection en fonction des espèces animales exposées et des possibilités d'extrapolation des résultats expérimentaux à l'Homme. Dans l'étude de Bartrand et collaborateurs (Bartrand et coll., 2008) sur *Bacillus anthracis* la relation exposition-infection a été étudiée chez le cobaye et le singe Rhésus ; les auteurs obtiennent des résultats comparables avec les 2 espèces, mais uniquement dans certaines conditions expérimentales de nébulisation. Pour *Brucella*, grâce à l'existence de données chez le cobaye, la souris, le singe rhésus et l'Homme, une étude comparative des relations dose-infection a pu être menée (Teske et coll., 2011) (Figure 30). L'analyse des similitudes observées a conduit les auteurs à construire un modèle commun à plusieurs espèces, du moins pour une administration de *Brucella melitensis* par voie sous-cutanée ou intradermique. Par contre, pour *Coxiella burnetii*, la mise en commun de données pour construire une relation dose-réponse commune s'est avérée inacceptable du fait d'une trop grande divergence des données (Tamrakar et coll., 2011)

Bien que ces études aient été réalisées dans des modèles assez différents du modèle d'aspergillose invasive chez la souris, cette possibilité de synthèse interspécifique nous encourage fortement à répéter nos expérimentations dans un autre modèle animal et tenter d'évaluer la variabilité intra-spécifique de la relation exposition/infection pour *A. fumigatus*. La convergence des résultats pourrait être facilitée par le fait que le modèle d'aspergillose invasive est réalisé chez les animaux profondément immunodéprimés, ce qui pourrait atténuer l'impact sur les défenses spécifiques. En première intention, le cobaye et le rat pourraient être proposés, dans la mesure où des modèles expérimentaux d'aspergillose invasive sont déjà validés pour ces espèces (Desoubieux et Chandener, 2012; Vallor et coll., 2008).

Dans sa forme actuelle, le modèle expérimental animal de primo-infection (et sa modélisation) a des applications dans l'étude de la virulence d'*Aspergillus* et de la physiopathologie de l'aspergillose. En effet, nous



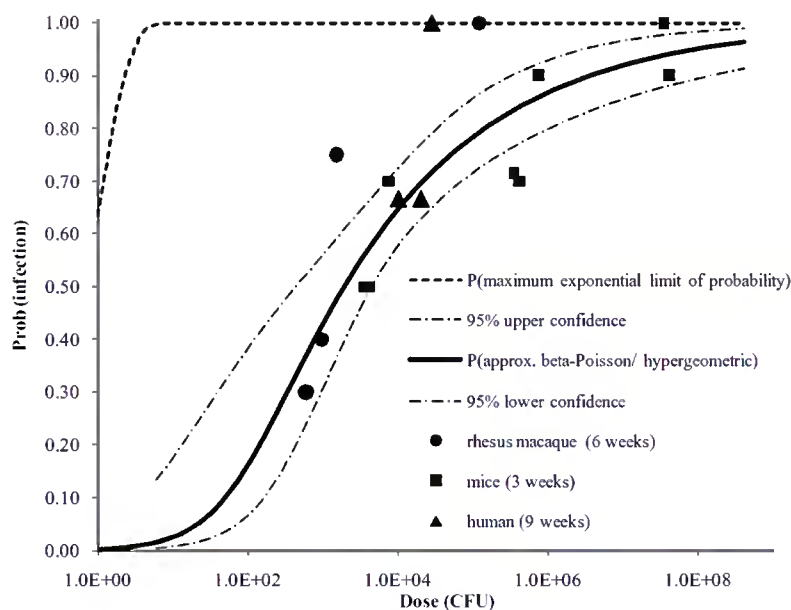


Figure 30 – Relation exposition-infection à *Brucella melitensis* et intervalle de confiance, établie à partir de données obtenues chez le singe Rhésus, la souris et l’Homme (extrait de Teske et coll., 2011).

avons choisi délibérément d’utiliser la souche de référence Af293 d’*A. fumigatus* (Nierman et coll., 2005) pour développer le modèle expérimental, afin que nos résultats puissent servir de base à l’étude comparative d’autres espèces d’*Aspergillus*, en particulier sur la virulence. Parmi les espèces d’*Aspergillus* pathogènes pour l’Homme, *Aspergillus fumigatus* est la plus virulente, en raison de sa thermotolérance, de ses capacités d’adaptation au stress, d’échappement à l’immunité de l’hôte et de pénétration intra-tissulaire (Abad et coll., 2010). L’analyse comparative de la virulence d’autres espèces ou de souches gagnerait en précision par l’application de conditions "naturelles" d’infection (aérosol de spores) et l’utilisation des paramètres définis par la relation dose-réponse, comme la dose infectieuse 50.

Parmi les espèces d’*Aspergillus* à étudier en priorité, figurent celles appartenant à la section *Usti* et en particulier *A. calidoustus* (Houbraken et coll., 2007). Cette espèce a la particularité d’être thermotolérante, comme *A. fumigatus*, d’être responsable d’infections sévères chez l’Homme (Iwen et coll., 1998; Pavie et coll., 2005; Azzola et coll., 2004) et d’être en partie résistante à la plupart des antifongiques (Kanafani et Perfect, 2008). Dans le cadre des suivis d’environnement de la contamination fongique à l’hôpital Saint-Louis et à l’hôpital Bichat, cette espèce est retrouvée de plus en plus fréquemment dans l’environnement et semble persister dans des unités à haut risque comme l’Unité de Greffe de Moelle Osseuse de l’hôpital Saint-Louis (Nguyen, 2011). Par ailleurs, nous avons montré dans le cadre de l’étude Transplant’Air que cette espèce présente dans l’environnement hospitalier pouvait être à l’origine d’une colonisation chez les transplantés pulmonaires.

Au sein de l’espèce *A. fumigatus*, la détermination de la dose infectieuse 50 aurait également toute sa pertinence dans le cadre des études sur les facteurs de virulence réalisées avec des souches mutées. Actuellement, la plupart de ces études estiment les modifications de virulence chez la souris après instillation intranasale de spores, ce qui peut représenter un biais d’évaluation en raison d’une exposition mal contrôlée.

La seule difficulté qui peut être rencontrée dans ce type d’étude est la production d’une quantité suffisante de spores pour l’aérosolisation, car certaines espèces et certaines souches mutées en produisent peu. Or, la technique de rinçage des cultures suivi d’une récupération des spores par filtration puis centrifugation entraîne la perte d’une grande quantité de spores. La technique de soufflage sur des colonies d’*Aspergillus* a été proposée dans les tous premiers modèles d’infection expérimentale (Piggott et Emmons, 1960). Elle a été grandement

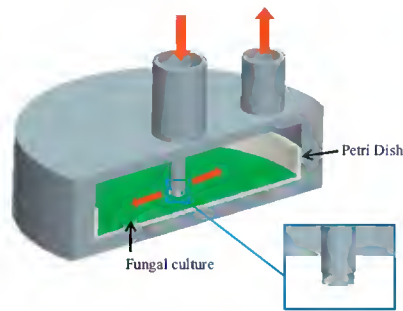


Figure 31 – Représentation 3D de l'intérieur du dispositif de génération de bioaérosol par soufflage décrit par Lee et coll. en 2010.

améliorée pour étudier l'aérobiologie des spores, avec la conception d'un dispositif plus reproductible de culture et de soufflage, décrit par Lee en 2010 (Lee et coll., 2010) (Figure 31). Dans le cadre d'une collaboration avec le laboratoire de physique de l'Ecole Normale Supérieure de Lyon (V. Bergeron), ce dispositif a été adapté par A. Metahni (doctorant) : il permet d'augmenter considérablement la production de spores et d'obtenir des aérosols à des concentrations qui ne peuvent être atteintes par l'aérosolisation d'une suspension. De plus, ces spores sont produites et aérosolisées de façon naturelle, sans passage par une phase en suspension et sans la contrainte de la nébulisation (A. Metahni, F. Choukri, communications personnelles). Cependant, la mesure de la concentration en spores à la sortie du dispositif et le maintien d'une concentration dans le temps ne sont pas encore maîtrisés.

Nous avons également montré qu'il était possible d'induire la réactivation d'une infection par l'administration d'un traitement immunosuppresseur, et ceci dans des conditions d'infection et d'immunodépression comparables à celles qui peuvent être observées chez l'Homme. Ce modèle expérimental ouvre de nombreuses perspectives d'étude sur le processus de réactivation, dont le mécanisme est mal connu. Parmi les paramètres qui pourraient faire l'objet d'une analyse spécifique figurent la durée entre la date d'exposition et l'introduction des traitements immunosuppresseurs, l'étude des facteurs de réactivation liés à l'hôte et celle de la capacité de différents isolats d'*Aspergillus fumigatus* ou d'espèces d'*Aspergillus* à induire une réactivation. Cette dernière étude pourrait ouvrir un nouveau champ d'analyse des facteurs de virulence liés au risque de réactivation.

L'étude des facteurs liés à l'hôte (thérapeutiques, génétiques, pathologiques) méritent une particulière attention car ils sont reconnus comme déterminants dans l'aspergillose aigue de primo-infection. Un exemple caractéristique de l'influence du type d'immunodépression dans la survenue de l'aspergillose est donné par l'étude de Balloy et collaborateurs (Balloy et coll., 2005) qui montrent des différences anatomopathologiques majeures entre les lésions observées chez les souris traitées par corticoïdes et les souris neutropéniques. L'étude du taux de réactivation en fonction du type de traitement immunosuppresseur administré reste à préciser, même si nous savons déjà qu'une immunodépression profonde et prolongée est nécessaire pour induire la réactivation.

Sur le plan épidémiologique, l'émergence de cas d'aspergillose invasive dans de nouvelles catégories de patients immunodéprimés tels que les patients atteints de syndrome myéloprolifératifs chroniques (Lortholary et coll., 2011) évoque l'existence de facteurs de susceptibilité encore mal connus. Là encore, le modèle animal avec sa flexibilité et les moyens d'utiliser des animaux génétiquement modifiés ou génétiquement prédisposés à des affections malignes est un outil de travail unique. Il est en effet tout à fait envisageable de construire des modèles expérimentaux d'aspergillose chez des souris greffées de moelle ou leucémique (Fortier et Graubert, 2010; BitMansour et Brown, 2002; Bichi et coll., 2002) ou de réaliser des co-infections avec des co-facteurs de morbidité comme le CMV.

Enfin, comme nous l'avons montré, ce modèle se prête bien aux études précliniques d'évaluation de l'efficacité

prophylactiques des antifongiques, en complément des études réalisées sur les modèles de primo-infection.

L'amélioration des conditions de modélisation mathématique et statistique doit également rester un objectif pour l'avenir. Le modèle bayésien s'est montré à la fois performant et souple pour ce type d'analyse complexe. Initialement bâti à partir d'un modèle exponentiel comportant un seul paramètre, il a été répété en introduisant un second paramètre de variabilité pour se rapprocher du modèle bêta-Poisson utilisé dans la majorité des études dose-réponse publiées en microbiologie. La confrontation des résultats obtenus a montré qu'on obtenait logiquement une estimation beaucoup plus large de la distribution *prior*e mais que, *in fine*, les valeurs de la distribution *posterior*e étaient tout à fait similaires.

Ce constat nous renforce dans l'idée de poursuivre l'amélioration du modèle dans une démarche bayésienne et d'introduire d'autres compartiments pouvant intervenir dans la variabilité et l'incertitude des estimations.

Parmi les éléments de variabilité qui n'ont pas été pris en compte dans notre modèle, figure le background génétique ou immunologique de l'hôte. Expérimentalement, son rôle peut être évalué chez l'animal, soit en utilisant des lignées de souris différentes, soit en variant les doses d'immunosuppresseur. L'évaluation des doses infectieuses 50 dans différentes conditions pourrait alors permettre de proposer une stratification des niveaux de risque, telle qu'on peut la percevoir chez l'Homme (Denning, 1998; Paterson et Singh, 1999), et qui pourrait être intégrée dans un modèle plus global d'évaluation du risque aspergillaire.

Une autre voie d'amélioration serait de prendre en compte les capacités de pénétration des spores dans l'arbre respiratoire. Dans ce domaine, des travaux de modélisation très avancés ont été réalisés avec des particules de différents calibres, et modélisés par Computational Fluid Dynamics (Kleinstreuer et Zhang, 2010; Zhang et coll., 2002). Ils ont permis d'estimer la part de dépôts des particules dans différents compartiments du poumon en fonction de leur diamètre. Une extrapolation aux spores fongiques pourrait être proposée pour affiner l'estimation du nombre de spores atteignant la cible alvéolaire.

Cette approche de modélisation pourrait aider à mieux définir la dose d'exposition dans les modèles d'études *in vitro* dont nous avons perçu les limites et les difficultés d'interprétation dans des conditions d'exposition empiriques.

Dans la dernière partie de notre travail, nous avons tenté d'aborder l'étude de la relation exposition/infection dans un contexte clinique. Initialement, il était envisagé d'effectuer cette étude chez les patients d'hématologie, mais les données antérieures dont nous disposions à l'hôpital Saint-Louis nous en ont dissuadé, en raison d'un taux d'incidence annuel trop faible pour espérer pouvoir effectuer une analyse de risque dans un délai compatible avec la thèse. De plus, la dispersion des malades dans plusieurs services et leur mobilité au sein de l'hôpital rendait difficile le suivi individuel de l'exposition sur une période d'observation suffisamment longue. L'étude a donc été réalisée chez les transplantés pulmonaires pendant la période d'hospitalisation post-greffe, dans la mesure où il était possible d'avoir un suivi personnalisé et suffisamment "serré" de leur environnement. De plus, un nombre moyen de 25 transplantations par an et un taux de colonisation de l'ordre de 20% avait été observé lors des 5 précédentes années dans le service, ce qui permettait d'espérer le suivi de 50 patients en 2 ans dont 10 colonisés.

Nous avons opté pour une évaluation de la contamination fongique dans la chambre même du patient pour avoir une idée de son exposition, mais aussi dans les parties communes du service, probablement plus représentatives d'un niveau de contamination global. La fréquence hebdomadaire de suivi ne permettait certes pas d'avoir une évaluation en temps réel de l'exposition mais elle était matériellement la fréquence la plus élevée que nous pouvions réaliser.

L'analyse de la relation entre la contamination fongique environnementale et la survenue d'une colonisation,

réalisée à l'aide d'un modèle de régression logistique par GEE s'est avérée informative sur le risque environnemental. En effet, les résultats de l'analyse multivariée ont permis de mettre en évidence une association significative entre la survenue d'une colonisation et la présence d'*Aspergillus fumigatus* sur les surfaces de la chambre pendant la même semaine (OR=6,0 [1,04-34,86]), ainsi qu'une tendance forte pour deux autres contaminations de surface dans la semaine précédente. Ces données rejoignent des observations, précédemment obtenues par notre laboratoire, en hématologie (Alberti et coll., 2001) et confirment l'importance du suivi mycologique des surfaces, et non seulement de l'air, dans l'évaluation du risque aspergillaire. L'analyse génotypique a confirmé ce risque, en montrant de grandes similarités entre des souches de l'environnement et de plusieurs souches obtenues aux mêmes dates dans des prélèvements cliniques. Cette similitude a rarement été observée dans d'autres études épidémiologiques (Girardin et coll., 1994; Chazalet et coll., 1998; Hadrich et coll., 2010), compte tenu de la diversité de la flore fongique et de la multiplicité des isolats d'*Aspergillus* présents dans l'environnement (Chazalet et coll., 1998). Cette étude reste à poursuivre sur les isolats cliniques et environnementaux d'*A. fumigatus*.

Ces observations nous encouragent donc à poursuivre l'évaluation du risque aspergillaire en milieu hospitalier. L'un des obstacles qui persiste à la réalisation d'une évaluation quantitative est d'ordre métrologique. En effet, les mesures de l'aérocontamination fongique sont généralement effectuées après un prélèvement par impaction sur milieu gélosé, puis comptage et identification microscopique des colonies. Cette technique a ses avantages (facilité, coût, évaluation de spores viables) mais aussi ses limites, dues au risque de saturation en cas d'environnement massivement contaminé, ou de sensibilité insuffisante pour la détection de faibles charges fongiques. Depuis quelques années, des techniques alternatives basées sur la quantification par PCR ont été développées (Haugland et coll., 2002), mais restent encore très peu diffusées en France (Bellanger et coll., 2010; Roussel et coll., 2012). Aux Etats-Unis, l'USEPA (United States Environmental Protection Agency) a développé cette technique pour 36 espèces de moisissures afin d'établir une cartographie fongique quantitative (Environmental Relative Moldiness Index, ERMI), et d'évaluer le risque fongique dans les habitations (Vesper et coll., 2007b, <http://www.epa.gov/microbes/moldtech.htm>).

Cette méthodologie offre des perspectives d'étude très intéressantes en milieu hospitalier. En particulier, la répétition des mesures devrait permettre d'estimer puis modéliser l'exposition dans l'environnement des patients à risque en fonction du temps. Il serait alors tout à fait possible de construire un modèle bayésien calqué sur le modèle expérimental en intégrant la variabilité de l'exposition. En associant un module prenant en compte le niveau de risque des patients, il serait envisageable d'obtenir une première approche quantitative du risque environnemental aspergillaire chez l'Homme.

# Références bibliographiques

- Abad, A., Fernandez-Molina, J., Bikandi, J., Ramirez, A., Margareto, J., Sendino, J., Hernando, F., Ponton, J., Garaizar, J. & Rementeria, A. (2010). What makes *Aspergillus fumigatus* a successful pathogen ? Genes and molecules involved in invasive aspergillosis. *Rev. Iberoam. Micol.* ; **27**, 155–1828.
- Agarwal, R., Gupta, D., Aggarwal, A., Behera, D. & Jindal, S. (2006). Allergic bronchopulmonary aspergillosis : lessons from 126 patients attending a chest clinic in north India. *Chest* ; **130**, 442–448.
- Aimanianda, V., Bayry, J., Bozza, S., Knemeyer, O., Perruccio, K., Elluru, S., Clavaud, C., Paris, S., Brakhage, A., Kaveri, S., Romani, L. & Latgé, J. (2009). Surface hydrophobin prevents immune recognition of airborne fungal spores. *Nature* ; **460**, 1117–1121.
- Alberti, C., Bouakline, A., Ribaud, P., Lacroix, C., Rousselot, P., Leblanc, T., Derouin, F. & *Aspergillus* Study Group. (2001). Relationship between environmental fungal contamination and the incidence of invasive aspergillosis in haematology patients. *J. Hospit. Infect.* ; **48**, 198–206.
- Alekseeva, L., Huet, D., Féménia, F., Mouyna, I., Abdelouahab, M., Cagna, A., Guerrier, D., Tichanné-Seltzer, V., Baeza-Squiban, A., Chermette, R., Latgé, J. & Berkova, N. (2009). Inducible expression of beta defensins by human respiratory epithelial cells exposed to *Aspergillus fumigatus* organisms. *BMC Microbiol.* ; **9**, 33.
- Allen, S., Sorensen, K., Nejdil, M., Durrant, C. & Proffit, R. (1994). Prophylactic efficacy of aerosolized liposomal (AmBisome) and non-liposomal (Fungizone) amphotericin B in murine pulmonary aspergillosis. *J Antimicrob Chemother.* ; **34**, 1001–1013.
- Allmers, H., Huber, H. & Baur, X. (2000). Two year follow-up of a garbage collector with allergic bronchopulmonary aspergillosis (ABPA). *Am. J. Ind. Med.* ; **37**, 438–442.
- Anonyme. (2011). Guide risque infectieux fongique en établissement de santé : identification du risqué et mise en place de mesures de gestion. *Hygiènes* ; **XIX**.
- Anonyme-Canada. (2001). Infections nosocomiales chez les patients d'établissements de santé liées aux travaux de construction : atténuer le risque d'aspergillose, de légionellose et d'autres infections. *Santé Canada* ; p.45.
- Appel, E., Vallon-Eberhard, A., Rabinkov, A., Brenner, O., Shin, I., Sasson, K., Shadkchan, Y., Osherov, N., Jung, S. & Mirelman, D. (2010). Therapy of murine pulmonary aspergillosis with antibody-alliinase conjugates and alliin. *Antimicrob. Agents Chemother.* ; **54**, 898–906.
- Araujo, R., Carneiro, A., Costa-Oliveira, S., Pina-Vaz, C., Goncalves Rodrigues, A. & Eduardo Guimaraes, J. (2008). Fungal infections after haematology unit renovation : evidence of clinical, environmental and economical impact. *European J. Haematol.* ; **80**, 436–443.
- Armstrong, T. & Haas, C. (2007). A quantitative microbial risk assessment model for legionnaires' disease : animal model selection and dose-response modeling. *Risk Analysis* ; **27**, 1581–1596.
- Arnou, P., Sadigh, M., Costas, C., Weil, D. & Chudy, R. (1991). Endemic and epidemic aspergillosis associated with in-hospital replication of *Aspergillus* organisms. *J. Infect. Dis.* ; **164**, 998–1002.
- Aufderheide, M. (2008). An efficient approach to study the toxicological effects of complex mixtures. *Exp. Toxicol. Pathol.* ; **60**, 163–180.

- Aufderheide, M. & Mohr, U. (1999). Cultex—a new system and technique for the cultivation and exposure of cells at the air-liquid interface. *Exp. Toxicol. Pathol.* ; **51**, 489–490.
- Azzola, A., Passweg, J., Habicht, J., Bubendorf, L., Tamm, M., Gratwohl, A. & Eich, G. (2004). Use of lung resection and voriconazole for successful treatment of invasive pulmonary *Aspergillus ustus* infection. *J. Clin. Microbiol.* ; **42**, 4805–4808.
- Bakand, S. & Hayes, A. (2010). Troubleshooting methods for toxicity testing of airborne chemicals *in vitro*. *J. Pharmacol. Toxicol. Methods* ; **61**, 76–85.
- Bakker-Woudenberg, I. (2003). Experimental models of pulmonary infection. *J. Microbiol. Methods.* ; **54**, 295–313.
- Balloy, V. & Chignard, M. (2009). The innate immune response to *Aspergillus fumigatus*. *Microbes Infect.* ; **11**, 919–927.
- Balloy, V., Huerre, M., Latgé, J. & Chignard, M. (2005). Differences in patterns of infection and inflammation for corticosteroid treatment and chemotherapy in experimental invasive pulmonary aspergillosis. *Infect. Immun.* ; **73**, 494–503.
- Balloy, V., Sallenave, J., Wu, Y., Touqui, L., Latgé, J., Si-Tahar, M. & Chignard, M. (2008). *Aspergillus fumigatus*-induced interleukin-8 synthesis by respiratory epithelial cells is controlled by the phosphatidylinositol 3-kinase, p38 MAPK, and ERK1/2 pathways and not by the toll-like receptor-MyD88 pathway. *J. Biol. Chem.* ; **283**, 30513–30521.
- Bart-Delabesse, E., Sarfati, J., Debeaupuis, J., van Leeuwen, W., van Belkum, A., Bretagne, S. & Latge, J. (2001). Comparison of restriction fragment length polymorphism, microsatellite length polymorphism, and random amplification of polymorphic DNA analyses for fingerprinting *Aspergillus fumigatus* isolates. *J. Clin. Microbiol.* ; **39**, 2683–2686.
- Bartrand, T., Wei, M. & Haas, C. (2008). Dose-response models for inhalation of *Bacillus anthracis* spores : interspecies comparisons. *Risk Analysis* ; **28**, 1115–1124.
- Becker, M., de Marie, S., Fens, M., Hop, W., Verbrugh, H. & Bakker-Woudenberg, I. (2002). Enhanced antifungal efficacy in experimental invasive pulmonary aspergillosis by combination of AmBisome with Fungizone as assessed by several parameters of antifungal response. *J. Antimicrob. Chemother.* ; **49**, 813.–820.
- Beever, R. & Dempsey, G. (1978). Function of rodlets on the surface of fungal spores. *Nature* ; **272**, 608–610.
- Bellanger, A., Millon, L., Khoufache, K., Rivollett, D., Bièche, I., Laurendeau, I., Vidaud, M., Botterel, F. & Bretagne, S. (2009a). *Aspergillus fumigatus* germ tube growth and not conidia ingestion induces expression of inflammatory mediator genes in the human lung epithelial cell line A549. *J. Med. Microbiol.* ; **58**, 174–179.
- Bellanger, A., Reboux, G., Murat, J., Bex, V. & Millon, L. (2010). Detection of *Aspergillus fumigatus* by quantitative polymerase chain reaction in air samples impacted on low-melt agar. *Am. J. Infect. Control.* ; **38**, 195–198.
- Bellanger, A., Reboux, G., Roussel, S., Grenouillet, F., Didier-Scherer, E., Dalphin, J. & Millon, L. (2009b). Indoor fungal contamination of moisture-damaged and allergic patient housing analysed using real-time PCR. *Lett. Appl. Microbiol.* ; **49**, 260–266.
- Bellocchio, S., Montagnoli, C., Bozza, S., Gaziano, R., Rossi, G., Mambula, S., Vecchi, A., Mantovani, A., Levitz, S. & Romani, L. (2004). The contribution of the Toll-like/IL-1 receptor superfamily to innate and adaptive immunity to fungal pathogens *in vivo*. *J. Immunol.* ; **172**, 3059–3069.
- Benet, T., Nicolle, M., Thiebaut, A., Piens, M., Nicolini, F., Thomas, X., Picot, S., Michallet, M. & Vanhems, P. (2007). Reduction of invasive aspergillosis incidence among immunocompromised patients after control of environmental exposure. *Clin. Infect. Dis.* ; **45**, 682–686.

- Bennett, J. (2010). An overview of the genus *Aspergillus*. In *Aspergillus*; M. Machida and K. Gomi (ed.).
- Berenguer, J., Allende, M., Lee, J., Garrett, K., Lyman, C., Ali, N., Bacher, J., Pizzo, P. & Walsh, T. (1995). Pathogenesis of pulmonary aspergillosis. Granulocytopenia versus cyclosporine and methylprednisolone-induced immunosuppression. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*; **152**, 1079–1086.
- Berube, K., Aufderheide, M., Breheny, D., Clothier, R., Combes, R., Duffin, R., Forbes, B., Gaca, M., Gray, A., Hall, I., Kelly, M., Lethem, M., Liebsch, M., Merolla, L., Morin, J., Seagrave, J., Swartz, M., Tetley, T. & Umachandran, M. (2009). *In vitro* models of inhalation toxicity and disease. The report of a FRAME workshop. *Altern. Lab. Anim.*; **37**, 89–141.
- Bichi, R., Shinton, S., Martin, E., Koval, A., Calin, G., Cesari, R., Russo, G., Hardy, R. & Croce, C. (2002). Human chronic lymphocytic leukemia modeled in mouse by targeted TCL1 expression. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*; **99**, 6955–6960.
- Bille, E., Dauphin, B., Leto, J., Bougnoux, M., Beretti, J., Lotz, A., Suarez, S., Meyer, J., Join-Lambert, O., Descamps, P., Grall, N., Mory, F., Dubreuil, L., Berche, P., Nassif, X. & Ferroni, A. (2011). MALDI-TOF MS Andromas strategy for the routine identification of bacteria, mycobacteria, yeasts, *Aspergillus spp.* and positive blood cultures. *Clin. Microbiol. Infect.*; doi : 10.1111/j.1469-0691.2011.03688.x.
- BitMansour, A. & Brown, J. (2002). Prophylactic administration of liposomal amphotericin B is superior to treatment in a murine model of invasive aspergillosis after hematopoietic cell transplantation. *J. Infect. Dis.*; **186**, 134–1371.
- Bitterle, E., Karg, E., Schroepel, A., Kreyling, W., Tippe, A., Ferron, G., Schmid, O., Heyder, J., Maier, K. & Hofer, T. (2006). Dose-controlled exposure of A549 epithelial cells at the air-liquid interface to airborne ultrafine carbonaceous particles. *Chemosphere*; **65**, 1784–1790.
- Bodey, G. & Vartivarian, S. (1989). Aspergillosis. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.*; **8**, 413–437.
- Boreux, J., Parent, E. & J, B. (2010). Pratique du bayésien. *Statistique et probabilités appliquées*; Springer (Ed.), Paris, 336 pp.
- Botterel, F., Gross, K., Ibrahim-Granet, O., Khoufache, K., Escabasse, V., Coste, A., Cordonnier, C., Escudier, E. & Bretagne, S. (2008). Phagocytosis of *Aspergillus fumigatus* conidia by primary nasal epithelial cells *in vitro*. *BMC Microbiol.*; **8**, 97.
- Brenier-Pinchart, M., Lebeau, B., Borel, J., Quesada, J., Mallaret, M., Garban, F., Brion, J., Molina, L., Bosson, J., Thiebaut-Bertrand, A., Grillot, R. & Pelloux, H. (2011). Community-acquired invasive aspergillosis and outdoor filamentous fungal spore load : a relationship ? *Clin. Microbiol. Infect.*; **17**, 1387–1390.
- Brenier-Pinchart, M., Lebeau, B., Quesada, J., Mallaret, M., Borel, J., Mollard, A., Garban, F., Brion, J., Molina, L., Bosson, J., Cahn, J., Grillot, R. & Pelloux, H. (2009). Influence of internal and outdoor factors on filamentous fungal flora in hematology wards. *Am. J. Infect. Control.*; **37**, 631–637.
- Burrell, R. (1970). Improved device for the administration of fungal spores to small animals via the respiratory route. *Appl. Microbiol.*; **20**, 984–985.
- Cacciapuoti, A., Loebenberg, D., Corcoran, E., Menzel, F. J., Moss, E. J., Norris, C., Michalski, M., Raynor, K., Halpern, J., Mendrick, C., Arnold, B., Antonacci, B., Parmegiani, R., Yarosh-Tomaine, T., Miller, G. & Hare, R. (2000). The MIQE guidelines : minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Antimicrob. Agents Chemother.*; **44**, 2017–2022.
- Cahill, B., Hibbs, J., Savik, K., Juni, B., Dosland, B., Edin-Stibbe, C. & Hertz, M. (1997). *Aspergillus* airway colonization and invasive disease after lung transplantation. *Chest*; **112**, 1160–1164.
- Caillot, D., Couaillier, J., Bernard, A., Casasnovas, O., Denning, D., Mannone, L., Lopez, J., Couillault, G., Piard, F., Vagner, O. & Guy, H. (2001). Increasing volume and changing characteristics of invasive pulmonary aspergillosis on sequential thoracic computed tomography scans in patients with neutropenia. *J. Clin. Oncol.*; **19**, 253–259.

- Chabasse, D., Bouchara, J., de Gentile, L., Brun, S., Cimon, B. & Penn, P. (2002). Les moisissures d'intérêt médical. *Cahier de formation biologie médicale* ; **25**, 1–59.
- Chandenier, J., Bernard, S., Montharu, J., Bailly, E., Fetissof, F., De Monte, M., Desoubeaux, G., Diot, P. & Richard-Lenoble, D. (2009). The utility of a nebulised intra-tracheal rat model of invasive pulmonary aspergillosis. *Mycoses* ; **52**, 239–245.
- Chazalet, V., Debeauvais, J., Sarfati, J., Lortholary, J., Ribaud, P., Shah, P., Cornet, M., Vu Thien, H., Gluckman, E., Brücker, G. & Latgé, J. (1998). Molecular typing of environmental and patient isolates of *Aspergillus fumigatus* from various hospital settings. *J. Clin. Microbiol.* ; **36**, 1494–1500.
- Chiller, T., Luque, J., Sobel, R., Farrokhsad, K., Clemons, K. & Stevens, D. (2002). Development of a murine model of cerebral aspergillosis. *J. Infect. Dis.* ; **186**, 574–577.
- Chishimba, L., Niven, R., Cooley, J. & Denning, D. (2012). Voriconazole and posaconazole improve asthma severity in allergic bronchopulmonary aspergillosis and severe asthma with fungal sensitization. *J. Asthma* ; **49**, 423–433.
- Clemons, K., Schwartz, J. & Stevens, D. (2011). Therapeutic and toxicologic studies in a murine model of invasive pulmonary aspergillosis. *Med. Mycol.* ; **49**, 834–847.
- Clemons, K. & Stevens, D. (2005). The contribution of animal models of aspergillosis to understanding pathogenesis, therapy and virulence. *Med. Mycol.* ; **43** Suppl 1, S101–S110.
- Codex-Alimentarius (1999). Principe et directives régissant la conduite de l'évaluation des risques microbiologiques. CAC/GL 30. FAO/OMS ; , [http://www.codexalimentarius.net/download/standards/10751/CXG\\_062f.pdf](http://www.codexalimentarius.net/download/standards/10751/CXG_062f.pdf).
- Cordonnier, C., Ribaud, P., Herbrecht, R., Milpied, N., Valteau-Couanet, D., Morgan, C., Wade, A. & de Greffe de Moelle et de Thérapie Cellulaire, S. F. (2006). Prognostic factors for death due to invasive aspergillosis after hematopoietic stem cell transplantation : a 1-year retrospective study of consecutive patients at French transplantation centers. *Clin. Infect. Dis.* ; **42**, 955–963.
- Dagenais, T. & Keller, N. (2009). Pathogenesis of *Aspergillus fumigatus* in aspergillosis. *Clin. Microbiol. Rev.* ; **22**, 447–465.
- Dassonville, C., Demattei, C., Detaint, B., Barral, S., Bex-Capelle, V. & Momas, I. (2008). Assessment and predictors determination of indoor airborne fungal concentration in Paris newborn babies' homes. *Environ. Health* ; **108**, 80–85.
- De Bary, A. (1854). Ueber die Entwicklung und den Zusammenhang von *Aspergillus glaucus* und *Eurotium*. *Botanische Zeitung* ; **12**, 425.
- De Pauw, B., Walsh, T., Donnelly, J., Stevens, D., Edwards, J., Calandra, T., Pappas, P., Maertens, J., Lortholary, O., Kauffman, C., Denning, D., Patterson, T., Maschmeyer, G., Bille, J., Dismukes, W., Herbrecht, R., Hope, W., Kibbler, C., Kullberg, B., Marr, K., Muñoz, P., Odds, F., Perfect, J., Restrepo, A, ADN Ruhnke, M., Segal, B., Sobel, J., Sorrell, T., Viscoli, C., Wingard, J., Zaoutis, T. & Bennett, J. (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. *Clin. Infect. Dis.* ; **46**, 1813–1821.
- DeHart, D., Agwu, D., Julian, N. & Washburn, R. (1997). Binding and germination of *Aspergillus fumigatus* conidia on cultured A549 pneumocytes. *J. Infect. Dis.* ; **175**, 146–150.
- Dekali, S., Rogerieux, F., Elgrabli, D., Achard, S. & Rat, P. (2010). A new *in vitro* model of airblood barrier for the study of the translocation and the toxicity of nanoparticles. *12<sup>th</sup> international congress of toxicology.* ; Barcelone, 19–23 juillet.



- Del Chierico, F., Masotti, A., Onori, M., Fiscarelli, E., Mancinelli, L., Ricciotti, G., Alghisi, F., Dimiziani, L., Manetti, C., Urbani, A., Muraca, M. & Putignani, L. (2012). MALDI-TOF MS proteomic phenotyping of filamentous and other fungi from clinical origin. *J. Proteomics.* ; **75**, 3314–30.
- d'Enfert, C., Vecchiarelli, A. & Brown, A. (2010). Bioluminescent fungi for real-time monitoring of fungal infections. *Virulence* ; **1**, 174–176.
- Denning, D. (1998). Invasive aspergillosis. *Clin. Infect. Dis.* ; **26**, 781–803.
- Denning, D., O'Driscoll, B., Hogaboam, C., Bowyer, P. & Niven, R. (2006). The link between fungi and severe asthma : a summary of the evidence. *Eur. Respir. J.* ; **27**, 615–629.
- Denning, D., Van Wye, J., Lewiston, N. & Stevens, D. (1991). Adjunctive therapy of allergic bronchopulmonary aspergillosis with itraconazole. *Chest* ; **100**, 813–819.
- Desoubeau, G. & Chandenier, J. (2010a). *Aspergillus* et maladies aspergillaires. *Feuillets de Biologie* ; **293**, 53–63.
- Desoubeaux, G. & Chandenier, J. (2010c). Traitements antifongiques actuels des maladies aspergillaires. *Feuillets de Biologie* ; **295**, 55–63.
- Desoubeaux, G. & Chandenier, J. (2012). A nebulized intra-tracheal rat model of invasive pulmonary aspergillosis. *Methods Mol. Biol.* ; **845**, 511–518.
- Diamond, R., Krzesicki, R., Epstein, B. & Jao, W. (1978). Damage to hyphal forms of fungi by human leukocytes *in vitro*. A possible host defense mechanism in aspergillosis and mucormycosis. *Am. J. Pathol.* ; **91**, 313–328.
- Dixon, D., Polak, A. & Walsh, T. (1989). Fungus dose-dependent primary pulmonary aspergillosis in immunosuppressed mice. *Infect. Immun.* ; **57**, 1452–1456.
- Dubourdeau, M., Athman, R., Balloy, V., Huerre, M., Chignard, M., Philpott, D., JP, L. & Ibrahim-Granet, O. (2006). *Aspergillus fumigatus* induces innate immune responses in alveolar macrophages through the MAPK pathway independently of TLR2 and TLR4. *J. Immunol.* ; **177**, 3994–4001.
- Eduard, W. (2009). Fungal spores : a critical review of the toxicological and epidemiological evidence as a basis for occupational exposure limit setting. *Crit. Rev. Toxicol.* ; **39**, 799–864.
- Fasseu, M., Tréton, X., Guichard, C., Pedruzzi, E., Cazals-Hatem, D., Richard, C., Aparicio, T., Daniels, F., Soulé, J., Moreau, R., Bouhnik, Y., Laburthe, M., Groyer, A. & Ogier-Denis, E. (2010). Identification of restricted subsets of mature microRNA abnormally expressed in inactive colonic mucosa of patients with inflammatory Bowel disease. *PloS One* ; **5**, 1–12.
- Fekkar, A., Balloy, V., Pionneau, C., Marinach-Patrice, C., Chignard, M. & Mazier, D. (2012). Secretome of human bronchial epithelial cells in response to the fungal pathogen *Aspergillus fumigatus* analyzed by differential in-gel electrophoresis. *J. Infect. Dis.* ; **205**, 1163–1172.
- Ford, S. & Friedman, L. (1967). Experimental study of the pathogenicity of *aspergilli* for mice. *J. Bacteriol.* ; **94**, 928–933.
- Fortier, J. & Graubert, T. (2010). Murine models of human acute myeloid leukemia. *Cancer Treat. Res.* ; **145**, 183–196.
- Fournel, I., Sautour, M., Lafon, I., Sixt, N., L'Ollivier, C., Dalle, F., Chavanet, P., Couillaud, G., Caillot, D., Astruc, K., Bonnin, A. & Aho-Glélé, L. (2010). Airborne *Aspergillus* contamination during hospital construction works : efficacy of protective measures. *Am. J. Infect. Control.* ; **38**, 189–194.
- Francesconi, A., Kasai, M., Petraitiene, R., Petraitis, V., Kelaher, A., Schaufele, R., Hope, W., Shea, Y., Bacher, J. & Walsh, T. (2006). Characterization and comparison of galactomannan enzyme immunoassay and quantitative real-time PCR assay for detection of *Aspergillus fumigatus* in bronchoalveolar lavage fluid from experimental invasive pulmonary aspergillosis. *J Clin. Microbiol.* ; **44**, 2485–2480.

- Fresenius, G. (1863). *Aspergillus fumigatus* Fresen. *Beitrage zur Mykologie* ; 81-82.
- Gams, W., Christensen, M., Onions, A., Pitt, J. & Samson, R. (1985). Infrageneric taxa of *Aspergillus*. *Plenum Press dans Samson R., Pitt J., eds, New York* **102**, pp. 55–62.
- Gangneux, J., Bretagne, S., Cordonnier, C., Datry, A., Derouin, F., Grillot, R., Kauffmann-Lacroix, C., Lebeau, B., Morin, O., Nicolle, M., MA, P. & Poirot, J. (2002a). Prevention of nosocomial fungal infection : the French approach. *Clin. Infect. Dis.* ; **35**, 343–346.
- Gangneux, J., Camus, C. & Philippe, B. (2008). Épidémiologie et facteurs de risque de l'aspergillose invasive du sujet non neutropénique. *Mal. Respir.* ; **25**, 139–153.
- Gangneux, J., Poirot, J., Morin, O., Derouin, F., Bretagne, S., Datry, A., Kauffmann-Lacroix, C., Paugam, A., Chandener, J., Bouakline, A., Bordes, M., Chachaty, E., Dupeyron, C., Grawey, I., Lecso, G., Lortholary, J., Mourlhou, P., Nesa, D., Saheb, F., Cornet, M., Vimont, A. & Cordonnier, C. (2002b). Surveillance mycologique de l'environnement pour la prévention de l'aspergillose invasive : Propositions de standardisation des méthodologies et des modalités d'application. *Presse Med.* ; **31**, 841–848.
- Gangneux, J., Robert-Gangneux, F., Gicquel, G., Tanquerel, J., Chevrier, S., Poisson, M., Aupée, M. & Guiguen, C. (2006). Bacterial and fungal counts in hospital air : comparative yields for 4 sieve impactor air samplers with 2 culture media. *Infect. Contr. Hosp. Epidemio* ; **27**, 1405–1408.
- Gangneux, J., Sulahian, A., Garin, Y., Farinotti, R. & Derouin, F. (1996). Therapy of visceral leishmaniasis due to *Leishmania infantum* : experimental assessment of efficacy of AmBisome. *Antimicrob. Agents Chemother.* ; **40**, 1214–1218.
- Gauthier, T., Wang, X., Sifuentes Dos Santos, J., Fysikopoulos, A., Tadriss, S., Canlet, C., Artigot, M., Loiseau, N., Oswald, I. & Puel, O. (2012). Trypacidin, a spore-borne toxin from *Aspergillus fumigatus*, is cytotoxic to lung cells. *PLoS One* ; **7**, e29906.
- Geman, S. & Geman, D. (1984). Stochastic relaxation, gibbs distributions, and the bayesian restoration of images. *IEEE Trans. Pattern Anal. Mach. Intell.* ; **6**, 721–741.
- Girardin, H., Sarfati, J., Traoré, F., Dupouy Camet, J., Derouin, F. & Latgé, J. (1994). Molecular epidemiology of nosocomial invasive aspergillosis. *J. Clin. Microbiol.* ; **32**, 684–690.
- Glass, N. & Donaldson, G. (1995). Development of primer sets designed for use with the PCR to amplify conserved genes from filamentous ascomycetes. *Appl. Environ. Microbiol.* ; **61**, 1323–1330.
- Gorelik, O., Cohen, N., Shpirer, I., Almozni-Sarafian, D., Alon, I., Koopfer, M., Yona, R. & Modai, D. (2000). Fatal haemoptysis induced by invasive pulmonary aspergillosis in patients with acute leukaemia during bone marrow and clinical remission : report of two cases and review of the literature. *Infect.* ; **41**, 277–282.
- Gots, R., Layton, N. & Pirages, S. (2003). Indoor health : background levels of fungi. *AIHA J.* ; **64**, 427–438.
- Greenberger, P. (2003). Clinical aspects of allergic bronchopulmonary aspergillosis. *Front. Biosci.* ; **8**, s119–s127.
- Haas, C., Rose, J. & Gerba, C. (1999). Quantitative microbial risk. *John Wiley & Sons, Inc.* ; New York, 450 pp.
- Hadrich, I., Makni, F., Ayadi, A. & Ranque, S. (2010). Microsatellite typing to trace *Aspergillus flavus* infections in a hematology unit. *J. Clin. Microbiol.* ; **48**, 2396–2401.
- Hajjeh, R. & Warnock, D. (2001). Counterpoint : invasive aspergillosis and the environment—rethinking our approach to prevention. *Clin. Infect. Dis.* ; **33**, 1549–1552.
- Haugland, R., Brinkman, N. & Vesper, S. (2002). Evaluation of rapid DNA extraction methods for the quantitative detection of fungi using real-time PCR analysis. *J. Microbiol. Methods.* ; **50**, 319–323.

- Heinning, J., Weeke, E. & Groth, S. (1998). High dose local steroid treatment in bronchopulmonary aspergillosis. *Allergy*; **43**, 24–31.
- Herbrecht, R., Denning, D., Patterson, T., Bennett, J., Greene, R., Oestmann, J., Kern, W., Marr, K., Ribaud, P., Lortholary, O., Sylvester, R., Rubin, R., Wingard, J., Stark, P., Durand, C., Caillot, D., Thiel, E., Chandrasekar, P., Hodges, M., Schlamm, H., Troke, P., de Pauw, B. & of-the-European-Organisation-for-Research-and-Treatment-of-Cancer-AND-the-Global-Aspergillus-Study-Group, I.-F.-I.-G. (2002). Voriconazole *versus* amphotericin B for primary therapy of invasive aspergillosis. *N. Engl. J. Med.*; **347**, 408–415.
- Hoeben, B., Burgess, D., McConville, J., Najvar, L., Talbert, R., Peters, J., Wiederhold, N., Frei, B., Graybill, J., Bocanegra, R., Overhoff, K., Sinswat, P., Johnston, K. & Williams, R. r. (2006). *In vivo* efficacy of aerosolized nanostructured itraconazole formulations for prevention of invasive pulmonary aspergillosis. *Antimicrob. Agents Chemother.*; **50**, 1552–1554.
- Hogan, C. & Denning, D. (2011). Allergic bronchopulmonary aspergillosis and related allergic syndromes. *Semin. Respir. Crit. Care Med.*; **32**, 682–692.
- Hohl, T., Van Epps, H., Rivera, A., Morgan, L., Chen, P., Feldmesser, M. & Pamer, E. (2005). *Aspergillus fumigatus* triggers inflammatory responses by stage-specific beta-glucan display. *PLoS Pathol.*; **1**, e30.
- Hong, S., Go, S., Shin, H., Frisvad, J. & Samson, R. (2005). Polyphasic taxonomy of *Aspergillus fumigatus* and related species. *Mycologia*; **97**, 1316–1329.
- Hope, W., Kruhlak, M., Lyman, C., Petraitiene, R., Petraitis, V., Francesconi, A., Kasai, M., Mickiene, D., Sein, T., Peter, J., Kelaher, A., Hughes, J., Cotton, M., Cotten, C., Bacher, J., Tripathi, S., Bermudez, L., Mangel, T., Zervas, P., Wingard, J., Drusano, G. & Walsh, T. (2007). Pathogenesis of *Aspergillus fumigatus* and the kinetics of galactomannan in an *in vitro* model of early invasive pulmonary aspergillosis : implications for antifungal therapy. *J. Infect. Dis.*; **195**, 455–466.
- Hope, W., Petraitis, V., Petraitiene, R., Aghamolla, T., Bacher, J. & Walsh, T. (2010). The initial 96 hours of invasive pulmonary aspergillosis : histopathology, comparative kinetics of galactomannan and (1->3)  $\beta$ -d-glucan and consequences of delayed antifungal therapy. *Antimicrob. Agents Chemother.*; **54**, 4879–4886.
- Hospenthal, D., Kwon-Chung, K. & Bennett, J. (1998). Concentrations of airborne *Aspergillus* compared to incidence of invasive aspergillosis : Lack of correlation. *Med. Mycol.*; **36**, 165–168.
- Houbraken, J., Due, M., Varga, J., Meijer, M., Frisvad, J. & Samson, R. (2007). Polyphasic taxonomy of *Aspergillus section Usti*. *Stud. Mycol.*; **59**, 107–128.
- Husain, S., Paterson, D., Studer, S., Crespo, M., Pilewski, J., Durkin, M., Wheat, J., Johnson, B., McLaughlin, L., Bentsen, C., McCurry, K. & Singh, N. (2007). *Aspergillus* galactomannan antigen in the bronchoalveolar lavage fluid for the diagnosis of invasive aspergillosis in lung transplant recipients. *Transplantation*; **83**, 1330–1336.
- Ibrahim-Granet, O., Jouvion, G., Hohl, T., Droin-Bergère, S., Philippart, F., Kim, O., Adib-Conquy, M., Schwendener, R., Cavaillon, J. & Brock, M. (2010). *In vivo* bioluminescence imaging and histopathologic analysis reveal distinct roles for resident and recruited immune effector cells in defense against invasive aspergillosis. *BMC Microbiol.*; **10**, 105.
- Ikemoto, H. (1992). Bronchopulmonary aspergillosis : diagnostic and therapeutic considerations. *Curr. Top. Med. Mycol.*; **4**, 64–87.
- Iversen, M., Burton, C., Vand, S., Skovfoged, L., Carlsen, J., Milman, N., Andersen, C., Rasmussen, M. & Tvede, M. (2007). *Aspergillus* infection in lung transplant patients : incidence and prognosis. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.*; **26**, 879–886.
- Iwen, P., Rupp, M., Langnas, A., Reed, E. & Hinrichs, S. (1998). Invasive pulmonary aspergillosis due to *Aspergillus terreus* : 12 years experience and review of the literature. *Clin. Infect. Dis.*; **26**, 1092–1097.

- Johnson, C., Edmiston, C. J., Zhu, Y., Adams, M., Roza, A. & Kurup, V. (2005). A murine model of invasive aspergillosis : variable benefit of interferon-gamma administration under *in vitro* and *in vivo* conditions. *Surg. Infect.* ; **6**, 397–407.
- Jones, R., Masago, Y., Bartrand, T., Haas, C., Nicas, M. & Rose, J. (2009). Characterizing the risk of infection from *Mycobacterium tuberculosis* in commercial passenger aircraft using quantitative microbial risk assessment. *Risk Anal.* ; **29**, 355–365.
- Kanafani, Z. & Perfect, J. (2008). Antimicrobial resistance : resistance to antifungal agents : mechanisms and clinical impact. *Clin. Infect. Dis.* ; **46**, 120–128.
- Karthus, M. (2011). Prophylaxis and treatment of invasive aspergillosis with voriconazole, posaconazole and caspofungin : review of the literature. *Eur. J. Med. Res.* ; **16**, 145–152.
- Kauffmann-Lacroix, C., Bousseau, A., Dalle, F., Brenier-Pinchart, M., Delhaes, L., Machouart, M., Gari-Toussaint, M., Datry, A., Lacroix, C., Hennequin, C., Toubas, D. & Morin, O. (2008). Surveillance mycologique de l'eau pour la prévention des mycoses invasives dans les établissements de santé : propositions de standardisation des methodologies. *Presse med.* ; **37**, 751–759.
- Khoufache, K., Cabaret, O., Farrugia, C., Rivollet, D., Alliot, A., Allaire, E., Cordonnier, C., Bretagne, S. & Botterel, F. (2010). Primary *in vitro* culture of porcine tracheal epithelial cells in an air-liquid interface as a model to study airway epithelium and *Aspergillus fumigatus* interactions. *Med. Mycol.* ; **48**, 1049–1055.
- Kirkpatrick, W., Najvar, L., Vallor, A., Wiederhold, N., Bocanegra, R., Pfeiffer, J., Perkins, K., Kugler, A., Sweeney, T. & Patterson, T. (2012). Prophylactic efficacy of single dose pulmonary administration of amphotericin B inhalation powder in a guinea pig model of invasive pulmonary aspergillosis. *J. Antimicrob. Chemother.* ; **67**, 970–976.
- Kleinstreuer, C. & Zhang, Z. (2010). Airflow and particle transport in the human respiratory system. *Rev. Fluid. Mech.* ; **42**, 301–334.
- Klich, M. (2009). Health effects of *Aspergillus* in food and air. *Toxicol. Ind. Health* ; **25**, 657–667.
- Knebel, J., Ritter, D. & Aufderheide, M. (2002). Exposure of human lung cells to native diesel motor exhaust—development of an optimized *in vitro* test strategy. *Toxicol. In Vitro* ; **16**, 185–192.
- Kothary, M., Chase, T. J. & Macmillan, J. (1984). Correlation of elastase production by some strains of *Aspergillus fumigatus* with ability to cause pulmonary invasive aspergillosis in mice. *Infect. Immun.* ; **43**, 320–325.
- Kramer, M., Denning, D., Marshall, S., Ross, D., Berry, G., Lewiston, N., Stevens, D. & Theodore, J. (1991). Ulcerative tracheobronchitis after lung transplantation. A new form of invasive aspergillosis. *Am. Rev. Respir. Dis.* ; **144**, 552–556.
- Kurup, V. & Grunig, G. (2002). Animal models of allergic bronchopulmonary aspergillosis. *Mycopathologia* ; **153**, 165–177.
- Lacey, J. & Crook, B. (1988). Fungal and actinomycete spores as pollutants of the workplace and occupational allergens. *Ann. Occup. Hyg.* ; **32**, 515–533.
- Latgé, J. (1999). *Aspergillus fumigatus* and aspergillosis. *Clin. Microbiol. Rev.* ; **12**, 310–350.
- Latgé, J. (2007). The cell wall : a carbohydrate armour for the fungal cell. *Mol. Microbiol.* ; **66**, 279–290.
- Lee, J., Hwanga, G., Jung, J., Lee, D. & Lee, B. (2010). Generation characteristics of fungal spore and fragment bioaerosols by airflow control over fungal cultures. *J. Aerosol Sci.* ; **41**, 319–325.
- Lee, L., Hachem, R., Berkheiser, M., Hackett, B., Jiang, Y. & Raad, I. (2012). Hospital environment and invasive aspergillosis in patients with hematologic malignancy. *Am. J. Infect. Control.* ; **40**, 247–249.

- Leenders, A., van Belkum, A., Janssen, S., de Marie, S., Kluytmans, J., Wielenga, J., Löwenberg, B. & Verbrugh, H. (1996). Molecular epidemiology of apparent outbreak of invasive aspergillosis in a hematology ward. *J. Clin. Microbiol.* ; **37**, 345–351.
- Lehrer, R. & Jan, R. (1970). Interaction of *Aspergillus fumigatus* spores with Human leukocytes and serum. *Infect. Immun.* ; **1**, 345–350.
- Lengerova, M., Kocmanova, I., Racil, Z., Hrnčirova, K., Pospisilova, S., Mayer, J., Najvar, L., Wiederhold, N., Kirkpatrick, W. & Patterson, T. (2012). Detection and measurement of fungal burden in a guinea pig model of invasive pulmonary aspergillosis by novel quantitative nested real-time PCR compared with galactomannan and (1,3)- $\beta$ -D-glucan detection. *J. Clin. Microbiol.* ; **50**, 602–608.
- Lewis, R., Albert, N. & Kontoyiannis, D. (2008). Efficacy of single-dose liposomal amphotericin B or micafungin prophylaxis in a neutropenic murine model of invasive pulmonary aspergillosis. *Antimicrob. Agents Chemother.* ; **52**, 4178–4180.
- Lewis, R., Prince, R., Chi, J. & Kontoyiannis, D. (2002). Itraconazole preexposure attenuates the efficacy of subsequent amphotericin B therapy in a murine model of acute invasive pulmonary aspergillosis. *Antimicrob. Agents Chemother.* ; **46**, 3208–3214.
- Liang, K. & Zeger, S. (1986). Longitudinal data analysis for discrete and continuous outcomes. *Biometrics* ; **42**, 121–130.
- Lieber, M., Smith, B., Szakal, A., Nelson-Rees, W. & Todaro, G. (1976). A continuous tumor-cell line from a human lung carcinoma with properties of type II alveolar epithelial cells. *Int. J. Cancer* ; **17**, 62–70.
- Link, H. (1809). Observationes in ordines plantarum naturales. *Ges. Naturf. Freunde z. Berlin Mag.* ; **3**, 1–42.
- Loebenberg, D., Cacciapuoti, A., Parmegiani, R., Moss, E. J., Menzel, F. J., Antonacci, B., Norris, C., Yarosh-Tomaine, T., Hare, R. & Miller, G. (1992). *In vitro* and *in vivo* activities of SCH 42427, the active enantiomer of the antifungal agent SCH 39304. *Antimicrob. Agents Chemother.* ; **36**, 498–501.
- Lortholary, O., Gangneux, J., Sitbon, K., Lebeau, B., de Monbrison, F., Le Strat, Y., Coignard, B., Dromer, F., Bretagne, S. & Group, F. M. S. (2011). Epidemiological trends in invasive aspergillosis in France : the SAIF network (2005-2007). *Clin. Microbiol. Infect.* ; **17**, 1882–1889.
- Lortholary, O., Meyohas, M. & Dupont, B. (1993). Invasive aspergillosis in patients with acquired immunodeficiency syndrome : report of 33 cases. French cooperative study group on aspergillosis in aids. *Am. J. Med.* ; **95**, 177–187.
- Luong, M., Clancy, C., Vadnerkar, A., Kwak, E., Silveira, F., Wissel, M., Grantham, K., Shields, R., Crespo, M., Pilewski, J., Toyoda, Y., Kleiboeker, S., Pakstis, D., Reddy, S., Walsh, T. & Nguyen, M. (2011). Comparison of an *Aspergillus* real-time polymerase chain reaction assay with galactomannan testing of bronchoalveolar lavage fluid for the diagnosis of invasive pulmonary aspergillosis in lung transplant recipients. *Clin. Infect. Dis.* ; **52**, 1218–1226.
- Mahieu, L., De Dooy, J., Van Laer, F., Jansens, H. & Ieven, M. (2000). A prospective study on factors influencing *Aspergillus* spore load in the air during renovation works in a neonatal intensive care unit. *J. Hosp. Infect.* ; **45**, 191–197.
- Marr, K. (2008). Fungal infections in hematopoietic stem cell transplant recipients. *Med. Mycol.* ; **46**, 293–302.
- Marr, K., Balajee, S., Hawn, T., Ozinsky, A., Pham, U., Akira, S., Aderem, A. & Liles, W. (2003). Differential role of MyD88 in macrophage-mediated responses to opportunistic fungal pathogens. *Infect. Immun.* ; **71**, 5280–5286.
- Marr, K., Patterson, T. & Denning, D. (2002). Aspergillosis. Pathogenesis, clinical manifestations, and therapy. *Infect. Dis. Clin. North Am.* ; **16**, 875–894.

- Martino, R. & Subirà, M. (2002). Invasive fungal infections in hematology : new trends. *Ann. Hematol.* ; **81**, 233–243.
- May, K. (1973). The Collison nebulizer. Description, performance and application. *J. of Aerosol Science* ; **4**, 235.
- Mayer, B., Koopman, J., Ionides, E., Pujol, J. & Eisenberg, J. (2011). A dynamic dose-response model to account for exposure patterns in risk assessment : a case study in inhalation *anthrax*. *J. R. Soc. Interface* ; **8**, 506–517.
- McCulloch, E., Ramage, G., Rajendran, R., Lappin, D., Jones, B., Warn, P., Shrief, R., Kirkpatrick, W., Patterson, T. & Williams, C. (2012). Antifungal treatment affects the laboratory diagnosis of invasive aspergillosis. *J. Clin. Pathol.* ; **65**, 83–86.
- Meklin, T., Reponen, T., McKinstry, C., Cho, S., Grinshpun, S., Nevalainen, A., Veepsäläinen, A., Haugland, R., Lemasters, G. & Vesper, S. (2007). Comparison of mold concentrations quantified by MSQPCR in indoor and outdoor air sampled simultaneously. *Sci. Total Environ.* ; **382**, 130–134.
- Menotti, J., Porcher, R., Ribaud, P., Lacroix, C., Jolivet, V., Hamane, S. & Derouin, F. (2007). Monitoring of nosocomial invasive aspergillosis and early evidence of an outbreak using cumulative sum tests (CUSUM). *Clin. Microbiol. Infect.* ; **382**, 130–134.
- Micheli, P. (1729). *Nova plantarum generaj uxta Toumefortii methodum ispo-sita*. Bernardo Paperini ; Florence, Italy, pp. 234.
- Moon, H., Chen, J., Gaylor, D. & Kodell, R. (2009). Growth polarity. Dans : *Aspergillus fumigatus* and Aspergillosis. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* ; **40**, 177–184.
- Moreau, P., Zahar, J., Milpied, N., Baron, O., Mahé, B., Wu, D., Germaud, P., Despins, P., Delajartre, A. & Harousseau, J. (1993). Localized invasive pulmonary aspergillosis in patients with neutropenia. Effectiveness of surgical resection. *Cancer* ; **72**, 3223–3226.
- Morton, C., Varga, J., Hornbach, A., Mezger, M., Sennfelder, H., Kneitz, S., Kurzai, O., Krappmann, S., Einsele, H., Nierman, W., Rogers, T. & Loeffler, J. (2011). The temporal dynamics of differential gene expression in *Aspergillus fumigatus* interacting with human immature dendritic cells *in vitro*. *PLoS One.* ; **6**, e16016.
- Moss, R. (2010). Allergic bronchopulmonary aspergillosis and *Aspergillus* infection in cystic fibrosis. *Curr. Opin. Pulm. Med.* ; **16**, 598–603.
- Nawada, R., Amitani, R., Tanaka, E., Niimi, A., Suzuki, K., Murayama, T. & Kuze, F. (1996). Murine model of invasive pulmonary aspergillosis following an earlier stage, noninvasive *Aspergillus* infection. *J. Clin. Microbiol.* ; **34**, 1433–1439.
- Neeld, D., Goodman, L., Gurney, J., Greenberger, P. & Fink, J. (1990). Computerized tomography in the evaluation of allergic bronchopulmonary aspergillosis. *Am. Rev. Respir. Dis.* ; **142**, 1200–1205.
- Nguyen, T. (2011). Place des *Aspergillus* de la section *Usti* dans la flore fongique de l'hôpital bichat Claude Bernard. *Faculté Paris Diderot* ; Mémoire de stage, Master M1 IMVI, 12pp.
- Nicas, M. & Hubbard, A. (2002). A risk analysis for airborne pathogens with low infectious dose : application to respirator selection against *coccidioides immitis* spores. *Risk Analysis* ; **26**, 1153–1163.
- Nicolle, M., Benet, T. & Vanhems, P. (2011). Aspergillosis : nosocomial or community-acquired? *Med. Mycol.* ; **49** suppl1, S24–S29.
- Nierman, W., Pain, A., Anderson, M., Wortman, J., Kim, H., Arroyo, J., Berriman, M., Abe, K., Archer, D., Bermejo, C., Bennett, J., Bowyer, P., Chen, D., Collins, M., Coulsen, R., Davies, R., Dyer, P., Farman, M., Fedorova, N., Fedorova, N., Feldblyum, T., Fischer, R., Fosker, N., Fraser, A., García, J., García, M., Goble,

- A., Goldman, G., Gomi, K., Griffith-Jones, S., Gwilliam, R., Haas, B., Haas, H., Harris, D., Horiuchi, H., Huang, J., Humphray, S., Jiménez, J., Keller, N., Khouri, H., Kitamoto, K., Kobayashi, T., Konzack, S., Kulkarni, R., Kumagai, T., Lafon, A., Latgé, J., Li, W., Lord, A., Lu, C., Majoros, W., May, G., Miller, B., Mohamoud, Y., Molina, M., Monod, M., Mouyna, I., Mulligan, S., Murphy, L., O'Neil, S., Paulsen, I., Peñalva, M., Perteua, M., Price, C., Pritchard, B., Quail, M., Rabbinowitsch, E., Rawlins, N., Rajandream, M., Reichard, U., Renauld, H., Robson, G., Rodriguez de Córdoba, S., Rodríguez-Peña, J., Ronning, C., Rutter, S., Salzberg, S., Sanchez, M., Sánchez-Ferrero, J., Saunders, D., Seeger, K., Squares, R., Squares, S., Takeuchi, M., Tekaiia, F., Turner, G., Vazquez de Aldana, C., Weidman, J., White, O., Woodward, J., Yu, J., Fraser, C., Galagan, J., Asai, K., Machida, M., Hall, N., Barrell, B. & Denning, D. (2005). Genomic sequence of the pathogenic and allergenic filamentous fungus *Aspergillus fumigatus*. *Nature* ; **438**, 1151–1156.
- Niki, Y., Bernard, E., Edwards, F., Schmitt, H., Yu, B. & Armstrong, D. (1991). Model of recurrent pulmonary aspergillosis in rats. *J. Clin. Microbiol.* ; **29**, 1317–1322.
- Nolard, N. (1994). Les liens entre les risques d'aspergillose et la contamination de l'environnement. *Pathologie-biologie* ; **42**, 706–710.
- O'Gorman, C., Fuller, H. & Dyer, P. (2009). Discovery of a sexual cycle in the opportunistic fungal pathogen *Aspergillus fumigatus*. *Nature* ; **457**, 471–474.
- Olson, J., Adler-Moore, J., Schwartz, J., Jensen, G. & Proffitt, R. (2006). Comparative efficacies, toxicities, and tissue concentrations of amphotericin B lipid formulations in a murine pulmonary aspergillosis model. *Antimicrob. Agents Chemother* ; **50**, 2122–2131.
- OMS (2006). Lignes directrices OMS relatives à la qualité de l'air : particules, ozone, dioxyde d'azote et dioxyde de soufre. Mise à jour mondiale 2005. Synthèse de l'évaluation des risques. *Organisation mondiale de la santé* ; .
- OMS (2009). WHO guidelines for indoor quality. Dampness and mould. *World Health Organization* ; 230 pp.
- ONU (2004). Caractérisation des dangers liés à la présence de pathogènes dans les aliments et dans l'eau. *Série évaluation des risques microbiologiques* ; 134 pp.
- Oosthuizen, J., Gomez, P., Ruan, J., Hackett, T., Moore, M., Knight, D. & Tebbutt, S. (2011). Dual organism transcriptomics of airway epithelial cells interacting with conidia of *Aspergillus fumigatus*. *PLoS One* ; **6**, e20527.
- Panackal, A., Imhof, A., Hanley, E. & Marr, K. (2006). *Aspergillus ustus* infections among transplant recipients. *Emerg. Infect. Dis.* ; **12**, 403–408.
- Pappas, P., Alexander, B., Andes, D., Hadley, S., Kauffman, C., Freifeld, A., Anaissie, E., Brumble, L., Herwaldt, L., Ito, J., Kontoyiannis, D., Lyon, G., Marr, K., Morrison, V., Park, B., Patterson, T., Perl, T., Oster, R., Schuster, M., Walker, R., Walsh, T., Wannemuehler, K. & Chiller, T. (2010). Invasive fungal infections among organ transplant recipients : results of the Transplant-Associated Infection Surveillance Network (TRANSNET). *Clin. Infect. Dis.* ; **50**, 1101–1011.
- Paris, S., Debeauvais, J., Cramer, R., Carey, M., Charlès, F., Prévost, M., Schmitt, C., Philippe, B. & Latgé, J. (2003). Conidial hydrophobins of *Aspergillus fumigatus*. *Appl. Environ. Microbiol.* ; **69**, 1581–1588.
- Pariselli, F., Sacco, M., Ponti, J. & Rembges, D. (2009). Effects of toluene and benzene air mixtures on human lung cells (A549). *Exp. Toxicol. Pathol.* ; **61**, 381–386.
- Pasanen, A. (2001). A review : fungal exposure assessment in indoor environments. *Indoor Air* ; **11**, 87–98.
- Paterson, D. & Singh, N. (1999). Invasive aspergillosis in transplant recipients. *Medicine (Baltimore)* ; **78**, 123–138.
- Patterson, T. (2005). The future of animal models of invasive aspergillosis. *Med. mycol.* ; **43** Suppl 1, S115–S119.

- Pavie, J., Lacroix, C., Hermoso, D., Robin, M., Ferry, C., Bergeron, A., Feuillade, M., Dromer, F., Gluckman, E., Molina, J. & Ribaud, P. (2005). Breakthrough disseminated *Aspergillus ustus* infection in allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplant Recipients receiving voriconazole or caspofungin prophylaxis. *J. Clin. Microbiol* **43**, 4902–4904.
- Peláez, T., Muñoz, P., Guinea, J., Valerio, M., Giannella, M., Klaassen, C. & Bouza, E. (2012). Outbreak of invasive aspergillosis after major heart surgery caused by spores in the air of the intensive care unit. *Clin. Infect. Dis.* ; **54**, e24–31.
- Persoz, C., Leleu, C., Achard, S., Fasseu, M., Menotti, J., Meneceur, P., Momas, I., Derouin, F. & Seta, N. (2011). Sequential air–liquid exposure of human respiratory cells to chemical and biological pollutants. *Toxicolo. Lett.* ; **207**, 53–59.
- Petraitis, V., Petraitiene, R., Solomon, J., Kelaher, A., Murray, H., Mya-San, C., Bhandary, A., Sein, T., Avila, N., Basevicius, A., Bacher, J. & Walsh, T. (2006). Multidimensional volumetric imaging of pulmonary infiltrates for measuring therapeutic response to antifungal therapy in experimental invasive pulmonary aspergillosis. *Antimicrob. Agents Chemother.* ; **50**, 1510–1517.
- Piggott, W. & Emmons, C. (1960). Device for inhalation exposure of animals to spores. *Proc. Soc. Exp. Bio. Med.* ; **103**, 805–806.
- Pitt, J. (1994). The current role of *Aspergillus* and *Penicillium* in human and animal health. *J. Med. Vet. Mycol.* ; **1**, 17–21.
- Plummer, M. (2003). JAGS : A program for analysis of bayesian graphical models using Gibbs sampling. *Proceedings of the 3rd International Workshop on Distributed Statistical Computing (DSC 2003)* ; 20-22 mars ; Vienne, Autriche.
- Plummer, M., Best, N., Cowles, K. & Vines, K. (2010). CODA : Output analysis and diagnostics for MCMC. Disponible à l'adresse : <http://CRAN.R-project.org/package=coda>.
- Raper, B. & Fennell, J. (1965). The genus *Aspergillus*. *Williams & Wilkins*, Baltimore.
- Reboux, G., Bellanger, A., Roussel, S., Grenouillet, F., Sornin, S., Piarroux, R., Dalphin, J. & Millon, L. (2009). Indoor mold concentration in Eastern France. *Indoor Air* ; **19**, 446–453.
- Reichenberger, F., Habicht, J., Gratwohl, A. & Tamm, M. (2002). Diagnosis and treatment of invasive pulmonary aspergillosis in neutropenic patients. *Eur. Respir. J.* ; **19**, 743–755.
- Rieg, G., Spellberg, B., Schwartz, J., Fu, Y., Edwards, J. J., Sheppard, D. & Ibrahim, A. (2006). Antifungal prophylaxis is effective against murine invasive pulmonary aspergillosis. *Antimicrob. Agents Chemother.* ; **50**, 2895–2896.
- Ritter, D., Knebel, J. & Aufderheide, M. (2001). *In vitro* exposure of isolated cells to native gaseous compounds–development and validation of an optimized system for human lung cells. *Exp. Toxicol. Pathol.* ; **53**, 373–386.
- Roberts, J., Schock, K., Marino, S. & Andriole, V. (2000). Efficacies of two new antifungal agents, the triazole ravuconazole and the echinocandin LY-303366, in an experimental model of invasive aspergillosis. *Antimicrob. Agents Chemother.* ; **44**, 3381–3388.
- Roussel, S., Reboux, G., Bellanger, A., Sornin, S., Grenouillet, F., Dalphin, J., Piarroux, R. & Millon, L. (2008). Characteristics of dwellings contaminated by moulds. *J. Environ. Monit.* ; **10**, 724–729.
- Roussel, S., Reboux, G., Millon, L., Parchas, M., Boudih, S., Skana, F., Delaforge, M. & Rakotonirainy, M. (2012). Microbiological evaluation of ten French archives and link to occupational symptoms. *Indoor Air* ; doi : 10.1111/j.1600-0668.2012.00781.x.



- Ruiz-Camps, I., Aguado, J. & Almirante, B. (2010). Recommendations of the Spanish Society of Infectious Diseases and Clinical Microbiology (SEIMC) on the prevention of invasive fungal infection due to filamentous fungi. *Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.* ; **28**, 172.e1–172.e21.
- Rupp, M., Iwen, P., Tyner, L., Marion, N., Reed, E. & Anderson, J. (2008). Routine sampling of air for fungi does not predict risk of invasive aspergillosis in immunocompromised patients. *J. Hosp. Infect.* ; **68**, 270–271.
- Sanaa, M. & Cerf, O. (2002). A risk analysis for airborne pathogens with low infectious dose : application to respirator selection against *Coccidioides immitis* spores. *Epidémiol. santé anim.* ; **41**, 157–168.
- Sautour, M., Sixt, N., Dalle, F., L'Ollivier, C., Fourquenet, V., Calinon, C., Paul, K., Valvin, S., Maurel, A., Aho, S., Couillault, G., Cachia, C., Vagner, O., Cuisenier, B., Caillot, D. & Bonnin, A. (2009). Profiles and seasonal distribution of airborne fungi in indoor and outdoor environments at a French hospital. *Sci. Total Environ.* ; **407**, 3766–3771.
- Schaffner, A., Douglas, H. & A, B. (1982). Selective protection against conidia by mononuclear and against mycelia by polymorphonuclear phagocytes in resistance to *Aspergillus*. *J. Clin. Invest.* ; **69**, 617–631.
- Schelenz, S., Smith, D. & Bancroft, G. (1999). Cytokine and chemokine responses following pulmonary challenge with *Aspergillus fumigatus* : obligatory role of TNF-alpha and GM-CSF in neutrophil recruitment. *Med. Mycol.* ; **37**, 183–194.
- Sheppard, D., Graybill, I. J., Najvar, L., Chiang, L., Doedt, T., Kirkpatrick, W., Bocanegra, R., Vallor, A., Patterson, T. & Filler, S. (2006b). Standardization of an experimental murine model of invasive pulmonary aspergillosis. *Antimicrob. Agents Chemother.* ; **50**, 3501–3503.
- Sheppard, D., Marr, K., Fredricks, D., Chiang, L., Doedt, T. & Filler, S. (2006a). Comparison of three methodologies for the determination of pulmonary fungal burden in experimental murine aspergillosis. *Clin. Microbiol. Infect.* ; **12**, 376–380.
- Sheppard, D., Rieg, G., Chiang, L., Filler, S., Edwards, J. J. & Ibrahim, A. (2004). Novel inhalational murine model of invasive pulmonary aspergillosis. *Antimicrob. Agents Chemother.* ; **48**, 1908–1911.
- Sherertz, R., Belani, A., Kramer, B., Elfenbein, G., Weiner, R., Sullivan, M., Thomas, R. & Samsa, G. (1987). Impact of air filtration on nosocomial *Aspergillus* infections. Unique risk of bone marrow transplant recipients. *Am. J. Med.* ; **83**, 709–718.
- Sidransky, H. & Friedman, L. (1959). The effect of cortisone and antibiotic agents on experimental pulmonary aspergillosis. *Am. J. Pathol.* ; **35**, 169–184.
- Silveira, F. & Husain, S. (2010). Post-transplant colonization with non-*Aspergillus* molds and risk of development of invasive fungal disease in lung transplant recipients. *AC Pasqualotto ed.* ; In *Aspergillosis : from diagnosis to prevention*, 567581.
- Singh, N. & Paterson, D. (2005). *Aspergillus* infections in transplant recipients. *Clin. Microbiol. Rev.* ; **18**, 44–69.
- Singhal, D., Baker, L., Wormald, P. & Tan, L. (2011). *Aspergillus fumigatus* biofilm on primary human sino-nasal epithelial culture. *Am. J. Rhinol. Allergy* ; **25**, 219–225.
- Sixt, N., Dalle, F., Lafon, I., Aho, S., Couillault, G., Valot, S., Calinon, C., Danaire, V., Vagner, O., Cuisenier, B., Sautour, M., Besancenot, J., L'Ollivier, C., Caillot, D. & Bonnin, A. (2007). Reduced fungal contamination of the indoor environment with the Plasmair system (Airinspace). *J. Hosp. Infect.* ; **65**, 156–162.
- Smith, B. (1977). Cell line A549 : a model system for the study of alveolar type ii cell function. *Am. Rev. Respir. Dis.* ; **115**, 285–293.

- Smith, P., Olson, J., Constable, D., Schwartz, J., Proffitt, R. & Adler-Moore, J. (2007). Effects of dosing regimen on accumulation, retention and prophylactic efficacy of liposomal amphotericin B. *J. Antimicrob. Chemother.* ; **59**, 941–951.
- Solé, A. & Salavert, M. (2005). *Aspergillus* infections in lung transplant recipients : risk factors and outcome. *Clin. Microbiol. Infect.* ; **11**, 359–365.
- Solé, A. & Salavert, M. (2008). Fungal infections after lung transplantation. *Transplantation reviews* ; **22**, 89–104.
- Solé, A. & Salavert, M. (2009). Fungal infections after lung transplantation. *Curr. Opin. Pulm. Med.* ; **15**, 243–253.
- Steinbach, W., Benjamin, D. J., Trasi, S., Miller, J., Schell, W., Zaas, A., Foster, W. & Perfect, J. (2004). Value of an inhalational model of invasive aspergillosis. *Med. Mycol.* ; **42**, 417–425.
- Sun, W., Wu, R. & Last, J. (1995). Effects of exposure to environmental tobacco smoke on a human tracheo-bronchial epithelial cell line. *Toxicology* ; **100**, 163–174.
- Tamrakar, S., Haluska, A., Haas, C. & Bartrand, T. (2011). Dose-response model of *Coxiella burnetii* (Q fever). *Risk Anal.* ; **31**, 120–128.
- Tansho, S., Abe, S., Ishibashi, H., Torii, S., Otani, H., Ono, Y. & Yamaguchi, H. (2006). Efficacy of intravenous itraconazole against invasive pulmonary aspergillosis in neutropenic mice. *J. Infect. Chemother.* ; **12**, 355–362.
- Tarkington, B., Wu, R., Sun, W., Nikula, K., Wilson, D. & Last, J. (1994). *In vitro* exposure of tracheobronchial epithelial cells and of tracheal explants to ozone. *Toxicology* ; **88**, 51–68.
- Templeton, S., Buskirk, A., Green, B., Beezhold, D. & Schmechel, D. (2010). Murine models of airway fungal exposure and allergic sensitization. *Med. Mycol.* ; **48**, 217–228.
- Teske, S., Huang, Y., Tamrakar, S., Bartrand, T., Weir, M. & Haas, C. (2011). Animal and human dose-response models for *Brucella* species. *Risk Anal.* ; **31**, 1576–1596.
- Teunis, P. & Havelaar, A. (2000). The beta-Poisson dose-response model is not a single-hit model. *Risk Analysis* ; **20**, 513–520.
- Teunis, P., van der Heijden, O., van der Giessen, J. & Havelaar, A. (1996). The dose-response relation in human volunteers for gastro-intestinal pathogens. *RIVM* ; 87 pp.
- Thom, C. & Church, M. (1926). "The *Aspergilli*". *Williams and Wilkins* ; Baltimore.
- Tolman, J., Wiederhold, N., McConville, J., Najvar, L., Bocanegra, R., Peters, J., Coalson, J., Graybill, J., Patterson, T. & Williams, R. r. (2009). Inhaled voriconazole for prevention of invasive pulmonary aspergillosis. *Antimicrob. Agents Chemother.* ; **53**, 2613–2615.
- Vadnerkar, A., Clancy, C., Celik, U., Yousem, S., Mitsani, D., Toyoda, Y., Nguyen, M., Kwak, E., Pilewski, J., Silveira, F., Crespo, M. & Nguyen, M. (2010). Impact of mold infections in explanted lungs on outcomes of lung transplantation. *Transplantation* ; **89**, 253–260.
- Vallor, A., Kirkpatrick, W., Najvar, L., Bocanegra, R., Kinney, M., Fothergil, I. A., Herrera, M., Wickes, B., Graybill, J. & Patterson, T. (2008). Assessment of *Aspergillus fumigatus* burden in pulmonary tissue of guinea pigs by quantitative PCR, galactomannan enzyme immunoassay, and quantitative culture. *Antimicrobiol. Agents Chemother.* ; **52**, 2593–2598.
- van de Sande, W., van Vianen, W., ten Kate, M., Vissers, J., Laurijsens, J., Tavakol, M., Rijnders, B., Mathot, R. & Bakker-Woudenberg, I. (2008). Caspofungin prolongs survival of transiently neutropenic rats with advanced-stage invasive pulmonary aspergillosis. *Antimicrob. Agents Chemother.* ; **52**, 1345–1350.

- Vesper, S., Haugland, R., Rogers, M. & Neely, A. (2007a). Opportunistic *Aspergillus* pathogens measured in home and hospital tap water by quantitative PCR (QPCR). *J. Water Health.* ; **5**, 427–431.
- Vesper, S., McKinstry, C., Haugland, R., Wymer, L., Ashley, P., Cox, D., DeWalt, G. & Friedman, W. (2007b). Development of an environmental relative moldiness index for homes in the U.S. *J. Occup. and Environ. Med.* ; **49**, 829–833.
- Voisin, C., Aerts, C., Tonnel, A., Houdret, J. & Ramon, P. (1975). Mise en survie en phase gazeuse et reconstitution *in vitro* du microenvironnement naturel des macrophages alvéolaires. *Pathol. Biol.* ; **23**, 453–459.
- Vonberg, R. & Gastmeier, P. (2006). Nosocomial aspergillosis in outbreak settings. *J. Hosp. Infect.* ; **63**, 246–254.
- Wanqing, L., Hai, W., Yuchong, C., Qian, L., Zhilong, Y., Jianghua, W., Hong, X. & Deqian, X. (2004). The first case of obstructing bronchial aspergillosis caused by *Aspergillus sydowi*. *Int. J. Infect. Dis.* ; **8**, 132–133.
- Warris, A., Gaustad, P., Meis, J., Voss, A., Verweij, P. & Abrahamsen, T. (2001). Recovery of filamentous fungi from water in a paediatric bone marrow transplantation unit. *J. Hosp. Infect.* ; **47**, 143–148.
- Wasylnka, J. & Moore, M. (2003). *Aspergillus fumigatus* conidia survive and germinate in acidic organelles of A549 epithelial cells. *J. Cell Sci.* ; **116**, 1579–1587.
- Watanabe, T., Bartrand, T., Weir, M., Omura, T. & Haas, C. (2010). Development of a dose-response model for SARS coronavirus. *Risk Anal.* ; **30**, 1129–1138.
- Weigt, S., Elashoff, R., Huang, C., Ardehali, A., Gregson, A., Kubak, B., Fishbein, M., Saggarr, R., Keane, M., Saggarr, R., Lynch, J. r., Zisman, D., Ross, D. & Belperio, J. (2009). *Aspergillus* colonization of the lung allograft is a risk factor for bronchiolitis obliterans syndrome. *Am. J. Transplant.* ; **9**, 1903–1911.
- Whitcutt, M., Adler, K. & Wu, R. (1988). A biphasic chamber system for maintaining polarity of differentiation of cultured respiratory tract epithelial cells. *In Vitro Cell Dev. Biol.* ; **24**, 420–428.
- White, T., Bruns, T., Lee, S. & Taylor, J. (1990). Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics, p. 315-322. In M. A. Innis, D. H. Gelfand, J. J. Sninsky, and T. J. White (ed.); Protocols : a guide to methods and applications. Academic Press, San Diego, CA.
- Wiederhold, N., Najvar, L., Vallor, A., Kirkpatrick, W., Bocanegra, R., Molina, D., Olivo, M., Graybill, J. & Patterson, T. (2008). Assessment of serum (1->3)-beta-D-glucan concentration as a measure of disease burden in a murine model of invasive pulmonary aspergillosis. *Antimicrob. Agents Chemother.* ; **52**, 1176–1178.
- Zhang, Z., Kleinstreuer, C. & Kim, C. (2002). Computational analysis of micron-particle deposition in a human triple bifurcation airway model. *Comput. Methods Biomech. Biomed. Engin.* ; **5**, 135–147.
- Zhang, Z., Liu, R., Noordhoek, J. & Kauffman, H. (2005). Interaction of airway epithelial cells (A549) with spores and mycelium of *Aspergillus fumigatus*. *J. Infect.* ; **51**, 375–382.



# **ANNEXES**



# **A1. Cahier d'observation de l'étude Transplant'Air**







## Résumé du protocole d'étude : Contamination fongique environnementale et risque aspergillaire chez les patients transplantés pulmonaires

### Investigateurs

#### Hôpital et faculté Bichat- Claude Bernard

- Service de pneumologie: O. Brugière, H. Mal
- UHLIN: C. Bonnal, W-Guerinot, J.C. Lucet.
- Service de réanimation : P. Montravers, M. Wolff
- Laboratoire de parasitologie-mycologie (Hôpital) : S. Houzé, C. Chochillon
- Laboratoire de parasitologie-mycologie, EA 3520 (Faculté Bichat) : C. Leleu (Thèse, EHESP 2009-2012), A. Labib, J. Menotti, F. Derouin

#### Hôpital Saint-Louis

- Département de biostatistique et informatique médicales (R. Porcher)

### Rappel de la situation

Chez les patients transplantés pulmonaires, la fréquence de la colonisation de l'arbre respiratoire par *Aspergillus* est de 30 à 40%, surtout dans les 6 premiers mois post-transplantation. La colonisation, associée ou non à une infection se traduit par une augmentation de la morbi/mortalité à 5 et 10 ans chez ces patients. Cette fréquence pose la question du risque de contamination en cours d'hospitalisation.

En hématologie, la relation entre la contamination fongique environnementale et l'incidence de l'aspergillose invasive a été montrée dans 2 études réalisées à l'hôpital Saint-Louis (Alberti 2001, Menotti 2010) mais cette relation n'a pas été retrouvée par d'autres équipes n'ayant effectué qu'un suivi de l'aérocontamination. A notre connaissance, aucune étude prospective et longitudinale n'a été réalisée en transplantation pulmonaire.

### Objectifs

Dans le but de préciser le risque nosocomial d'infection fongique par des champignons filamenteux chez les transplantés pulmonaires, notre *objectif principal* est de caractériser la relation entre contamination fongique de l'environnement hospitalier et l'incidence des cas de colonisation ou d'infection aspergillaire chez les transplantés pulmonaires hospitalisés à l'hôpital Bichat- Cl. Bernard.

Les *objectifs secondaires* sont

- d'évaluer la performance des marqueurs sériques pour le diagnostic des colonisation/infection fongiques
- définir les mesures de prévention permettant de réduire l'exposition des patients

### Protocole d'étude (mai 2010 – mai 2012)

L'étude consiste en un suivi *prospectif* de tous les patients transplantés pulmonaires hospitalisés, depuis le jour de l'intervention jusqu'à la fin de leur hospitalisation. Ce suivi comporte :

- *un volet environnemental* : recherche d'une contamination fongique par des prélèvements hebdomadaires (air et surfaces) dans la chambre *du patient* (en suivant ses lieux d'hospitalisation) et dans son environnement proche (poste de soin et couloir du service).
- *un volet bio-clinique* : recherche hebdomadaire de la colonisation/infection par *Aspergillus* et autres champignons filamenteux sur des prélèvements bronchiques (expectoration, aspiration bronchique et lavage bronchique ou alvéolaire) par culture, en associant des dosages de marqueurs d'origine fongique (galactomannane,  $\beta$ -glucanes).

### Analyse des résultats

Les données seront recueillies chaque semaine et seront traitées par deux approches :

- une analyse descriptive : étude de l'incidence des cas de colonisation et d'infection fongique, de la cinétique d'évolution des taux de galactomannane et de  $\beta$ -glucane, et de la nature et la variation de la contamination fongique environnementale ;
- une analyse statistique quantitative, comportant la comparaison des relations entre contamination environnementale/contamination du patient et l'incidence des cas d'aspergillose, et l'analyse de la performance de la culture mycologique et des biomarqueurs de l'infection).



PréG

## Données pré-greffe

### Maladie sous-jacente

Emphysème	<input type="checkbox"/>	Fibrose pulmonaire	<input type="checkbox"/>
Mucoviscidose	<input type="checkbox"/>	DDB	<input type="checkbox"/>
Tumeur pulmonaire	<input type="checkbox"/>	Alpha-1-antitrypsinase	<input type="checkbox"/>
BPCO	<input type="checkbox"/>	Autre : .....	

### Autres antécédents

Fumeur :  Oui  Non      Diabète :  Oui  Non  
 → Nombre de PA :

## Bilan infectieux pré-greffe

Date : |\_|\_|\_|\_| / |\_|\_|\_|\_| / |\_|\_|\_|\_|      Non fait :

### Mycologie

Prélèvement broncho-pulmonaire :      Date : |\_|\_|\_|\_| / |\_|\_|\_|\_| / |\_|\_|\_|\_|

→ Nature du prélèvement :      Non fait :

Examen direct :      Négatif       Positif

Culture :      Négative       Positive

→ *Aspergillus sp*  .....

→ *Candida sp*  .....

→ Autre : .....

Antigène aspergillaire :      Date : |\_|\_|\_|\_| / |\_|\_|\_|\_| / |\_|\_|\_|\_|

→ Négatif       Positif       Non fait :

→ Taux :

Anticorps aspergillus :      Date : |\_|\_|\_|\_| / |\_|\_|\_|\_| / |\_|\_|\_|\_|

→ Négatif       Positif       Non fait :

### Bactériologie

Infection bactérienne documentée    OUI  .....      NON

### Virologie

Serologie CMV : → Donneur : Positif       Négatif       Inconnue

→ Receveur : Positif       Négatif       Inconnue

### Traitement

Antifongique :      OUI  .....      NON

# Greffe

JO

Date : |\_|\_|\_|/|\_|\_|\_|/|\_|\_|\_|

## Caractéristiques

### Type de transplantation :

Greffe mono-pulmonaire  Bi-pulmonaire  Greffe cœur-poumon Programmée  en urgence 

Durée : |\_|\_|\_| minutes

### Antécédents de transplantation :

1ère greffe ? Oui  Non 

Si non, date de la première greffe |\_|\_|\_|/|\_|\_|\_|/|\_|\_|\_|

Type de greffe Mono  Bi  Autre 

## Prophylaxie

### Antibiotique :

 Oui  ..... Non 

### Antifongique :

 Oui  Non 
Posaconazole  Voriconazole  Caspofongine  Autre : .....

## Traitements immunosuppresseurs

Cyclosporine Oui  Non Corticoïde Oui  Non Tacrolimus/Sirolimus Oui  Non 


---

## Données mycologiques sur le donneur

Exposer en clair :

## Prélèvement mycologique du greffon

Date : |\_|\_|\_|/|\_|\_|\_|/|\_|\_|\_| Non fait 

Résultats

S

Du

au

.

Traitements

Date du relevé |\_|\_|\_| / |\_|\_|\_| / |\_|\_|\_|

**Antifongique**

Voriconazole / Vfend

Depuis le :

Fluconazole / Triflucan

Depuis le :

**Aucun**

Posaconazole / Noxafil

Depuis le :

Caspofongine / Cancidas

Depuis le :

Amphotericine B / Fungizone

Depuis le :

Idraconazole / Sporanox

Depuis le :

**Immunosuppresseur**

Neoral / Ciclosporine

Depuis le :

Tacrolimus / Prograf

Depuis le :

Corticoïde Bolus

Le :

**Antibiotique**

Oui

Non

Tazociline

Depuis le :

**Ventilation mécanique**

Oui

Non

Date d'extubation :

Environnement

Date du relevé : |\_|\_|\_| / |\_|\_|\_| / |\_|\_|\_|

**Environnement général de la chambre**Service : Réa chir grande Réa chir petite Post-réa Pneumo 

N° de la chambre : |\_|\_|\_|

Plasmair™ : OUI  NON 

Depuis le : |\_|\_|\_| / |\_|\_|\_| / |\_|\_|\_|

Porte : Ouverte  Fermée Chambre : A air traité  Conventionnelle Travaux : Dans le service  A l'étage 

→ Préciser :

Remarques lors du prélèvement :



**Titre :** Evaluation du risque lié à l'exposition aérienne à *Aspergillus fumigatus*

### Résumé

*Aspergillus fumigatus* est un champignon filamenteux pathogène responsable de différentes formes d'infections pulmonaires allergiques sur les sujets immunocompétents et d'infections invasives chez les patients neutropéniques. L'inhalation de spores est le mode habituel de contamination suggérant un rôle majeur de l'environnement dans l'épidémiologie de l'aspergillose. Cependant, la relation entre les concentrations d'*Aspergillus* dans l'air et la probabilité d'infections ne sont pas connues.

Dans cette étude, trois approches complémentaires ont été proposées pour analyser cette relation.

*In vitro*, nous avons utilisé un dispositif de culture en interface air-liquide pour analyser les conséquences de l'exposition de cellules pulmonaires A549 à différentes concentrations de spores d'*Aspergillus fumigatus*. Aucun effet significatif sur la production de cytokines pro-inflammatoires n'a été retrouvé suite à cette exposition, même lorsque cette exposition aspergillaire était combinée avec une exposition au formaldéhyde.

*In vivo*, la relation entre l'exposition à des spores d'*Aspergillus* et la survenue d'une infection a été étudiée dans un modèle murin d'aspergillose invasive en utilisant la souche de référence Af293 d'*Aspergillus fumigatus*. Dans une approche bayésienne la relation dose-infection entre probabilité d'infection et exposition aux spores a été estimée en utilisant le modèle exponentiel et le modèle plus flexible bêta-Poisson. Ceci a permis d'estimer la dose infectieuse 50 à  $1,8-1,9 \cdot 10^4$  spores inhalées viables. Secondairement, ce modèle a été utilisé pour mettre au point un nouveau modèle de réactivation d'aspergillose et étudier l'efficacité de l'amphotéricine B liposomale dans la prophylaxie de l'aspergillose invasive.

Chez l'homme, nous avons tenté d'estimer la relation entre l'exposition environnementale aux spores fongiques et l'incidence de la colonisation ou de l'infection aspergillaire chez 44 transplantés pulmonaires étudiée de façon consécutive. À l'aide d'un modèle de régression par GEE, nous avons trouvé une relation significative entre la contamination des surfaces par *Aspergillus* et l'incidence de la colonisation. De plus, nous avons montré des identités génotypiques entre les isolats cliniques et environnementaux d'*Aspergillus*, ce qui confirme les risques d'acquisition d'*Aspergillus* dans le cadre hospitalier.

Globalement, ces résultats apportent des données nouvelles sur la relation entre la contamination environnementale et la probabilité d'aspergillose chez les patients immunodéprimés.

**Mots-clés :** *Aspergillus*, Aspergillose invasive, Modèle animal, Statistique bayésienne, Infection nosocomiale

---

**Title :** Risk assessment of airborne exposure to *Aspergillus fumigatus*

### Abstract

*Aspergillus fumigatus* is an opportunistic fungal pathogen responsible for various respiratory diseases in normal hosts and severe invasive infections in neutropenic patients. Spore inhalation is the usual route of *Aspergillus* infection, suggesting a determining role of environmental contamination in the epidemiology of aspergillosis. However the relationship between *Aspergillus* concentration in the air and probability of infection is not quantitatively known. In this study, three different approaches were proposed to analyse this relationship.

*In vitro* we used an air-liquid interface module to expose pulmonary A549 cells to high concentrations of *A. fumigatus* spores, but found no effect of exposure on the production of pro-inflammatory cytokines, even when exposure was combined with exposure to formaldehyde.

*In vivo*, the relationship between spore exposure and infection was examined in a murine model of invasive aspergillosis, using the reference Af293 strain of *A. fumigatus*. In a Bayesian approach, the dose-response relationship between the probability of infection and spore exposure was approximated using the exponential model and the more flexible beta-Poisson model. It allowed estimating the median infective dose at  $1.8-1.9 \times 10^4$  inhaled viable spores. Further, this model was used to develop a unique model of reactivating aspergillosis and then to examine the efficacy of liposomal amphotericin B on prophylaxis of aspergillosis.

In human, we attempted to estimate the relationship between environmental exposure to fungal spores and the incidence of *Aspergillus* colonization or infection in 44 consecutive lung transplant recipients. In a GEE multivariate analysis, we found a significant relationship between surface contamination by *Aspergillus* and the incidence of colonization. Furthermore, we found genotypic similarities between clinical and environmental isolates of *Aspergillus*, which confirm the risk of acquisition of *Aspergillus* in the hospital setting.

Altogether, this result provides new insights into the relationship between airborne exposure and probability of aspergillosis in immunocompromised hosts.

**Key-words :** *Aspergillus*, Invasive aspergillosis, Animal model, Bayesian statistic, Nosocomial infection