

UNIVERSITE DE LIEGE
Faculté de Médecine
Service de Microbiologie Médicale
Professeur P. De Mol

Apport de la réaction
de polymérisation en chaîne
dans le diagnostic de l'aspergillose invasive

Marie-Pierre Hayette

Thèse présentée en vue de l'obtention du grade
de Docteur en Sciences Biomédicales
Année académique 2001-2002

Promoteur Professeur P. De Mol

REMERCIEMENTS

Je tiens à remercier tout d'abord Monsieur le Professeur P. De Mol, promoteur de ce travail, qui m'a permis d'entreprendre un travail dans le domaine de la mycologie. Je lui exprime toute ma reconnaissance pour son soutien et ses encouragements, ses conseils judicieux, sa disponibilité sans faille et sa patience infinie dans la relecture critique de toutes ces pages.

Mes remerciements s'adressent également à tous ceux qui ont collaboré de près ou de loin à la réalisation de ce travail.

Tout d'abord à Dolorès Vaira, qui m'a fait bénéficier à maintes reprises de sa grande expérience dans le domaine de la biologie moléculaire. J'ai pu apprécier sa simplicité et sa disponibilité constantes.

Je remercie toute l'équipe vétérinaire et tout d'abord le Docteur Marcq, pour ses compétences et sa bonne humeur.

Je tiens à remercier tout particulièrement Luc Duwez, dont la gentillesse, le savoir-faire et l'esprit d'ouverture ont éclairé les semaines passées près des lapins et sans lequel la partie expérimentale n'aurait pu avoir lieu.

Mes remerciements vont ensuite à Fabrice Suzin, pour son dévouement, ses week-ends passés au laboratoire, son soutien constant et son « savoir-faire moléculaire ».

Je tiens également à remercier mes collègues, Pierrette Melin et Geneviève Christiaens, qui m'ont permis de terminer ce travail en me déchargeant souvent de la routine du laboratoire. Qu'elles en soient remerciées chaleureusement.

Je remercie tout le personnel du laboratoire de microbiologie, pour leur aide, leurs conseils et leur soutien amical.

Enfin, je tiens à marquer toute ma reconnaissance à ma famille. D'abord à mes parents toujours curieux de me voir aboutir. Je remercie Paul, mon mari, pour sa patience et son esprit de motivation. Je remercie mes enfants, Pierre-Jean-Rémi, Jean-Emmanuel, Louis-Michel et Yves-Alexandre, pour les heures passées à attendre Maman en compagnie de « baby-sitters » diverses et variées !

LISTE DES ABBREVIATIONS

Acn : aspergillose chronique nécrosante	Vor : voriconazole
ADN : acide désoxyribonucléique	VZV : virus varicella zoster
Alpp : alcaline protéase	TIFI : Trends of invasive fungal infection
AmB : amphotericine B	
API : aspergillose pulmonaire invasive	
AI : aspergillose invasive	
CDC : center for disease control	
CMI : concentration minimale inhibitrice	
Cy A : cyclosporine A	
CMV : cytomégalovirus	
D.O. densité optique	
ELISA :enzyme linked immunosorbent assay	
EORTC : european organization for research and treatment of cancer	
FDA: food and drug administration	
GM : galactomannane	
HSV : virus herpes simplex	
Il : interleukine	
Itra : itraconazole	
LBA: lavage broncho-alvéolaire	
Mepp : métalloprotéase	
µl : microlitre	
ml : millilitre	
MRGH : maladie du rejet du greffon contre l'hôte	
NFS : numération formule sanguine	
PAS : acide périodique de Schiff	
PCR : réaction de polymérisation en chaîne	
RNA : acide ribonucléique	
SIDA : syndrome d'immunodéficience humaine	
Sp. : species	
Th : lymphocyte T helper	

TABLE DES MATIERES

LISTES ABBREVIATIONS	1
TABLE DES MATIERES.....	2
1. CHAPITRE I. GENERALITES	9
1.1. PLACE D'ASPERGILLUS SP. DANS LA SYSTÉMATIQUE.....	9
1.2. DESCRIPTION DU GENRE ASPERGILLUS.....	10
1.2.1. Aspect morphologique.	11
1.2.1.1. Caractères macroscopiques : aspect des colonies.	11
1.2.1.2. Caractères microscopiques.	11
1.2.1.2.1. Description de la forme asexuée.	12
1.2.1.2.2. Description de la forme sexuée.	14
1.2.2. Structure cellulaire.....	14
1.2.2.1. Membrane plasmique.	14
1.2.2.2. Paroi.....	14
1.2.2.3. Extension des hyphes.	15
1.2.3. Classification.....	16
1.3. EPIDÉMIOLOGIE.	16
1.3.1. Habitat naturel.	16
1.3.2. Modes de contamination.....	17
1.3.2.1. Contamination aérienne.....	17
1.3.2.1.1. Contamination dans l'environnement.....	17
1.3.2.1.2. Sources de contamination en milieu hospitalier.....	17
1.3.2.2. Autres voies et/sources de contamination.	19
1.3.2.3. Inoculum et temps d'incubation.....	19
1.3.3. Polymorphisme génétique d'<i>A. fumigatus</i>.....	20
1.3.4. Facteurs de risque pour le développement d'une aspergillose invasive.....	20
1.3.4.1. Transplantation de moelle osseuse.....	21
1.3.4.1.1. Présentation.....	21
1.3.4.1.2. Facteurs prédisposants aux infections.	22
1.3.4.1.3. Séquence des infections.....	23
1.3.4.2. Transplantation d'organe solide.....	24
1.3.4.2.1. Présentation.....	24
1.3.4.2.2. Séquence des infections.....	24
1.3.4.3. Infections aspergillaires au cours du SIDA.	25
1.3.4.3.1. Présentation.....	25
1.4. PATHOGENESE.	26
1.4.1. Facteurs liés au champignon.	26
1.4.1.1. Caractéristiques propres au champignon.....	26

1.4.1.2.	Facteurs de virulence.....	27
1.4.1.2.1.	Adhésines.....	28
1.4.1.2.2.	Pigments.....	28
1.4.1.2.3.	Molécules toxiques.....	29
1.4.1.2.4.	Enzymes.....	29
1.4.2.	Facteurs liés à l'hôte.....	31
1.4.2.1.	Défenses naturelles.....	31
1.4.2.1.1.	Barrières anatomiques.....	31
1.4.2.1.2.	Cellules phagocytaires.....	31
	*Macrophages.....	32
	*Polynucléaires neutrophiles.....	32
1.4.2.1.3.	Plaquettes.....	33
1.4.2.1.4.	Composants humoraux.....	33
1.4.2.2.	Immunité acquise.....	34
1.4.2.2.1.	Immunité cellulaire lymphocytaire T.....	34
1.4.2.2.2.	Immunité protectrice.....	34
1.4.3.	Mécanisme d'action des molécules immunosuppressives.....	35
1.4.3.1.	Médicaments.....	35
1.4.3.1.1.	Corticoïdes.....	35
1.4.3.1.2.	Cyclosporine A.....	35
1.5.	MANIFESTATIONS CLINIQUES DES FORMES PROFONDES.....	35
1.5.1.	Aspergillose pulmonaire invasive.....	36
1.5.1.1.	Broncho-pneumonie aspergillaire.....	37
1.5.1.2.	Trachéo-bronchite nécrosante.....	40
1.5.1.3.	Sinusite aspergillaire invasive.....	41
1.5.1.4.	Aspergillose pulmonaire chronique nécrosante.....	43
1.5.2.	Aspergillose disséminée.....	44
1.5.2.1.	Aspergillose généralisée.....	44
1.5.2.2.	Aspergillose cérébrale.....	45
1.5.2.3.	Aspergillose digestive.....	46
1.6.	DIAGNOSTIC BIOLOGIQUE DES ASPERGILLOSES INVASIVES.....	46
1.6.1.	Paramètres biologiques.....	46
1.6.2.	Diagnostic mycologique.....	47
1.6.2.1.	Limites.....	47
1.6.2.2.	Nature du prélèvement.....	47
1.6.2.2.1.	Prélèvements broncho-pulmonaires.....	47
1.6.2.2.2.	Prélèvements extra-pulmonaires.....	49
1.6.2.3.	Mise en culture.....	49
1.6.2.3.1.	Examen microscopique.....	49
1.6.2.3.2.	Culture.....	50
1.6.2.3.3.	Antifongigrammes.....	51
1.6.3.	Diagnostic histologique.....	51
1.6.4.	Diagnostic sérologique.....	52
1.6.4.1.	Détection d'antigènes circulants.....	52
1.6.4.1.1.	Galactomannane.....	52
1.6.4.1.2.	β 1-3 glucan.....	54
1.6.4.2.	Détection d'anticorps.....	54

1.6.5.	Biologie moléculaire.....	56
1.6.5.1.	Introduction.....	56
1.6.5.2.	Généralités sur la PCR.....	56
1.6.5.2.1.	Définition.....	56
1.6.5.2.2.	Historique de la PCR.....	56
1.6.5.2.3.	Amplification de l'ADN par PCR.....	57
1.6.5.2.4.	Les applications de la PCR.....	59
1.6.5.3.	PCR <i>Aspergillus sp.</i>	60
1.6.5.3.1.	Lavages broncho-alvéolaires.....	60
1.6.5.3.2.	Sang périphérique.....	60
1.6.6.	Schéma décisionnel dans le diagnostic des API.....	61
1.7.	PRÉVENTION.....	62
1.7.1.	Prévention chez les greffés de moelle osseuse.....	62
1.7.2.	Prévention chez les transplantés d'organe solide.....	63
1.8.	TRAITEMENT DES ASPERGILLOSES INVASIVES.....	63
1.8.1.	Introduction.....	63
1.8.2.	Amphotéricine B.....	64
1.8.2.1.	Description de la molécule.....	64
1.8.2.2.	Formulations lipidiques d'AmB.....	65
1.8.3.	Itraconazole.....	66
1.8.4.	Choix de l'agent antifongique : synthèse.....	67
1.8.5.	Nouvelles molécules.....	68
1.8.5.1.	Triazolés de seconde génération.....	68
1.8.5.1.1.	Voriconazole.....	68
1.8.5.1.2.	Posaconazole (SCH 56592, SCH59884).....	69
1.8.5.1.3.	Lipopeptides : échinocandines, pneumocandines et dérivés.....	69
1.9.	BUTS DU TRAVAIL.....	70
2.	CHAPITRE II. MISE AU POINT D'UNE TECHNIQUE PCR POUR LA DETECTION D'ADN D'<i>A. FUMIGATUS</i>. EVALUATION SUR LAVAGES BRONCHOALVEOLAIRES. 71	
2.1.	INTRODUCTION.....	71
2.1.1.	Choix de la cible.....	71
2.1.2.	PCR nichée : choix des amorces.....	72
2.2.	MATÉRIEL ET MÉTHODES.....	72
2.2.1.	Cultures fongiques.....	72
2.2.2.	Patients.....	72
2.2.2.1.	Classification des patients selon la co-morbidité.....	73
2.2.2.2.	Classification des patients selon le risque aspergillaire.....	73
2.2.3.	Lavages broncho-alvéolaires.....	74
2.2.4.	Protocole d'extraction de l'ADN.....	74
2.2.4.1.	Organisation des « locaux PCR ».....	74
2.2.4.2.	Extraction de l'ADN génomique des champignons.....	76
2.2.4.3.	Extraction de l'ADN à partir des lavages bronchoalvéolaires.....	77
2.2.4.4.	Dosage de l'ADN extrait.....	77

2.2.5.	Amplification de l'ADN par PCR.....	78
2.2.5.1.	Paramètres de la PCR nichée.....	78
2.2.5.1.1.	Préparation du mix.....	78
2.2.5.1.2.	Cycles d'amplification.....	80
2.2.6.	Amplification du gène de la bêta-globine.....	80
2.2.6.1.	Paramètres de la PCR.....	81
2.2.6.1.1.	Préparation du mix:.....	81
2.2.6.1.2.	Cycles d'amplification.....	81
2.2.6.2.	Détection des produits de PCR.....	82
2.2.6.2.1.	Gel d'agarose.....	82
2.2.6.2.2.	Paramètres de l'électrophorèse.....	82
2.2.6.2.3.	Révélation après électrophorèse.....	82
2.3.	RESULTATS.....	83
2.3.1.	Dosage de l'ADN extrait d'<i>A. fumigatus</i>.....	83
2.3.2.	Contrôle des paramètres de la 1^{ère} étape de la PCR nichée.....	83
2.3.2.1.	Température d'hybridation des amorces.....	83
2.3.2.2.	Concentration en MgCl ₂	83
2.3.3.	Détermination des paramètres de la deuxième étape de la PCR nichée.....	83
2.3.3.1.	Température d'hybridation des amorces.....	84
2.3.3.2.	Concentration en MgCl ₂	84
2.3.3.3.	Nombre de cycles d'amplification.....	84
2.3.4.	Sensibilité de la PCR.....	84
2.3.5.	Spécificité de la PCR.....	84
2.3.6.	Evaluation de la PCR sur les lavages bronchoalvéolaires.....	85
2.3.6.1.	Résultats de la PCR pour les groupes A, B et C.....	85
2.3.6.2.	Caractéristiques histologiques des aspergilloses pulmonaires invasives (Groupe A). 85	
2.3.6.3.	Résultats des cultures bactérienne, fongique et virale des lavages bronchoalvéolaires.....	86
2.3.6.4.	Sensibilité, spécificité et valeurs prédictives.....	86
2.4.	DISCUSSION.....	88
3.	CHAPITRE III. EVALUATION DE LA DETECTION PAR PCR D'ADN D'ASPERGILLUS SP. SUR MODELE EXPERIMENTAL D'ASPERGILLOSE INVASIVE.	91
3.1.	INTRODUCTION.....	91
3.1.1.	Choix de l'animal d'expérience.....	91
3.1.2.	Choix de la cible.....	91
3.1.3.	Choix des amorces.....	92
3.2.	MATERIEL ET METHODES.....	92
3.2.1.	Description du modèle expérimental.....	92
3.2.1.1.	Caractéristiques des lapins.....	92
3.2.1.2.	Protocole d'immunodépression des lapins.....	93
3.2.1.3.	Protocole d'injection des spores d' <i>Aspergillus fumigatus</i>	94
3.2.1.3.1.	Culture d' <i>Aspergillus fumigatus</i>	94
3.2.1.3.2.	Suspension de spores.....	94

3.2.1.3.3.	Injection intra-trachéale des spores.	95
3.2.1.4.	Protocoles d'anesthésie.	95
3.2.1.4.1.	Anesthésie générale.	95
3.2.1.4.2.	Anesthésie gazeuse.	95
3.2.1.4.3.	Euthanasie.	95
3.2.2.	Prélèvements de sang et analyses réalisées.	96
3.2.2.1.	Prélèvements de sang.	96
3.2.2.2.	Traitement des tubes de sang.	96
3.2.2.3.	Numération et formule sanguine (NFS).	97
3.2.2.4.	Antigène galactomannane.	97
3.2.2.5.	Echantillons pour analyse en PCR.	97
3.2.3.	Prélèvements et analyses des organes.	98
3.2.3.1.	Analyse histopathologique.	98
3.2.3.2.	Culture fongique.	98
3.2.4.	Extraction de l'ADN à partir de suspension de spores	98
d'<i>A. fumigatus</i>.	98
3.2.4.1.	Suspension de spores.	98
3.2.4.2.	Protocoles d'extraction.	99
3.2.4.2.1.	Extraction selon le protocole décrit par Yamakami et coll.	99
3.2.4.2.2.	Extraction utilisant les colonnes Qiagen®	99
3.2.4.2.3.	Extraction utilisant le kit Amplicor® sang total.	99
3.2.4.2.4.	Extraction utilisant le Tripure®.	99
3.2.5.	Extraction de l'ADN d'<i>Aspergillus sp.</i> à partir du sang total.	100
3.2.5.1.	Lyse des globules rouges.	100
3.2.5.2.	Extraction de l'ADN à partir du culot cellulaire.	100
3.2.6.	Amplification de l'ADN par PCR.	101
3.2.6.1.	Conditions de la PCR.	101
3.2.7.	Amplification du gène de la bêta-globine.	103
3.2.7.1.	Détection des produits de PCR.	103
3.3.	RESULTATS.	104
3.3.1.	Contrôle des paramètres de la PCR.	104
3.3.1.1.	Température d'hybridation des amorces.	104
3.3.1.2.	Concentration en MgCl ₂	104
3.3.1.3.	Nombre de cycles.	104
3.3.2.	Sensibilité de la PCR.	104
3.3.3.	Spécificité de la PCR.	105
3.3.4.	Comparaison des protocoles d'extraction.	105
3.3.5.	Paramètres biologiques.	106
3.3.5.1.	Eléments figurés.	106
3.3.5.2.	Survie.	108
3.3.5.3.	Histologie et culture fongique des organes.	109
3.3.6.	Résultats de l'antigène galactomannane.	110
3.3.7.	Résultats de la PCR.	111
3.3.7.1.	Résultats sous forme de tableau comparatif PCR/GM.	111
3.3.7.2.	Comparaison des résultats PCR versus Galactomannane	112
3.3.7.3.	Représentation graphique des résultats PCR versus GM.	113
3.3.7.4.	Représentation graphique des résultats cumulés PCR versus GM.	114
3.3.7.5.	Délai moyen de positivité de la PCR par rapport au GM.	114

3.3.7.6.	Précocité de la positivité de la PCR et du galactomannane.....	115
3.4.	DISCUSSION.	116
4.	CHAPITRE IV. LA RESISTANCE AUX ANTIFONGIQUES EST-ELLE MARQUEUR DE PATHOGENICITE ?	121
4.1.	INTRODUCTION.....	121
4.2.	MATERIEL ET METHODES	121
4.2.1.	Souches d' <i>Aspergillus fumigatus</i> : origines.	121
4.2.2.	Culture des souches d' <i>A. fumigatus</i>	121
4.2.3.	NCCLS M38-P.....	122
4.2.3.1.	Milieu de culture.	122
4.2.3.2.	Antifongiques.....	122
4.2.3.3.	Méthodologie.	123
4.2.3.3.1.	Préparation des solutions stock d'antifongiques.	123
4.2.3.3.2.	Préparation des solutions de travail d'antifongiques.....	123
4.2.3.3.3.	Préparation des suspensions fongiques.....	123
4.2.3.3.4.	Préparation des microplaques.	123
4.2.3.4.	Incubation des microplaques.	124
4.2.3.5.	Détermination des concentrations minimales inhibitrices (CMI).	124
4.2.3.5.1.	Lecture visuelle.	124
4.2.3.5.2.	Lecture spectrophotométrique.....	125
4.2.4.	Etude statistique.	125
4.3.	RESULTATS.....	126
4.3.1.	Moyenne des CMI.	126
4.3.2.	CMI ₉₀	126
4.3.3.	Moyenne géométrique des CMI en fonction de l'origine des isolats.	127
4.3.4.	Moyenne des CMI obtenues pour les souches témoins.	128
4.3.5.	Souches résistantes mises en évidence.	128
4.4.	DISCUSSION.	130
5.	CONCLUSION GENERALE	134
6.	BIBLIOGRAPHIE	136

ANNEXES

ANNEXE 1 : VALEURS DES CMI DES 4 ANTIFONGIQUES VIS A VIS DES 106 SOUCHES D' <i>ASPERGILLUS FUMIGATUS</i>	153
ANNEXE 2 :LETTRE D'APPROBATION DU COMITE D'ETHIQUE.	154

ANNEXE 3 : ARTICLE PUBLIE DANS UNE REVUE INTERNATIONALE	155
ANNEXE 4 : POSTERS PRESENTES DANS UN CONGRES INTERNATIONAL	156
ANNEXE 5 : FORMULES DE TAMPONS	157
ANNEXE 6 : PROTOCOLES D'EXTRACTION DE L'ADN	161
ANNEXE 7 : MILIEUX DE CULTURE	166
ANNEXE 8 : REPERTOIRE DES TABLEAUX	168
ANNEXE 9 : REPERTOIRE DES FIGURES	172
ANNEXE 10 : REPERTOIRE DES PHOTOS.....	175

CHAPITRE I.

Tableau I.1. Position systématique des champignons d'intérêt médical sur base moléculaire, d'après D.L. Hawkmoth (60).

Phylum	Ordre	Famille	Genre	
Ascomycètes	<i>Dothideales</i>	<i>Lophiostomataceae</i>	<i>Pyrenochaeta</i>	
		<i>Piedraiaceae</i>	<i>Piedraia</i>	
	<i>Eurotiales</i>	<i>Testudinaceae</i>	<i>Neotestudina</i>	
		<i>Trichocomaceae</i>	<i>Aspergillus</i> ←	
			<i>Penicillium</i>	
	<i>Hypocreales</i>	<i>Hypocreaceae</i>	<i>Acremonium</i>	
			<i>Cylindrocarpon</i>	
	<i>Microascales</i>	<i>Microascaceae</i>	<i>Pseudallescheria</i>	
	<i>Onygenales</i>	<i>Arthrodermataceae</i>	<i>Arthroderma</i> (<i>Nannizia</i> ,	
			<i>Microsporium</i> , <i>Epidermophyton</i>	
				<i>Trichophyton</i>)
			<i>Gymnoascaceae</i>	<i>Malbranchea</i>
			<i>Onygenaceae</i>	<i>Emmonsia</i>
				<i>Ajellomyces</i>
				<i>Coccidioides</i>
		<i>Ophiostomatales</i>	<i>Ophiostomataceae</i>	<i>Sporothrix</i>
		<i>Pneumocystidales</i>	<i>Pneumocystidaceae</i>	<i>Pneumocystis</i>
		<i>Saccharomycetales</i>	<i>Endomycetaceae</i>	<i>Endomyces</i> (<i>Geotrichum</i>)
	<i>Blastoschizomyces</i>			
	<i>Saccharomycetaceae</i>		<i>Candida</i>	
<i>Cladophialophora</i>				
<i>Exophiala</i>				
<i>Fonsecaea</i>				
<i>Madurella</i>				
<i>Paracoccidioides</i>				
<i>Phialophora</i>				
<i>Wangiella</i>				
<i>Filobasidiella</i> (<i>Cryptococcus</i>)				
<i>Malassezia</i>				
<i>Trichosporon</i>				
<i>Rhinosporidium</i>				
Basidiomycètes	<i>Sporidiales</i>	<i>Sporidiobolaceae</i>	<i>Pythium</i>	
	<i>Uncertain</i>		<i>Basidiobolus</i>	
Hyphochytriomycètes	<i>Uncertain</i>		<i>Loboa</i>	
Oomycètes	<i>Peronosporales</i>	<i>Pythiaceae</i>	<i>Rhizomucor</i>	
Zygomycètes	<i>Entomophtorales</i>	<i>Basidiobolaceae</i>	<i>Rhizopus</i>	
		<i>Uncertain</i>	<i>Saksenaceae</i>	
	<i>Mucorales</i>	<i>Mucoraceae</i>		

1. CHAPITRE I. GENERALITES

Le genre *Aspergillus* renferme 185 espèces auxquelles l'homme est constamment exposé. Cependant très peu d'espèces sont associées à des maladies puisque trois espèces sont responsables de 95 % des cas d'infection chez l'homme: *A. fumigatus*, *A. flavus* et *A. niger*. Parmi les autres espèces causant des infections humaines on décrit *A. nidulans*, *A. terreus*, *A. orizae*, *A. ustus* et *A. versicolor* (60).

A. fumigatus est l'espèce majoritairement isolée lors d'infections invasives et non-invasives. De plus, c'est le seul agent reconnu responsable des formes allergiques. Par contre les aspergillomes et formes invasives sont aussi causées par *A. flavus* et *A. niger*.

1.1. PLACE D'ASPERGILLUS SP. DANS LA SYSTEMATIQUE.

Les champignons constituent un des 5 règnes des organismes existants selon la classification de Whittaker (175) et Margulis et Schwarz (96). Les 5 règnes sont organisés en trois niveaux :

1. procaryotes (règne des Monères incluant bactéries, actinomycètes et cyano-bactéries)
2. eucaryotes unicellulaires c'est-à-dire les protistes (protozoaires, algues nucléées, oomycètes)
3. eucaryotes (règne des mycètes, règne des animaux et règne des végétaux). Le règne des champignons est subdivisé en 4 phylums ou divisions (Ascomycètes, Basidiomycètes, Chytridiomycètes et Zygomycètes) (Tableau I.1). Les Chytridiomycètes ne renferment pas de champignon d'intérêt médical. Les champignons n'ayant pas de reproduction sexuée connue sont classés parmi les Deutéromycètes.

Le règne des champignons est très vaste: en effet, on dénombre environ 72.000 espèces reconnues pour 4000 bactéries et 4000 virus décrits (60). De très nombreuses espèces sont découvertes chaque année, mais heureusement pour le mycologue médical, elles sont soit associées à des plantes, soit à des insectes ou à d'autres mycètes, soit isolées du sol.

Aspergillus fumigatus

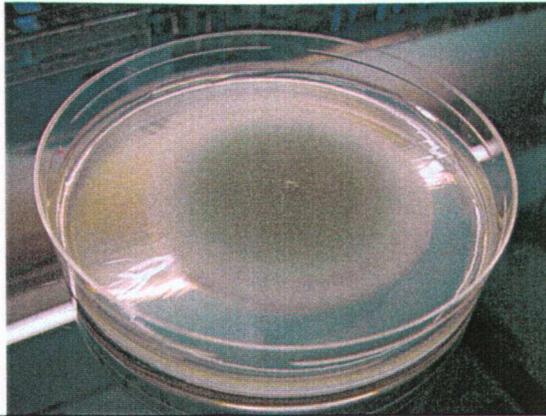


Photo I.1. *A. fumigatus* sur gélose au malt. Culture de 4 jours. Colonie de couleur vert-bleuté. Texture superficielle rase à poudreuse.

Aspergillus flavus

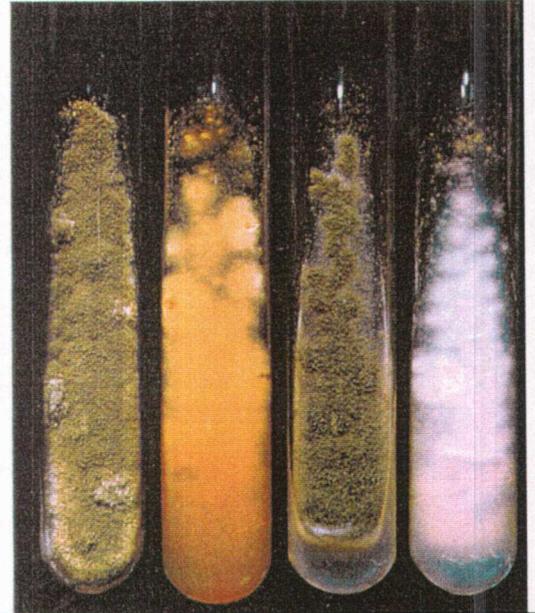


Photo I.3. *A. flavus* sur milieu de Sabouraud à gauche et sur milieu de Czapek à droite. Aspect poudreux et duveteux de couleur vert-jaune.

Aspergillus fumigatus

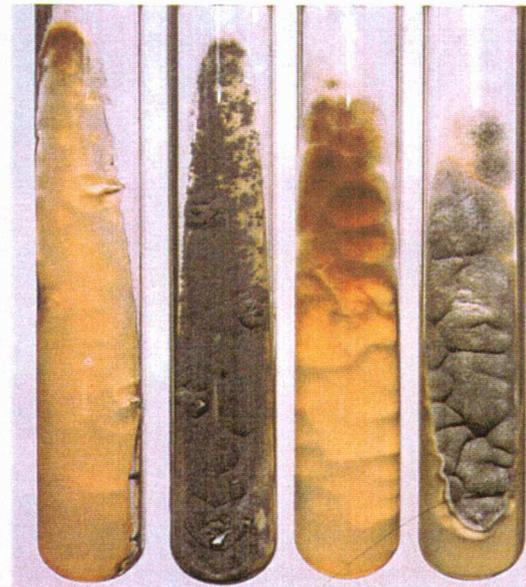


Photo I.2. *A. fumigatus* sur gélose de Sabouraud à gauche et sur milieu de Czapek à droite. Colonie de couleur gris-vert et un revers teinté de rouge. Cette coloration gris vert foncé est caractéristique de l'espèce.

Aspergillus nidulans

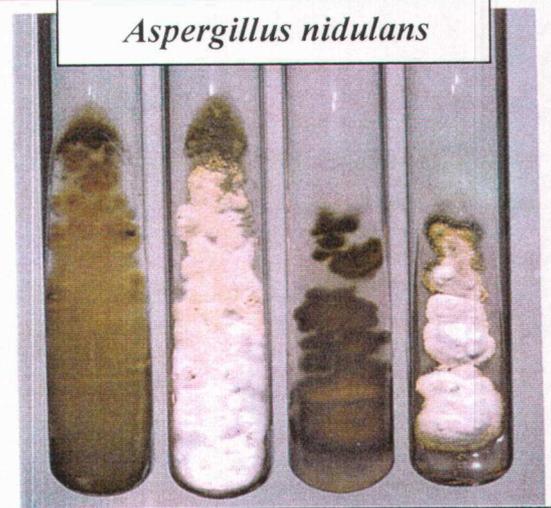


Photo I.4. *A. nidulans* donne une colonie veloutée vert-pré. Les granulations jaunes crème qui apparaissent en périphérie, correspondent aux formes sexuées (cleistothèces).

Parmi les 72.000 espèces décrites, plus de 300 sont désormais reconnues comme vrais pathogènes de l'homme ou des animaux.

Les principaux champignons responsables de mycoses sont responsables 1) de mycoses superficielles, 2) de mycoses profondes et systémiques causées par des champignons filamenteux ou levures opportunistes ou des champignons dimorphiques introduits d'abord au niveau respiratoire 3) de mycoses sous-cutanées ou ostéo-articulaires.

Les *Aspergillus* causent surtout des infections profondes.

1.2. DESCRIPTION DU GENRE *ASPERGILLUS*.

Les champignons du genre *Aspergillus* sont des organismes filamenteux asexués (anamorphes) pour la plupart, se reproduisant par l'intermédiaire de spores que l'on classe dans l'ordre des Deutéromycètes (Champignons imparfaits ou Fungi imperfecti). Cependant, certains d'entre eux ont une reproduction sexuée connue (téléomorphe) par l'intermédiaire d'ascospores comme par exemple *A. nidulans* dont la forme téléomorphe est *Emericella nidulans*. Ceux-ci sont classés parmi les Ascomycètes. Mais, par souci de simplification et pour ne pas créer des genres différents, le nom générique d'*Aspergillus* est utilisé pour toutes les espèces même si une reproduction sexuée est décrite.

Le genre *Aspergillus* a été créé en 1729 par Pier Antonio Micheli (103) et dérive du nom latin « aspergillum » (asperger) en référence au globe perforé utilisé pour répandre l'eau dans les célébrations catholiques. Il est défini actuellement à l'aide de deux caractères essentiels : l'existence d'un stipe ayant une cellule basale et la présence d'une vésicule terminale portant des phialides qui apparaissent simultanément. Ils produisent tous des conidies unicellulaires.

Bien que n'entrant pas dans la définition du genre, on peut ajouter que toutes les espèces pathogènes poussent à 40°C.

A. niger

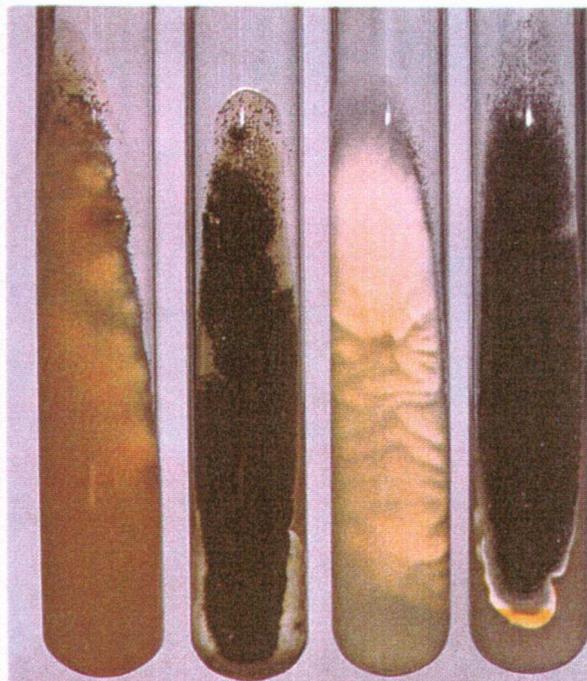


Photo I.5. Colonie poudreuse noire , avec revers beige sur milieu de Sabouraud et revers blanc sur gélose au malt.

A. terreus

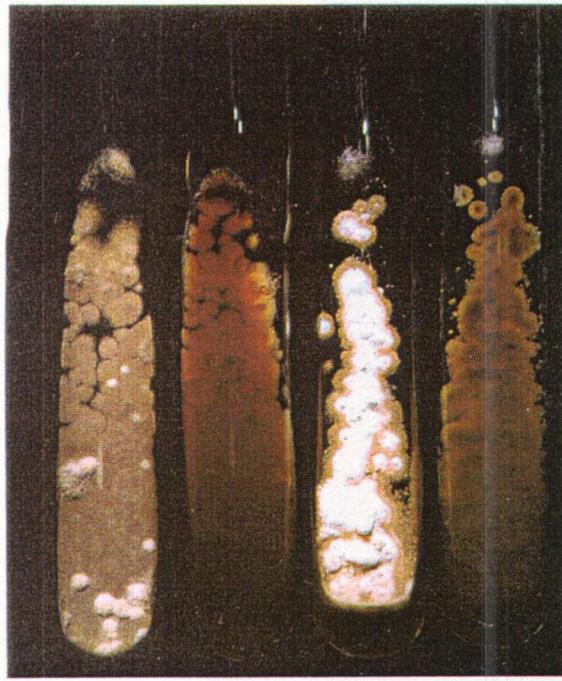


Figure I.6. Colonie veloutée de couleur ocre soutenue caractéristique sur les deux milieux ; revers brun orangé.

A. versicolor

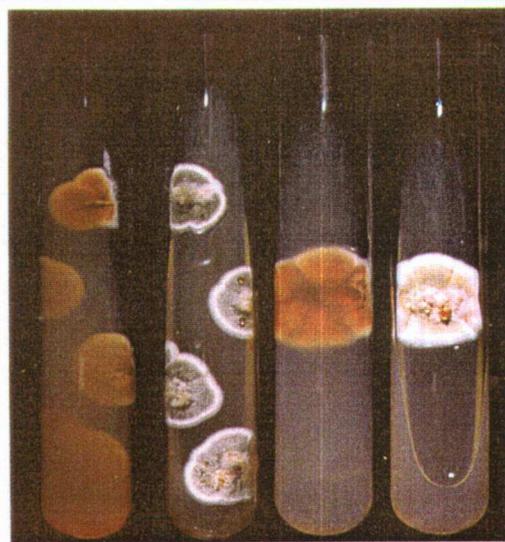


Photo I.7. *A. versicolor*. Culture sur milieu de Sabouraud à gauche et gélose au malt à droite.

Photos I.2. à I.7.
d'après Badillet,
de Bièvre et
Guého, (11).

1.2.1. Aspect morphologique.

1.2.1.1. Caractères macroscopiques : aspect des colonies.

L'aspect et la couleur de la colonie dépendent beaucoup du milieu utilisé pour la culture. Les *Aspergillus* sont décrits sur deux milieux de référence: le milieu de Czapek (à base de saccharose, et sels) et le milieu au malt (à base d'extrait de malt contenant 4% de sucres) même si le milieu de Sabouraud, classiquement utilisé pour mettre en culture les champignons permet de donner une première orientation pour l'identification.

L'aspect typique est en général obtenu après 2 à 7 jours de culture.

La couleur des colonies est un des premiers critères retenus pour la classification. Elle est très variable selon les espèces : elle peut être blanche, rosée, ocre, beige, verte, ou noire. La couleur la plus fréquente est le vert et celle-ci peut être très nuancée variant du vert jaune, au vert olive, vert de gris, vert marron (Photos I.1 à I.7).

Le revers est incolore, jaune marron ou rougeâtre.

La texture de la colonie peut être veloutée, floconneuse ou granuleuse.

La couleur et la texture des colonies sont dues essentiellement aux caractères microscopiques tels que conidies (plus ou moins abondantes), hyphes, têtes conidiennes et structures sexuées si elles existent.

L'aspect de la bordure de la colonie est aussi une caractéristique importante selon quelle est nettement ou grossièrement délimitée, fine ou diffuse, irrégulièrement lobée, aérienne ou incrustée.

1.2.1.2. Caractères microscopiques.

Les descriptions des formes sexuées et asexuées sont reprises du cours de mycologie de C. de Bièvre (36).

1.2.1.2.1. Description de la forme asexuée.

- Le mycélium.

Le mycélium des *Aspergillus* ressemble à celui de la plupart des autres champignons filamenteux septés. Il est composé d'hyphes hyalins septés et branchés, multinucléés. Les hyphes sont fins ou épais et comportent un nombre variable de conidiophores. La forme mycélienne est caractérisée par une croissance abondante avec production d'un très grand nombre de spores.

- Le stipe ou conidiophore.

Le stipe est un filament dressé produit par les filaments végétatifs au niveau d'une cellule particulière appelée cellule du pied ou cellule basale. Ces cellules basales formeront un branchement toujours à angle droit par rapport au mycélium.

Les dimensions du stipe varient selon les espèces de 40 à 3000 µm.

La paroi du conidiophore peut être lisse, rugueuse, échinulée ou piquetée. Celui-ci peut être droit ou sinueux (*A. nidulans*), septé ou non (*A. niger* parfois septé), plus large à la base. Certaines espèces comme *A. glaucus* ont un stipe branché. Ces cellules basales formeront un branchement toujours à angle droit par rapport au mycélium.

Ce branchement qui forme un conidiophore va se terminer par une vésicule de taille et de forme variable selon les espèces (Figure I.1).

- La vésicule.

Elle correspond à la partie terminale renflée du stipe. Elle peut être sphérique, hémisphérique, elliptique, allongée. Le plus souvent elles sont hyalines mais elles peuvent aussi être pigmentées. Leur paroi peut être très fine ou plus épaisse. Il n'y a en principe pas de septum entre la vésicule et le conidiophore. Parfois les vésicules ne sont pas dans le prolongement du stipe et forment un angle avec lui (*A. deflectus*).

Selon l'espèce, certaines parties de la vésicule deviennent fertiles et donnent naissance à des phialides, productrices de spores.

Figure I.1. Représentation schématique du conidiophore et des têtes aspergillaires (d'après De Hoog et Guarro (38)).

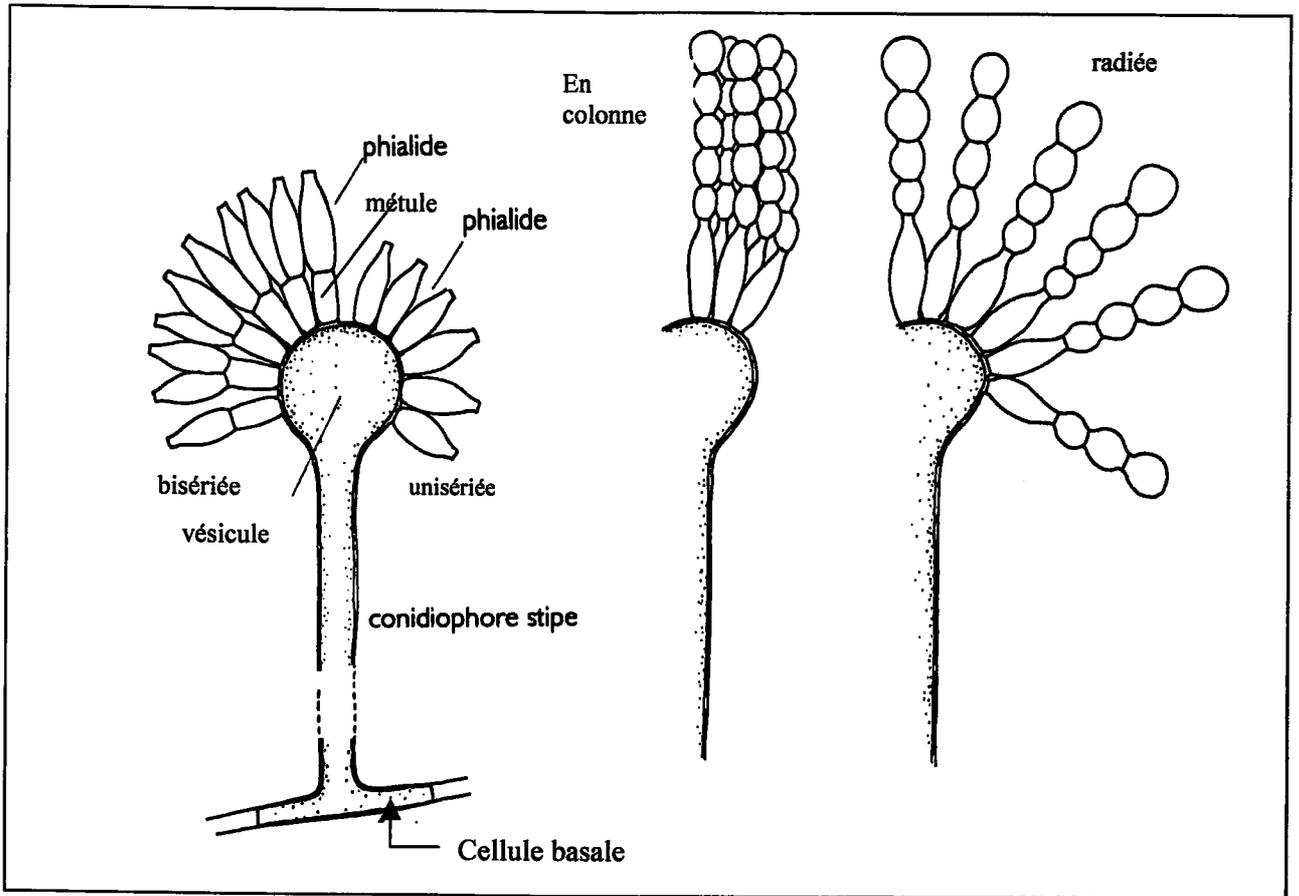
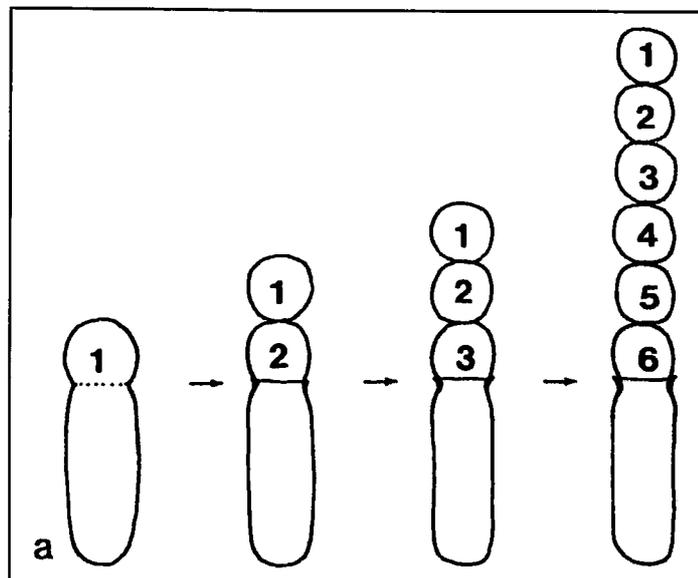


Figure I.2. Représentation schématique de la formation de phialospores chez *Aspergillus*. La première conidie est formée à partir de la paroi interne de la phialide comme celles qui vont succéder (d'après De Hoog et Guarro (38)).



- Les métules et les phialides.

Les phialides sont des cellules conidiogènes de taille fixe qui produisent de très nombreuses conidies ou spores, qui chez les *Aspergillus* restent attachées formant de très longues chaînes. Les phialides sont soit produites directement par la vésicule, soit par l'intermédiaire d'articles stériles appelés métules. Les phialides sont produites simultanément au sommet de la vésicule ou sur toute sa surface. A maturité, elles sont séparées de la vésicule par une cloison. Les phialides sont le plus souvent cylindriques et homogènes en taille et de forme au sein d'une même culture pour une même espèce.

Selon les espèces les phialides mesurent de 5 à 10 μm . Chez certaines espèces, elles ne sont pas produites directement par la vésicule mais par l'intermédiaire d'articles stériles appelés métules. On peut observer au sein de la même colonie la présence de phialides seules ou de phialides avec métules.

Les métules varient de 5 à 25 μm , elles sont quelquefois septées. Elles sont incolores ou brunâtres. Elles sont également produites simultanément sur la vésicule et produiront par bourgeonnement, une ou plusieurs phialides qui sont les éléments fertiles.

- Les conidies ou spores.

Selon les espèces, les conidies sont uni- ou plurinucléées, mais elles sont toujours unicellulaires. Leur dimensions varient de 2 à 5 μm environ. L'épaisseur de la paroi est variable selon les espèces et elle présente soit de fines aspérités ou au contraire des épines ou des tubérosités importantes. Les conidies sont formées à partir de la paroi interne des phialides (Figure I.2). La division nucléaire s'opère au premier stade de la formation des conidies. L'un des nouveaux noyaux migre au sommet du cylindre et un septum apparaît qui sépare le nouveau noyau du reste du cylindre. Une autre division s'ensuit dans le cylindre et un nouveau noyau est formé. Celui-ci migre à son tour en haut du cylindre et pousse la première conidie formée en dehors du cylindre, restant cependant attachée à la base. Le processus se poursuit de la même façon et ainsi se forme une chaîne de conidies au bout de chaque phialide. Selon les espèces le lien qui relie les conidies entre elles est plus ou moins labile conduisant à des chaînes plus ou moins courtes de conidies.

Les conidies représentent l'élément de dispersion et de conservation de l'espèce. Elles sont transportées par l'air en quantité importante, constituant de ce fait l'élément infectieux par inhalation et par contact direct.

1.2.1.2.2. Description de la forme sexuée.

De nombreuses espèces d'*Aspergillus* ont une reproduction sexuée. Celle-ci aboutit à la formation d'ascospores à l'intérieur de structures appelées asques (Figure I.3). Les ascospores ont une forme généralement biconcave.

Dans le groupe des *Aspergillus nidulans*, la couleur des ascospores varie du rouge-brun au rouge-pourpre ou violet; dans le groupe d'*Aspergillus ornatus* les ascospores présentent des nuances rouges-brun à maturité. La plupart des autres sont hyalines. Une asque renferme en général 8 ascospores.

Le cléistothèce ou ascocarpe dans lequel les asques sont formées, ont un aspect variable selon les espèces. Ces structures peuvent être entourées de chlamydozoïdes appelées Hülle cells (*A. nidulans*), qui n'ont pas de fonction définie qui sont intercalaires ou terminales comme les chlamydozoïdes.

1.2.2. Structure cellulaire.

Les champignons sont des eucaryotes et possèdent donc un noyau bien individualisé entouré d'une membrane nucléaire.

1.2.2.1. Membrane plasmique.

Le cytosol des cellules fongiques est entouré par une membrane plasmique appelée plasmalemme. Cette membrane est composée de glycoprotéines, lipides et ergostérol.

La présence d'ergostérol est importante à ce niveau car c'est la cible des antifongiques azolés, largement utilisés en thérapeutique.

1.2.2.2. Paroi.

La membrane plasmique est entourée d'une paroi rigide de structure complexe et stratifiée composée de polysaccharides associés à des peptides (Figure I.4).

Figure I.4. Ultrastructure d'une cellule fongique. PL : plasmalemme ; GC : appareil de Golgi ; M : mitochondrie ; ER : réticulum endoplasmique ; V : vacuole ; MT : microtubules ; N : noyau ; CW : paroi fongique . D'après Schaechter et coll. (137).

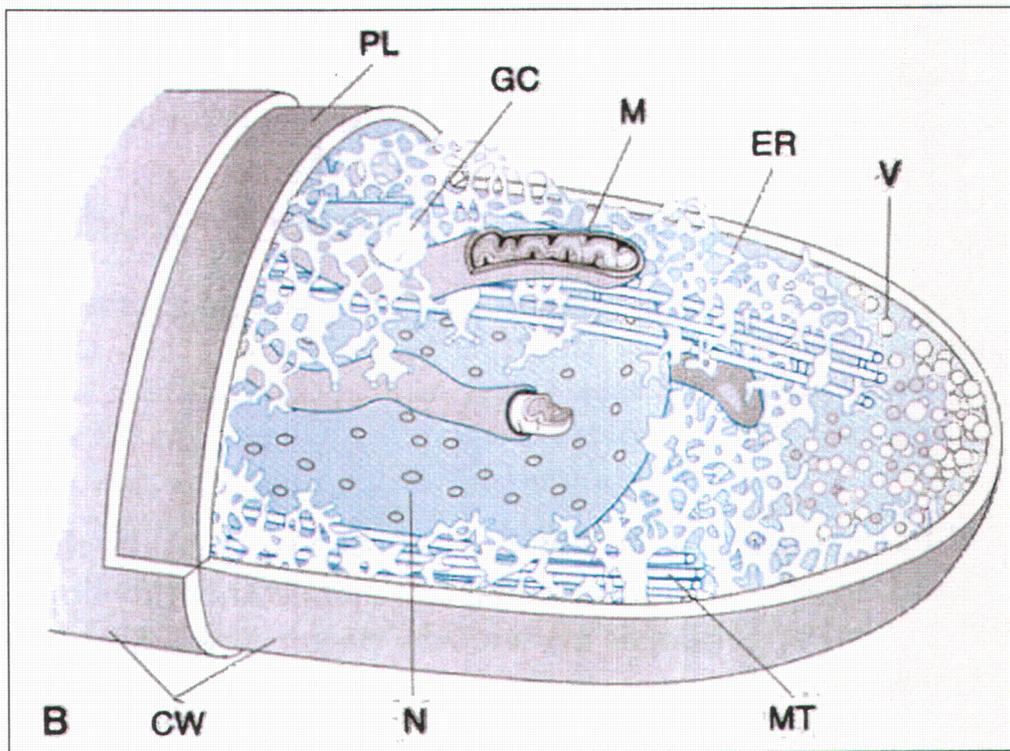
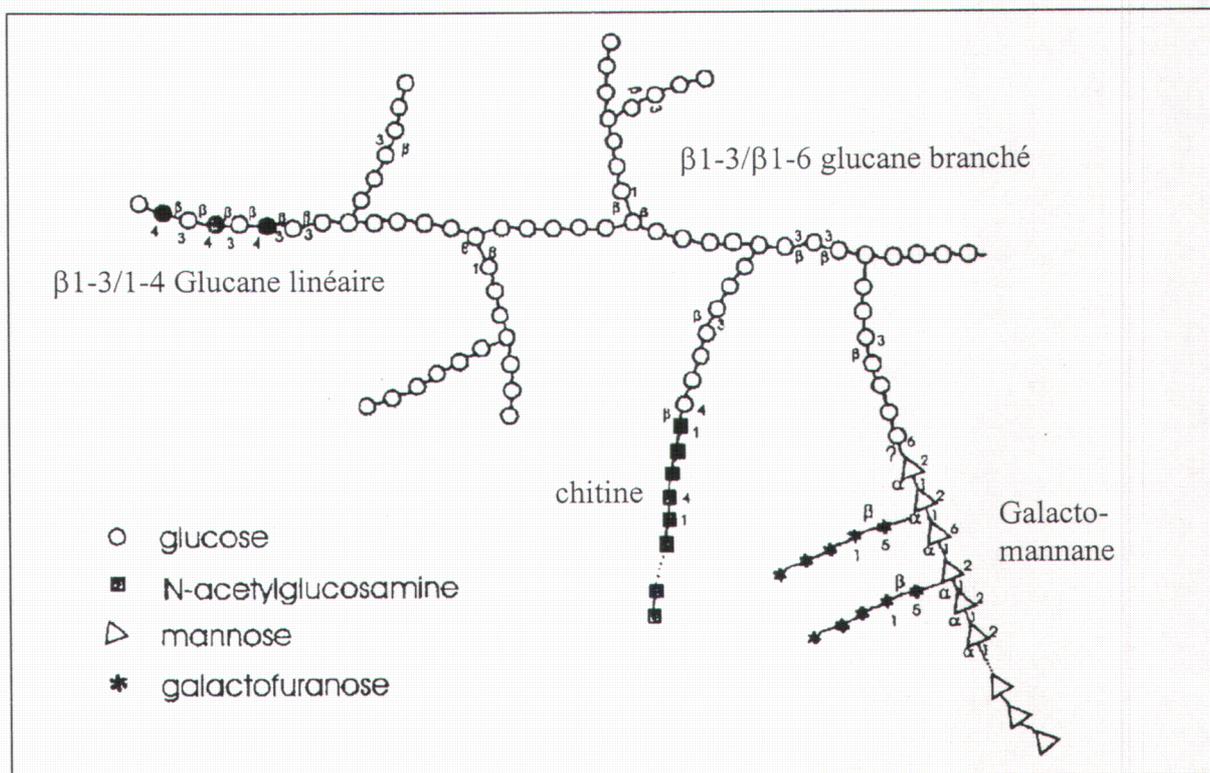


Figure I.5. Structure moléculaire de la paroi fongique d'*A. fumigatus*. D'après Th. Fontaine et coll. (49).



Cependant, et contrairement à celle des levures, la paroi des champignons filamenteux a été jusqu'ici peu étudiée.

En ce qui concerne *Aspergillus fumigatus*, espèce principalement étudiée dans ce domaine, les polysides de la paroi sont principalement composés de chitine (N-acétyl-glucosamine), de galactomannane et de polymère de glucose liés en β 1-3 et β 1-4 qui sont reliés par liaisons covalentes aux chaînes latérales de β 1-3 glucan (49). Le galactomannane est composé d'une chaîne linéaire de mannoses reliés par des liaisons α (1-2) et α (1-6) et de chaînes latérales composées de résidus galactofuranose liés en β (1-5) (Figure I.5).

La concentration de chitine est bien plus importante pour les champignons filamenteux (10%) que chez les levures (2%) (49).

La paroi fongique, qui détermine la forme du champignon, protège celui-ci des dommages mécaniques extérieurs, bloque l'entrée des macro-molécules toxiques et permet la résistance aux variations importantes de pression osmotique.

1.2.2.3. Extension des hyphes.

L'extension des hyphes est apicale avec accumulation des précurseurs de la paroi fongique à l'extrémité des filaments. C'est à ce niveau que l'activité métabolique est alors maximale avec production et sécrétion d'enzymes hydrolytiques et servant à la synthèse de la nouvelle paroi.

La paroi fongique mature est épaisse et rigide mais au cours de son évolution elle peut devenir plus souple en certains endroits et permettre ainsi l'apparition d'un branchement latéral de l'hyphe. L'ensemble ainsi formé donne naissance à un mycélium interconnecté (60).

Typiquement chez les *Aspergillus* les branches latérales se forment à 45°C mais cette particularité se retrouve également chez d'autres genres fongiques proches comme les *Scedosporium sp.*

1.2.3. Classification.

Pratiquement, la classification est fondée sur les critères de la forme asexuée. La classification de Raper et Thom 1965 (128) classe les *Aspergillus* en 18 groupes, 132 espèces et 18 variétés. Depuis de très nombreuses espèces ont été identifiées. Le manuel plus récent de De Hoog et Guarro (38), publié en 1995, cite 175 espèces.

1.3. EPIDEMIOLOGIE.

1.3.1. Habitat naturel.

Les *Aspergillus* sont les champignons parmi les plus communs de tous les environnements : ils sont parmi les 15 premiers champignons dans l'ordre d'incidence des moisissures présentes dans l'air, avec une fréquence variant de 0.1 à 22% de la totalité des spores. Si les *Alternaria* sont plus fréquents, les *Aspergillus* suivent juste après dans l'ordre de fréquence devant de peu les *Penicillium* (142). Par ailleurs, des conidies aspergillaires ont été retrouvées aussi bien dans l'atmosphère haute, qu'en Antarctique et dans les vents et le sable du Sahara (12).

Ce sont des champignons ubiquitaires et cosmopolites. Ils sont présents dans le sol, dans le terreau des plantes ornementales et sur les végétaux en décomposition notamment dans les environnements chauds tels que le foin et le compost. Ce dernier est particulièrement riche en spores avec plus de 10^8 spores par gramme de compost ce qui rend les plantes sources de dissémination (131). Dans certains endroits comme les granges à foin, on a retrouvé jusqu'à 10^9 spores par m^3 d'air. Mais ces chiffres sont exceptionnels et le plus souvent ne dépassent pas 200 spores par m^3 d'air. De façon surprenante, l'intérieur des habitations est plus riche en spores que l'extérieur.

Bien que le terreau des plantes ornementales contienne de grandes quantités de spores, celles-ci sont peu distribuées dans l'air ambiant tant que le terreau n'est pas remué, mais elles constituent un danger potentiel dans l'environnement pour les patients immunodéprimés (115).

Les *Aspergillus* sont également présents sur tous les types de débris organiques tels que nourriture avariée, papiers peints humides. On les retrouve aussi sur les sachets de dialyse craquelés, lentilles de contact, médicaments ouverts, parois de réfrigérateurs, liquides de nettoyage, dans la poussière

de construction, à l'intérieur des conduites d'air. Ces organismes ont été retrouvés également à partir de prélèvements conservés dans du formol.

1.3.2. Modes de contamination.

La principal mode de contamination est la contamination aérienne.

1.3.2.1. Contamination aérienne.

1.3.2.1.1. Contamination dans l'environnement.

Les spores d'*Aspergillus* sont largement disséminées dans l'air. Une fois inhalées, leur taille leur permet de pénétrer profondément dans le tractus respiratoire jusque dans les alvéoles pulmonaires où elles pourront germer. La plupart des espèces sont cependant incapables de se développer à température du corps (37°C) et ne sont pas, par conséquent, des pathogènes humains (115).

Comme les *Aspergillus* se trouvent principalement au contact de matériel végétal en décomposition, les zones rurales et particulièrement les zones agricoles constituent une source majeure de contamination. Il a été montré que l'incidence de la colonisation due à *A. fumigatus* parmi les patients atteints de mucoviscidose était plus élevée en zone rurale qu'en zone urbaine (145).

Aspergillus fumigatus principale espèce pathogène, n'est probablement pas diffusible sur de grandes distances. En effet, les concentrations de spores aériennes diminuent très rapidement à partir du point d'émission. Les zones rurales sont plus riches en spores aspergillaires. Les mois d'hiver semblent plus favorables à la fructification et à la dissémination de cette espèce. Les pics journaliers ne dépassent cependant pas 100 à 200 spores/ m³ d'air (115) .

1.3.2.1.2. Sources de contamination en milieu hospitalier.

La majorité des infections épidémiques nosocomiales a pu être attribuée à un enrichissement en spores aspergillaires de l'air inhalé associé à de grands mouvements de poussière comme en

produisent des travaux intérieurs ou extérieurs au bâtiment hospitalier, à un dysfonctionnement du traitement de l'air ou à une contamination des faux plafonds (81).

a. Contamination liée aux matériaux.

La plupart du temps, en cas d'infection nosocomiale due à *Aspergillus* sp., la présence de spores est retrouvée dans les systèmes de ventilation (125) des salles d'opération ou des services d'hospitalisation. Les *Aspergillus* sont soit présents directement dans la poussière des systèmes de ventilation ou au niveau de la prise d'air extérieur, comme dans le cas décrit par Gage et coll. (52).

L'origine de l'infection peut être également liée à l'accumulation de poussières contaminées dans des zones où règne une humidité anormalement élevée (115). C'est ainsi que de la poussière issue de matériau d'isolation anti-feu fut à l'origine de 15 cas mortels d'aspergillose invasive dans une unité d'hématologie d'un bâtiment neuf (2).

b. Contamination liée aux travaux (rénovation, démolition).

Des infections nosocomiales aspergillaires sont associées à des travaux de construction dans l'environnement immédiat d'un service hospitalier où sont hospitalisés les patients neutropéniques. Dans certains cas l'air du service est contaminé car les travaux se font tout près du service. Dans d'autres cas, c'est le système de ventilation qui apporte de l'air contaminé depuis les sites en travaux (55).

Lors de ces travaux de démolition ou de rénovation, d'énormes quantités de spores sont émises dans l'air sous forme de nuage et s'accumulent dans la poussière. Il est alors important de prendre des mesures préventives de cloisonnement hermétique entre les zones extérieures contaminées et les services de soins.

De plus, la surveillance des poussières accumulées au cours de travaux doit se faire par des prélèvements de surface dans des endroits difficiles d'accès au nettoyage courant d'une part. D'autre part des contrôles de l'aéropollution fongique doivent également être renforcés dans ce cas. On utilise à cet effet des compteurs de particules. L'empoussièrément de l'air est défini par

les concentrations numériques des particules en suspension dont les tailles sont supérieures à des niveaux granulométriques (diamètre des particules) définis. On constitue une limite de classe d'empoussièrement (de 1 à 100.000 par exemple), en se fixant une concentration numérique maximale acceptable par site, pour chacun des niveaux granulométriques (81).

Cependant il n'existe pas de norme précise de contamination aspergillaire. Dans un service à haut risque où il existe une ventilation avec traitement de l'air on ne retrouve généralement pas d'*Aspergillus*. Aussi, la présence d'une colonie, doit-elle attirer l'attention. De plus la présence d'une colonie sous flux laminaire doit être considérée comme anormale (17).

c. Contamination par l'eau.

De récentes publications font état du rôle potentiel de l'eau comme source de contamination primaire dans les hôpitaux. Depuis 1985 des rapports font état de l'isolement de souches d'*Aspergillus* sp. dans l'eau de distribution d'hôpitaux américains et européens (6) pouvant aller jusqu'à 21% des sources testées. De plus l'analyse de la distribution des espèces dans l'eau de l'eau distribuée et au niveau des aérosols est identique, ce qui fait suggérer aux auteurs que les spores de l'air proviennent de l'eau (6). Si cela se confirme les systèmes de protection des patients immunodéprimés seront à adapter.

1.3.2.2. Autres voies et/sources de contamination.

Les contaminations transcutanées, per-opératoires, gastrointestinales sont plus rares (131). La nourriture contaminée comme le poivre, le thé, la marijuana (42) qui sont très riches en spores est par ailleurs une source non négligeable de contamination (115).

1.3.2.3. Inoculum et temps d'incubation.

Le développement d'une aspergillose invasive nécessite pour le patient à risque d'être exposé à un inoculum important. Cependant les doses requises ne sont pas déterminées.

La période d'incubation entre l'exposition à un risque aspergillaire et le développement de la maladie n'est pas non plus définie. On peut cependant noter que chez les patients neutropéniques, l'aspergillose invasive ne se manifeste jamais avant le deuxième jour de neutropénie profonde bien que beaucoup de ces patients soient colonisés à leur entrée à l'hôpital (42).

1.3.3. Polymorphisme génétique d'*A. fumigatus*.

Différentes méthodes de typage moléculaire ont été appliquées à l'étude des souches isolées chez les patients et dans l'environnement. Ces études ont montré qu'il y a une grande variété de génotypes distribués de par le monde et que les mêmes génotypes suscitent des infections aussi bien en Europe qu'aux Etats-Unis (42).

Un seul génotype est généralement retrouvé chez les patients développant une aspergillose invasive. Cependant, il ne semble pas qu'il y ait un groupe de génotypes plus pathogène que les autres (35 , 42).

La situation paraît être différente pour les transplantations pulmonaires. En effet, une étude réalisée chez 8 patients transplantés pulmonaires ayant développé soit une aspergillose invasive, soit ayant été seulement colonisés, a permis de mettre en évidence que les patients étaient infectés par plusieurs génotypes différents (154). Ceci s'explique par la diversité des souches environnementales d'*A. fumigatus* et par le fait que les patients transplantés d'organe solide ne sont pas protégés durant leur hospitalisation par un flux laminaire qui limite l'exposition au risque aspergillaire.

1.3.4. Facteurs de risque pour le développement d'une aspergillose invasive.

La sensibilité aux infections aspergillaires dépend surtout de l'altération des barrières muco-cutanées, de la diminution du nombre des neutrophiles et des macrophages, et/ou de leurs fonctions.

Tableau I .2. Incidence de l'aspergillose invasive selon la population de patients. D'après D. Denning (42).

Groupe	%
Transplantation cœur –poumon ou poumon	19-26
Maladie granulomateuse chronique	25-40
Leucémie aiguë	5-24
Transplantation de Moelle osseuse allogénique	4-9
Transplantation de Moelle osseuse autologue sans facteur de croissance	0.5-6
SIDA	0-12
Transplantation de foie	1.5-10
Transplantation de cœur et de rein	0.5-10
Immunodépression combinée sévère	3.5
Brûlés	1-7
Lupus érythémateux	1
Transplantation de moelle osseuse autologue avec facteurs de croissance	<1

L'inhalation et/ou la pénétration des spores provoquera une infection si elle est favorisée par l'existence de lésions bronchiques ou pulmonaires et/ou conditionnée par des déficits immunitaires iatrogènes (irradiations, corticothérapie, immunodépression), par la consommation d'héroïne, ou par un déficit congénital de la phagocytose (granulomatose septique chronique, déficit en myéloperoxydase). Les transplantés de moelle, en rejet sous corticoïdes, sont les plus exposés.

Les aspergilloses invasives et disséminées se rencontrent chez les patients atteints de leucémies aiguës, les patients transplantés de moelle osseuse ou d'organe, patients atteints de maladies auto-immunes et de sarcoïdose, et aussi au cours du SIDA. Le tableau I.2 montre une estimation de l'incidence des aspergilloses invasives selon les populations considérées.

En ce qui concerne les infections invasives et/ou disséminées le facteur de risque majeur est la neutropénie profonde ($<0.1.10^9$ /litre) et prolongée (>3 semaines) que l'on rencontre particulièrement lors des leucémies aiguës en traitement.

Nous insisterons particulièrement sur trois populations à risque de développer une aspergillose invasive: transplantés de moelle, d'organe et patients atteints de SIDA.

1.3.4.1. Transplantation de moelle osseuse.

1.3.4.1.1. Présentation.

Suite à une greffe de moelle, on note des anomalies fonctionnelles des lymphocytes B et T pendant environ trois à 4 mois après la greffe. Neuf à douze mois après la greffe, la plupart des patients retrouvent une fonction immune normale. L'histo-incompatibilité du donneur et du receveur et le développement de la maladie du rejet du greffon contre l'hôte (MRGH) d'expression aiguë ou chronique prolonge cette période d'immunodépression propice au développement des infections fongiques et bactériennes.

Il existe des relations étroites entre MRGH et infections. En effet, les bactéries peuvent partager des épitopes communs avec des cellules intestinales et déclencher des réactions immunes dirigées contre l'hôte. De même, la réactivation de certains virus latents comme le virus herpes simplex

(HSV) ou le cytomegalovirus (CMV) peut induire la présence d'antigènes de surface qui vont stimuler une réaction immune dirigée contre l'hôte (153). D'autre part, la survenue d'une maladie de rejet du greffon contre l'hôte engendre des désordres dans les fonctions lymphocytaires B et T d'où une altération des fonctions immunes normales responsables d'une détérioration de la défense anti-infectieuse.

1.3.4.1.2. Facteurs prédisposants aux infections.

La survenue d'infections chez les transplantés de moelle est déterminées par de multiples facteurs incluant: 1. la maladie sous-jacente 2. le traitement préalable du patient 3. le conditionnement du patient avant la greffe 4. la survenue de la MRGH 5. l'environnement du patient et de l'unité de transplantation.

La perte et la reconstitution de l'immunité sont les clés centrales de la réussite de la greffe de moelle.

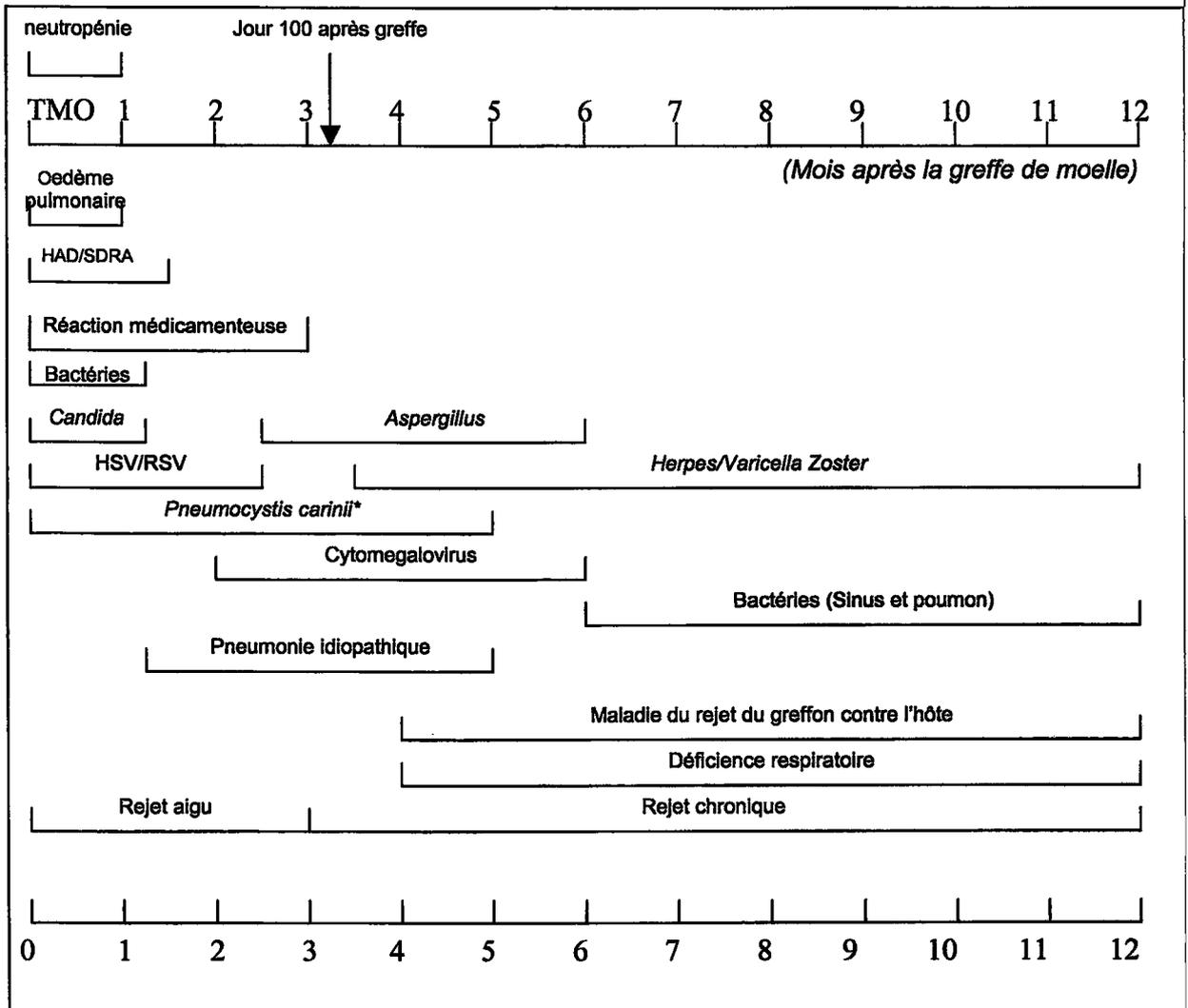
a. Le conditionnement pré-greffe.

Le conditionnement du patient pour préparer le patient à une greffe allogénique a tendance à abolir l'immunité du receveur pour permettre la prise de greffe. Ceci est fondamentalement différent des transplantations rénales ou cardiaques, où l'immunité est diminuée mais non détruite. Un facteur de risque important est la rupture précoce des barrières muqueuses suite à la toxicité du régime de conditionnement. Les barrières anatomiques sont également abolies par l'introduction quasi-systématique de cathéters centraux.

b. La prévention de la MRGH.

L'évènement majeur qui conditionne la reconstitution immunologique de l'hôte après transplantation et par conséquent la survenue ou non d'infections, est le développement de la maladie du greffon contre l'hôte et son traitement. Cette maladie, sous sa forme chronique, se développe chez environ 1/3 des survivants de greffe de moelle allogénique, 100 jours après la greffe. Le mécanisme par lequel la MRGH prédispose aux infections n'est cependant pas totalement élucidé.

Figure I.6. Représentation schématique et temporelle des complications liées au traitement et des complications infectieuses survenant chez les greffés de moelle allogénique. TMO, transplantation de moelle osseuse ; HAD, hémorragie alvéolaire diffuse; SDRA, syndrome de détresse respiratoire aigue ; HSV, virus herpes simplex, RSV : virus respiratoire syncytial ; * , très rare si prophylaxie par triméthoprime-sulfaméthoxazole appropriée. Schéma d'après Serody & Shea (143).



La prévention de la MRGH est réalisée depuis quelques années par l'administration de cyclosporine A (37). Une alternative également utilisée est la déplétion de la moelle transplantée des lymphocytes T mûres qu'elle contient, qui sont responsables du rejet de greffe (97). L'inconvénient est une plus longue période de neutropénie et une moins bonne prise de greffe.

c. Neutropénie.

Quelque soit le conditionnement d'avant greffe, on assiste invariablement à une neutropénie sévère. La durée de cette neutropénie est influencée par le régime instauré pour la prévention du rejet de greffe aigu et est d'environ 18 jours (leucocytes $<100/\mu\text{l}$) pour la cyclosporine. En cas de survenue de rejet de greffe les patients ont des périodes de neutropénie plus longues et meurent souvent suite à des complications infectieuses.

Cependant, même après rétablissement d'un nombre normal de granulocytes, leur fonctionnalité est altérée, ce qui est également le cas pour les macrophages. Mais à ce moment-là, la période de risque pour les infections bactériennes et fongiques est passée.

1.3.4.1.3. Séquence des infections.

La survenue des infections est résumée sur la figure I.6. Globalement on distingue trois phases de risque : Phase I. 0-30 jours post-greffe, Phase II. 30-100 jours post-greffe, Phase III. >100 jours post-greffe (31).

Les infections aspergillaires surviennent surtout au cours de la phase II.

Actuellement des efforts sont surtout développés dans le sens d'une plus grande prévention des infections et la reconstitution de l'immunité perturbée.

Tableau I.3. Incidence des infections chez les transplantés d'organe solide d'après une méta –analyse de Patel et Paya (121).

Type d'infection	Incidence des infections (%) ^a chez les receveurs de				
	Foie	Rein	Cœur	Poumon/cœur-poumon	Pancréas/pancréas-rein
Bactéries	33-68	47	21-30	54	35
CMV	22-29	8-32	9-35	39-41	50
HSV	3-44	53	1-42	10-18	6
VZV	5-10	4-12	1-12	8-15	9
Candida spp.	1-26	2	1-5	10-16	32
Filamenteux	2-4	1-2	3-6	3-19	3
<i>P. carinii</i>	4-11	5-10	1-8	15	/

^aLes écarts reflètent les différents pourcentages fournis par la compilation des études réalisées dans plusieurs centres de transplantation.

1.3.4.2. Transplantation d'organe solide.

1.3.4.2.1. Présentation.

Elle concerne essentiellement les transplantations de foie, rein, cœur et poumon.

Le niveau d'immunodépression dépend de la dose de la durée et de la séquence des médicaments immunosuppresseurs.

La plupart de ces agents entraînent une altération de l'immunité cellulaire. Cependant, ils peuvent également toucher la réponse humorale. Ceci engendre une plus grande sensibilité aux agents intracellulaires obligatoires comme *Toxoplasma gondii* et aux Herpesvirus, de la même façon que dans l'immunodépression rencontrée au cours du SIDA. La meilleure approche de l'infection chez ces patients est la prévention : le tableau I.3 montre l'incidence des infections d'après Patel et Paya (121).

Un principe important et qui se retrouve chez toutes les populations immunodéprimées est le fait que la réponse inflammatoire à l'infection est atténuée par l'immunodépression et le diagnostic est souvent retardé par manque de signes précoces.

1.3.4.2.2. Séquence des infections.

De même que dans la transplantation de moelle, il existe trois phases à risque pour les infections après la greffe:

Phase I : 0-30 jours post-greffe

Phase II : 1-6 mois post-greffe

Phase III : >6 mois post-greffe

Parmi les transplantation d'organe, ce sont les transplantations pulmonaires qui engendrent le plus d'infections aspergillaires: 15% des cas sont notifiés à l'Université de Standford (78).

Les infections aspergillaires surviennent lors des trois premiers mois de la greffe et les infections disséminées s'accompagnent d'une mortalité d'environ 100% malgré l'utilisation d'amphotéricine B. Les infections localisées ont un meilleur pronostic (99).

1.3.4.3. Infections aspergillaires au cours du SIDA.

1.3.4.3.1. Présentation.

Bien que les aspergilloses aient été initialement incluses dans la liste des infections opportunistes définissant le SIDA (68), elles en ont été retirées en 1984 parce que l'on pensait qu'elles étaient liées à une neutropénie et non à une déplétion lymphocytaire (138). Cependant depuis 1991, un nombre croissant d'aspergilloses témoigne de l'émergence récente de cette infection au cours du SIDA, particulièrement dans sa localisation pulmonaire (102).

Les facteurs de risques qui contribuent à l'émergence des infections aspergillaires sont une maladie pulmonaire chronique due à de fréquentes infections pulmonaires (notamment à *P. carinii*), l'usage fréquent de corticoïdes, d'antibiotiques à large spectre et de médicaments entraînant une neutropénie comme la zidovudine et le ganciclovir. L'amélioration du traitement immunomodulateur qui prolonge la durée de la maladie est sans doute le facteur clé qui explique l'émergence des infections aspergillaires au cours du SIDA (51, 170).

Par ailleurs les défenses naturelles contre *Aspergillus* (polynucléaires neutrophiles et macrophages) sont partiellement altérées au cours du SIDA: ainsi, les patients présentent fréquemment une dysmyélopoïèse liée au VIH avec une neutropénie modérée prolongée, voire une altération des fonctions des neutrophiles. La fonction macrophagique semble altérée au cours du SIDA, et les multiples agressions microbiennes bronchopulmonaires joueraient un rôle dans la dégradation du tapis ciliaire (102).

L'aspergillose survient en moyenne 10 à 25 mois après le diagnostic de SIDA et la plupart des patients ont des taux de lymphocytes CD4 inférieurs à 50/mm³. Une neutropénie et une corticothérapie ne sont retrouvées que dans la moitié des cas (102).

La forme la plus fréquemment rencontrée est la forme invasive aiguë (113). Les organes le plus souvent touchés sont les poumons (76 %), le système nerveux central (32 %) et le cœur (15 %). Les infections au niveau du système nerveux central sont plus fréquentes que chez les autres groupes à risque (105).

Il est parfois difficile au cours du SIDA de faire la part entre infection et colonisation. En effet, certains auteurs ont observé jusqu'à 67% des prélèvements respiratoires contaminés par des *Aspergillus* (147) et le diagnostic s'en trouve retardé. Le taux de mortalité est par ailleurs très

élevé avec une médiane de survie de 30 jours après le diagnostic de l'infection dans la série de Wallace et coll. (170) et de 4 mois dans la série de Lortholary et coll. (90).

Une série de 17 cas autopsiés dont les données histopathologiques ont été étudiées montre que dans 40% des cas une forme chronique d'aspergillose a été observée suggérant que l'aspergillose n'est pas une infection terminale au cours du SIDA (113). Le fait que les cellules phagocytaires soient peu affectées chez les patients atteints de SIDA, explique sans doute la forme plutôt chronique observée dans cette série. Toujours dans cette série, 11 patients sur 17 avaient une infection à CMV concomitante à l'aspergillose invasive. Or le rôle immunosuppresseur du CMV sur l'immunité humorale et cellulaire est bien décrite et pourrait expliquer cette co-infection (113). Chez 9 patients sur 17 (toujours dans la même étude) une fibrose a été retrouvée et dans 8 cas sur 9 celle-ci a pu être reliée à une infection préalable à *P. carinii*.

Ainsi, il faut savoir penser à l'aspergillose devant un patient au nombre de CD4 < 50/mm³ présentant une pathologie bronchopulmonaire fébrile.

1.4. PATHOGENESE.

1.4.1. Facteurs liés au champignon.

1.4.1.1. Caractéristiques propres au champignon.

Les spores d'*A. fumigatus* sont capables de germer en 5 à 12 heures à 37°C selon le milieu de culture utilisé. Leur volume augmente dans un rapport de 4 à 8 fois le volume de départ et leur revêtement hydrophobe est remplacé par une autre membrane externe. Quand les hyphes apparaissent, la phase de croissance logarithmique commence pour atteindre un plateau au bout de 24 heures (42).

La plupart des espèces d'*Aspergillus* sont incapables de se développer à 37°C, une clé caractéristique qui permet de distinguer les souches pathogènes des autres. Il y a également de grandes différences dans la vitesse de croissance des différentes espèces et *A. fumigatus* est l'espèce la plus rapide. De plus des expériences *in vitro* ont montré qu'en présence d'hydrocortisone, *A. fumigatus* doublait sa surface de croissance en 48 minutes et que l'extension des hyphes était de 1 à 2 cm par heure. Ainsi, la rapidité de croissance semble être un facteur important dans la progression de la maladie.

Par ailleurs la petite taille des spores d'*A. fumigatus* (3-5 µm) et leurs propriétés aérodynamiques leur permet de pénétrer profondément dans les alvéoles et d'outrepasser les barrières du tractus respiratoire supérieur (4, 5).

1.4.1.2. Facteurs de virulence.

Les techniques de biologie moléculaire ont permis l'étude des facteurs de virulence potentiels grâce aux techniques de clonage et de mutation génétique (84).

La plupart de ces études prend appui sur modèle animal. Cependant, il n'y a pas de consensus concernant le meilleur animal à utiliser pour reproduire un modèle expérimental d'aspergillose invasive. Au vu de la littérature, il existe une grande hétérogénéité, non seulement concernant l'animal utilisé, mais aussi le traitement immunosuppresseur, la voie et la dose d'inoculation des conidies aspergillaires. Cependant, malgré tout, quelques conclusions peuvent être tirées de ces différentes études.

Dose de conidies injectées. Il existe une relation directe entre la dose de conidies injectées et la létalité. La dose de conidies doit être adaptée au poids de l'animal.

Drogue immunosuppressive. L'intensité de l'immunosuppression va dépendre du type de drogue immunosuppressive utilisée. Ainsi, chez les lapins un traitement par la cytosine arabinoside va engendrer une aspergillose invasive plus sévère que l'utilisation de cyclosporine A (Cy A) en association avec des corticoïdes (16). Il semble de plus que l'utilisation de Cy A soit plus aisée que la cytosine arabinoside et donc préférée.

Type d'animal. Les souris sont les animaux le plus utilisés pour développer des modèles expérimentaux d'aspergillose invasive. Toutes les espèces ne sont pas également sensibles à l'infection et l'on préférera l'utilisation de souris déficientes en C5 comme les DBA2.

Voie d'inoculation. L'inoculation intranasale mime le mieux l'infection naturelle. L'invasion aspergillaire se développe dans le poumon et progresse vers le cerveau, le foie, les reins et la rate. Cependant la réponse est très hétérogène et nécessite l'utilisation de grands groupes de souris.

L'inconvénient majeur de ces modèles animaux est le manque de conformité par rapport à l'infection humaine. En effet, chez l'animal, on inocule en une seule fois de grandes quantités de conidies et chez l'homme, l'exposition est continue et répétée.

Tableau I.4. Molécules d'*A. fumigatus* ayant un rôle potentiel dans la virulence du champignon d'après J.P. Latgé (84).

Catégorie	Rôle in vivo	Molécule
Adhésines	Promotion et interaction des protéines et des cellules de l'hôte avec <i>A. fumigatus</i> .	Récepteur du complément (54-58 kDa) Récepteur de la laminine (72 kDa) Hydrophobines (14 et 16 kDa)
Pigments	Inhibition de la phagocytose des conidies	Dihydroxynaphtalène-mélanine
Molécules toxiques	Mort cellulaire(cellules de l'hôte) Lyse des érythrocytes Immunosuppression	Rnase (18kDa)(=restrictocine=ASPF1) Hémolysine (30 kDa) Métabolites secondaires comme la gliotoxine
Enzymes	Promotion de la colonisation de la matrice pulmonaire et /ou dégradation des facteurs humoraux Antioxydants pendant la phagocytose Altération de l'épithélium	Sérine protéase (33kDa) Aspartic protéase (38kDa) Metalloprotéase (40 kDa) Dipeptidylpeptidases (88 et 94 kDa) Catalases (350 kDa et ?) Superoxyde dismutases (27 et 67 kDa) Phospholipase

D'autre part il n'existe pas de modèle animal qui mime l'aspergillose sous sa forme chronique (84).

1.4.1.2.1. Adhésines.

Les facteurs de virulence potentiels ont surtout été étudiés pour *A. fumigatus*. Ils sont répertoriés dans le tableau I.4.

Les adhésines sont toutes les molécules qui sont impliquées dans la fixation des conidies aux protéines de l'hôte. Les conidies se fixent spécifiquement à des molécules circulantes ou structurelles de l'hôte: fibrinogène, laminine, complément, fibronectine, albumine, immunoglobulines, collagène et protéines du surfactant (84). La fixation s'opère par des interactions physico-chimiques non spécifiques et /ou via un récepteur. Seul un petit nombre d'interactions ont été caractérisées au niveau biologique ou moléculaire.

La paroi la plus externe des conidies d'*A. fumigatus* est composée de protéines appelées hydrophobines qui leur confèrent des propriétés hydrophobes.

Les hydrophobines sont une famille protéique homogène et très résistante à la dégradation chimique. Ce type de protéines joue un rôle essentiel dans les interactions, mais elles ne semblent pas essentielles pour la virulence du champignon (160).

Les sucres présents à la surface des conidies sont également impliqués dans la fixation aux protéines de l'hôte.

Cependant aucune des adhésines d'*A. fumigatus* n'a été purifiée à ce jour et leur rôle dans l'établissement de la maladie reste à débattre.

1.4.1.2.2. Pigments.

La synthèse de pigments mélaniques par *A. fumigatus* ne semble pas essentiel dans l'établissement de la virulence du champignon (84).

1.4.1.2.3. Molécules toxiques.

A. fumigatus produit plusieurs métabolites secondaires toxiques.

La gliotoxine est la plus étudiée (108, 109). C'est une molécule toxique qui a beaucoup de propriétés immunosuppressives cependant le rôle dans la virulence de ces molécules reste à déterminer car des souches d'*A. fumigatus* qui ne produisent pas ces molécules sont quand même pathogènes *in vitro* (84).

A. fumigatus produit aussi une RNase et une hémolysine dont les effets sont toxiques.

La RNase appelée aussi restrictocine ou ASPF1 a été le plus étudiée. Elle clive le rRNA 28S des ribosomes de façon très spécifique. Elle est présente dans la paroi cellulaire et est sécrétée *in vivo*: elle est détectée dans l'urine de patients développant une aspergillose invasive. Cependant il y a plusieurs arguments réfutant son rôle dans la pathogénicité: d'autres espèces pathogènes ne synthétisent pas cette molécule et certaines espèces non pathogènes sont au contraire productrices, enfin un mutant déficient se comporte comme un non déficient (84).

L'hémolysine produite par *A. fumigatus* a été détectée *in vivo* sur modèle animal. Cependant son rôle exact dans la pathogénèse reste à déterminer.

1.4.1.2.4. Enzymes.

Il est logique de penser que des enzymes sélectives sont essentielles dans l'invasion tissulaire des champignons pathogènes. De plus, comme le parenchyme pulmonaire est composé d'élastine et de collagène, il était raisonnable de penser que le champignon produisait des enzymes protéolytiques spécifiques.

L'activité protéolytique du collagène est assurée à 30% par une métalloprotéase (Mepp). Le gène MEP a été cloné et des doubles mutants $\Delta alp \Delta mep$ ont permis de montrer que l'absence de

sécrétion extracellulaire de protéases n'empêchait pas l'activité protéolytique d'où l'hypothèse que d'autres protéases devaient être produites par le champignon pour prendre le relai (84).

Plus récemment une protéase de la famille des pepsines (Pepp) a été caractérisée (38-kDa). Mais comme les deux précédentes aucun rôle spécifique n'a pu être mis en évidence.

En fait, la protéine majeure synthétisée par *A. fumigatus* est une sérine alcaline protéase (Alpp) de 33 kDa. C'est un membre de la famille des subtilisines et elle a été très bien caractérisée sur le plan biochimique et génétique (50, 130). Cependant, des expériences mettant en jeu des mutations-délétions spécifiques (Δ Alpp) ont montré que l'activité de protéolyse du collagène n'était pas inhibée et que les souches mutantes étaient capables d'entraîner une mortalité identique aux souches sauvages (157, 159).

Ces expériences permettent de penser que les protéases précitées n'interviennent pas dans l'invasion tissulaire au cours de l'aspergillose invasive et suggèrent que cette famille des protéases aspartiques pourrait plutôt intervenir dans la morphogénèse fongique, par dégradation des tissus et production de substrats nutritionnels.

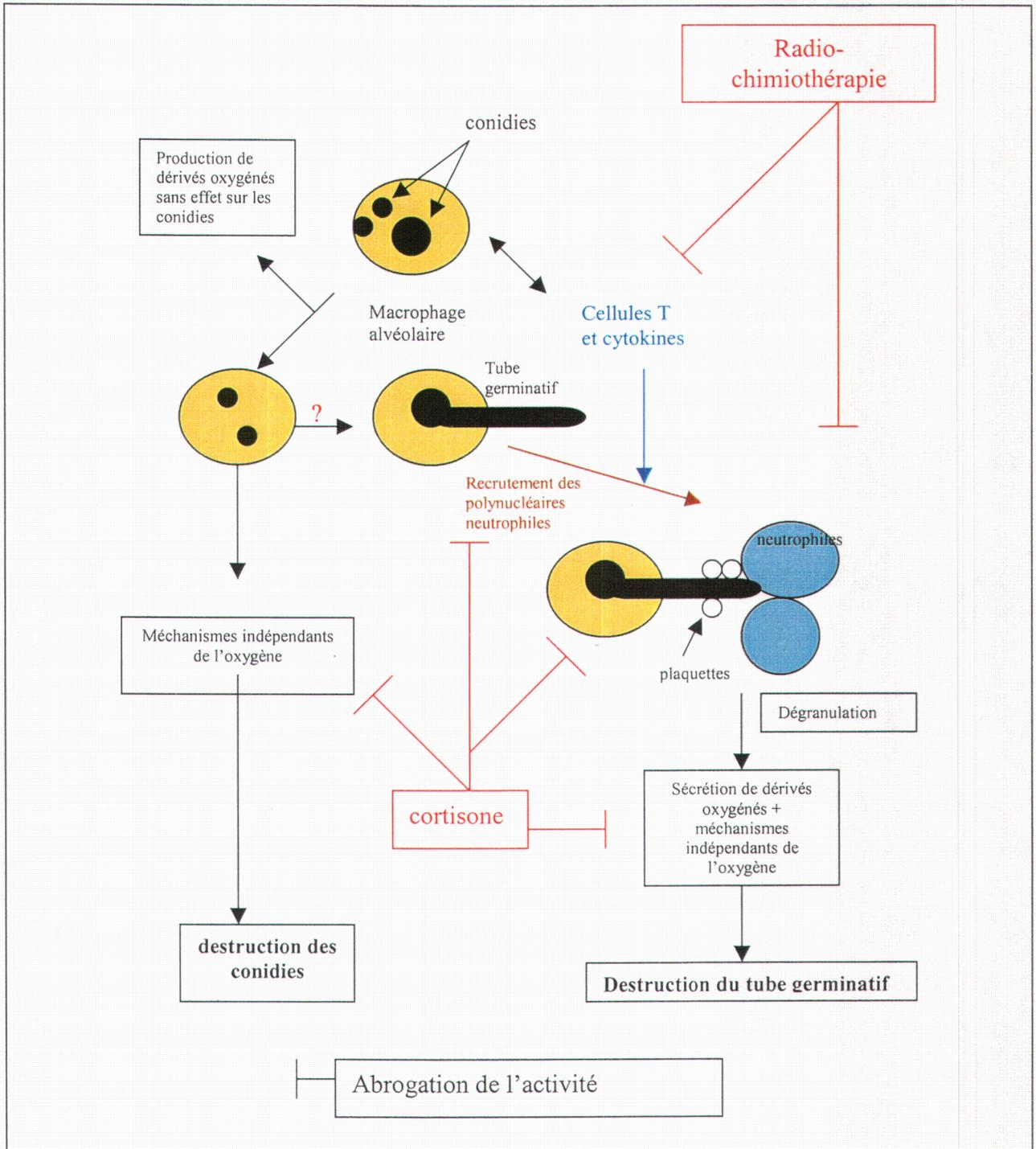
Plus récemment, des expériences ont montré que les enzymes oxydatives pourraient jouer un rôle essentiel dans le processus d'invasion en empêchant l'action des dérivés oxygénés produits par les cellules phagocytaires : trois catalases et deux superoxyde dismutases ont ainsi été caractérisées pour *A. fumigatus*.

Comme il existe de multiples catalases avec des rôles redondants, il est très difficile d'étudier leur rôle dans la pathogénèse. Cependant et comme précédemment, des expériences faites avec des souches déficientes dans l'activité oxydasique avaient le même potentiel pathogène que les souches sauvages (84, 176).

En conclusion: Tous ces résultats suggèrent que les facteurs de virulence chez *A. fumigatus* sont multiples. Les expériences conduisant à la délétion d'un seul gène ne permettront donc pas d'identifier ces facteurs de virulence. Par contre, il serait intéressant d'identifier un gène de régulation contrôlant un ensemble de gènes impliqués dans la virulence.

Des expériences concernant le rôle du *areA* gène ont été réalisées récemment dans ce sens (65). La difficulté de mettre en évidence un facteur de virulence précis conduit plutôt à penser qu'*Aspergillus fumigatus* est virulent parce qu'il arrive à résister aux mécanismes de défense de l'hôte et survit plus longtemps, comme le prouve le rôle des dérivés mélaniques qui inhibent la phagocytose (84).

Figure I.7. Représentation schématique de l'immunité naturelle et sa régulation par les agents immunosuppresseurs utilisés dans les greffes de moelle osseuse, d'après J.P. Latgé (84).



1.4.2. Facteurs liés à l'hôte.

1.4.2.1. Défenses naturelles.

L'immunité non spécifique et naturelle joue un rôle majeur dans la défense contre les *Aspergillus* par reconnaissance et clairance de l'organisme chez l'hôte immunocompétent.

L'immunité non spécifique inclut trois barrières majeures : barrières anatomiques, facteurs humoraux incluant le complément, et cellules phagocytaires (Figure I.7).

1.4.2.1.1. Barrières anatomiques.

L'homme se contamine le plus souvent par inhalation de spores. A ce niveau, la première ligne de défense se situe au niveau des cils vibratiles qui par leurs mouvements et la sécrétion de mucus s'opposent au développement du champignon. Une grande partie de spores est arrêtée à ce stade.

Cependant clairance mucociliaire peut être moins efficace pour *A. fumigatus* que pour d'autres champignons car celui-ci sécrète des molécules toxiques qui inhibent l'activité ciliaire et des protéases qui endommagent l'épithélium (5). De plus, on a pu démontrer que les cellules épithéliales et endothéliales pouvaient internaliser les conidies et servir de réservoir potentiel (120). Chez l'homme, le rôle du surfactant dans la clairance n'est pas clairement défini. Celui-ci jouerait un rôle par l'intermédiaire de protéines hydrophiles en augmentant l'agglutination, la phagocytose et la destruction des conidies (92).

1.4.2.1.2. Cellules phagocytaires.

La plupart des études rapportent un rôle majeur des cellules phagocytaires dans la protection contre *A. fumigatus*.

Les poumons étant le site d'infection et les macrophages alvéolaires étant les cellules particulièrement bien représentées à ce niveau, ils constituent au niveau pulmonaire, la première ligne de défense contre *Aspergillus*.

Les neutrophiles qui sont recrutés par la réponse inflammatoire et qui peuvent surpasser en nombre les macrophages, sont les acteurs de seconde ligne.

*Macrophages

Ils sont capables d'ingérer et de tuer les spores d'*Aspergillus*. Il semble que la reconnaissance, la fixation et l'ingestion des conidies par les macrophages s'opère via un récepteur de type lectinique : le récepteur mannosyl-fucosyl et deux autres récepteurs (inhibés par des oligosaccharides) sont supposés intervenir, mais des récepteurs spécifiques n'ont pas été identifiés (84).

Après ingestion des conidies, la réponse typique du macrophage s'opère. La destruction des conidies commence après un délai de quelques heures avec une efficacité relativement faible puisque seulement 90% des spores sont détruites en 24 heures. Le médiateur responsable de la destruction des conidies par les macrophages n'a pas été identifié et il semble que les phénomènes oxydatifs n'interviennent pas.

Une destruction complète des conidies par les macrophages alvéolaires n'a jamais été rapportée, suggérant le rôle important de la défense de seconde ligne exercée par les neutrophiles. D'autant plus qu'il a été démontré que les conidies ingérées par les monocytes pouvaient germer (84).

*Polynucléaires neutrophiles.

On pensait initialement que les neutrophiles étaient capables d'agir uniquement sur les hyphes et pas sur les conidies. Or des études récentes ont montré qu'ils pouvaient ingérer et tuer des spores d'*A. fumigatus* (84).

Quoiqu'il en soit les polynucléaires neutrophiles restent responsables en premier lieu de la destruction des hyphes. Ils adhèrent à la surface des hyphes, mais sont incapables de les internaliser à cause de leur taille. Les récepteurs de cette adhésion ne sont pas encore identifiés sachant que complément et anticorps ne sont pas nécessaires (150).

Le contact entre neutrophiles et hyphes entraîne une explosion respiratoire avec sécrétion de dérivés oxygénés actifs et dégranulation (85). A la différence de l'action des macrophages, les neutrophiles agissent rapidement en tuant 50% des hyphes en 2 heures (133).

La destruction des hyphes requiert des oxydants qui ne peuvent agir que parallèlement à l'action destructrice du contenu des granules des neutrophiles. Les enzymes responsables de la destruction de la paroi fongique n'ont pas été identifiées (84), cependant les hydrolases agissant sur les polysaccharides semblent jouer un rôle essentiel (46, 119).

Les mécanismes responsables des phénomènes oxydatifs tels que la lipoperoxydation, l'oxydation protéique et la dégradation de l'ADN ne sont pas déterminés.

1.4.2.1.3. Plaquettes.

Elles jouent aussi un rôle dans la protection contre *Aspergillus*. Elles se fixent sur la paroi des hyphes et sont activées au cours de leur fixation. Elles pourraient intervenir dans la défense de l'organisme directement par altération de la paroi fongique et en augmentant les effets fongicides des neutrophiles.

Une possible conséquence de cet effet serait l'aggravation de la thrombopénie déjà présente chez la plupart des patients à risque de développer une aspergillose invasive (84).

1.4.2.1.4. Composants humoraux.

Il n'y a pas beaucoup d'études sur l'interaction entre *A. fumigatus* et les constituants sériques. On note une augmentation du fibrinogène pendant les aspergilloses invasives et *A. fumigatus* peut se fixer sur le fibrinogène. Cependant son rôle dans l'invasion reste à élucider.

La C-réactive protéine, une protéine de la phase aiguë de l'infection dont le rôle est d'activer les protéines de la cascade du complément, peut se lier au champignon. D'autre part, le rôle du complément dans la défense contre *A. fumigatus* a été revu récemment (77). Ainsi, l'activation directe par la voie alterne et la fixation du C3 à la surface du champignon ont été démontrées.

1.4.2.2. Immunité acquise.

1.4.2.2.1. Immunité cellulaire lymphocytaire T.

Jusqu'ici, peu d'études ont porté sur l'immunité acquise engendrée par les infections dues à *Aspergillus sp.* Ces études ont été concentrées sur des modèles murins expérimentaux d'aspergillose invasive et d'aspergillose broncho-pulmonaire allergique.

Peu d'études concernent l'immunité cellulaire dans la réponse à l'aspergillose invasive.

Cependant il a été démontré sur modèle expérimental que la progression de la maladie est associée à une réponse de type Th2 (augmentation des taux d'IL4 et IL-10 et faible réponse IFN γ). Par contre une réponse immunitaire protectrice est associée à la présence de lymphocytes Th1 producteurs d'IFN γ et de macrophages producteurs d'IL-12 (réponse de type 1).

Les études expérimentales montrent clairement que dans les modèles d'infection à *A. fumigatus* la production des cytokines diffère selon qu'il s'agit d'une souris sensible ou résistante à l'infection (84).

1.4.2.2.2. Immunité protectrice.

Les lymphocytes T jouent un rôle central dans l'immunité protectrice même si les cellules effectrices et les mécanismes responsables ne sont pas clairement établis.

Le rôle des anticorps dans l'immunité protectrice n'a pas non plus été vraiment suffisamment étudié. Des transferts passifs d'anticorps chez la souris ne sont pas protecteurs (43). Cependant les patients qui survivent à une aspergillose invasive ont des anticorps vis à vis d'antigènes spécifiques d'*Aspergillus* (21). D'autres études sont nécessaires pour conclure.

1.4.3. Mécanisme d'action des molécules immunosuppressives.

1.4.3.1. Médicaments.

1.4.3.1.1. Corticoïdes

Au sein des drogues utilisées dans le traitement des patients à risque de développer une aspergillose invasive, les corticoïdes jouent un rôle majeur dans la progression de la maladie. Cependant leur rôle spécifique dans l'interaction entre *A. fumigatus* et le système immunitaire n'est pas très bien compris.

Schaffner et coll. (139) ont montré que le premier rôle des corticoïdes était d'altérer la fonction anti-conidienne des macrophages, permettant la germination des conidies à l'intérieur des macrophages et empêchant leur destruction. Plusieurs hypothèses ont été émises à ce sujet mais la cible réelle des glucocorticoïdes n'a pas encore été identifiée.

D'autre part, les corticoïdes empêchent le recrutement des polynucléaires neutrophiles et leur production de dérivés oxygénés en réponse à la présence d'hyphes aspergillaires (133).

1.4.3.1.2. Cyclosporine A.

A la différence des corticoïdes, la cyclosporine A ne supprime pas l'activité fongicide des polynucléaires neutrophiles et des macrophages alvéolaires (134).

Cependant, des études *in vitro* ont montré qu'elle pouvait induire une immunosuppression significative de la fonction phagocytaire antifongique, surtout en association avec les corticoïdes.

1.5. MANIFESTATIONS CLINIQUES DES FORMES PROFONDES.

La porte d'entrée des *Aspergillus* inclut le tractus respiratoire, la peau altérée ou d'autres plaies comme les plaies opératoires, la cornée et l'oreille. Les infections du tractus digestif surviendraient parfois, mais elles n'ont jamais été bien documentées.

Tableau I.5. Profils caractéristiques de l'aspergillose invasive selon les groupes de patients, d'après D. Denning (42).

Pathologie sous-jacente	Période de risque maximal	Sites typiques et caractéristiques (% des cas)	Commentaires
Leucémie aiguë; myélome multiple stade II/III; leucémie chronique en crise blastique ; anémie aplastique et traitement immunosuppresseur ; greffe de moelle autologue ou transplantation de cellules souches périphériques.	Pendant la phase d'induction de la chimiothérapie (75%) ; pendant le traitement de maintenance ou de consolidation (25%)	Poumon (80-90%) Sinus (5-10%) Cerveau (5-10%)	Haut risque d'hémorragie pour les lésions proches du hile du poumon
Greffe de moelle allogénique ou transplantation de cellules souches périphériques	Tôt au cours de la neutropénie (20-30%) ou tard (médiane 100 jours) surtout si rejet de greffe de stade II ou III (75%).	Poumon (80-90%) Sinus (5-10%) Dissémination incluant le cerveau (5-20%)	Pathologie souvent bilatérale, diffuse et de mauvais pronostic
Transplantation de foie	Variable dans les 4 semaines post-transplantation	Poumon, cerveau, plaie, infection disséminée	Diagnostic différentiel difficile
Transplantation de poumon	Variable	Sites en contact avec l'air, poumon, infection disséminée, cerveau	Distinction entre infection et colonisation difficile
Transplantation de cœur et rein	Variable souvent après traitement d'un rejet	Nodules pulmonaires apparaissant tardivement ou infection bilatérale disséminée.	Bon pronostic si diagnostic posé à temps
SIDA	Phase terminale souvent si neutropénie et/ou traitement par corticoïdes	Tous sites mais surtout cavités à parois fines ou épaisses dans le lobe supérieur et sites en contact avec l'air.	Présentation subaiguë souvent confondue avec tuberculose. Pronostic sombre, hémorragies fatales fréquentes (25%)
Granulomatose chronique	Variable au cours de la vie	Poumon (70%) Plèvre(20%) os (10) infection disséminée (10-15%)	Progression lente sous forme d'abcès froids.
Brûlés	Souvent dans les deux mois suivant les brûlures	Infection superficielle conduisant à la dissémination	Progresse en 5 à 10 jours vers le décès; traitement souvent inefficace et amputation parfois nécessaire

Parmi les infections, les aspergilloses respiratoires dominent à 80-90% (42). Cependant l'infection aspergillaire peut toucher tous les organes à la suite d'une contamination superficielle ou traumatique ou encore suite à une dissémination hématogène.

C'est l'immunité de l'hôte qui définit le type de manifestation clinique après pénétration de spores d'*Aspergillus*. Chez un sujet immunocompétent *Aspergillus* peut agir comme allergène ou causer des infections localisées dans les poumons ou les sinus.

Chez les patients neutropéniques, il y a une croissance extensive du champignon dans les poumons avec, souvent, dissémination à d'autres organes.

Parmi les infections du tractus respiratoire, nous décrivons essentiellement les aspergilloses pulmonaires invasives, et les formes disséminées.

1.5.1. Aspergillose pulmonaire invasive.

L'aspergillose pulmonaire invasive est une infection souvent sous-estimée. Une étude rétrospective de Vogeser et coll. (169) portant sur les rapports nécropsiques dans une étude réalisée en Allemagne, rapporte une incidence de décès de 4% dus à l'aspergillose invasive dont la moitié n'avait pas été suspectée durant la vie du patient.

Les présentations cliniques de l'aspergillose invasive varient en fonction du groupe de patients impliqués. Ce sont les patients le plus immunodéprimés qui ont le moins de symptômes et une progression de la maladie très rapide avec environ de 7 à 14 jours entre les premiers signes et le décès (42). Inversement, les patients le moins immunodéprimés ont une atteinte modérée avec une progression lente (environ 2 à 3 mois). Cependant, le profil classique de l'aspergillose pulmonaire invasive se présente chez un patient neutropénique ayant une fièvre persistante ou récurrente sous antibiotique à large spectre avec des infiltrats pulmonaires à la radiographie.

Le tableau I.5. (42) présente les principales caractéristiques des aspergilloses invasives selon le type de maladie sous-jacente.

Les aspergilloses pulmonaires invasives sont divisées en cinq groupes:

1. Bronchopneumonie aspergillaire.
2. Trachéo-bronchite nécrosante.
3. Sinusite invasive.
4. Aspergillose pulmonaire chronique nécrosante.
5. Aspergillose disséminée.

1.5.1.1. Broncho-pneumonie aspergillaire.

a. **Symptomatologie:** Environ 25 à 33% des patients n'ont pas de symptômes attribuables à la maladie initialement. Dès que la maladie progresse les symptômes apparaissent. Les manifestations cliniques, particulièrement chez les patients neutropéniques sont le reflet de la pathogenèse qui associe invasion des vaisseaux, thrombose et infarctus.

Les premiers symptômes sont la **toux sèche** et la **fièvre**. Cependant, les patients traités par des corticostéroïdes, n'ont souvent pas de fièvre. Ils ont par contre une douleur parfois située au niveau pleural mais qui est plus souvent sourde et non spécifique (42).

L'**hémoptysie** peut être observée mais n'est pas souvent une présentation classique. Chez les patients cancéreux deux profils ont été observés: le premier est un infarctus hémorragique dû à l'invasion vasculaire pendant la granulocytopenie. Le second était la formation d'un anévrisme mycotique pendant la sortie de neutropénie. Les polynucléaires neutrophiles envahissent les parois des vaisseaux provoquant la destruction des structures élastiques des vaisseaux pulmonaires et bronchiques. Ces anévrismes peuvent se rompre et entraîner une hémoptysie potentiellement fatale. En conséquence, la survenue d'une hémoptysie chez un patient granulopénique doit faire rechercher rapidement la présence d'*Aspergillus* dans le tractus respiratoire.

La **dyspnée** est plus fréquente chez les patients ayant une aspergillose diffuse. Chez certains patients, la forme clinique est apparentée à une embolie pulmonaire.

Chez les patients neutropéniques, le pneumothorax est rare alors qu'une douleur aiguë avec dyspnée est plus typique (42).

b. L'aspect radiologique n'est pas spécifique et il est très hétérogène. On note souvent la présence d'infiltrats alvéolaires ou d'opacités nodulaires. Cependant, cavitation et lésions cunéiformes à la base pleurale sont les plus typiques.

Les premières lésions apparaissent sous forme d'opacités nodulaires uniques ou multiples. Elles progressent rapidement vers une consolidation diffuse bilatérale ou une cavitation, ou vers de grandes lésions périphériques cunéiformes, représentant l'infarctus hémorragique. Cette dernière caractéristique suffit à évoquer l'aspergillose et est suffisante pour débiter un traitement (173).

Des ombres diffuses, souvent situées dans le lobe inférieur, sont également visibles. Un épanchement pleural est rarement observé. Dans le contexte d'une neutropénie, un pneumothorax est aussi très suggestif d'infection fongique invasive, aspergillose ou zygomycose. Pour les patients greffés d'organe solide, le diagnostic différentiel majeur d'une pathologie nodulaire est la nocardiose et/ou le lymphome. Dans ce cas l'obtention d'un lavage broncho-alvéolaire est essentiel au diagnostic (42).

Scanner thoracique: Dans 10% des cas d'aspergillose prouvée, la radiographie était normale la dernière semaine avant le décès du patient. Par contre, le scanner thoracique montre souvent des formations nodulaires chez les patients dont la radiographie est normale et c'est un outil diagnostique indispensable au diagnostic de l'aspergillose pulmonaire invasive (26, 149).

Chez les patients neutropéniques, les lésions précoces le plus caractéristiques sont de petits nodules et/ou de petites lésions situés à la base pleurale à angle droit et entourés d'une légère atténuation de densité en verre dépoli, constituant le signe du halo. Il peut n'y avoir qu'une lésion mais le plus souvent elles sont multiples avec parfois un nodule plus volumineux que les autres ou une pseudomasse périphérique isolée. Le signe du halo est donc un signe précoce qui précède le signe du grelot de deux à trois semaines (79).

Quand la maladie progresse, les nodules peuvent s'excaver (souvent lorsque le nombre de neutrophiles remonte), aboutissant au signe du grelot qui correspond à la présence d'un croissant aérien séparant le pôle supérieur de la masse fongique et nécrotique du pôle supérieur de la cavité. Cependant ce signe apparaît tardivement lors de la guérison de la granulopénie, soit deux à trois semaines après l'opacité initiale, au moment où le diagnostic a déjà été fait dans 50% des cas (53). Ces deux signes du halo et du croissant d'air (signe du grelot) sont très suggestifs d'aspergillose pulmonaire invasive, bien qu'ils puissent apparaître lors d'autres infections fongiques à tropisme vasculaire, comme la mucormycose et l'actinomycose, infections à *Trichosporon*, ou *Fusarium* et

plus rarement dans les infections à germes pyogènes telles que les infections à *Pseudomona sp.s* et *Klebsiella sp.* D'autre part l'existence d'une hémorragie peut masquer le grelot ce qui explique que cette image ne contribue au diagnostic que dans 1/3 des cas (53).

Dans une étude plus récente, l'**imagerie par résonance magnétique nucléaire (IRM)** compte tenu de son excellente capacité à détecter les hémorragies, est une aide au diagnostic pour l'identification précoce de l'aspergillose pulmonaire invasive en démontrant le caractère en cible des opacités nodulaires. Dans tous les cas, il existe une réaction inflammatoire périphérique apparaissant sur les séquences pondérées et prenant le contraste après injection intraveineuse de produit de contraste (66).

Il est à noter que les examens radiologiques tels que la tomodensitométrie est utilisée pour guider les gestes invasif parfois nécessaire pour confirmer le diagnostic.

c. Les anomalies histologiques et l'histoire naturelle de l'aspergillose invasive permettent de comprendre les signes radiologiques et tomodensitométriques (67). Elles sont caractérisées par des infarctus hémorragiques pulmonaires secondaires à un envahissement vasculaire par le champignon responsable directement de thrombose vasculaire. Macroscopiquement les nodules sont des lésions en cible composées d'un centre gris contenant de la nécrose et des champignons, entourés d'infarctus hémorragique.

d. Pronostic: Le pronostic des atteintes focales et en particulier de type nodulaire, est plus favorable que les atteintes diffuses qui ont tendance à progresser plus lentement (42). En effet, la résection est une option thérapeutique possible pour les atteintes focales mais ne l'est pas dans les atteintes diffuses bilatérales ou extensives. Le plus grand problème pour les patients ayant une atteinte focale est la survenue incontrôlable d'hémoptysies parfois fatales.

e. Envahissement des structures intra-thoraciques. L'aspergillose pulmonaire invasive n'est pas contenue à l'intérieur du parenchyme pulmonaire par des barrières anatomiques. Ainsi, les champignons peuvent par contiguïté se propager de la plèvre à l'espace pleural, les muscles inter-

costaux, les côtes et le péricarde. L'invasion peut continuer ensuite vers l'épicarde et le myocarde, causant un infarctus myocardique (172).

Ces manifestations ne sont pas caractéristiques d'une infection aspergillaire et peuvent survenir également avec d'autres champignons opportunistes capables d'envahir la paroi des vaisseaux tels que *Pseudallescheria boydii*, *Fusarium sp.*, et les champignons du groupe des Zygomycètes (173).

1.5.1.2. Trachéo-bronchite nécrosante

Ce type d'infection aspergillaire est proportionnellement plus fréquent chez les patients atteints de SIDA et chez les transplantés d'organe que dans les autres immunodépressions. Cependant dans environ 25% des cas, les patients ne sont apparemment pas immunodéprimés (42).

La pathologie s'étend de la trachéo-bronchite modérée avec excès de production de mucus et inflammation, à la trachéo-bronchite ulcérée avec présence d'ulcères souvent positionnés autour du pli de suture chez les transplantés de poumon. La distinction entre infection et colonisation est dans ce cas parfois difficile.

a. Symptomatologie: Environ 80% des patients ont des symptômes, même si ceux-ci sont modérés ou peuvent être attribuables à un phénomène de rejet.

Ces symptômes incluent toux, fièvre et dyspnée, douleurs thoraciques et hémoptysie.

Beaucoup de patients meurent d'insuffisance respiratoire suite à une occlusion pulmonaire. D'autres développent une aspergillose disséminée dans les derniers jours de leur vie.

b. Aspect radiologique: Les radiographies pulmonaires sont normales au début de la maladie mais des condensations apparaissent ensuite.

Le scanner thoracique fait apparaître des condensations péri-bronchiales et des nodules centro-lobulaires.

c. Diagnostic. La bronchoscopie avec biopsie, examen cytologique et culture fongique sont le seul moyen permettant de poser le diagnostic. Le traitement à base de dérivés azolés semble meilleur que les traitements utilisant l'amphotéricine B (78).

1.5.1.3. Sinusite aspergillaire invasive.

L'aspergillose est l'infection fongique la plus courante en ce qui concerne les sinus para-nasaux. La plupart des patients qui ont développé une sinusite aspergillaire n'avaient pas de maladie sous-jacente. Sur 20 cas d'aspergillose orbitale, seul un patient était diabétique (156). Il y a seulement quelques cas publiés concernant des patients diabétiques ou leucémiques ayant développé une aspergillose sinusale (124). Le développement de la maladie est fulminant chez les patients immunodéprimés: le taux de mortalité est de 100% chez les patients greffés de moelle.

Le nez et les sinus para-nasaux possèdent des facteurs locaux prédisposants aux infections fongiques, incluant la présence de polypes, des infections bactériennes répétées et une rhinite chronique avec stagnation de sécrétions nasales. Certains auteurs ont suggéré que l'occlusion de l'ostium nasal des sinus créait une atmosphère anaérobie favorable au développement de la pathogénicité d'*Aspergillus sp.* D'autres rapports mettent en doute ce concept arguant que les infections aspergillaires se développent en général dans des sites bien aérés tels que les bronches et le conduit auditif. D'autres facteurs favorisants sont une antibiothérapie prolongée pour le traitement d'une sinusite et l'utilisation plus importante d'antibiotiques et d'immunosuppresseurs.

On distingue trois formes de sinusite invasive: rhinosinusite invasive aiguë et deux formes chroniques: sinusite invasive chronique et sa variante le granulome aspergillaire para-nasal, que l'on rencontre sous les tropiques (104). *Aspergillus flavus* est proportionnellement l'espèce le plus souvent isolée de ces lésions.

a. Rhinosinusite aspergillaire invasive aiguë.

Cette forme est une manifestation relativement fréquente de d'aspergillose invasive chez les patients neutropéniques et les transplantés de moelle. Elle est peu fréquente chez les transplantés d'organe solide.

La présentation clinique est similaire à celle de la mucor-mycose rhino-cérébrale. Les symptômes les plus fréquents incluent **fièvre, toux, épistaxis et maux de tête**. La sinusite aspergillaire invasive est parfois la seule manifestation de l'aspergillose invasive et l'extension aux structures adjacentes telles que le palais, l'orbite ou le cerveau est fréquente et, en général, rapide. La sinusite invasive peut se développer simultanément à une aspergillose pulmonaire invasive (42).

Diagnostic: seuls scanner et IRM ont utiles dans le diagnostic et peuvent permettre de faire la distinction entre sinusite bactérienne et fongique. Les arguments de certitude sont apportés par une culture (écouvillonnage nasal ou ponction de sinus) positive pour *Aspergillus* et la présence de filaments dans les tissus.

Un **traitement** médicamenteux à base d'amphotéricine B semble être supérieur à l'administration d'itraconazole. Le curetage chirurgical apporte parfois une amélioration. Cependant, chez les patients immunodéprimés la chirurgie est parfois associée à des complications majeures (39) et ne semble pas offrir de meilleur pronostic par rapport au traitement antifongique seul (43).

L'**évolution** est en général marquée par une première réponse au traitement suivi de rechutes. Si l'on n'arrive pas à juguler l'infection, l'invasion des structures adjacentes conduit rapidement au décès.

b. Sinusite invasive chronique.

Cette forme touche les patients en apparence non immunodéprimés. Certains sont cependant diabétiques, alcooliques ou atteints de SIDA (42).

La **présentation clinique** ne peut être différenciée d'autres étiologies fongiques. Au début de la maladie, les symptômes sont difficiles à distinguer d'une simple colonisation des sinus par le champignon et dans ce cas seules les radiographies et l'étude histologique permettent de poser le diagnostic. Au cours de l'évolution de la maladie qui s'opère en général sur plusieurs mois, on note la présence de symptômes visuels comme la diplopie, cécité unilatérale, douleur oculaires et prolapsus. Les céphalées, perte ou diminution de l'odorat sont aussi fréquentes. La fièvre est toujours absente.

Diagnostic. L'invasion de la muqueuse et des tissus par des hyphes est caractéristique de cette maladie, mais les filaments mycéliens comme dans les autres formes chroniques sont très rares. Les cultures sont en général positives mais nécessitent parfois de multiples prélèvements.

Les **caractéristiques radiologiques** sont identiques à celle de la forme aiguë. A noter que la destruction osseuse peut être observée sans invasion fongique. Elle serait due à un phénomène de pression ou à la production locale de toxine.

L'atteinte du sinus sphénoïde est à mentionner particulièrement à cause de ses fréquentes complications telles que perturbation visuelle majeure, abcès cérébral et décès dus à l'atteinte de la carotide. Environ 10% des infections du sinus sphénoïde sont dues à *Aspergillus sp.*

Traitement. Dans les deux formes de sinusite chronique invasive, le débridement chirurgical suivi par une longue cure d'antifongiques sont nécessaires. Chronicité et rechutes fréquentes caractérisent cette maladie.

1.5.1.4. Aspergillose pulmonaire chronique nécrosante.

Cette forme est également désignée par le terme d'aspergillose pulmonaire semi-invasive. Elle est moins commune que la forme pulmonaire invasive.

Lorsque les défenses immunitaires conservent une certaine efficacité, l'atteinte pulmonaire est limitée et prend une évolution chronique. La plupart des patients ont entre 40 et 75 ans et l'évolution est souvent favorable après traitement (42).

a. Facteurs favorisants: Ce sont l'alcoolisme, le diabète, la prise de corticoïdes au long cours pour des maladies chroniques tels que la sarcoïdose, un état de débilité, des cancers pulmonaires, le SIDA. Cependant beaucoup de patients n'ont pas de facteur de risque.

b. Symptomatologie: Elle s'étend sur de longs mois et ressemble un peu à celle de l'aspergillome: une toux chronique productive accompagnée d'hémoptysies modérées. Des malaises et une perte de poids sont fréquents. La fièvre est présente de façon occasionnelle et est en général peu élevée.

c. Radiologie: Les images montrent des lésions nodulaires généralement uniques. Quelquefois, il s'agit de lésions occupant une cavité cancéreuse résiduelle et il est parfois difficile de faire la distinction avec l'aspergillome si l'on ne dispose pas de clichés antérieurs.

d. Histologie. Le diagnostic définitif est posé par la mise en évidence de filaments sur coupes tissulaires avec culture positive pour *Aspergillus*. Cependant, les filaments sont souvent rares et l'on peut ne trouver que des granulomes sur coupe histologique en association avec une culture positive. Différents profils histologiques ont été décrits tels que la pneumonie granulomateuse angio-invasive nécrosante, cavité granulomateuse bronchectatique et granulomatose bronchocentrique.

e. Diagnostic biologique. Ces patients ont des anticorps (précipitines) anti-aspergillaires à taux élevés ce qui permet d'orienter le diagnostic (42).

1.5.2. Aspergillose disséminée.

Elle résulte de la dissémination des spores par voie hématogène.

1.5.2.1. Aspergillose généralisée

La plupart des cas s'observent chez les patients atteints de leucémie aiguë ou d'autres hémopathies ou chez les patients transplantés d'organe. Dans cette population environ 30 à 40% des patients développent une aspergillose disséminée suite à une aspergillose pulmonaire invasive (18). A peu près tous les organes peuvent être touchés, cependant, le cerveau est le plus fréquemment atteint (50 à 60%), suivi par le tractus gastro-intestinal (40 à 50%). Viennent ensuite les reins (30%) le foie (30%) la thyroïde (25%) le cœur (15%) et la rate (15%). L'espèce la plus fréquemment isolée est *A. fumigatus*.

Les autopsies de patients atteints d'aspergillose pulmonaire invasive montrent que beaucoup d'entre eux ont en fait des formes disséminées (169). La dissémination est souvent suspectée, mais rarement prouvée avant l'autopsie, sauf en cas d'aspergillose cérébrale ou cutanée. Ictère et

coagulation intra-vasculaire disséminée sont souvent observés dans les stades terminaux de la maladie sans que l'on en connaisse les raisons précises (42).

Dans la majorité des cas, les signes cliniques majeurs sont liés à l'infection pulmonaire et l'infection des autres organes est asymptomatique.

Les aspergilloses disséminées ont un taux de mortalité particulièrement élevé, cependant, certains patients sous antifongiques et dont les défenses immunitaires sont restaurées, peuvent guérir (19).

Nous ne décrivons que les deux formes le plus fréquentes, aspergillose cérébrale et aspergillose gastro-intestinale.

1.5.2.2. Aspergillose cérébrale.

L'atteinte cérébrale peut résulter de l'extension d'un foyer sinusal mais, le plus souvent, elle est consécutive à une dissémination hémotogène.

La présentation clinique et l'évolution de la maladie dépendent du statut immun du patient. En effet, les patients le plus immunodéprimés ont des signes cliniques modérés, alors que ceux qui le sont moins, ont tendance à présenter une symptomatologie qui associe des déficits neurologiques focaux tels qu'hémiplégie, paralysie du nerf crânien. Un déficit progressif du système nerveux central est parfois observé.

Cinq types de manifestations peuvent être observées: méningite, méningo-encéphalite, abcès cérébraux multiples ou abcès unique, et granulome isolé.

Sur le scanner cérébral, on distingue des lésions hypodenses bien délimitées qui sont uniques ou multiples et qui correspondent à des abcès, souvent situés dans des zones d'infarctus. Ces lésions sont en général profondes et peu accessibles.

Le diagnostic définitif nécessite une biopsie ou aspiration de la lésion; cependant l'état du patient empêche parfois de telles investigations. La présence d'autres sites infectés par *Aspergillus* est importante dans l'orientation du diagnostic.

Chez les patients transplantés de moelle, les abcès cérébraux sont dus à *Aspergillus* dans 50% des cas, 25% des cas étant dus à *Candida sp.* (59).

1.5.2.3. Aspergillose digestive.

L'œsophage est le site le plus fréquemment atteint au sein du tractus digestif. L'infection peut se manifester par une œsophagite ulcérate avec formation de pseudo-membranes et abcès. Les muscles adjacents sont souvent profondément envahis. Le gros intestin est l'autre site digestif fréquemment infecté. Les lésions gastro-intestinales peuvent causer perforation ou hémorragie massive et l'invasion des tissus adjacents n'est pas rare (18).

1.6. DIAGNOSTIC BIOLOGIQUE DES ASPERGILLOSES INVASIVES.

1.6.1. Paramètres biologiques.

Le nombre de leucocytes est souvent normal de même que le bilan chimique. Des chiffres élevés de bilirubine et lactate deshydrogénase sont parfois retrouvés mais ne sont pas spécifiques. Une anomalie de la coagulation est parfois observée. Le taux de fibrinogène est classiquement élevé chez les patients neutropéniques ayant une leucémie aiguë et ne constitue pas un bon marqueur d'infection dans ce cas.

Les taux de protéine C réactive sont plus souvent élevés mais ce facteur n'est pas un marqueur spécifique.

Plus récemment, l'élévation de la procalcitonine a été proposée comme marqueur d'infection. Mais elle ne permet pas de distinguer entre infection bactérienne ou fongique et semble moins élevée que les taux de protéine C réactive dans les aspergilloses invasives (14).

1.6.2. Diagnostic mycologique.

1.6.2.1. Limites.

Aspergillus étant un saprophyte de l'environnement, son isolement dans les milieux de culture ne permet pas de distinguer une infection d'une colonisation ou d'une contamination de laboratoire. L'isolement d'*Aspergillus* chez un patient immunodéprimé doit cependant toujours être prise en compte.

Une aspergillose invasive doit être prouvée par la présence de filaments mycéliens sur coupe histologique d'un prélèvement biopsique. Cela n'est pas toujours possible du vivant du patient à cause du risque hémorragique qui contre-indique les prélèvements invasifs.

1.6.2.2. Nature du prélèvement.

La nature du prélèvement dépendra du site de l'infection, des manifestations cliniques et des résultats des investigations radiologiques, enfin de la maladie sous-jacente et de l'état du patient. Les difficultés diagnostiques de l'aspergillose invasive, conduisent les cliniciens à utiliser des méthodes de plus en plus invasives. S'il est acquis que la biopsie sous thoracotomie constitue le « gold standard », il est bien évident que ceci doit être contrebalancé par le risque d'aggravation de l'état souvent fragile du patient à risque d'aspergillose.

1.6.2.2.1. Prélèvements broncho-pulmonaires.

Les **prélèvements non-invasifs** tels que sécrétions nasales, trachéales, expectorations ont une sensibilité faible. De rares études affirment l'intérêt diagnostique de l'écouvillonnage nasal rapportant 56 % de sensibilité (3).

Les études réalisées sur la valeur de l'expectoration sont convergentes:

*la plupart des patients atteints d'aspergillose invasive n'expectorent pas d'*Aspergillus* (sensibilité de 8 à 48% selon les auteurs).

Tableau I.6. Efficacité des différents types de prélèvements pour le diagnostic d'une aspergillose pulmonaire invasive D'après Kappe R. et Rimek D. (74).

Echantillon	Efficacité en terme de diagnostic (%)*
Frottis buccal	2
Frottis oropharyngé	5
Lavage buccal	5
Salive	5
Expectoration	30
Sécrétions trachéales	35
Aspiration bronchique	40
Lavage broncho-alvéolaire	50
Biopsie trans-bronchique	60
Biopsie trans-thoracique	70
Biopsie après thoracotomie	80
	*estimation pour toutes les techniques de laboratoire.

Tableau I.7. Efficacité des techniques de détection sur prélèvement pulmonaire dans le diagnostic d'une aspergillose pulmonaire invasive. D'après Kappe R. et Rimek D. (74).

Technique utilisée	Efficacité (%)*
Examen direct non coloré	15
Gram	10
Calcofluor	25
Gomori-Grocott	25
Culture en milieu solide	40
Culture en milieu liquide	35
Détection d'antigène	25
Détection d'anticorps	non applicable
Amplification nucléique	35
	* estimé pour tous les types de prélèvement.

*l'isolement d'un *Aspergillus* même une seule fois chez un patient neutropénique présente une excellente valeur prédictive d'une maladie invasive mais n'a aucune valeur chez un patient non immunodéprimé (jusqu'à 16 % d'isolement en dehors de toute infection aspergillaire (56).

*la positivité de la culture est tardive (6 à 15 jours après l'apparition des signes radiologiques).

Les **examens pratiqués sous fibroscopie bronchique** présentent une réelle valeur dans le diagnostic de l'aspergillose invasive. Le lavage broncho-alvéolaire reste le meilleur prélèvement qui permet dans plus de 60% des cas d'isoler le champignon (71, 126).

De plus, il permet la recherche d'autres agents étiologiques (viraux, bactériens et fongiques). Par ailleurs, divers facteurs influencent la qualité des résultats comme l'expérience du fibroscopiste, la technique utilisée et l'expérience du laboratoire.

En matière de spécificité, la présence d'hyphes à l'examen direct présente une très haute valeur diagnostique, de même qu'une culture positive chez un patient neutropénique, même si l'examen direct est négatif.

Les **biopsies pulmonaires** sont beaucoup plus sensibles mais elles ne résolvent pas toutes les difficultés. En effet, leur qualité dépend essentiellement de la possibilité de prélever une quantité suffisante de parenchyme au sein d'une lésion signalée par imagerie. Ceci explique les grandes variations de performances décrites dans la littérature: ponction transtrachéale (faible sensibilité), ponction-aspiration trans-pariétale (peu utilisée à cause des risques importants de complication), biopsie transbronchique (sensibilité, 18-59%), biopsie transthoracique à l'aiguille (sensibilité, 53%), biopsie après thoracotomie (sensibilité, 94%) (56).

D'autres auteurs ont publié un tableau similaire de rendement croissant des différents prélèvements pour le diagnostic d'une aspergillose pulmonaire invasive (Tableau I.6 et I.7) (73).

Pratiquement pour les lésions pulmonaires périphériques et focales, le prélèvement de choix est la ponction à l'aiguille ou la lésion elle-même, en cas de résection. Pour les lésions multifocales bilatérales, le meilleur prélèvement sera le lavage broncho-alvéolaire (42).

1.6.2.2.2. Prélèvements extra-pulmonaires.

Nous insisterons seulement sur les prélèvements cérébraux et les hémocultures. La dissémination de l'infection survient dans 20 à 40% des cas d'aspergillose invasive et le cerveau est après le poumon le second organe touché (15% des cas d'après des données autopsiques) (19). Les seules possibilités diagnostiques sont la **biopsie cérébrale** et le **liquide céphalo-rachidien**. Cependant, ce dernier reste stérile dans presque la totalité des cas. Les techniques de biologie moléculaire modifieront peut-être cette faible sensibilité des cultures, mais, pour le moment, peu de données sont disponibles.

Les **hémocultures** restent en général presque constamment négatives, quelque soit le type d'infection et quelque soit le milieu de culture utilisé. Même le système Isolator[®] (Wampole, USA) fondé sur la lyse-centrifugation du sang et repiquage sur milieux de culture, qui a permis d'améliorer la sensibilité de détection des *Candida sp.* de 30 à 60-90% dans le cas de candidose invasive, ne permet pas d'isoler les *Aspergillus* dans le sang (41).

1.6.2.3. Mise en culture.

Tous les prélèvements adressés au laboratoire dans un contexte de suspicion d'aspergillose doivent faire l'objet d'un examen microscopique direct et d'une mise en culture.

Une étape préalable de concentration (centrifugation, cyto-centrifugation) est nécessaire quand il s'agit de prélèvements liquides car les filaments mycéliens peuvent être très rares.

1.6.2.3.1. Examen microscopique.

Celui-ci peut se pratiquer à frais ou après coloration de frottis ou d'appositions.

Les colorants utilisés en microbiologie tels que le Gram et Giemsa sont utilisables mais non recommandés, car la lecture est plus difficile et la visualisation des hyphes peut être extrêmement aléatoire.

Deux types de colorations sont conseillées pour la visualisation des éléments fongiques: tout d'abord la coloration de **Gomori-Grocott**, largement utilisée en histologie, qui est une

imprégnation argentique par fixation sur les polysaccharides de la paroi fongique (57). Cette coloration permet de colorer la paroi des éléments fongiques en noir ou brun sur un fond vert mais ne permet pas de distinguer les éléments non fongiques de la préparation. La lecture est rapide et est très aisée pour un œil exercé.

Plus récemment l'utilisation de **Calcofluor**, un fluorochrome qui se fixe aux polysaccharides liés en $\beta(1-3)$ et plus spécifiquement à la chitine de la paroi fongique, permet de visualiser les éléments fongiques par une fluorescence bleutée. Ainsi la réponse peut être très rapide car le colorant peut être utilisé directement sur le prélèvement à frais.

La présence d'hyphes à l'examen direct présente une très haute valeur diagnostique mais ne permet pas de préciser l'espèce fongique incriminée.

1.6.2.3.2. Culture.

Les *Aspergillus* poussent sur tous les milieux de bactériologie mais il est préférable d'utiliser les milieux spécifiques tels que le milieu de Sabouraud additionné d'antibiotiques (chloramphénicol ou gentamicine).

L'incubation se fait à 35°C, et le plus souvent les cultures sont interprétables après 24 à 48 heures. Il est parfois nécessaire de prolonger la culture pendant une semaine si le patient est sous traitement.

Le repiquage sur des milieux pauvres tels que la gélose au malt ou milieu de Czapek favorise la fructification et l'aspect macroscopique est plus caractéristique.

L'identification des espèces se fait selon les critères macroscopiques et microscopiques que nous avons décrits dans les paragraphes précédents. L'association de deux espèces est rare mais possible.

L'isolement d'*Aspergillus* dans une expectoration est plus convaincante si on isole plusieurs fois le champignon au niveau du même site, ou si la quantité de colonies sur les boîtes est importante. Cependant le plus souvent le nombre de colonies est faible même dans le cas d'une aspergillose invasive et n'est pas toujours corrélée avec la gravité de l'infection.

Aspergillus est isolé très rarement du sang, des urines ou du liquide céphalo-rachidien.

Photo I.8. Coupe histologique de filaments mycéliens d'*Aspergillus sp.* colorés à l'HES hématoxyline-éosine-safran d'après Badillet et coll. (11).

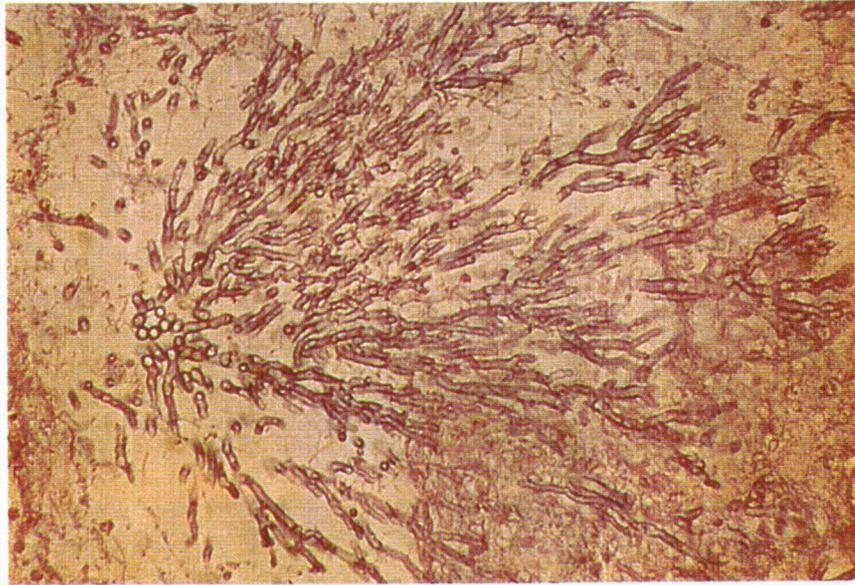
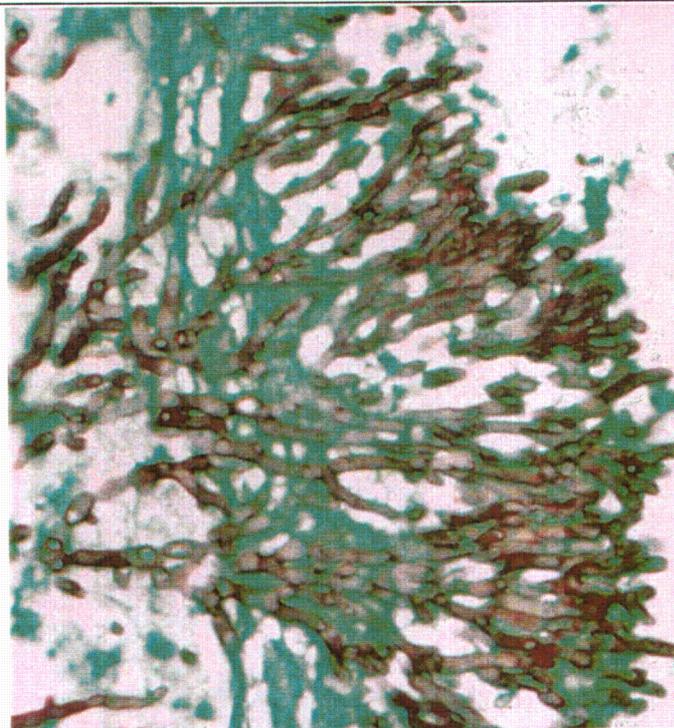


Photo I.9. Coupe histologique d'aspergillose invasive colorée au Grocott d'après Chandler et coll (28).



1.6.2.3.3. Antifongigrammes.

Les antifongigrammes des champignons filamenteux ne sont pas réalisés en routine.

Les seules méthodes disponibles pour réaliser les antifongigrammes sont la méthode de référence NCCLS document M38-P (114) et la méthode E-test[®], technique de diffusion en gélose utilisant des languettes imprégnées d'antifongique (ou d'antibiotique) selon un mode exponentiel et donnant directement la concentration minimale inhibitrice (CMI). La méthode NCCLS peut être réalisée soit en microdilution dans des plaques de microtitration, soit en macrodilution dans des tubes avec une préférence pour la première qui est plus facile à mettre en œuvre.

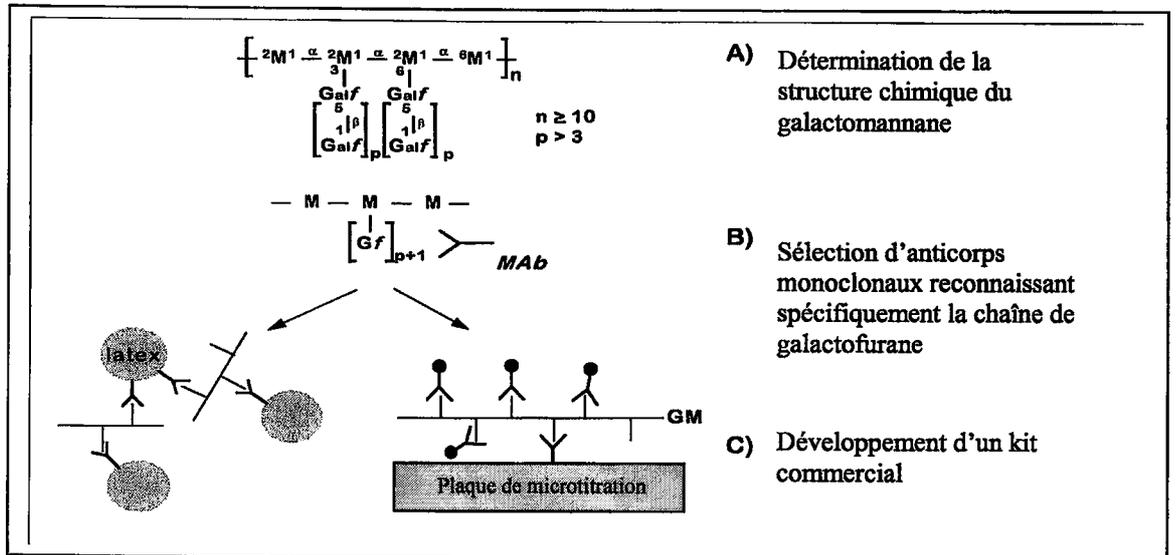
Le gros avantage de la technique E-test[®] est sa facilité d'utilisation, cependant la corrélation *in vitro-in vivo* n'a pas encore été établie et les CMI critiques ne sont pas encore fixées. A l'heure actuelle, il semble cependant que la mise sous itraconazole, antifongique azolé, nécessite de tester la sensibilité antifongique au préalable. En effet, Denning et coll. (40) ont mis en évidence une corrélation *in vitro-in vivo* en ce qui concerne des souches itraconazole-résistantes.

1.6.3. Diagnostic histologique.

L'histopathologie permet de visualiser après colorations spéciales, les hyphes aspergillaires au sein de la réaction cellulaire. Les colorations standards (hématoxylline-éosine-safran, acide périodique de Schiff (PAS)) sont utilisées de façon à visualiser la réaction cellulaire. Il faut noter que la coloration de PAS ne colore pas toujours les filaments mycéliens et ne doit jamais être utilisée seule. Des colorations fongiques plus spécifiques sont absolument nécessaires à la visualisation des éléments fongiques. Pour cela, on utilise en général le Gomori-Grocott (Grocott), en association ou non avec des colorations immunohistochimiques (immunoperoxydase).

Avec la coloration de Gomori-Grocott, les filaments apparaissent au sein de tissus nécrosés et présentent typiquement des ramifications dichotomiques à 45°C qui sont toutes dirigées dans la même direction (Photos I.8 et I.9). Cependant, d'autres champignons peuvent donner les mêmes images (*Fusarium*, *Scedosporium*), et en aucun cas on ne peut affirmer la présence d'un *Aspergillus* sur base d'un examen histopathologique.

Figure I.8. Représentation schématique des étapes nécessaires au développement d'un test diagnostique d'après J.P. Latgé (84).



Pour pallier à cet inconvénient, des réactions d'immunohistochimiques sont utilisées. Hélas, elles donnent des réactions croisées et ne sont pas fiables à 100% (9).

La culture reste essentielle pour affirmer l'origine aspergillaire d'hyphes vus à l'examen microscopique.

1.6.4. Diagnostic sérologique.

1.6.4.1. Détection d'antigènes circulants.

1.6.4.1.1. Galactomannane.

A l'heure actuelle seule la détection du galactomannane circulant fait l'objet d'un test commercialisé en Europe.

Deux types de méthodologies ont été appliquées à la détection du galactomannane circulant. Le premier test commercialisé pour la détection du galactomannane dans les liquides biologiques est un test d'agglutination en latex (Pastorex® *Aspergillus*, Biorad) dont la sensibilité est de 15ng/ml (61, 91). Une seconde technique utilisant le même anticorps monoclonal (EB-A2) comme capteur et détecteur a été développée plus récemment sous forme d'une technique immuno-enzymatique de type sandwich ELISA (Platelia® *Aspergillus*, Biorad) dont la sensibilité est de 1 ng/ml (151) (Figure I. 8). Ce test peut être réalisé sur différents milieux biologiques tels que le sérum, le lavage broncho-alvéolaire, le liquide céphalo-rachidien et les urines.

Sensibilité-spécificité. Ces deux kits ont été évalués sur des populations de patients atteints d'hémopathies et le plus souvent, dans le sérum. Le premier test au latex est très spécifique mais trop peu sensible avec des chiffres variant selon les auteurs de 38 à 71% et de 86 à 95% pour la spécificité (95, 165).

Des études récentes ont montré pour le test ELISA une sensibilité supérieure à 90% et une spécificité variant de 71 à 95% selon les auteurs (91, 93, 132, 165). La spécificité du test peut être augmentée de 71 à 84% si un test est déclaré positif quand il est confirmé par un second sérum

positif (165). Il est maintenant admis qu'un test galactomannane positif doit être confirmé par un second test positif pour être pris en compte. En effet, l'augmentation de la sensibilité des techniques engendrent une augmentation des faux positifs qui peut atteindre jusqu'à 8% pour le test ELISA (93, 151, 165).

Délai de positivité. La détection du galactomannane en ELISA précède de 2 à 3 semaines le test au latex (61, 132, 165).

Chez certains patients la détection précède la symptomatologie de quelques jours, voire de quelques semaines (23, 93, 155) et ces études montrent que l'on peut contrôler l'infection si l'on traite à ce stade.

Un autre avantage de l'ELISA est la possibilité de quantifier la présence de galactomannane et de suivre l'efficacité du traitement en fonction du taux détecté (23, 132).

Chez un patient atteint d'aspergillose invasive, la détection du galactomannane reste constamment positive après le premier résultat positif et les taux les plus élevés sont détectés au stade terminal de la maladie (en l'absence ou échec du traitement) (84). Il a été montré que la clairance de l'antigénémie était associée à une évolution favorable du patient, de même que la persistance de taux élevés s'accompagnait en général d'une évolution mortelle (122).

A l'heure actuelle la détection du galactomannane sérique en ELISA est la technique la plus sensible dans le diagnostic des aspergilloses invasives ainsi que le montrent plusieurs études européennes avec des reproductibilités intra et inter-laboratoire relativement bonnes (23, 132, 152, 156, 167, 168). La place des techniques de biologie moléculaire reste encore à déterminer dans cette indication.

Autres milieux biologiques: Le galactomannane est présent dans les urines à des concentrations plus basses que dans le sérum, c'est à dire de l'ordre 0.5 ng/ml (151). De plus, la sécrétion urinaire est inconstante et n'est jamais plus précoce que dans le sérum (83, 151).

La détection du galactomannane dans les **lavages broncho-alvéolaires** est plus précoce que la détection sérique, cependant ce type de prélèvement n'est pas toujours facile à réaliser. Ainsi la détection du GM dans les urines et le LBA peut être réalisée après la détection sérique, par exemple pour confirmer un résultat sérique positif (84).

Malgré les progrès réalisés, le diagnostic d'aspergillose invasive par détection d'antigène circulant doit encore être amélioré: soit en augmentant la sensibilité des techniques, soit en mettant au point des tests utilisant d'autres antigènes sécrétés en plus grandes concentrations que le galactomannane.

1.6.4.1.2. β 1-3 glucan.

Le β 1-3 glucan est un antigène de la paroi d'*Aspergillus* que l'on peut également utiliser à visée diagnostique (116). Un test colorimétrique, Fungitec G Test M K (Seikagaku Kogyo Co. Ltd., Tokyo, Japon), permettant de détecter cet antigène est largement utilisé au Japon (Wako Pure chemical Industries, Osaka, Japan), mais n'est pas commercialisé en Europe. La sensibilité du test est de l'ordre du picogramme. Les faibles quantités de β 1-3 glucan détectées dans le sérum peuvent s'expliquer par le fait que cet antigène est un composant intégral de la paroi fongique et contrairement au galactomannane n'est pas relargué dans les liquides biologiques. Une comparaison récente avec la détection de galactomannane en ELISA montre une meilleure sensibilité pour le β 1-3 glucan avec 68% contre 57% pour l'ELISA (72).

Cependant, il faut noter que ce test ne permet pas de distinguer les infections fongiques entre elles ce qui le rend moins spécifique et plus difficile à interpréter que le galactomannane. De plus des faux positifs ont été rapportés chez des patients après chirurgie ou hémodialyse, ce qui rend l'interprétation délicate (112).

1.6.4.2. Détection d'anticorps.

La détection d'anticorps anti-*Aspergillus* présente comme indication majeure le diagnostic d'aspergillome et d'aspergillose bronchopulmonaire allergique, deux formes observées chez les patients immunocompétents. Parmi la vingtaine de tests développés, les deux tests le plus souvent utilisés en routine sont l'immunodiffusion et la contre-immunoélectrosynérèse avec recherche de deux précipitines majeures, catalase et chymotrypsine (83). En effet, ce sont deux tests peu

coûteux, faciles à mettre en œuvre et suffisamment peu sensibles pour ne pas détecter les anticorps présents chez les patients en bonne santé. Ils ont l'inconvénient d'être peu standardisés, car les antigènes utilisés sont des extraits bruts. Des tests immunoenzymatiques plus sensibles sont en cours de développement avec comme limite la difficulté d'obtenir de grandes quantités d'antigènes purifiés. Par ailleurs, l'utilisation de techniques plus sensibles présente l'inconvénient de détecter des anticorps chez les patients normaux particulièrement exposés à un risque aspergillaire ou atteints de mucoviscidose.

La détection d'anticorps présente peu d'intérêt chez les patients neutropéniques parce que ces patients sont incapables de produire une élévation des taux d'anticorps en réponse à l'infection et la mesure des titres ne permet pas de distinguer entre colonisation, et infection invasive. De plus, il y a toujours un délai entre l'infection et la production d'anticorps, réduisant la valeur de ces tests par manque de précocité chez ceux qui peuvent développer une réponse anticorps (41). Chez les patients transplantés d'organe solide, il a été montré que 84% parmi ceux qui développent une infection invasive présentent des anticorps anti-aspergillaires. Cependant chez certains patients les titres étaient retombés à la normale au moment de l'apparition des signes cliniques (162). Dans une étude portant sur 4 patients transplantés pulmonaires, les titres des IgG étaient augmentés soit 1 à 2 semaines avant les signes radiologiques évocateurs, soit de façon concomitante au diagnostic cytologique ou microbiologique (161). Cependant, ce type de diagnostic nécessite des prélèvements répétés de façon à mettre en évidence l'augmentation des titres.

Au total, les différentes études rapportent une sensibilité très faible de 10 à 39% (44, 73, 95) ou même une absence de réponse détectable dans une étude réalisée chez des patients atteints de leucémie (179). La présence d'anticorps chez les patients neutropéniques correspond à des anticorps produits avant l'immunosuppression. Une élévation du titre des anticorps à la fin de l'immunosuppression serait signe d'une évolution vers la guérison, alors que l'absence ou la diminution du titre d'anticorps signeraient plutôt une évolution péjorative (84).

En conclusion, on peut dire que la détection d'anticorps n'a pas d'intérêt dans le diagnostic précoce de l'aspergillose invasive chez les patients neutropéniques. Il peut cependant être utilisé dans cette indication comme test diagnostique complémentaire chez les transplantés d'organe solide.

1.6.5. Biologie moléculaire.

1.6.5.1. Introduction.

Les techniques d'amplification des acides nucléiques présentent beaucoup d'avantages par rapport aux techniques classiques de diagnostic biologique. Elles sont plus sensibles, plus spécifiques et plus rapides surtout quand il s'agit de microorganismes dont la culture requiert plusieurs jours. C'est pour toutes ces raisons qu'elles tiennent de plus en plus de place dans le diagnostic biologique des maladies infectieuses.

Cependant, leur utilité dans le diagnostic des aspergilloses est encore mal définie. Plusieurs raisons permettent de l'expliquer: les *Aspergillus* sont ubiquitaires et entraînent souvent des problèmes de contamination. L'extraction de l'ADN n'est pas très facile du fait de la complexité de la paroi fongique. Le génome d'*Aspergillus fumigatus*, espèce majoritaire, n'est pas complètement séquencé et les facteurs de virulence ne sont pas clairement définis.

Toutes ces raisons conduisent à un retard dans les études cliniques et parfois à des divergences dans les résultats.

1.6.5.2. Généralités sur la PCR.

1.6.5.2.1. Définition.

La réaction de polymérisation en chaîne ou PCR est une technique permettant l'amplification enzymatique d'une région spécifique d'acide desoxyribonucléique (ADN) comprise entre deux régions d'ADN de séquence connue. La technique est fondée sur le fonctionnement cyclique d'une ADN polymérase, enzyme capable de copier un brin d'ADN utilisé comme matrice en un brin complémentaire par élongation à partir de l'extrémité 3'-OH libre d'une amorce oligonucléotidique synthétique (29).

1.6.5.2.2. Historique de la PCR.

Cette technique révolutionnaire d'amplification de l'ADN permettant l'obtention en quelques heures de 10^6 copies d'un fragment d'ADN cible, a été inventée en 1985 par Kary Mullis, qui

travaillait pour la firme Cetus, en Californie (110, 111). En 1990, K. Mullis a obtenu le prix Nobel pour son invention.

La technique a été utilisée la première fois pour amplifier un fragment d'ADN de la β globine humaine en vue d'effectuer le diagnostic de l'anémie à cellules falciformes (drépanocytose) (135). Elle a ensuite été utilisée pour le clonage de fragment d'ADN (141).

Deux progrès technologiques capitaux ont été à la base de l'utilisation très large de la PCR en biologie moléculaire et en biologie clinique :

1-l'utilisation d'ADN polymérase thermostables supportant la température élevée de dénaturation de l'ADN. La première enzyme thermostable utilisée en PCR est la Taq polymérase (136) isolée d'une bactérie thermophile, *Thermus aquaticus*, isolée d'une source d'eau chaude du parc de Yellowstone, aux Etats-Unis. Cette molécule avait été dénommée molécule de l'année 1989 par la revue Science (76). Depuis d'autres polymérase ont été isolées à partir d'autres microorganismes et sont commercialisées.

2-le développement de blocs chauffants automatisés programmables, permettant le passage rapide et automatisé d'une température à une autre, au cours des cycles d'amplification ; ces blocs chauffants appelés thermocycleurs ont permis l'automatisation de la technique et sa diffusion dans de nombreux laboratoires.

1.6.5.2.3. Amplification de l'ADN par PCR.

L'amplification d'un fragment cible d'ADN nécessite l'utilisation :

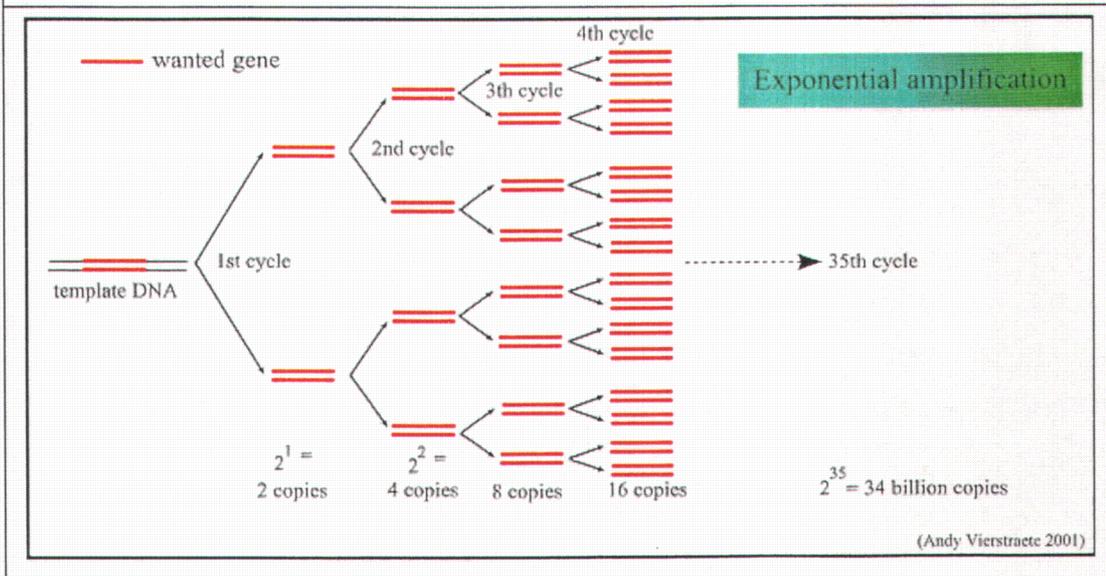
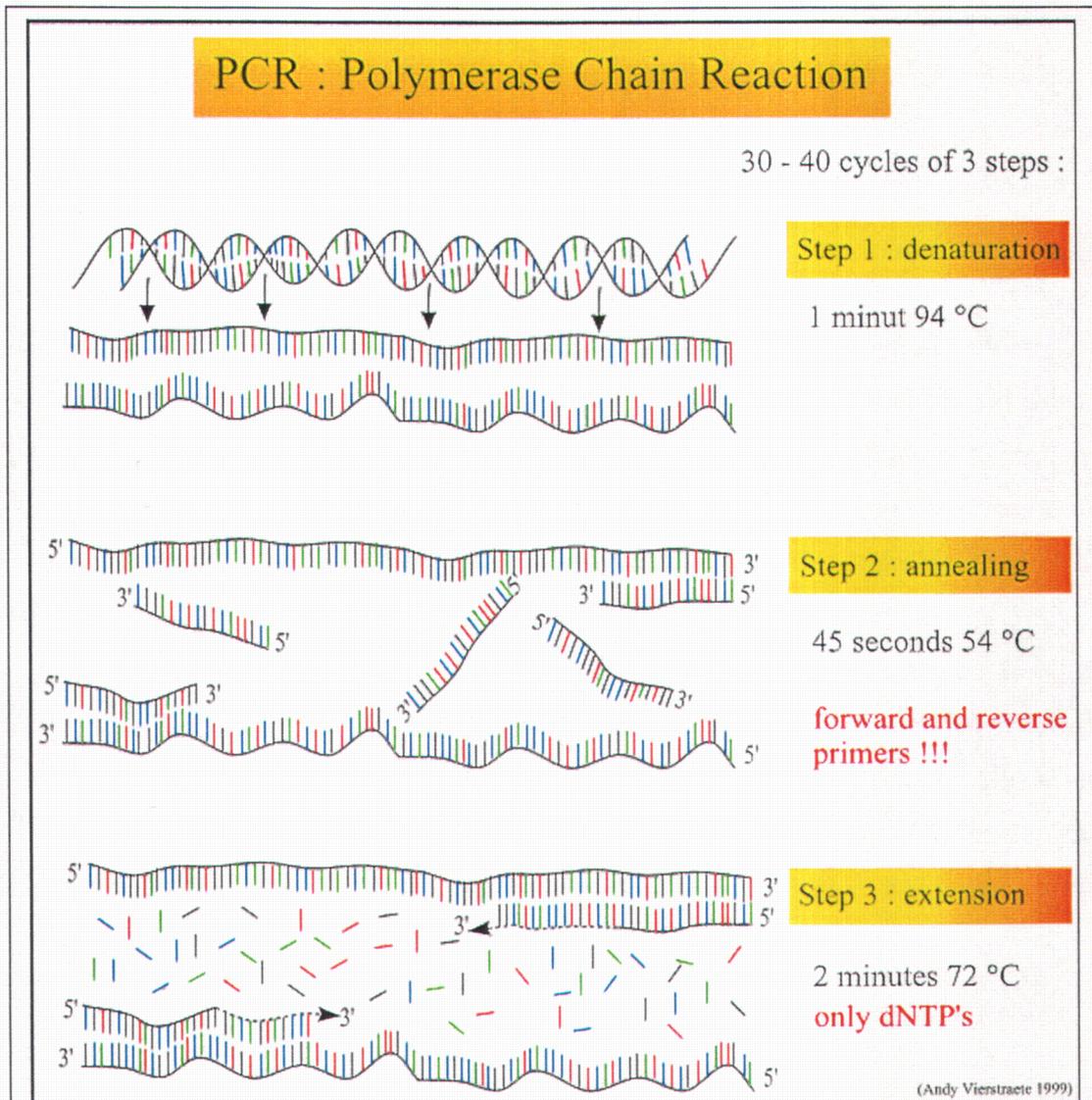
1-de deux amorces oligonucléotidiques appelées « amorces » ou « primers » en anglais.

Ce sont de petites molécules synthétiques d'ADN simple brin (monocaténaire), composées d'une vingtaine de nucléotides, complémentaires des deux extrémités du fragment d'ADN que l'on veut amplifier.

2-de désoxyribonucléosides triphosphates (dNTPs). Il s'agit d'un mélange équimoléculaire des désoxyribonucléosides à savoir dATP, dCTP, dGTP et dTTP.

3-d'ADN polymérase permettant la synthèse d'un brin complémentaire de l'ADN matrice, à partir de l'extrémité 3' de l'amorce. Les dNTPs viennent s'accrocher de façon complémentaire à l'extrémité 3'-OH de l'amorce.

Figure I.9. Représentation schématique des différentes étapes de la réaction de polymérisation en chaîne (PCR), d'après A. Verstraete (données internet) : exemple à l'appui.



L'amplification d'un fragment d'ADN cible s'effectue par une série de 30 à 40 cycles d'amplification (Figure I.9), chaque cycle comportant les 3 étapes suivantes:

Dénaturation de l'ADN : elle consiste à dérouler la double hélice et à rompre par action de la chaleur, les liaisons hydrogène qui lient les bases complémentaires. Ceci a pour effet de séparer les deux brins d'ADN. La dénaturation s'effectue à 94-95°C.

Hybridation des amorces : L'hybridation des amorces se fait sur chacun des deux brins d'ADN préalablement séparés l'un de l'autre. Les amorces s'hybrident au niveau des régions complémentaires, dans le sens 5'→3'. Les températures d'hybridation varient entre 40 et 72°C selon la température de fusion des amorces (T_m) (melting temperature) et la spécificité requise.

Elongation ou extension de l'ADN : Elle consiste en la synthèse d'un brin d'ADN complémentaire du brin d'ADN matrice, à partir de l'extrémité 3'-OH de chaque amorce hybridée. La synthèse du brin d'ADN complémentaire est possible grâce à l'action d'une l'ADN polymérase et à la présence, dans le milieu réactionnel des dNTPs. Elle s'effectue à température optimale de l'enzyme qui est de 72°C.

La **Taq polymérase** a une activité 5'→3' polymérase et n'a pas d'activité 3'5' exonucléase ce qui ne permet pas de réparer les erreurs de synthèse. Au cours de chaque cycle d'amplification d'une durée de 3 à 5 minutes, la température doit être diminuée ou augmentée en fonction des trois étapes à respecter.

Après chaque cycle d'amplification, le nombre de copies de l'ADN bicaténaire est multiplié par 2. D'autre part, chaque nouveau brin d'ADN synthétisé pourra servir de matrice pour le cycle d'amplification suivant si bien que la séquence d'ADN cible sera sélectivement amplifiée cycle après cycle. Le fragment d'ADN amplifié, appelé amplicon, sera défini par les extrémités 5' des amorces.

Les produits de la première extension sont les brins d'ADN synthétisés d'après l'ADN original qui a servi de matrice. Ils n'ont pas de longueur définie, car l'enzyme continue la synthèse du brin complémentaire jusqu'à ce qu'elle soit interrompue par le début du cycle d'amplification suivant. Les produits d'extension du 2^{ème} cycle d'amplification ont une longueur soit indéterminée, soit limitée, selon que le brin d'ADN qui leur a servi de matrice faisait partie de l'ADN original ou

Tableau I.8. Analyses réalisées par biologie moléculaire dans le domaine de la microbiologie par les 18 Centres belges de Diagnostic moléculaire (CDM).

Détection de bactéries
<p><i>Bartonella henselae</i> et <i>B. quintana</i> <i>Bordetella pertussis</i> <i>Borrelia burgdorferi</i> <i>Chlamydia pneumoniae</i> <i>Chlamydia trachomatis</i> <i>Corynebacterium diphtheriae</i> <i>E. coli</i> producteurs de vérotoxine <i>Legionella pneumophila</i> <i>Mycoplasma pneumoniae</i> <i>Mycobacterium tuberculosis</i> Mycobactéries atypiques Identification des bactéries difficiles à cultiver</p>
Détection de gènes de résistance de bactéries
<p>Gène de résistance de <i>M. tuberculosis</i> à la rifampicine Gène de résistance à la méthicilline chez les staphylocoques Gènes de résistances à la vancomycine chez les entérocoques : vanA, vanB, vanC Gène de résistance aux macrolides pour <i>H. pylori</i>.</p>
Détection de virus
<p>Cytomégalovirus (CMV) Epstein-Barr virus (EBV) Virus de l'hépatite B (HBV) Virus de l'hépatite C (HCV) Virus de l'immunodéficience humaine (VIH) Papillomavirus (HPV) Enterovirus Virus herpes simplex (HSV1 et HSV2) Parvovirus B19 Polyomavirus JC et BK Virus de la Rubéole Virus de la varicelle</p>
Détection de protozoaires
<p><i>Toxoplasma gondii</i></p>
Détection de champignons
<p><i>Aspergillus</i> sp. <i>Candida</i> sp <i>Pneumocystis carinii</i></p>

avait été synthétisé au cours du premier cycle. Par contre, la majorité des produits d'extension du 3^{ème} cycle ont une longueur définie, correspondant à la position des amorces sur l'ADN de départ. A partir du 4^{ème} cycle d'amplification, la séquence cible d'ADN est amplifiée de façon exponentielle.

Le nombre final théorique (N) de copies de la séquence cible, obtenu après amplification est donné par la formule suivante : $N = (2^n - 2n)x$

Où n = nombre de cycles

x = nombre de copies de l'ADN original

$2n$ = les produits d'extension obtenus après le premier cycle d'amplification + les produits d'extension de longueur indéfinie obtenus au cours des cycles suivants.

En cas de rendement de 100%, après 20 cycles d'amplification, on obtiendrait 2^{20} copies de l'ADN cible. Mais, en pratique, le rendement n'atteint jamais 100%. Le rendement moyen des réactions d'élongation est de 50%. Si l'on appelle X le facteur d'amplification, Y le nombre de copies initiales et R le rendement de chacune des étapes, on a : $X = Y(1-R)^n$. Ainsi, pour une PCR de 30 cycles on obtiendra seulement $1.3 \cdot 10^6$.

Les facteurs limitant le rendement de la PCR sont :

La diminution de la quantité d'enzyme disponible après 25 à 30 cycles.

La diminution de l'activité de l'enzyme suite à la dénaturation thermique qu'elle subit au cours des cycles d'amplification.

La tendance des ADN synthétisés à se réhybrider entre eux, quand ils deviennent nombreux, ce qui entre en compétition directe avec l'étape d'hybridation des amorces.

1.6.5.2.4. Les applications de la PCR.

En microbiologie, la PCR est de plus en plus utilisée dans la détection de nombreux agents pathogènes viraux, bactériens, parasitaires ou fongiques (123).

Tableau I.9. Résultats comparatifs des techniques de PCR appliquées au diagnostic des aspergilloses pulmonaires invasives dans les lavages bronchoalvéolaires.

Patients	Sensibilité (%)	Spécificité (%)	YPP (%)	VPN (%)	Faux positifs (%)	Sensibilité (ordre de grandeur)	Références
Immunodéprimés (n=23) Non immunodéprimés (n=28)	100	94.4	40	100	5.8 (idp) 18 (nidp)	500pg	Tang et al. 1993 (158)
Immunodéprimés (n=15) Non immunodéprimés (n=7)	100	83	37	100	27 (idp) 28 (nidp)	100pg	Spreadbury et al 1993 (146)
Immunodéprimés (n=14)	100	62	66	100	21	1pg	Melchers et al 1994 (100)
Immunodéprimés (n=28) SIDA (n=15) Non immunodéprimés (n=9)	100	75	16	100	23 (idp)	Non disponible	Bretagne et al. 1995 (22)
SIDA=41	100	80	11	100	19	Non disponible	Bart-Delabesse et al. 1996 (13)
Non immunodéprimés à risque faible (n=72)	/	/	/	/	15	1pg	Verweij et al. 1995 (166)
Immunodéprimés (n=12)	100	100	100	100	0	0.6 fg	Jones et al.1998 (70)
Immunodéprimés (n=74) Non immunodéprimés (=103)	100	96	62	100	3.4	25 fg	Hayette et al. 2001 (62)

Idp : immunodéprimés; nidp : non immunodéprimé.

Le tableau I.8. dresse la liste des agents infectieux détectés en PCR par les laboratoires de microbiologie médicale en Belgique en 2002.

A côté du diagnostic, la PCR est de plus en plus utilisée pour la détection de la résistance aux antibiotiques par mutation génétique (résistance de *M. tuberculosis* à la rifampicine, résistance de *S. aureus* à la méticilline) en confirmation des tests de sensibilité *in vitro*.

1.6.5.3. PCR *Aspergillus sp.*

Les deux principaux liquides biologiques qui ont été ciblés pour la PCR *Aspergillus* sont les lavages broncho-alvéolaires, et le sang périphérique (sang total, sérum et plasma).

1.6.5.3.1. Lavages broncho-alvéolaires.

Les premières études ont porté sur les lavages broncho-alvéolaires, ce qui s'explique par le fait que les aspergilloses touchent en premier lieu la sphère pulmonaire et que les performances des cultures ne dépassent pas 60%.

Certaines techniques publiées pèchent par leur excès de sensibilité, d'où un nombre élevé de faux positifs qui peut atteindre 25% (Tableau I.9.).

Les valeurs prédictives positives sont très hétérogènes et varient de 11% à 100%.

Les valeurs prédictives négatives par contre sont uniformément égales à 100%.

L'intérêt de l'utilisation de la PCR dans les lavages bronchoalvéolaires réside davantage dans l'élimination d'une suspicion d'aspergillose invasive que dans le diagnostic de celle-ci. La PCR pourrait confirmer une culture négative et éliminer un traitement présomptif inutile.

1.6.5.3.2. Sang périphérique.

Les études sur le sang sont postérieures puisque la première a été publiée en 1996 (177).

Tableau I.10. Résultats comparatifs des principales publications consacrées au diagnostic moléculaire des aspergilloses invasives sur sang périphérique.

Population	Sensibilité (%)	Spécificité (%)	VPP (%)	VPN (%)	Faux positifs (%)	Echantillon, prise d'essai (nombre)	Références
20 patients avec aspergillose invasive	70	100	100	77	0	Serum, 100µl (n=40)	Yamakami et al. 1996 (177)
20 volontaires sains							
35 contrôles	88	100	95	100	0	Sang total, 7 ml (n=456)	Einsele et al 1997(40)
Immunodéprimés (n=86)	100 si 2 PCR +						
Immunodéprimés (n=41)	50	100	50	67	0	Serum, 200µl (n=281)	Bretagne et al. 1998 (2')
Immunodéprimés (n=48)	94	100	94	83	0	Serum (100µl) (n=93)	Golbang et al. 1999 (54)
Non immunodéprimés (n=15)							
Immunodéprimés (n=93)	100	89	95	100	2.1	Sang total, 3-5ml (n=250)	Skiadny et al. 2000 (144)
Non immunodéprimés (n=47)							
Immunodéprimés (n=37)	100 si 1 PCR +	79% si 1 PCR+	80% si 1 PCR+	100	5.7	Serum, 600µl (n=175)	Williamson et al. 2000 (174)
Non immunodéprimés (n=47)	81 si 2 PCR +	100 si 2 PCR +	100 si 2 PCR +				
Immunodéprimés (n=7)	100	100	100	100	0	Sang total, 7 ml (n=57)	Loeffler et al. 2000 (88)
Non immunodéprimés (n=50)							
Immunodéprimés (n=121)	75	96	42	98	Difficile à évaluer	Sang total, 10 ml (n=619)	Lass-Flörl et al. 2000 (82)
Contrôles (n=47)							
Immunodéprimés (122)							
(33 avec aspergillose pulmonaire invasive et 89 contrôles)	79	92	Difficile à évaluer	Difficile à évaluer		Sang total, 200µl (n=92) Plasma, 200µl (n=10)	Kami et al. 2001 (72)

Les études ont été réalisées soit sur le sang total (45 , 86, 87), soit sur le sérum (24, 174). Deux publications ont comparé les mérites respectifs du sang total versus plasma (89), et culot leucocytaire versus sérum et plasma (33). Les deux études ne reflètent pas tout à fait les conditions réelles puisqu'elles sont réalisées en ajoutant à du sang total des conidies (89) ou de l'ADN d'*Aspergillus fumigatus* (33). Cependant les deux études concluent à une moins bonne sensibilité de la PCR réalisée sur plasma et la seconde montre que sang total et le sérum donnent des résultats comparables. Le sérum est par ailleurs plus facile à collecter et à conserver que le sang total dans une routine de laboratoire.

Au niveau de l'apport au diagnostic des aspergilloses invasives, les résultats diffèrent selon les auteurs (Tableau I.10). La sensibilité est beaucoup plus variable que les PCR appliquées sur LBA. Les études qui ont comparé la détection du galactomannane et de la PCR sur sang périphérique sont également contradictoires (15, 24, 72, 75, 174).

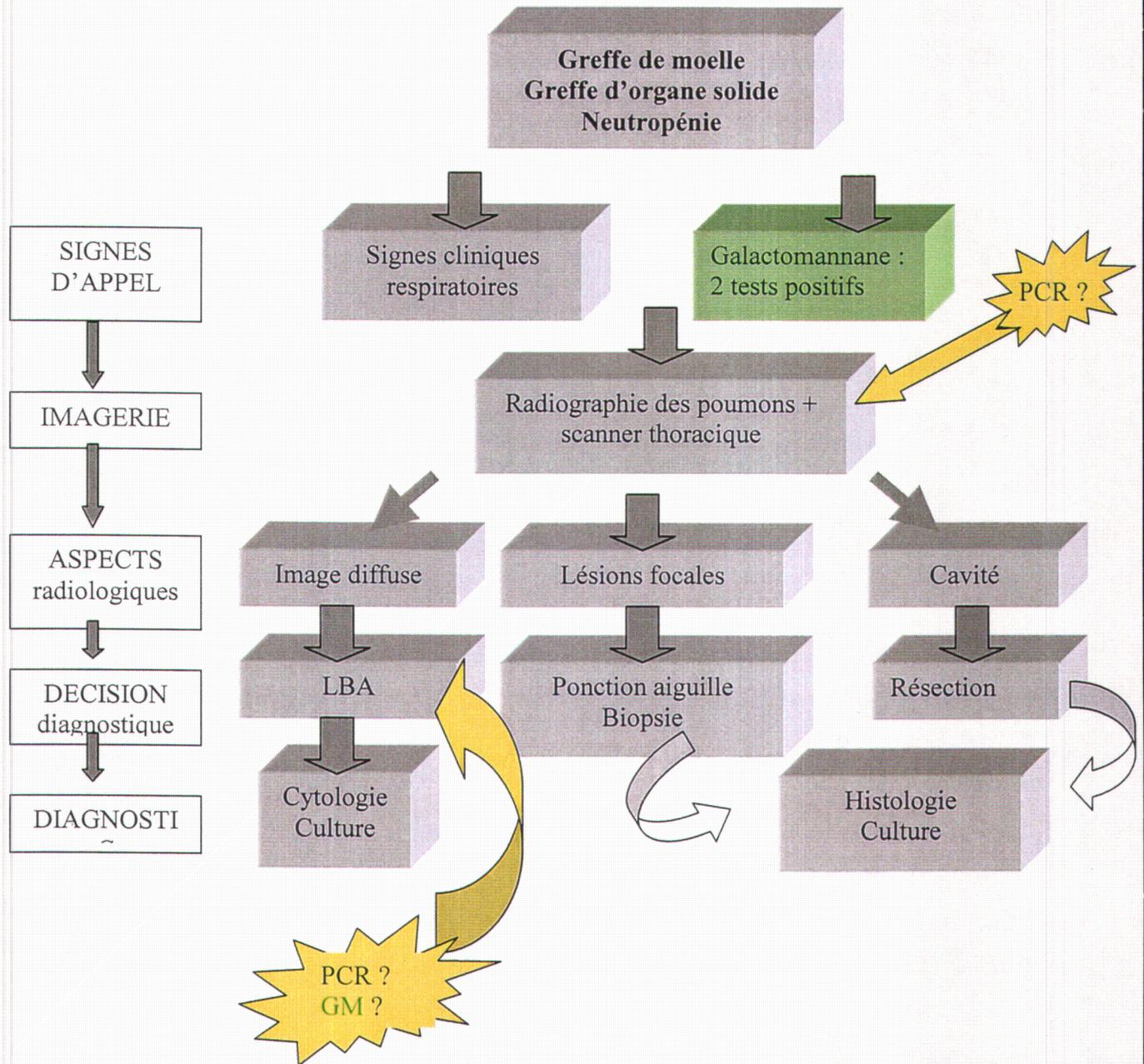
1.6.6. Schéma décisionnel dans le diagnostic des API.

De plus en plus d'auteurs suggèrent l'utilisation de la détection d'antigène galactomannane dans le suivi des patients greffés de moelle ou d'organe (23, 41, 93).

Ainsi, chez les patients neutropéniques, deux schémas décisionnels coexistent selon les équipes : le schéma conventionnel se fonde sur les symptômes cliniques et les données radiologiques (scanner) ; le schéma alternatif se fonde sur la détection de l'antigène galactomannane (2 résultats consécutifs positifs) et les données radiologiques (scanner) (Figure I.10.).

Récemment, le groupe d'étude européen EORTC (European Organisation for Research and Treatment of Cancer) a publié des critères nécessaires à la définition des cas d'aspergillose invasive applicables aux patients atteints de cancer et chez les transplantés de moelle osseuse , certains de ces critères étant également applicables à d'autres populations immunodéprimées (10). Ces critères sont utilisables pour la définition des cas en matière de recherche, mais pas dans une perspective clinique.

Figure I.10. Algorithme pour le diagnostic d'aspergillose invasive chez les patients immunodéprimés.



1.7. PREVENTION.

Il existe des recommandations du Center for Diseases Control (CDC) concernant les transplantations de moelle osseuse (31). Il n'en existe pas pour les transplantés d'organe solide.

1.7.1. Prévention chez les greffés de moelle osseuse.

La prévention des infections bactériennes, virales et fongiques sont essentielles dans la protection du patient transplanté. Elles passent soit par l'administration systématique d'antibiotiques, antiviraux ou antifongiques, soit par le dépistage par culture, détection d'antigènes circulants, ou détection par PCR (infection à CMV). Nous insisterons essentiellement sur la prévention contre les aspergilloses.

Hygiène hospitalière. Les mesures de prévention consistent en l'utilisation d'un système de filtration de l'air à haute capacité (>90%) (filtre HEPA), de pression positive de la chambre, de chambre bien isolées, de taux d'échanges d'air élevés (>12 fois par heure) et de barrières entre le service de soins et les aires de rénovation ou travaux. Pour prévenir l'accumulation de poussière et de spores d'*Aspergillus*, le nettoyage des chambres doit être particulièrement soigné dans ce cadre.

Prévention. Aucune recommandation ne peut être faite. Le fluconazole est tout à fait inefficace dans la prévention contre les infections à *Aspergillus*. Des études complémentaires doivent être menées pour définir une stratégie de prévention. Différentes approches ont été faites en administrant des doses variables d'amphotéricine B, sous forme de spray nasal, d'aérosols ou sous forme lipidique, mais les résultats sont insuffisants en ce qui concerne l'efficacité et la tolérance de ces formulations.

Les capsules d'itraconazole ne sont pas non plus recommandées en usage prophylactique, pour trois raisons : 1. faible absorption gastrointestinale 2. concentrations sériques inférieures aux CMI pour *A. fumigatus* 3. interactions médicamenteuses avec des drogues potentiellement utilisées pendant le traitement des patients. La forme intraveineuse sous forme de complexe avec une cyclodextrine est en cours d'évaluation pour cette indication.

Actuellement, les patients qui ont une culture positive pour *Aspergillus sp.* dans un prélèvement respiratoire sont présumés développer une infection invasive et sont traités de façon agressive avec de l'amphotéricine B intraveineuse.

Le risque de récurrence après une première infection invasive est apparu particulièrement élevé chez les patients greffés de moelle.

En ce qui concerne les infections tardives, des suivis réguliers par l'antigénémie ou l'antigénurie ont été proposés, mais certains auteurs leur reprochent leur faible valeur prédictive positive (7).

1.7.2. Prévention chez les transplantés d'organe solide.

Etant donné le coût élevé des chambres munies de filtres HEPA, le maintien des patients sous filtre HEPA n'est pas recommandé pour les greffes d'organe solide (58).

Des précautions visant à réduire l'apport de spores dans l'environnement du patient doivent être prises : pas de fleurs ou de plantes en pots et nourriture surveillée.

1.8. TRAITEMENT DES ASPERGILLOSES INVASIVES.

1.8.1. Introduction.

Les antifongiques efficaces contre *Aspergillus* sont peu nombreux. Le succès de leur utilisation est rare et dépend en partie de paramètres non directement liés à l'action antifongique elle-même: précocité de prescription, sortie d'aplasie, localisation de l'aspergillose, possibilité de chirurgie complémentaire.

Les cibles des agents antifongiques sont principalement la structure cellulaire fongique (paroi, membrane cytoplasmique), mais également le métabolisme et la division cellulaire.

Figure I.11. Amphotéricine B.

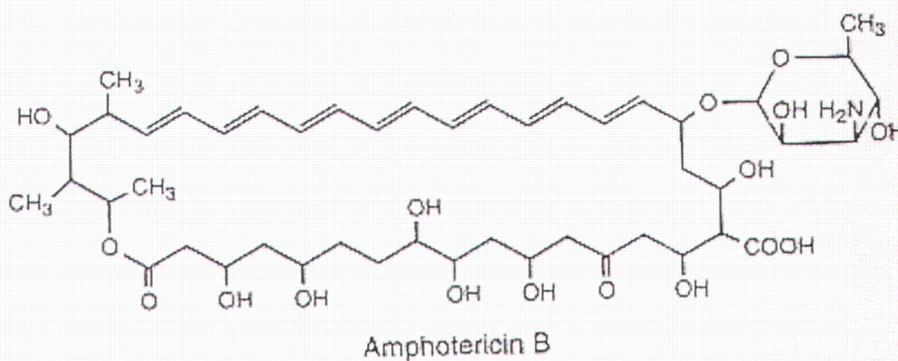


Figure I.12. Formulations lipidiques d'amphotéricine B.

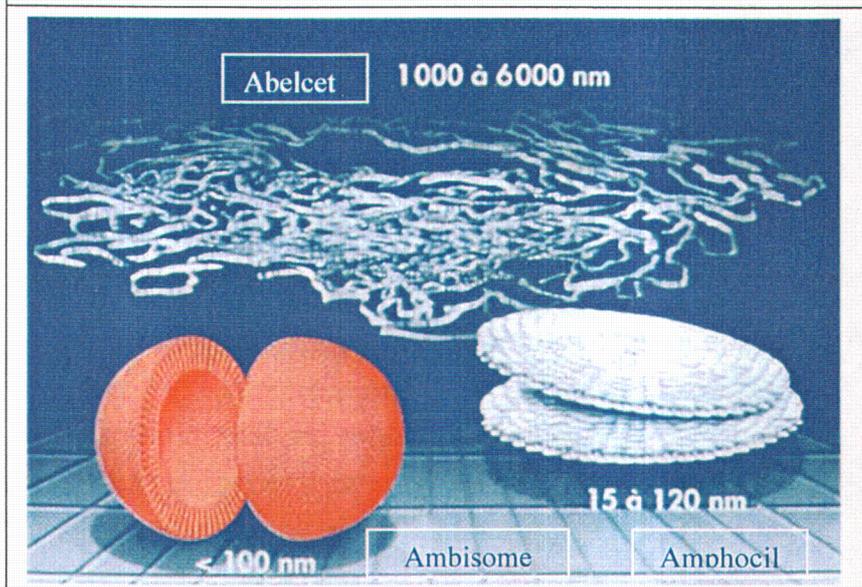


Figure I.13. Ambisome.

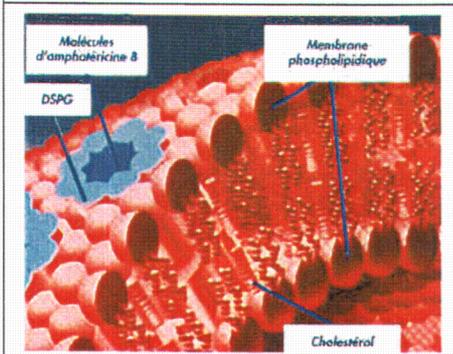


Figure I.14. Abelcet.

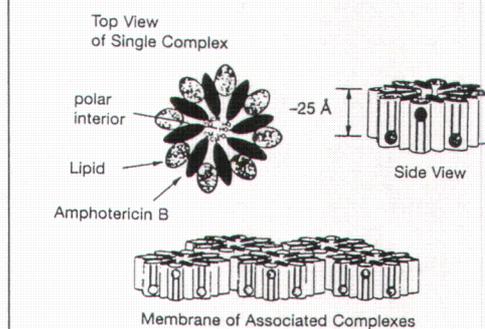
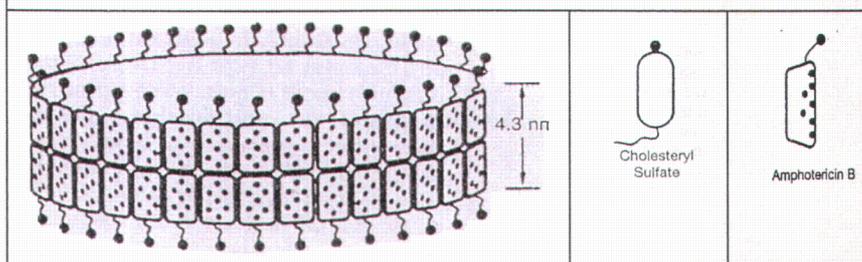


Figure I.15. Amphocil.



1.8.2. Amphotéricine B.

1.8.2.1. Description de la molécule.

L'amphotéricine B (AmB) reste encore à l'heure actuelle la molécule de référence dans le traitement des aspergilloses invasives, malgré le taux de mortalité associé qui varie de 10 à 100% (42).

L'amphotéricine B appartient à la famille des polyènes qui sont des agents macrocycliques (Figure I.11). Leur mécanisme d'action n'est pas complètement élucidé. Deux modes d'actions sont cependant décrits :

1. Liaison aux stérols de la membrane fongique et création de canaux transmembranaires, d'où perméabilité accrue aux cations monovalents comme le potassium.
2. Inhibition de la pompe à protons ATPase dépendante d'où déplétion des réserves cellulaires et peroxydation des lipides. La conséquence est une fragilisation de la membrane et une fuite des ions calcium.

L'amphotéricine B a deux inconvénients majeurs :

1. du fait de son insolubilité dans l'eau, elle doit être solubilisée dans un milieu aqueux pour être biologiquement active. C'est en effet le desoxycholate d'Amphotéricine qui est commercialisé (Fungizone®).
2. sa toxicité et notamment la néphrotoxicité, qui est synergique en cas de prise simultanée de cyclosporine A. En effet, bien que l'Amphotéricine B possède une plus grande affinité pour l'ergostérol, elle se lie toutefois pour une faible partie au cholestérol des membranes cellulaires ce qui est à l'origine de la toxicité de la molécule.

Les recommandations de dosage classiquement adoptées sont les suivantes (84).

En début de traitement (1 à 2 jours), l'Amphotéricine B doit être administrée aux doses maximales tolérées jusqu'à l'observation d'une réponse au traitement. La dose varie entre 0.8 à 1.5 mg/kg/jour en intraveineuse (i.v.) pour une dose totale de 1.5 à 4 g par patient pour une période d'au moins 2 semaines.

1.8.2.2. Formulations lipidiques d'AmB.

Différentes stratégies ont été utilisées dans le but de diminuer la toxicité de l'Amphotéricine B et d'augmenter son efficacité (148).

Plusieurs types de formulations lipidiques ont été réalisées en incorporant la molécule l'AmB. Trois d'entre elles sont maintenant commercialisées dans plusieurs pays (une composition liposomale et deux complexes lipidiques)(Figure I.12.):

-Ambisome (Nextar): c'est la seule vraie préparation liposomale composée de petites vésicules unilamellaires composées de phosphatidylcholine, distéaryl phosphatidylglycérol-cholestérol-AmB (Figure I.13.).

-AmB-lipid complex (Abelcet; Liposome Co.): composée d'une membrane bicouche en forme de ruban, composée de dimyristoyl phosphatidylcholine, dimyristoyl phosphatidylglycérol et AmB dans un rapport de 7 :3 :3 (Figure I.14.).

-AmB à dispersion colloïdale (Amphocil; Sequus Pharmaceutical): composé de structures en disque de cholesteryl sulfate complexé avec l'AmB (v/v) (Figure I.15.).

L'idée repose sur l'utilisation de molécules porteuses capables d'apporter l'AmB jusqu'au site de l'infection.

Les trois formulations lipidiques ont été comparées avec la Fungizone[®]. Il n'y a pas de consensus quand à la dose à utiliser. De plus les formulations lipidiques ont été souvent utilisées en cas d'échec au traitement à la Fungizone[®] et les comparaisons sont difficiles à établir (84).

Les conclusions sont que les trois formulations lipidiques sont moins toxiques que la Fungizone[®]. Cependant, elles sont beaucoup plus chères qu'un traitement à base de Fungizone.

Des études randomisées sont encore nécessaires pour évaluer l'efficacité réelle de ces préparations comparativement à l'utilisation de Fungizone[®] (84, 148).

1.8.3. Itraconazole.

L'itraconazole (Sporanox[®], Janssen) est un antifongique triazolé ayant une activité anti-aspergillaire (Figure I.16.).

Le principal mécanisme d'action des composés azolés réside dans l'inhibition préférentielle des enzymes du cytochrome P-450. Ces enzymes sont présentes chez la plupart des espèces vivantes, bactéries, champignons, plantes protozoaires, vertébrés et font partie intégrante du réticulum endoplasmique et de la membrane interne des mitochondries.

Dans la cellule fongique, les azolés interfèrent avec la biosynthèse de l'ergostérol, composant majeur de la paroi fongique (ce stérol étant chez les champignons l'équivalent du cholestérol dans la cellule des mammifères). Ils inhibent la 14 α -déméthylase qui catalyse la transformation du lanostérol en ergostérol. Ce phénomène entraîne une accumulation des précurseurs et inversement une déplétion en ergostérol, entraînant des anomalies dans la perméabilité membranaire.

La synthèse du cholestérol dans la cellule de mammifère est également bloquée par les azolés au stade de la 14 α -déméthylation, mais la dose nécessaire d'azolé pour exercer cette inhibition est variable ce qui explique l'hépatotoxicité de certains azolés.

Généralement, les azolés sont considérés comme des agents fongistatiques.

L'itraconazole existe sous forme de capsules, de solution orale et plus récemment de solution intraveineuse. Cette molécule est aussi efficace que l'amphotéricine B *in vitro*. *In vivo*, de nombreux rapports confirment son efficacité en première ligne ou après échec d'un traitement à l'Amphotéricine B, cependant très peu d'études randomisées confirment ces résultats *in vivo* (42).

Son administration orale doit faire l'objet de dosages sériques réguliers (monitoring thérapeutique), car l'absorption gastro-intestinale est très irrégulière d'un patient à l'autre. D'autre part, l'itraconazole ne peut pas être administré en même temps que d'autres molécules qui activent le cytochrome P-450 (rifampicine, phénytoïne, phénobarbital,...), ou sous étroit contrôle avec la cyclosporine (contrôle des taux), la digoxine (monitoring), les inhibiteurs de la protéase.

Récemment des souches itraconazole-résistantes ont été isolées (40), ce qui nécessite de connaître la sensibilité *in vitro* avant mise sous traitement.

Les formulations intraveineuses d'itraconazole sont disponibles depuis 1999. Les études sur modèle animal (118) et dans le traitement de patients immunodéprimés (27) ont montré son efficacité dans le traitement des aspergilloses invasives. Une étude européenne a permis de montrer que la formulation intraveineuse d'itraconazole était aussi efficace que l'amphotéricine B dans le traitement empirique d'une fièvre persistante chez des patients cancéreux (20). Les nombreuses interactions médicamenteuses limitent cependant son utilisation.

1.8.4. Choix de l'agent antifongique : synthèse.

Le choix de l'agent se fera en fonction de la toxicité de la drogue et des facteurs qui affectent sa biodisponibilité (notamment pour l'itraconazole).

Agent	dose	Commentaires
AmB deoxycholate (Fungizone®)	0.8-1.25 mg/kg/j iv	1ère ligne, néphrotoxique
Itraconazole (Sporanox ®)	200 mg 3 fois/j pendant 4 j. puis 200 mg 2 fois/j.	1ère ligne si : pas de prise simultanée d'inducteurs de P-450 ; augmente les taux de cyclosporine (dosage nécessaire) augmenter les doses si aspergillose cérébrale
Formulations lipidiques d'Amphotéricine B :		Seconde ligne :
Amphocil®	4-6 mg/kg/j.iv	En cas de néphrotoxicité due à la prise d'amphotéricine B.
Abelcet®	1-5 mg/kg/j, iv	
Ambisome®	5 mg/kg/j, iv	

Tableau I.11. Traitement de 1^{ère} et 2^{de} ligne des AI (d'après D. Denning (42)).

On peut noter que ces recommandations de Denning ont été publiées avant la mise sur le marché de l'itraconazole en solution intraveineuse. Il faut donc envisager l'utilisation de cette formulation intraveineuse à la place de la solution orale (27).

1.8.5. Nouvelles molécules.

1.8.5.1. Triazolés de seconde génération.

1.8.5.1.1. Voriconazole.

Le voriconazole (Vfen®, Pfizer) sous forme orale et injectable, non commercialisé, mais approuvé par la FDA (food and drug administration) depuis octobre 2001 dans le traitement des aspergilloses invasives, en seconde intention.

Cette molécule est un dérivé synthétique de seconde génération du fluconazole (Figure I.17.).

C'est le résultat d'une analyse des relations entre les structures et les activités des dérivés azolés sur *Aspergillus* sp. En effet, le remplacement du cycle triazole du fluconazole par un cycle pyrimidine augmente l'activité antifongique.

Comme pour les dérivés azolés, le mécanisme d'action passe par l'inhibition de la 14 α -déméthylase intervenant dans la synthèse de l'ergostérol. De plus, la molécule a une activité inhibitrice de la 24-méthylène dihydrolanostérol qui explique son activité sur les moisissures, activité que n'a pas le fluconazole.

Le voriconazole interfère avec le métabolisme de la cyclosporine, de la carbamazépine, de la phénytoïne et de la warfarine.

Les premiers essais cliniques ont rapporté des effets secondaires de type troubles visuels transitoires.

Il a été mis en évidence une bonne efficacité thérapeutique chez les patients neutropéniques souffrant d'une aspergillose disséminée, et chez les patients non neutropéniques ayant une aspergillose chronique.

Des résultats d'une étude randomisée voriconazole/amphotéricine B dans le traitement en première intention de l'aspergillose invasive ont été présentés au congrès « Trends in invasive fungal infections » à Prague en novembre 2001. Ils ont montré que le Voriconazole avait une efficacité 20 fois supérieure à celle de l'amphotéricine B. Ceci permet de penser que l'amphotéricine B ne restera pas toujours le « gold standard » pour le traitement des aspergilloses invasives.

1.8.5.1.2. Posaconazole (SCH 56592, SCH59884).

Le posaconazole est aussi un dérivé de seconde génération du fluconazole et c'est un analogue structurel de l'itraconazole (Figure I.18).

Il est très peu soluble dans l'eau, de ce fait les chercheurs ont développé une molécule précurseur (SCH-59884), plus soluble dans l'eau, qui rend possible l'administration intraveineuse. Ce précurseur, inactif *in vitro*, est déphosphorylé *in vivo* et transformé en posaconazole actif.

Le mode d'action est similaire à celui des autres azolés et l'inhibition de la 14c-déméthylase est 10 fois plus forte que celle de l'itraconazole.

Cette drogue a une activité fongicide *in vitro* vis à vis d'une large variété d'*Aspergillus* sp. et ceci à des concentrations inférieures à l'itraconazole et à l'amphotéricine B (48).

L'efficacité clinique dans les aspergilloses invasives est en cours d'évaluation.

1.8.5.1.3. Lipopeptides : échinocandines, pneumocandines et dérivés.

La famille des lipopeptides est complexe et se répartit en plusieurs sous-groupes : échinocandines, pneumocandines, mulundocandines et dérivés hémisynthétiques.

Ils agissent sur la paroi fongique par inhibition de la β -1,3-D-glucane synthétase.

Ils inhibent la biosynthèse du β -1,3-D-glucane en empêchant l'incorporation du glucose dans le chaîne de synthèse.

Les échinocandines sont des substances naturelles isolées à partir de souches d'*Aspergillus nidulans* et *A. rugulosis*. Sur le plan structurel, ce sont des peptides hexacycliques ayant une chaîne grasse différente fixée sur le groupe α -aminé de l'ornithine (Figure I.19).

La caspofungin (Cancidas[®]) est une des molécules dont le développement est parmi le plus avancé. Elle a une activité antifongique sur *Candida* et *Aspergillus* (1). Elle a été approuvée par la FDA en 2001, dans le traitement de seconde ligne après échec ou intolérance à un traitement par l'amphotéricine B et/ou l'un de ses dérivés lipidiques.

1.9. BUTS DU TRAVAIL.

Le diagnostic des aspergilloses invasives repose le plus souvent sur un faisceau d'arguments parfois non spécifiques et reste le plus souvent présomptif. Un retard dans le diagnostic de ce type d'infection conduit le plus souvent au décès du patient, car la plupart des antifongiques sont inefficaces s'ils sont donnés tardivement.

Il nous a paru intéressant d'évaluer qu'elle était la place de techniques hautement sensibles comme les techniques de polymérisation en chaîne dans le diagnostic des aspergilloses invasives. En effet, au moment où nous avons entrepris ce travail, les premières publications commençaient à paraître dans ce domaine.

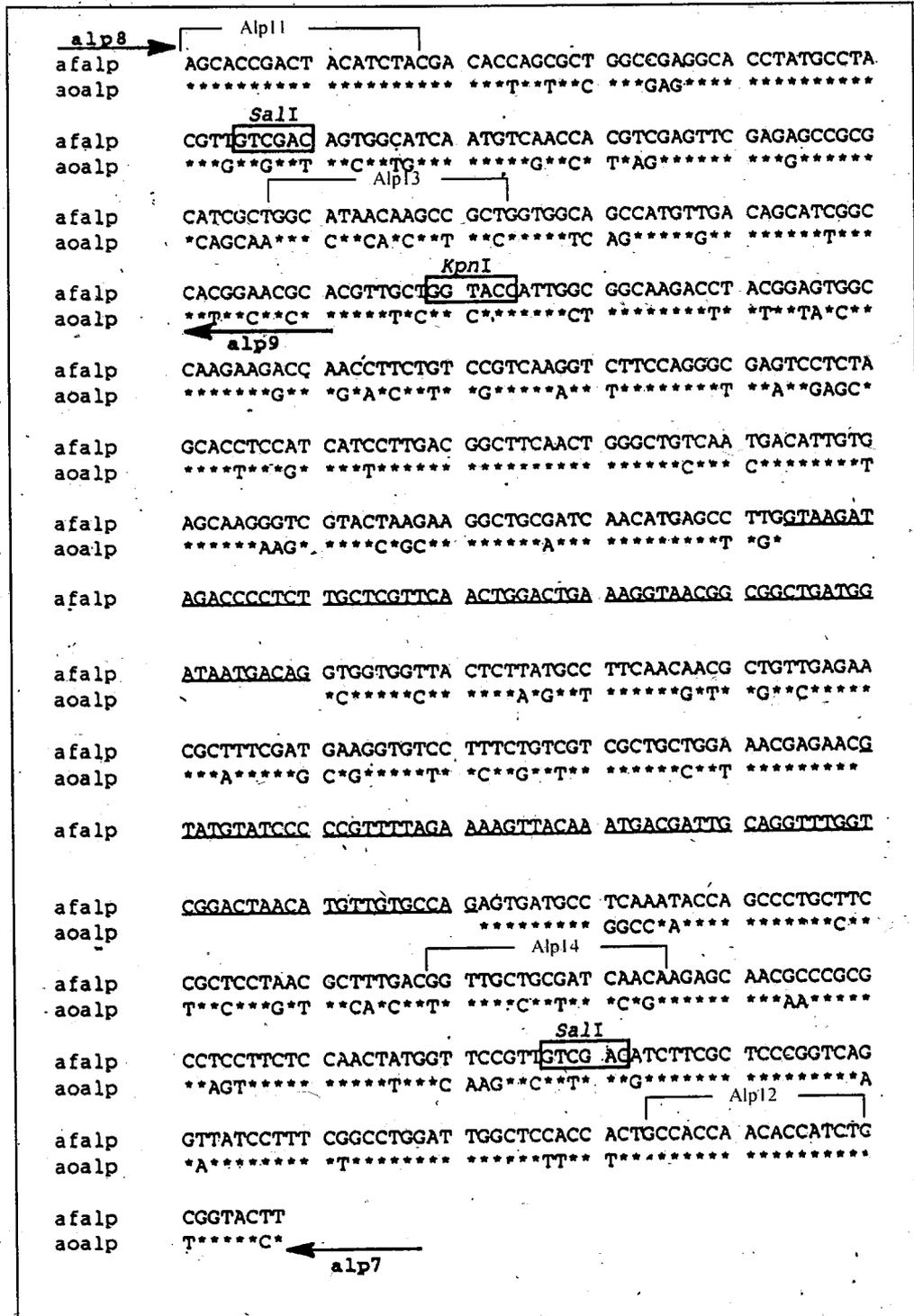
Deux objectifs majeurs ont été poursuivis lors de ce travail :

1. la mise au point d'une technique PCR et son évaluation pour la détection d'*Aspergillus sp.* dans les liquides de lavage broncho-alvéolaire.
2. l'évaluation d'une technique PCR pour la détection d'*Aspergillus sp.* dans le sang périphérique. Cela a nécessité la mise au point d'un modèle expérimental d'aspergillose invasive de façon à recueillir un nombre suffisant d'échantillons positifs ou potentiellement positifs.

Parallèlement à ces deux axes majeurs , nous avons cherché à savoir si la résistance *in vitro* d'*Aspergillus fumigatus* aux antifongiques pouvait être un critère de pathogénicité.

CHAPITRE II.

Figure II.1. Séquence du gène de l'alkaline protéase d'*A. fumigatus* et *A. flavus* choisie comme cible. Position des amorces Alp11-Alp 12, et Alp13 -Alp 14. D'après Reichard et coll. (130).



2. CHAPITRE II. MISE AU POINT D'UNE TECHNIQUE PCR POUR LA DETECTION D'ADN D'*A. FUMIGATUS*. EVALUATION SUR LAVAGES BRONCHOALVEOLAIRES.

2.1. INTRODUCTION.

2.1.1. Choix de la cible.

Au moment où nous avons initié ce travail, Tang et coll (158) venaient de publier une technique de PCR appliquée à la détection d'ADN d'*Aspergillus sp.* dans les liquides de lavage broncho-alvéolaire (LBA). La cible choisie correspond à la séquence de gène codant pour des protéases à activité élastinolytique, dont on pensait à l'époque qu'elles avaient un rôle majeur dans la virulence des souches d'*A. fumigatus* responsables d'API (157).

La séquence N-terminale de 25 acides aminés du gène de cette protéase avait été caractérisée par Reichard et al. 1990 (130). La séquence a une longueur de 748 bp (Figure II.1).

La technique publiée par Tang et al. (158) consiste en une amplification de la cible par PCR grâce à deux amorces Alp11 et Alp12 et hybridation secondaire par Southern blot avec une sonde nucléotidique marquée.

Afin d'éviter de réaliser des Southern blot comme technique de contrôle de spécificité dans le but de rendre la technique facilement réalisable en routine de laboratoire, nous avons choisi de développer une seconde PCR appelée « PCR nichée ». Celle-ci consiste à réaliser une seconde amplification en utilisant des « amorces internes » à la séquence cible amplifiée avec le premier couple d'amorces appelées « amorces externes ». On sélectionne ainsi une séquence cible, dont une partie plus courte est réamplifiée avec le second couple d'amorces. Ceci permet d'augmenter à la fois la sensibilité et la spécificité de l'amplification.

Tableau II.1. Caractéristiques des amorces Alp11, Alp12, Alp13 et Alp14.

Amorces	Séquences	Nombre de nucléotides	T° de fusion (Tm)
Externes (Tang et coll. (158))			
Alp11	5'-AGC ACC GAC TAC ATC TAC-3'	18	54°C
Alp12	5'-GAG ATG GTG TTG GTG GC-3'	17	54°C
Internes choisies (62)			
Alp13	5'-CTG GCA TAC AAC GCC GCT G-3'	19	62°C
Alp14	5'-TTG TTG ATC GCA GCA ACC-3'	18	54°C

Tableau II.2 . Souches fongiques utilisées dans la mise au point de la PCR.

Souches fongiques	Nom de l'espèce	Nombre	Source
<i>Aspergillus</i>	<i>A. fumigatus</i>	3	Souches cliniques
	<i>A. flavus</i>	3	
	<i>A. nidulans</i>	2	
	<i>A. niger</i>	2	
	<i>A. terreus</i>	1	
	<i>A. glaucus</i>	1	
Champignons filamenteux	<i>Fusarium oxysporum</i>	1	ATCC 10154
	<i>Fusarium solani</i>	1	Souches cliniques
	<i>Paecilomyces sp.</i>	1	
	<i>Penicillium sp.</i>	1	
	<i>Pseudallescheria boydii</i>	2	
	<i>Trichoderma harzianum</i>	2	
	<i>Rhizopus rhizopodiformis</i>	1	
	<i>Mucor sp.</i>	1	
Levures du genre <i>Candida</i>	<i>C. albicans</i>	1	ATCC 10231
	<i>C. glabrata</i>	1	ATCC90030

2.1.2. PCR nichée : choix des amorces.

Nous avons choisi les amorces internes grâce à un programme informatique (Genome.net) qui en permet le choix en fonction de caractéristiques établies.

Deux amorces ont été choisies et appelées Alp13 et Alp14. Les caractéristiques en sont données dans le tableau II.1.

2.2. MATERIEL ET METHODES.

2.2.1. Cultures fongiques.

Toutes les cultures de champignons utilisées au cours de la mise au point de la PCR ont été cultivées sur Sabouraud dextrose agar ou SDA (Oxoid, Unipath, Bashinstoke, England) et incubées à 35°C ou 28°C jusqu'à 5 jours selon les souches. Dans le tableau II.2. figure la liste des souches utilisées lors de la mise au point.

Les souches ont été identifiées selon les caractéristiques macroscopiques et microscopiques le plus souvent après repiquage sur gélose au malt. L'analyse microscopique a été réalisée après empreintes prises grâce au cellophane adhésif et montage dans du bleu de lactophénol

2.2.2. Patients.

Tous les patients ayant subi une bronchoscopie au Centre Hospitalier Universitaire de Liège, qu'ils soient hospitalisés ou non, ont été inclus dans le protocole sans aucune autre sélection. L'étude s'est déroulée sur une période de 12 mois (1997-1998).

Tous les dossiers des patients ont été examinés de façon à définir les groupes de patients d'après les données cliniques, radiologiques, histologiques et les données autopsiques en cas de décès du patient.

2.2.2.1. Classification des patients selon la co-morbidité.

Au total, 74 patients immunodéprimés et 108 non immunodéprimés ont été inclus dans l'étude.

Les 74 patients immunodéprimés l'étaient pour différentes étiologies :

- corticothérapie au long cours
 - pour BPCO (bronchite chronique pulmonaire obstructive), (n=18)
 - pour d'autres pathologies (n=13)
- hémopathie maligne (n=16) dont 11 greffes de moelle
- transplantation d'organe solide (n=5)
- cancer (n=19)

Les 103 patients non immunodéprimés avaient subi une bronchoscopie à la recherche de l'étiologie d'une pneumonie sévère.

2.2.2.2. Classification des patients selon le risque aspergillaire.

Parmi les 177 patients, trois groupes ont été définis :

Groupe A (n=10): aspergillose prouvée ou probable.

-prouvée: sur des critères histologiques c'est-à-dire s'il existe des filaments mycéliens avec signes d'invasion vasculaire et culture fongique positive pour *Aspergillus sp.* d'un ou plusieurs prélèvements respiratoires ou d'une biopsie pulmonaire.

-probable: culture positive pour *Aspergillus sp.* d'un ou plusieurs prélèvements respiratoires et arguments cliniques ou radiologiques (infiltrats pulmonaires, opacité nodulaire, cavitation, ou fièvre persistante sous antibiotiques au long cours) ou histologie positive avec culture fongique négative.

Groupe B : colonisation aspergillaire

Culture positive d'un ou plusieurs prélèvements respiratoires sans argument clinique ou radiologique d'aspergillose invasive.

Groupe C : aucune évidence d'aspergillose.

Cultures fongiques négatives pour *Aspergillus sp.* et absence d'argument clinique ou radiologique en faveur d'une aspergillose invasive.

2.2.3. Lavages broncho-alvéolaires.

Tous les lavages broncho-alvéolaires prélevés ont été traités selon les protocoles établis dans le laboratoire de microbiologie. Ils ont été mis en culture à la recherche de bactéries, champignons, et virus.

Après homogénéisation et avant traitement pour analyses de routine, une partie (1 à 5 ml) a été transférée dans un tube stérile et congelée directement à -20°C pour analyse ultérieure en PCR.

2.2.4. Protocole d'extraction de l'ADN.

2.2.4.1. Organisation des « locaux PCR ».

La réalisation de cette technique nécessite de nombreuses précautions. En effet, de part son effet d'amplification, elle permet de produire de très grandes quantités d'amplicons (produits amplifiés), ce qui à présente un risque de contamination pour d'autres prélèvements, si des précautions ne sont pas appliquées. Ainsi les règles dictées par Kwok et Higushi (80) ont été suivies tout au long de cette étude.

Quatre pièces sont dévolues à la réalisation de la technique PCR. Dans toutes ces pièces une blouse est à la disposition de celui qui entre et le port de gants est obligatoire.

Le nettoyage régulier des surfaces se fait grâce à une solution Phagosept[®] Spray (Merck Eurolabo, Belgique) et à une solution qui permet de détruire l'ADN (ADN Away[®], Promega, Belgique).

De plus des ultra-violets sont en permanence présents dans les pièces 1, 3 et 4 de façon à détériorer l'ADN éventuellement encore présent dans la pièce.

Les trois pièces sont réparties comme suit :

1. Pièce pré-PCR :

Extraction de l'ADN à partir des prélèvements cliniques. L'extraction à partir des cultures fongiques a été réalisée dans une 4^{ème} pièce indépendante de façon à ne pas contaminer ce local avec des quantités importantes d'ADN fongique.

Préparation du mix (mélange réactionnel pour l'amplification contenant le tampon, les nucléotides et la Taq polymérase) et distribution de l'ADN extrait dans chaque tube. Stockage des réactifs nécessaires à la préparation du mix.

2. Pièce d'amplification :

Cette pièce contient deux Thermocycleurs (GeneAmp® 2400 system, Perkin Elmer Cetus, Norwalk, Connect.) et (Mastercycler® gradient Eppendorf, Merck Eurolab, Belgique).

3. Pièce pour la PCR nichée.

Transfert de produits amplifiés dans de nouveaux tubes contenant le mix pour la réalisation de la seconde PCR.

Comme les tubes de la première amplification sont ouverts dans cette pièce, celle-ci doit être soumise à un nettoyage particulièrement soigné.

On sépare les tubes déjà amplifiés de ceux contenant le nouveau mix avec une paroi en plastique de façon à éviter au maximum les aérosols d'amplicons contaminants.

Cette étape est cruciale dans la génération des contaminations.

4. Pièce post-PCR :

Révélation des produits de PCR sur gel d'agarose. Prise de photographie Polaroid® des gels.

Cette pièce est également contaminée par des amplicons puisque l'on ouvre les tubes après la PCR pour déposer sur gel d'agarose. Il est très important que tout ce qui sort de cette pièce soit considéré comme à danger de contamination. La décontamination des surfaces doit être particulièrement efficace. Des U.V. sont allumés en dehors des heures de travail pour dénaturer les éventuels amplicons qui auraient échappé à la décontamination des surfaces.

Le passage dans les pièces 3 ou 4 n'autorise plus un passage dans la pièce 1 le même jour.

2.2.4.2. Extraction de l'ADN génomique des champignons.

La technique utilisée a été adaptée de Tang et coll. (158).

Cultures en milieu liquide: les conidies ou les levures sont prélevées à partir des cultures sur milieu solide et sont inoculées dans des boîtes de Pétri stériles de 5 cm de diamètre contenant 1.5 ml de milieu liquide (glucose 2%, extrait de levure 0.3% et peptone 1%).

Les boîtes ont ensuite été incubées de 24h à 48h (selon les souches) à 35°C. Le jour suivant le tapis mycélien obtenu est séché sur un papier Joseph (Merck Eurolab, Leuven, Belgique) et transféré dans un tube stérile de 14 ml en polypropylène (Falcon, Becton Dickinson, new Jersey).

Lyse des cellules fongiques: quatre ou cinq billes de verre stériles de 3 mm de diamètre sont ajoutées pour faciliter l'éclatement des cellules. Le tube est plongé ensuite pendant 10 secondes dans l'azote liquide, puis vortexé jusqu'à obtention d'une sorte de purée homogène.

On ajoute ensuite le tampon d'extraction de l'ADN (Annexe 6) (0.8ml) et on vortexe de nouveau de façon à obtenir un liquide homogène.

Séparation de l'ADN et des protéines: le tampon d'extraction de l'ADN (Annexe 6) est ajouté (0.8ml) et on mélange de nouveau de façon à obtenir un liquide homogène.

Un mélange (v/v) de phénol-chloroforme (v/v) (Merck Eurolab, Leuven, Belgique) est ajouté et après mélange par Vortex, il est centrifugé 15 min. à 15.000 x g. La phase aqueuse (phase supérieure) est récupérée et extraite de nouveau selon la même procédure. L'extraction se poursuit par une dernière étape utilisant du chloroforme (v/v) selon la même procédure.

Précipitation de l'ADN. La phase supérieure est collectée et transférée dans un nouveau tube de 2 ml (Sarstedt, Nümbrecht, Allemagne). Deux volumes d'éthanol absolu conservé à -20°C (Merck Eurolab) sont ajoutés pour précipiter le ADN et le tube est placé 20 min. dans le congélateur à -20°C. Après centrifugation (15min. à 15.000g) l'éthanol est éliminé à la pipette puis le reste est évaporé dans un bloc chauffant à sec.

Le culot est ensuite remis en suspension dans une solution de RNase A (Sigma Aldrich, St. Louis, USA) à 50 µg/ml puis congelé à -20°C jusqu'à traitement en PCR.

2.2.4.3. Extraction de l'ADN à partir des lavages bronchoalvéolaires.

Cette méthode a été adaptée des techniques publiées par Tang et al. (158) et Spreadbury et al.(146). Un échantillon de 250 µl de LBA est prélevé et mélangé au même volume de tampon d'extraction (le même qui est utilisé pour l'extraction de l'ADN génomique). Après homogénéisation des solutions, on ajoute un volume de 20 µl d'une solution (conservée à -20°C) de protéinase K (Sigma, St-Louis, USA) à 10mg/ml. Après homogénéisation au Vortex, le tube est placé dans un bain-marie à 65°C pendant une heure, puis porté à ébullition pendant 15 minutes pour inactiver l'enzyme.

Séparation de l'ADN et des protéines: la séparation de l'ADN des protéines est réalisée par deux extractions successives qui s'effectuent volume à volume.

La première utilise un mélange phénol-chloroforme-isoamylalcool (25 :24 :1) qui est ajouté v/v soit 500 µl, à la solution traitée à la protéinase K. Après homogénéisation par Vortex, le tube est centrifugé 15 minutes à 15.000g puis la phase aqueuse est recueillie. La seconde extraction utilise un mélange de chloroforme-isoamylalcool qui est ajouté v/v selon la même procédure que précédemment.

Après centrifugation, la phase supérieure est recueillie pour précipitation de l'ADN selon la même procédure que celle décrite pour l'extraction d'ADN génomique.

Précautions: tout le long des procédures d'extraction, des pipettes à déplacement positif, munies de filtres pour éviter les aérosols, sont utilisées.

Les extractions sont réalisées sous hotte chimique pour éviter les vapeurs de phénol.

Des contrôles d'extractions en utilisant de l'eau et du tampon d'extraction sont également réalisés pour contrôler la procédure.

2.2.4.4. Dosage de l'ADN extrait.

A partir du ADN extrait on réalise une dilution au 200^{ème} dans de l'eau soit 3 µl dans 600 µl d'eau. On dose les solutions grâce à un spectrophotomètre à 260 nm et à 280 nm pour contrôler la pureté de l'ADN obtenu (c'est-à-dire absence de protéine).

Le calcul se fait comme suit :

$$C(\mu\text{g/ml}) = D.O._{260} \times C.E. \times \text{dilution}$$

C.E. : coefficient d'extinction molaire (C.E.=37 ADN simple brin, 50 ADN double brin)
dilution : 200

Le rapport des D.O. à 260/280 nm doit être compris entre 1.8 et 2.

2.2.5. Amplification de l'ADN par PCR.

2.2.5.1. Paramètres de la PCR nichée.

Les deux PCR successives ont été réalisées selon les mêmes conditions mise à part la concentration de MgCl₂.

2.2.5.1.1. Préparation du mix.

Les réactions d'amplification ont été réalisées dans un volume final de 50µl contenant:

-**Tampon** contenant 10 mM Tris-HCl à pH 8.3, 50 mM KCl et 1.5 mM MgCl₂ (2.25 mM pour la seconde étape de la PCR) (tampon 10x, Takara, Otsu, Japon).

-**primers** : 0.4 µM soit 20 pmol, (synthétisés par Eurogentec, Belgique)

-**dNTP**: 0.2 mM de chaque déoxynucléotide triphosphate (solution équimolaire à 2.5 mM de dATP, dCTP, dGTP, dTTP (Takara, Otsu, Japon)

-**Taq polymérase** (Taq Takara, Otsu, Japon) : 1.25U.

On utilise en général des solutions concentrées (x10) de chaque réactif. Tous les réactifs utilisés sont prêts à l'emploi. En effet, les *Aspergillus* étant ubiquitaires, la préparation de réactifs et leur stérilisation comprend toujours un risque de contamination par des spores de l'environnement.

Les composants du mix sont préparés dans un seul tube puis répartis dans des tubes de 0.2 ml (Eurogentec, Seraing , Belgique).

Au cours de la première étape de la PCR, le mix est recouvert d'une goutte d'huile minérale (Sigma, StLouis , Min.) pour limiter les contaminations par aérosol lors du transfert du produit amplifié dans le nouveau mix.

L'ADN « cible » ,qui a été préalablement extrait, est ajouté dans chaque tube en dernier lieu, chaque tube étant fermé après avoir été rempli.

Au cours de la seconde étape de la PCR nichée, c'est le produit amplifié qui est ajouté (5 µl) au mix nouvellement préparé.

Tableau II. 3. Préparation du mix pour la PCR nichée

Réactifs (mix)	Volume par tube (µl)	
	1 ^{ère} étape de la PCR nichée	2 ^{ème} étape de la PCR nichée
Taq polymérase (5U/µl)	0.25	0.25
Tampon PCR 10x	5	5
dNTPs (2.5mM)	4	4
MgCl ₂ (15mM)	0	1.5
Amorce Alp11 ou Alp13 (2µM)	10	10
Amorce Alp12 ou Alp14 (2µM)	10	10
H ₂ O	15,75	14.25
Total Mix	45	45
ADN	5	5 (produit amplifié)

Tableau II.5. Caractéristiques des amorces du gène de la bêta-globine (135).

Amorces	Séquences	Nombre de nucléotides	T° de fusion (Tm)
Bglo 1	5'-CCT-TTG-TTC-CCT-AAT-CCA-A-3'	19	58°C
Bglo 2	5'-CCT-CAC-CTT-CTT-TCA-TGG-AG-3'	20	63°C

2.2.5.1.2. Cycles d'amplification.

L'amplification a été réalisée dans un thermocycleur Perkin Elmer Cetus® ou sur un Mastercycleur® gradient Eppendorf (Merck Eurolab).

Tableau II.4. Paramètres de la PCR nichée.

Étapes de la PCR nichée	T°C (1 ^{ère} étape)	T°C (2 ^{ème} étape)	Temps
Dénaturation de l'ADN	94	94	5 min
Dénaturation	94	94	60 sec
Cycles (30) Hybridation	50	65	60 sec
Elongation	72	72	60min
Elongation	72	72	7 min

La dernière étape est souvent suivie d'un maintien à 4°C pour conserver les produits amplifiés avant la révélation.

2.2.6. Amplification du gène de la bêta-globine.

L'amplification du gène de la β -globine a été réalisée pour valider l'absence d'inhibiteurs de PCR selon la technique publiée par Saiki et coll. (135). La séquence des amorces est donnée dans le tableau II.5. L'absence d'amplification du gène de la β globine ne permet pas de valider un résultat négatif pour la PCR *Aspergillus*.

2.2.6.1. Paramètres de la PCR

2.2.6.1.1. Préparation du mix:

Les PCR ont été réalisées dans un volume final de 50µl contenant :

-10 mM Tris-HCl à pH 8.3, 50 mM KCl et 1.5 mM MgCl₂ (tampon 10x, Takara, Otsu, Japon).

-primers : 0.4 µM (soit 20 pmol), (synthétisés par Bio-source, Nivelles, Belgique)

-dNTP : 0.2 mM de chaque déoxynucléotide triphosphate (solution équimolaire à 2.5mM de dATP, dCTP, dGTP, dTTP, Takara, Otsu, Japon)

- Taq polymérase (Taq Takara, Otsu, Japon) : 1.25U.

Tableau II.6. Préparation du mix pour amplification de la β-globine.

Réactifs (mix)	Volume/tube (µl)
Taq polymérase (5U/µl)	0.5
Tampon PCR 10x	5
dNTPs (2.5 mM)	4
Amorce Bglo 1 (2µM)	10
Amorce Bglo 2 (2µM)	10
H ₂ O	15,5
Total Mix	45
ADN	5

2.2.6.1.2. Cycles d'amplification.

Le détail des cycles d'amplifications sont décrits dans le tableau ci-dessous.

Tableau II.7. Paramètres de la PCR β-globine.

Étapes	T°C	Temps
Dénaturation de l'ADN	95	3 min
Dénaturation	94	30 sec
Cycles (30) Hybridation	54	30 sec
Elongation	72	30 sec
Elongation	72	7 min

2.2.6.2. Détection des produits de PCR.

2.2.6.2.1. Gel d'agarose.

L'ADN amplifié après la seconde PCR est détecté sur gel d'agarose à 2% (Eurogentec, Belgique) en tampon Tris-borate-EDTA (TBE, cf. annexes) dans lequel on ajoute du bromure d'éthidium (0.5µg/ml) qui va permettre de visualiser l'ADN amplifié sous ultra-violets. Le tampon d'électrophorèse est le TBE (1x) sans bromure d'éthidium.

Les gels d'agarose sont coulés dans la cuve à électrophorèse (Gibco BRL, Life Technologies, Gaithersburg) dans un support muni de 2 peignes de 14 trous permettant faire 28 dépôts par gel. Lors de chaque électrophorèse, un marqueur de poids moléculaire est utilisé pour évaluer la taille des bandes présentes. Les marqueurs IV et V (Eurogentec, Belgique) ont été utilisés au cours du travail.

Chaque produit amplifié (10µl) est mélangé à 2 µl d'une solution à base de bleu de bromophénol (Annexe 5) ; 7µl du mélange sont ensuite déposés. La solution de bleu de bromophénol permet de visualiser l'avancement de la migration au cours de l'électrophorèse et la présence de glycérol permet au mélange de rester au fond du puits.

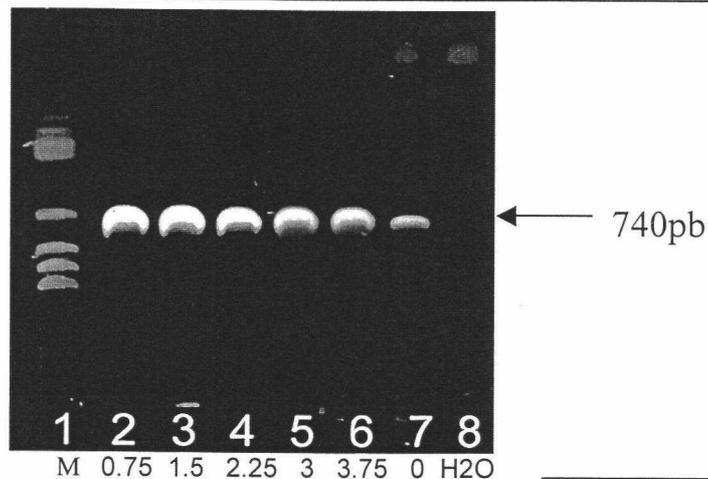
2.2.6.2.2. Paramètres de l'électrophorèse.

Le fragment d'ADN migre d'autant plus vite que sa taille est petite, si bien que la durée de l'électrophorèse dépend entre autres de la taille du fragment amplifié. Le temps de migration utilisé était de 25 minutes, avec un voltage de 100 volts et ampérage 500mA.

2.2.6.2.3. Révélation après électrophorèse.

La molécule de bromure d'éthidium s'intercale entre les brins d'ADN rendant le fragment amplifié visible en lumière ultraviolette à 254 nm. On dépose le gel sur un transilluminateur UV muni d'un écran protecteur et une photographie du gel est prise sur film Polaroid® (iso 3000).

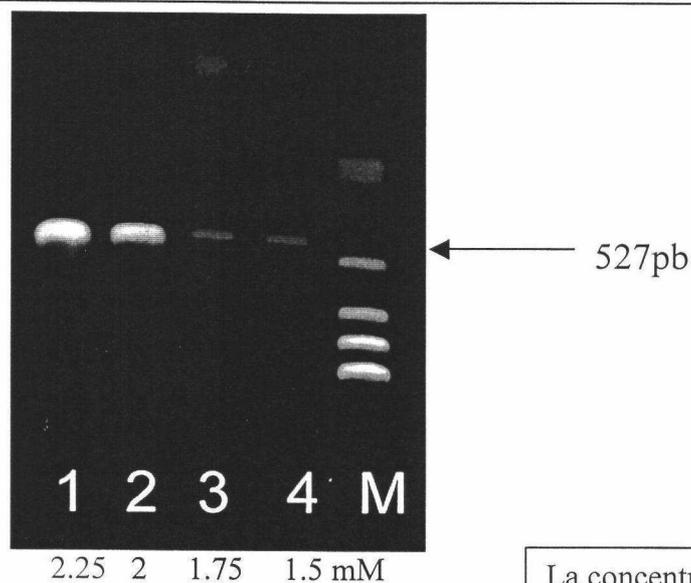
Photo II.1. Electrophorèse des produits d'amplification d'*A. fumigatus* en fonction de la concentration en $MgCl_2$. (1^{ère} étape de la PCR nichée, amorces Alp11 et Alp12).



Puits 1: marqueur IV ;
de 2 à 7 : concentrations de $MgCl_2$ (mM);
8 : témoin négatif

La concentration de
1.5 mM de $MgCl_2$ a
été retenue

Photo II.2. Electrophorèse des produits d'amplification d'*A. fumigatus* en fonction de la concentration en $MgCl_2$. (2^{ème} étape de la PCR nichée, amorces Alp13 et 14).



Puits 1 à 4 : Concentrations de $MgCl_2$
Puits M : marqueur IV.

La concentration de 2.25
mM de $MgCl_2$ a été
retenue.

2.3. RESULTATS.

2.3.1. Dosage de l'ADN extrait d'*A. fumigatus*.

La concentration obtenue est de 0.92 µg/µl. Des dilutions successives d'ADN ont été réalisées dans de l'eau pour tester la sensibilité de la technique.

2.3.2. Contrôle des paramètres de la 1^{ère} étape de la PCR nichée.

Les paramètres de la première PCR ont été analysés pour vérifier si dans nos conditions de travail les résultats obtenus concordaient avec les résultats de Tang et coll. (158). Les tests ont été effectués avec l'ADN d'*A. fumigatus*.

2.3.2.1. Température d'hybridation des amorces.

La température de 63°C a été adoptée pour l'hybridation des amorces. Celle-ci permet d'obtenir une bande spécifique de 740 pb pour *A. fumigatus* et 690 pb pour *A. flavus*. D'autres températures testées n'ont pas donné de meilleur résultat.

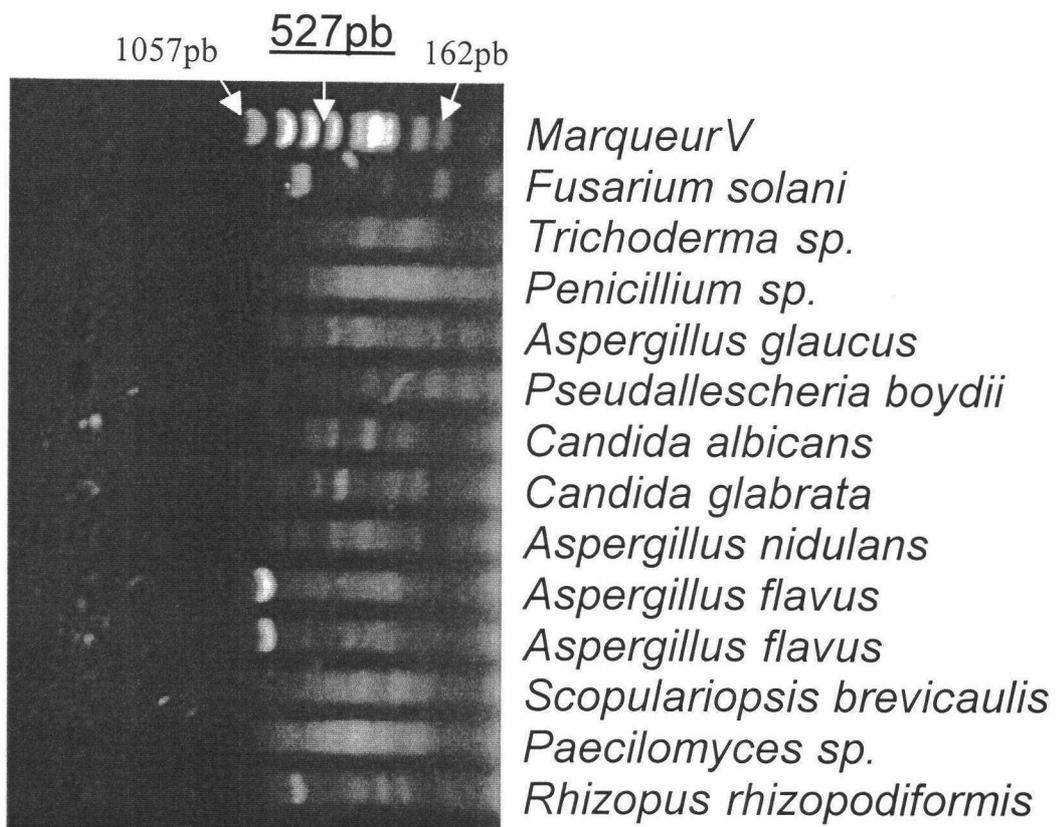
2.3.2.2. Concentration en MgCl₂.

La concentration en MgCl₂ a été recontrôlée puisqu'elle dépend de la Taq polymérase utilisée. Nous avons testé de 0 à 3.75 mM (concentration finale dans le mix) et nous avons retenu la concentration de 1.5 mM qui est la concentration de base dans les tampons de PCR (Photo II.1).

2.3.3. Détermination des paramètres de la deuxième étape de la PCR nichée.

Les déterminations ont été réalisées avec l'ADN d'*A. fumigatus*.

Photo II.3. Spécificité de la PCR nichée vis à vis d'ADN extrait de champignons filamenteux et de levures. La bande spécifique de 527 pb n'est observée pour aucune des souches testées. Pour *A. flavus* une bande apparaît située entre 1057 et 770 pb.



2.3.3.1. Température d'hybridation des amorces.

Les températures variant de 54°C à 63°C ont été testées. La température de 63°C a été retenue car elle permet l'amplification d'un fragment d'ADN d'*A. fumigatus* de 527 pb.

2.3.3.2. Concentration en MgCl₂.

Les concentrations variant de 1.5 à 2.25 mM et nous avons retenu la concentration de 2.25 mM qui est la concentration de base dans les tampons de PCR (Photo II.2). Les concentrations de 2.75 et 3 mM n'apportaient pas d'amélioration par rapport à la concentration retenue (résultats non joints).

2.3.3.3. Nombre de cycles d'amplification.

Une PCR nichée compte en général de 50 à 60 cycles au total. Après avoir testé plusieurs combinaisons, la séquence de deux fois 30 cycles d'amplification a été retenue.

2.3.4. Sensibilité de la PCR.

La sensibilité de la méthode a été évaluée sur des dilutions de 10 en 10 d'ADN d'*A. fumigatus* et d'*A. flavus* extraits selon le protocole précédemment décrit (cf.§2.2.4.2).

La sensibilité de la PCR nichée est de 25 fg pour *A. fumigatus* et 10 pg pour *A. flavus*. Il faut noter qu'en ce qui concerne *A. flavus* les résultats ont été observés après la première étape de PCR et après 42 cycles. En effet, aucune bande spécifique n'a été observée après la deuxième étape de PCR.

2.3.5. Spécificité de la PCR.

La spécificité a été évaluée sur différentes souches de champignons filamenteux, sur de l'ADN de *Candida albicans* et *C. glabrata* et sur de l'ADN de cytomégalovirus (obtenu dans le laboratoire de microbiologie du C.H.U. de Liège à partir d'une culture positive) (Photo II.3.). Le choix s'est

Tableau II.8. Résultats de la PCR sur les LBA des patients du groupe A (aspergillose prouvée ou probable).

N°	Pathologie sous-jacente	API	LBA/ culture fongique	Autopsie réalisée	PCR	Evolution (traitement)
1	Transplantation de foie	Prouvée ^{dis}	<i>A. fumigatus</i>	oui	+	Décès
2	BPCO corticodépendant	Prouvée ^{acn}	<i>A. fumigatus</i>	oui	+	décès ^(AmB)
3	Leucémie lymphoïde chronique + BPCO	Probable	<i>A. fumigatus</i>	non	+	Décès
4	Arthrite rhumatoïde corticodépendant	Prouvée	Negative	oui	+	Décès
5	BPCO corticodépendant	Prouvée ^{dis}	<i>A. fumigatus</i>	oui	+	Décès
6	Cancer de l'estomac	Prouvée	<i>A. fumigatus</i>	oui	+	Décès
7	BPCO corticodépendant	Prouvée ^{acn}	<i>A. fumigatus</i>	oui	+	Décès
8	Leucémie myéloïde chronique en crise blastique	Probable	<i>A. fumigatus</i>	non	+	Survie ^(Vor)
9	Leucémie lymphoïde chronique en crise blastique	Prouvée	Negative	oui	+	Décès
10	BPCO corticodépendant	Probable	<i>A. fumigatus</i>	non	+	Décès

N°: numéros attribués aux patients ; API : aspergillose pulmonaire invasive ; LBA : lavage broncho-alvéolaire ; BPCO : bronchite pulmonaire chronique obstructive ; ^{acn} aspergillose chronique nécrosante ; ^{dis} aspergillose disséminée ; ^(AmB) : amphotéricine B ; ^(vor) : voriconazole.

Tableau II.9. Résultats de la PCR sur les LBA des patients du groupe B (colonisation).

N°	Pathologie sous-jacente	API	LBA/ culture fongique	Autopsie réalisée	PCR	Evolution (traitement)
1	Valvulopathie mitrale	non	<i>A. fumigatus</i>	non	+	Survie ^(AmB/It)
2	BPCO corticodépendant	non	<i>A. fumigatus</i>	non	+	décès
3	BPCO corticodépendant	non	<i>A. fumigatus</i>	oui	+	décès
4	BPCO non corticodépendant	non	<i>A. fumigatus</i>	non	+	survie
5	Myélodysplasie en crise blastique	non	<i>A. flavus</i>	oui	+	décès

N°: numéros attribués aux patients ; API : aspergillose pulmonaire invasive ; LBA : lavage bronchoalvéolaire ; BPCO : bronchite pulmonaire chronique obstructive ; ^(AmB+It) : amphotéricine B et itraconazole.

porté sur des pathogènes ou contaminants susceptibles d'être rencontrés dans les lavages bronchoalvéolaires.

La bande spécifique de 527 pb n'est pas apparue pour les souches d'*A. niger*, *A. nidulans*, *A. glaucus*, *A. terreus* ou *A. flavus*. En ce qui concerne *A. flavus*, une bande située entre 800 et 1000 pb a été observée. L'amplification de cette espèce a donc été recommencée dans les mêmes conditions que celles décrites par Tang et coll. (158) c'est-à-dire après 42 cycles. Ceci a permis d'observer la bande de 690 pb décrite par les auteurs. Il a donc été décidé de recommencer la première étape de la PCR chaque fois que des bandes non spécifiques très marquées apparaîtraient entre 900 et 1000 paires de bases.

2.3.6. Evaluation de la PCR sur les lavages bronchoalvéolaires.

2.3.6.1. Résultats de la PCR pour les groupes A, B et C.

Les résultats sont donnés dans les tableaux ci-joints (Tableaux II. 8, 9 et 10).

Au total, 5 échantillons ont été exclus du fait de l'absence d'amplification de la bêta-globine.

2.3.6.2. Caractéristiques histologiques des aspergilloses pulmonaires invasives (Groupe A).

Parmi les patients ayant développé une aspergillose pulmonaire invasive, la moitié d'entre eux avaient une bronchite pulmonaire chronique obstructive, soit 5 patients sur 10. Parmi ces 5 patients, seuls trois d'entre eux ont subi une autopsie. L'étude histologique des trois prélèvements pulmonaires a montré pour deux d'entre eux, la présence d'une aspergillose chronique nécrosante (acn) qui est la forme histologique généralement associée aux patients atteints de bronchite pulmonaire chronique obstructive qui développent une aspergillose invasive. Le troisième patient a développé une aspergillose disséminée.

Tableau II.10. Résultats de la PCR sur les LBA des patients du groupe C (aucune évidence d'aspergillose invasive)

N	Pathologie sous-jacente	API	LBA/ culture fongique	Autopsie réalisée	PCR	Evolution
1	Brûlures multiples	non	Négative pour <i>Aspergillus</i>	non	+	survie
161	Pneumopathie sévère	non	Négative pour <i>Aspergillus</i>	Pas dans tous les cas	-	variable

N: nombre de patients ; API : aspergillose pulmonaire invasive ; LBA : lavage bronchoalvéolaire.

Tableau II.11. Comparaison des résultats de la culture pour recherche d'*Aspergillus sp.* versus PCR dans les groupes A, B et C.

Groupes (nombre de patients)	Culture positive pour <i>Aspergillus sp.</i>	Culture négative pour <i>Aspergillus sp.</i>	PCR <i>Aspergillus sp.</i> positive
A (n=10)	9	1	10
B (n=5)	5	0	5
C (n=162)	0	1	1

Tableau II.12. Résultats des cultures des lavages bronchoalvéolaires du groupe C.

Microorganismes présents en culture	Nombre de cultures positives (%)
Bactéries	50 (30)
<i>Candida sp.</i>	28 (17)
Bactéries + <i>Candida sp.</i>	31 (19)
Virus	2 (0.01)
Culture négative	50 (30)

2.3.6.3. Résultats des cultures bactérienne, fongique et virale des lavages bronchoalvéolaires.

Les résultats des cultures sont donnés dans les tableaux II.11 et 12. On peut remarquer que malgré la positivité de plus de 50% des cultures, cela n'a pas engendré de faux positifs pour la PCR *Aspergillus sp.*

2.3.6.4. Sensibilité, spécificité et valeurs prédictives.

Les chiffres sont donnés dans le tableau ci-dessous.

Tableau II.13. Résultats des sensibilité, spécificité, valeurs prédictives de la PCR.

Sensibilité	100%
Spécificité	96%
VPP	62%
VPN	100%
Faux positifs	3.4%

VPP : valeur prédictive positive

VPN : valeur prédictive négative

La valeur prédictive positive est calculée en considérant la technique en tant que test diagnostic d'une aspergillose pulmonaire invasive. Si l'on calcule la VPP en tant que test diagnostic pour la présence d'ADN d'*Aspergillus sp.*, la valeur est alors supérieure (93%).

Le nombre de « faux-positifs » correspond aux 5 cas de colonisation plus un cas observé dans le groupe C. Ce cas correspond à un patient brûlé n'ayant pas reçu de traitement anti-aspergillaire et n'ayant pas développé d'aspergillose invasive. Les cultures du lavage bronchoalvéolaire de ce patient étaient positives pour des bacilles à Gram négatif.

2.4. DISCUSSION.

Sensibilité et spécificité de la PCR. Ce travail a permis la mise au point d'une technique de PCR pour l'amplification d'ADN d'*Aspergillus sp.* applicable à la détection d'*A. fumigatus* et d'*A. flavus* dans les lavages bronchoalvéolaires. En comparaison de la technique PCR de Tang et coll. (158) qui utilisent les mêmes amorces externes suivie d'une hybridation après Southern Blot, la sensibilité est améliorée de 20 fois puisque l'on détecte 25 fg d'ADN d'*A. fumigatus* comparativement à 500 fg détecté par Tang et coll. (158).

Par contre en ce qui concerne *A. flavus*, la technique développée ne permet pas d'amplifier la bande spécifique de 527 pb. Par contre en appliquant les même conditions que Tang et coll. (158), c'est à dire après 42 cycles d'amplification avec les amorces externes, la sensibilité de la PCR (10 pg) était meilleure que celle publiée par les auteurs (50 pg) après révélation par marquage au bromure d'éthidium. La moins bonne sensibilité de la PCR à cet égard est peu pénalisante dans notre institution, car l'isolement d'*A. flavus* en culture y est excessivement rare.

La spécificité de cette technique est par ailleurs excellente puisqu'aucune réaction croisée n'a été observée au cours des essais incluant champignons filamenteux, levures et virus .

PCR sur échantillons cliniques. La spécificité de la technique a été confirmée sur les échantillons cliniques puisque, malgré la présence de nombreux agents pathogènes (70% des lavages bronchoalvéolaires du groupe C étaient positifs pour au moins un agent infectieux), on compte un seul «faux positif» dans ce groupe, dont la culture n'a pas permis d'identifier d'*Aspergillus* mais des bacilles à Gram négatif. Le patient ne présentait aucun signe d'aspergillose invasive et a bien évolué sans traitement antifongique. La positivité de la PCR peut s'expliquer soit par la présence de spores dans le tractus respiratoire, soit par une contamination de l'échantillon lors du prélèvement ou encore pendant le traitement pour réalisation de la PCR.

Parmi les études portant sur la détection d'*Aspergillus sp.* dans les lavages bronchoalvéolaires, les « faux positifs » rapportés dans la littérature varient de 0 à 28% sur des populations immunodéprimées ou non immunodéprimées (22, 70, 100, 146, 164, 166). Ils correspondent plus à la présence de spores dans le tractus respiratoire qu'à de réels faux positifs. En effet, certaines

études rapportent 16% de lavages bronchoalvéolaires positifs en culture pour des *Aspergillus sp.* chez des sujets en bonne santé (30).

Le pourcentage de « faux positifs » observé dans cette étude est 3.4%, soit 6 patients, ce qui est assez bas. Dans la moitié des cas, ils s'agit de patients qui présentent des risques de colonisation par des spores aspergillaires au niveau du tractus respiratoire. En effet, 3 patients sur 6 ont une bronchite pulmonaire chronique obstructive et deux d'entre eux sont sous corticoïdes au long cours. L'association bronchite pulmonaire chronique obstructive et corticoïdes sont des facteurs majeurs de risque de colonisation (166).

Si l'on compare la sensibilité et la spécificité de la technique développée, il apparaît que les chiffres observés sont identiques ou très proches de ceux publiés dans la littérature (Tableau I.9., verso p.59). La seule différence se situe dans le nombre de faux positifs sans doute dus à une sensibilité excessive des techniques (22, 164), qui les rendent inapplicables au diagnostic à l'inverse de la présente étude.

En ce qui concerne les apports de la PCR dans le diagnostic de l'aspergillose, si tous les cas où la culture était positive ont été confirmés par la PCR, deux cas « culture négative, PCR positive » ont été observés (cas n°4 et n°9). Dans les deux cas, le diagnostic d'aspergillose avait été posé lors de l'autopsie et la PCR aurait pu contribuer au diagnostic si elle avait été réalisée du vivant du patient. La PCR développée dans ce travail permet d'augmenter la performance des cultures de lavages bronchoalvéolaires de 20%, ce qui n'est pas négligeable.

Particularité de la population. Parmi la population de patients du groupe A (aspergillose invasive prouvée ou probable), on peut remarquer la proportion importante de patients ayant comme pathologie sous-jacente une bronchite pulmonaire chronique obstructive. Ce type de population n'est pas celle qui est habituellement touchée par l'aspergillose invasive. Cela s'explique par des facteurs propres à l'institution puisque, parmi la population immunodéprimée incluse dans l'étude, on retrouve presque autant de patients sous corticoïdes au long cours pour le traitement d'une bronchite pulmonaire chronique obstructive (18/74) que de patients atteints d'hémopathies malignes ou de transplantés d'organes solides (21/74). Il se trouve que chez les patients atteints de bronchite pulmonaire chronique obstructive, les manifestations sont plus insidieuses et lentes à apparaître que chez les patients neutropéniques dont l'évolution est souvent fulminante. De plus, ces patients bronchiteux chroniques sont très souvent colonisés par les *Aspergillus* avant de développer une infection invasive, ce qui rend le diagnostic différentiel difficile à poser.

D'autre part, le suivi des patients d'hématologie est très étroit avec une couverture antibiotique ou antifongique souvent précocément instaurée en cas de la moindre suspicion de pathologie infectieuse.

Conclusions et perspectives sur l'apport de cette technique dans le diagnostic de l'aspergillose invasive :

La PCR qui a été développée et appliquée à la détection d'*Aspergillus sp.* sur lavages bronchoalvéolaires permet d'augmenter les performances du diagnostic de l'ordre de 20% par rapport à la culture. Sa haute valeur prédictive négative permet en outre d'exclure une aspergillose invasive chez un patient à risque, ce qui constitue un outil supplémentaire dans le cadre du diagnostic des infections opportunistes chez les patients immunodéprimés.

Cette technique présente une spécificité plutôt étroite puisqu'elle cible préférentiellement *A. fumigatus*. Ceci n'est pas un inconvénient majeur dans notre institution puisque la plupart des aspergilloses invasives sont dues à cette espèce et que l'on arrive quand même à détecter *A. flavus*. Cependant, il nous a paru intéressant de s'orienter vers une PCR capable d'amplifier d'autres espèces d'*Aspergillus sp.* même si elles sont moins souvent responsables d'infection profonde comme *A. flavus*, *A. terreus* ou *A. nidulans*.

De plus, il semble nécessaire de développer une technique qui puisse s'appliquer sur le sang périphérique. En effet, les lavages bronchoalvéolaires sont réalisés souvent lors de manifestations cliniques d'une pneumonie sévère et il serait intéressant de pouvoir détecter une pathologie avant ses manifestations cliniques, par exemple lors d'un suivi sanguin régulier et non invasif.

La mise au point d'une PCR pour la détection d'*Aspergillus sp.* sur sang périphérique fait l'objet du chapitre suivant.

CHAPITRE III.

3. CHAPITRE III. EVALUATION DE LA DETECTION PAR PCR D'ADN D'ASPERGILLUS SP. SUR MODELE EXPERIMENTAL D'ASPERGILLOSE INVASIVE.

3.1. INTRODUCTION

3.1.1. Choix de l'animal d'expérience.

Nous avons choisi de travailler sur un modèle animal expérimental, car d'une part l'aspergillose n'est pas une pathologie très fréquente, et que d'autre part, son diagnostic est souvent réalisé tardivement. Le modèle animal, s'il n'est pas totalement superposable à ce qui se passe chez l'homme, permet de recueillir de nombreux prélèvements et de suivre quotidiennement l'évolution de la maladie.

Le lapin a été préféré à la souris car c'est un plus gros animal qui permet de prélever de plus grandes quantités de sang. En effet la réalisation de la numération formule sanguine et le recueil de sang pour PCR et dosage d'antigène galactomannane nécessitait le prélèvement de minimum 1,5 à 2 ml par jour.

Certaines équipes utilisent des groupes de souris qui sont sacrifiées chaque jour. Cependant, cela ne permet pas de suivre le même animal tout au long de l'évolution de la maladie comme cela se passe chez l'homme, biaisant un peu l'expérience. Aussi, le lapin a-t-il été retenu pour cette étude.

3.1.2. Choix de la cible.

La séquence cible choisie a été publiée par Melchers et coll. (100). Elle correspond aux gènes de l'ARN ribosomal 18S de différentes espèces d'*Aspergillus sp.* dans la région V7-V9 (Figure III.1.). Nous avons choisi cette cible car les gènes codant pour l'ARN ribosomal sont présents en plusieurs copies dans le génome, rendant la technique intrinsèquement plus sensible.

Tableau III.1. Caractéristiques des amorces Asp5, Asp8, Asp1 et Asp7 (176).

Amorces	Séquences	Nombre de nucléotides	T° de fusion (Tm)
Externes			
Asp5	5'-GAT AAC GAA GAG ACC TCG G-3'	19	62°C
Asp8	5'-TGC CAA CTC CCC TGA GCC AG3'	20	66°C
Internes			
Asp1	5'-CGG CCC TTA AAT AGC CCG GTC-3'	21	68°C
Asp7	5'-CCT GAG CCA GTC CGA AGG CC-3'	20	68°C

3.1.3. Choix des amorces.

Le choix des amorces a été orienté par l'étude publiée par Yamakami et coll.(177) en 1996, concernant une technique PCR appliquée à la détection d'*Aspergillus* sp. dans le sérum. Nous avons choisi d'appliquer cette technique à la détection d'*Aspergillus* sur sang périphérique étant donné les résultats encourageants de cette étude.

Les caractéristiques des amorces sont notées dans le tableau III.1 . On peut constater d'après leur position sur la séquence que Asp 5 et Asp1 se chevauchent sur deux bases. De même, Asp 1 et Asp7 se chevauchent sur 10 bases.

3.2. MATERIEL ET METHODES.

3.2.1. Description du modèle expérimental.

3.2.1.1. Caractéristiques des lapins.

L'étude a été entreprise après approbation du projet par le comité d'éthique (Annexe 2).

Les lapins d'expérience ont été obtenus via l'animalerie universitaire qui possède son propre élevage. Au total, 18 lapins albinos néo-zélandais ont été inclus dans l'expérience. Quatre d'entre eux ont servi de témoins négatifs et 14 ont été utilisés pour réaliser un modèle d'aspergillose invasive expérimentale. Leur poids variait de 2.5 à 4 kg et l'expérience s'étendait sur 12 jours.

Au cours de l'expérience les lapins ont été gardés dans des cages séparées (un par cage) dans un cubicule isolé des autres animaux de l'étage, de façon à les préserver au mieux des contaminations éventuelles par les autres animaux (Photo III.1). L'eau de boisson était renouvelée chaque jour. La nourriture était ajustée en fonction de leur appétit.

Les lapins témoins négatifs, c'est-à dire qui ne recevaient pas de spores d'*Aspergillus*, restaient dans le même cubicule, mais à l'écart des autres pour éviter toute contamination éventuelle.

3.2.1.2. Protocole d'immunodépression des lapins.

Le protocole d'immunodépression est résumé dans le tableau ci-dessous.

Tableau III.2. Protocole d'immunodépression des lapins.

Injection de spores d'*A. fumigatus*



Drogue	J1	J2	J3	J4	J5	J6	J7	J8	J9	J10	J11	J12
Cytarabine	•	•	•	•	•			•	•			
Vancomycine	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•
Gentamicine				•	•	•	•	•	•	•	•	•
Ceftazidime				•	•	•	•	•	•	•	•	•
Teicoplanine				•	•	•	•	•	•	•	•	•

La molécule utilisée pour provoquer une immunodépression chez le lapin est la cytarabine (Cytosar®1g, Pharmacia Upjohn). Cette molécule est un antimétabolite qui agit préférentiellement sur les lignées blanches, mais aussi les plaquettes et la lignée rouge.

Le protocole d'immunodépression a été conduit selon le protocole de Berenguer et coll.(16) que nous avons un peu modifié : mode d'injection de la cytarabine et ceftazidime seulement une fois par jour et non deux fois par jour.

La cytarabine a été administrée en sous-cutané à raison de 525mg/m² de surface corporelle. Le rapport entre la surface et le poids a été calculé selon la formule :

$$S = K \cdot \sqrt[3]{P^2}$$

S : surface en cm²

K coefficient égal à 8.5 pour le lapin

P poids (g).

Une couverture antibiotique a été assurée tout au long des 12 jours de façon à éviter le développement d'infections bactériennes favorisées par l'immunodépression.

Une couverture antibiotique a été assurée tout au long des 12 jours de façon à éviter le développement d'infections bactériennes favorisées par l'immunodépression.

Tout d'abord de la vancomycine (Vancocin®, Glaxo Welcome) a été administrée dans l'eau de boisson de J1 à J12 à raison de 50 mg/l.

Trois antibiotiques ont été administrés par voie intra-musculaire de J4 à J12 (Photo III.2):

- teicoplanine (Targocid 400®, Aventis) à la dose de 5 mg/kg.
- ceftazidime (Glazidim®, Glaxo Welcome) à la dose de 75 mg/kg
- gentamicine (Géomycine®, Glaxo Welcome) à la dose de 5 mg/kg.

3.2.1.3. Protocole d'injection des spores d'*Aspergillus fumigatus*.

3.2.1.3.1. Culture d'*Aspergillus fumigatus*.

Une souche d'*Aspergillus fumigatus* isolée d'un patient ayant développé une aspergillose invasive a été mise en culture sur gélose au malt et incubée à 37°C pendant 48 heures. La culture a été repiquée sur un nouveau milieu au malt et incubée de la même façon pour s'assurer de sa vitalité. Le tube est ensuite laissé 5 jours à température ambiante pour favoriser la formation de spores.

3.2.1.3.2. Suspension de spores.

La suspension de spores a été réalisée dans du liquide physiologique contenant 0.025% de tween 80 de façon à assurer une bonne séparation des spores dans la suspension.

Le nombre de spores a été compté en cellule de Thoma pour obtenir une concentration de 1 à 5. 10⁸ dans un volume de 250 µl.

Des repiquages de 100 µl de chaque dilution sont inoculés sur boîte de Sabouraud-chloramphénicol (Bio-Mérieux, Marcy l'étoile, France) de façon à contrôler la quantité de spores administrées.

Photo III.1. Cubicule avec biberon d'eau additionnée de vancomycine (5mg/l)



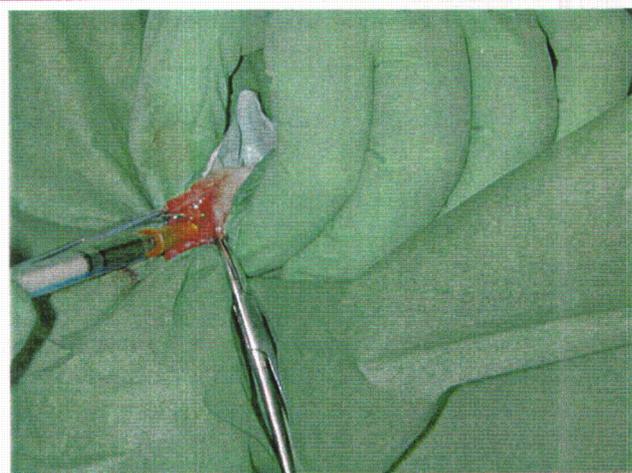
Photo III.2. Cytosar, et antibiotiques injectés au lapin.



Photo III.3. Rasage de la partie du cou nécessaire à l'injection intra-trachéale.



Photo III.4. Injection intra-trachéale après dissection mousse des muscles de la région.



3.2.1.3.3. Injection intra-trachéale des spores.

L'injection des spores est réalisée par voie intra-trachéale sous anesthésie générale (cf. §3.2.1.4.) (Photo III.3). L'opération a été réalisée par le Docteur F. Marcq, vétérinaire responsable de l'animalerie de la faculté au moment de l'étude.

Après rasage du cou de l'animal, les tissus sont écartés jusqu'à la trachée. Après réalisation d'un orifice dans celle-ci, les 250 µl de suspension sont injectés (Photo III.4). Les tissus sous-cutanés sont suturés et la peau est refermée par quelques agrafes.

3.2.1.4. Protocoles d'anesthésie.

3.2.1.4.1. Anesthésie générale.

L'anesthésie générale a été utilisée essentiellement pour réaliser l'injection intra-trachéale. Elle a été réalisée par injection intra-musculaire d'un anesthésique-myorelaxant, la xylozine (Rompun®, Bayer) (5 mg/kg) et de kétamine, anesthésique et myorelaxant (Imalgène®, Merial) (35 mg/kg).

3.2.1.4.2. Anesthésie gazeuse.

Chaque lapin est d'abord prémédiqué avec 0.25 mg/kg d'analgésique, le dropéridol (Thalamonal®, Janssen-Cilag) (2.5 mg/ml). Après environ 15 minutes, il est placé dans une cage fermée dans laquelle arrive un gaz anesthésiant, l'isoflurane (Forène®, Abbott). L'opération se fait en deux temps. Tout d'abord, une induction à 4.5% d'isoflurane dans un mélange d'oxygène (1/3) et protoxyde d'azote (2/3) avec un débit de 5 litres /minute, puis une seconde phase à 3.5 % d'isoflurane avec un débit de 3.5 l/min (Photos III.5 à III.8).

3.2.1.4.3. Euthanasie.

Les lapins présentant des signes évidents d'insuffisance respiratoire aiguë sont euthanasiés par injection intra-cardiaque d'un narcotique et curarisant, l'embutramide-mebenzonium (T61®, Hoechst) (1ml). Les lapins survivant aux 12 jours d'expérience sont euthanasiés de la même façon.

Photo III.5. Distribution de gaz isoflurane permettant d'alimenter la cage d'induction et le système de maintien.

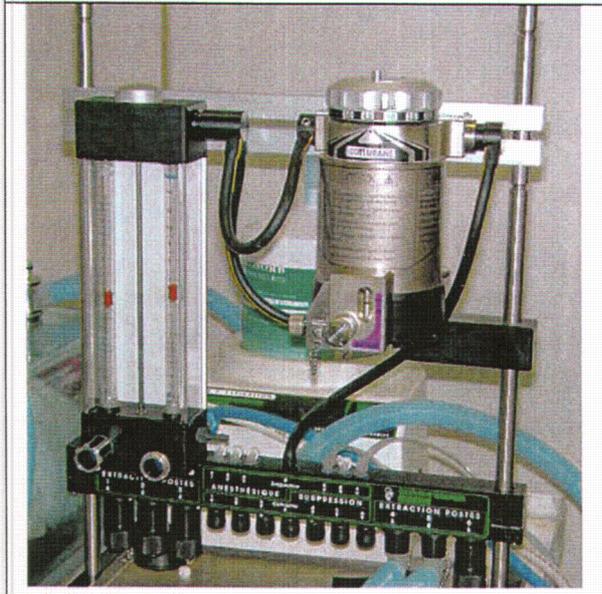


Photo III.6. Cage d'induction dans laquelle le lapin est maintenu de 10 à 15 minutes avant d'être placé sur la table de travail.

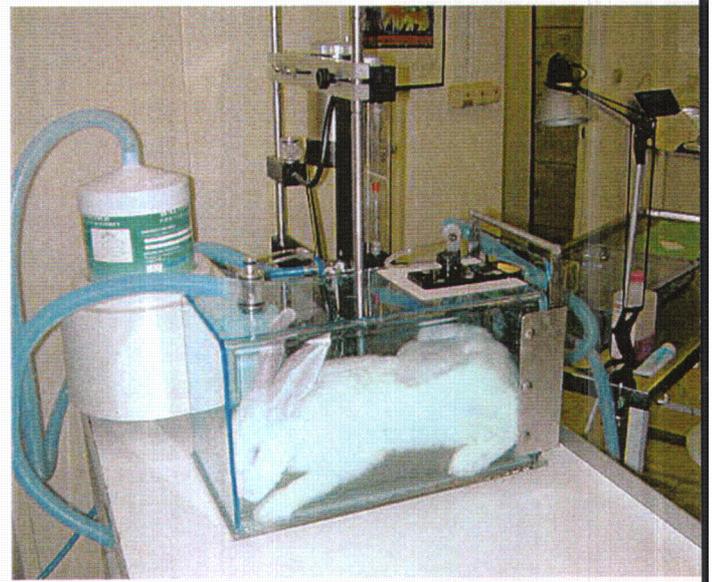


Photo III.7. Table de travail avec arrivée de gaz anesthésiant permettant le maintien du lapin dans un état de semi-sommeil.



Photo III.8. Prélèvements de sang au niveau de l'oreille du lapin dans des tubes sous vide. Prélèvement au niveau de l'artère ou d'une veine.



3.2.2. Prélèvements de sang et analyses réalisées.

3.2.2.1. Prélèvements de sang.

Les prélèvements de sang ont été réalisés quotidiennement de J1 au jour du décès du lapin. Ils ont été réalisés sous anesthésie gazeuse, le plus souvent au niveau de l'artère des oreilles grâce à l'utilisation d'aiguille à ailettes. Les veines étant très difficiles à prélever à ce niveau, nous avons décidé de prélever toujours au niveau de l'artère. En effet, le placement de cathéters, tel qu'il était décrit dans certaines publications (16), n'est pas apparu très facile à mettre en œuvre. D'autre part, quelques essais nous ont prouvé que le bouchage des cathéters était fréquent et survenait dans un délai très court. Le dernier jour, les prélèvements ont été faits par ponction intracardiaque avant l'injection de T61.

Une quantité maximum de 2 ml de sang a été prélevées puisque, sur le plan éthique, on peut prélever au maximum 8ml/kg (163).

Les prélèvements ont été réalisés sur tube sec et sur anticoagulant EDTA (Vacutainer, Becton Dickinson, Franklin Lakes, USA).

Les tubes de chaque lapin étaient placés dans des sachets individuels en plastique de façon à limiter les contaminations éventuelles de tube à tube.

3.2.2.2. Traitement des tubes de sang.

Quand tous les prélèvements de la journée étaient réalisés, les tubes étaient traités au laboratoire le jour même.

Le tube de sang coagulé était centrifugé 10 minutes à 3000 trs/min. puis le sérum était décanté, aliquoté et congelé à -20°C en tubes à vis stériles (Sartstedt, Numbrecht, Allemagne).

Les tubes de sang anticoagulé étaient aliquotés tels quels pour traitement immédiat (NFS et PCR) ou centrifugés (10 minutes à 3000 trs/min), décantés et le plasma réparti par volume de 200 μl et congelé à -80°C .

3.2.2.3. Numération et formule sanguine (NFS).

Les numérations ont été réalisées chaque jour sur un minimum de 200 µl de sang total (sur EDTA). Elles sont réalisées sur un Automate du Laboratoire d'Hématologie (Technicon, Becton Dickinson, USA).

Les formules sanguines sont lues au microscope sur frottis coloré au May-Grünwald-Giemsa (Merck Eurolab, Belgique).

3.2.2.4. Antigène galactomannane.

La détection de l'antigène GM est réalisé en ELISA par le kit commercialisé sous le nom de Platelia® *Aspergillus* (Biorad, USA).

De façon à standardiser les étapes de lavages, nous avons adapté ce kit manuel sur un automate de laboratoire, le BEP III (Behring, Allemagne). Le seuil de détection est de 1 ng/ml. Un sérum négatif, deux sérum « seuil » (1ng/ml) et un sérum positif (10 ng/ml) sont testés en parallèle avec les sérums de l'expérience.

Le résultat est formulé sous forme d'un index :

$$\text{INDEX} = \text{D.O. échantillon} / \text{D.O. moyenne des sérum seuil}$$

D.O. = densité optique

L'interprétation est faite de la façon suivante : un résultat est positif si son index est > à 1.5, douteux s'il est compris entre 1 et 1.5 et négatif s'il est < à 1.

3.2.2.5. Echantillons pour analyse en PCR.

Le sang total est traité pour éliminer les globules rouges et le culot leucocytaire est congelé à -80°C (cf. méthodologie au paragraphe 3.2.4.).

Quand cela était possible, des aliquotes de sérum et plasma ont été recueillis et congelés à -80°C.

3.2.3. Prélèvements et analyses des organes.

Cinq organes ont été prélevés après constatation de la mort du lapin : les poumons, le coeur, le foie, les reins et le cerveau.

Les organes ont été prélevés pour analyse histologique et culture fongique, soit dans les zones macroscopiquement anormales ou au hasard si aucune lésion n'était apparente.

3.2.3.1. Analyse histopathologique.

Les prélèvements ont été placés dans des pots stériles contenant une solution de formol à 10%. Si le délai d'acheminement dépassait 24 heures, ils étaient placés dans une solution d'alcool à 70% après 24 heures dans le formol.

Les analyses histologiques ont été réalisées par le Service de Pathologie de l'Institut Vétérinaire de Liège, dans le service de F. Coignoul, par le Docteur Daniel Desmecht et le Docteur D. Cassart..

3.2.3.2. Culture fongique.

Les prélèvements ont été réalisés dans des pots stériles et mis en culture le jour du prélèvement.

Les fragments ont été mis en culture en tubes sur gélose Sabouraud-chloramphénicol (Bio-Mérieux, Marcy l'étoile, France) et incubés 48 heures à 35°C, puis un mois à 28°C.

L'identification des espèces fongiques a été réalisée par examen microscopique et macroscopique.

3.2.4. Extraction de l'ADN à partir de suspension de spores d'*A. fumigatus*.

3.2.4.1. Suspension de spores.

A partir d'une culture de 48 heures d'une souche clinique d'*Aspergillus fumigatus* sur milieu solide de Sabouraud, les spores ont été prélevées avec un écouvillon stérile et mises en suspension dans du liquide physiologique additionné de Tween 80 à 0,025%.

Après dilution avec le même tampon, le comptage a été effectué en cellule de Thoma. Les dilutions ultérieures ont été réalisées de façon à obtenir des suspensions de spores variant de 1 à 1000 spores par ml.

3.2.4.2. Protocoles d'extraction.

Quatre protocoles d'extraction ont été testés en parallèle à partir de 100 µl de suspension de spores. Ces quatre protocoles sont décrits dans l'annexe 6.

3.2.4.2.1. Extraction selon le protocole décrit par Yamakami et coll.

Le protocole a été suivi à partir de 100 µl de suspension de spores correspondant aux 100 µl d'échantillon décrit dans le protocole.

3.2.4.2.2. Extraction utilisant les colonnes Qiagen®.

A la place du culot de leucocytes décrit dans le protocole, 100 µl de suspension de spores ont été utilisées.

3.2.4.2.3. Extraction utilisant le kit Amplicor® sang total.

L'extraction a été réalisée avec la technique de lyse du culot leucocytaire décrite dans le protocole. A la place du culot de leucocytes 100 µl de suspensions de spores ont été utilisées.

3.2.4.2.4. Extraction utilisant le Tripure®.

Le protocole a été réalisé selon la description faite dans les annexes, la solution à extraire correspondant aux 100 µl de suspension de spores.

3.2.5. Extraction de l'ADN d'*Aspergillus sp.* à partir du sang total.

3.2.5.1. Lyse des globules rouges.

Le sang total prélevé sur EDTA a été soumis à une lyse des globules rouges par le kit de préparation des échantillons Amplicor® Sang Total (Roche diagnostics, Brandburg, USA), permettant de lyser les globules rouges et blancs en deux étapes séparées, grâce à deux réactifs différents.

La solution de lyse des rouges appelée « Solution de lavage des échantillons » est une solution de phosphate de sodium contenant un détergent à 0.4% et 0.05% d'azide de sodium.

1. On mélange 1 volume (500 µl) de sang total à 2 volumes (1 ml) de solution de lavage des échantillons. On mélange 10 à 15 fois par retournement, puis on laisse à température ambiante pendant 5 minutes pour faciliter la lyse. Ensuite, les tubes sont centrifugés pendant 3 minutes à vitesse maximale (15.000 trs/min). Le culot de globules blancs se distingue par sa couleur plus claire. Le surnageant est prélevé et éliminé.
2. Deux volumes de solution de lavage sont ajoutés au culot. On mélange sur Vortex pour remettre en suspension et on mélange de nouveau par retournement 10 à 15 fois. Puis on centrifuge comme précédemment 3 minutes à vitesse maximale (15.000 tr/min).
3. L'étape 2 est répétée encore une fois de façon à éliminer au maximum l'hémoglobine présente dans le prélèvement.

Le culot peut être directement traité pour extraction de l'ADN ou être congelé à -80°C.

3.2.5.2. Extraction de l'ADN à partir du culot cellulaire.

Le culot cellulaire est décongelé à température ambiante quelques minutes, s'il n'a pu être traité directement.

Le « réactif d'extraction », appelé ainsi dans le kit Amplicor® Sang Total (Roche diagnostics, Brandburg, USA), est une solution de Tris-HCL contenant 1% de détergent, 0.01% de protéinase K, 7.5 mM de MgCl₂ et 0.05% d'azide de sodium.

La méthodologie consiste à ajouter 200 µl de réactif au culot décongelé et de placer le tube fermé au bain marie à 60°C pendant 45 minutes. Le tube est ensuite maintenu à 100°C pendant 30 minutes pour éliminer complètement la protéinase K.

L'échantillon est ensuite centrifugé quelques secondes, pour concentrer l'échantillon au fond du tube. On peut le garder à +4°C jusqu'à la réalisation de la PCR.

3.2.6. Amplification de l'ADN par PCR.

3.2.6.1. Conditions de la PCR.

Les deux étapes de la PCR nichée sont réalisées dans les mêmes conditions, excepté pour les températures d'hybridation.

Préparation du mélange réactionnel (appelé mix):

Les PCR ont été réalisées dans un volume final de 50 µl contenant :

-tampon contenant 10 mM Tris-HCl à pH 8.3, 50 mM KCl et 1.5 mM (tampon 10x, Takara, Otsu, Japon).

-primers : 0.4 µM (soit 20 pmol), (synthétisés par Eurogentec, Belgique)

-dNTP : 0.2 mM de chaque déoxynucléotide triphosphate (solution équimolaire à 2.5mM de dATP, dCTP, dGTP, dTTP, Takara, Otsu, Japon)

- Taq polymérase (Taq Takara, Otsu, Japon) : 1.25U.

Les quantités utilisées sont données dans le tableau III.3.

On utilise en général des solutions concentrées 10 fois de chaque réactif. Des réactifs prêts à l'emploi ont été utilisés (cf. chapitre précédent). Les réactifs sont préparés dans un seul tube, puis répartis dans des tubes de 0.2 ml (Eurogentec, Seraing, Belgique).

Au cours de la première étape de la PCR, le mix est recouvert d'une goutte d'huile minérale (Sigma, St Louis, Min., USA) pour limiter les contaminations par aérosol lors du transfert du produit amplifié dans le nouveau mix.

L'ADN « cible » est ajouté dans chaque tube en dernier lieu, chaque tube étant fermé après avoir été rempli.

Au cours de la seconde étape de la PCR nichée, c'est le produit amplifié lors de la première étape qui est ajouté (2 µl) au mix nouvellement préparé.

Tableau III. 3. Préparation des mix pour la PCR nichée

Réactifs (mix)	Volume par tube (µl)	
	PCR 1ère étape	PCR 2 ^{ème} étape
Taq polymérase (5U/µl)	0.25	0.25
Tampon PCR 10x	5	5
dNTPs (2.5mM)	4	4
MgCl ₂ (15mM)	0	1.5
Amorce Asp5 ou Asp1 (2µM)	10	10
Amorce Asp8 ou Asp7 (2µM)	10	10
H ₂ O	15,75	17.25
Total Mix	45	48
ADN	5	2 (produit amplifié)

***Cycles d'amplification.**

L'amplification a été réalisée sur les thermocycleurs précédemment décrits dans le chapitre II selon les paramètres du tableau III.4.

Tableau III.4. Paramètres de la PCR nichée.

Étapes	T°C	Temps
Dénaturation de l'ADN	94	5 min
Dénaturation	94	1 min
Cycles (30) Hybridation	50	1 min
Elongation	72	1 min
Elongation	72	7 min

La dernière étape est souvent suivie d'un maintien à 4°C pour conserver les produits amplifiés avant la révélation qui peut être post-posée au lendemain par exemple.

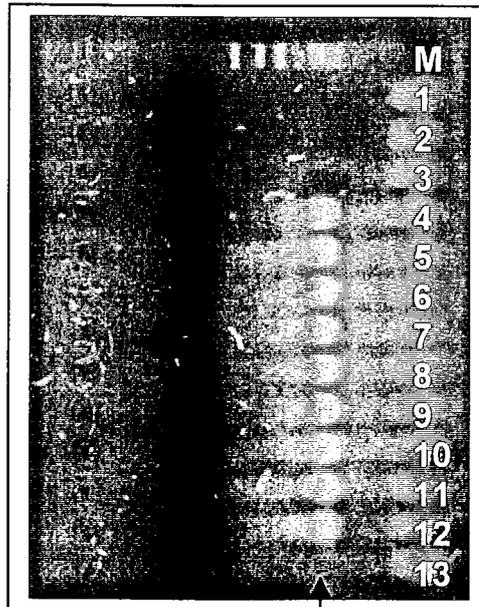
3.2.7. Amplification du gène de la bêta-globine.

L'amplification du gène de la β -globine a été réalisée selon la technique décrite par Saiki et coll. (155) décrite au chapitre précédent de nouveau comme contrôle d'amplification.. Cependant, étant donné l'absence de ce gène chez le lapin, nous avons ajouté de la β -globine à l'extrait d'ADN en mélangeant volume à volume un extrait cellulaire contenant de la β -globine avec l'extrait à amplifier. Ensuite, 5 μ l du mélange est utilisé pour la PCR.

3.2.7.1. Détection des produits de PCR.

La détection s'est faite selon les mêmes modalités que celles décrites dans la chapitre II , §2.2.6.2.

Photo III.9. Electrophorèse des produits d'amplification d'ADN d'*A. fumigatus* (amorces Asp 1, 5, 7, 8). M : marqueur IV. Puits 1 à 3 : H₂O. Puits 4 à 13 : ADN d'*A. fumigatus* : puits 4 à 6 : 5 ng/ml. Puits 7 à 9: 1 ng/ml. Puits 10 à 12: 0,1 ng/ml. Puits 13: 0.01ng/ml.



357pb

3.3. RESULTATS.

3.3.1. Contrôle des paramètres de la PCR.

Nous avons effectué un contrôle des paramètres de la PCR pour vérifier si, dans nos conditions de travail les résultats obtenus concordent avec les résultats de Yamakami et al.(177).

3.3.1.1. Température d'hybridation des amorces.

Différentes températures ont été testées selon un gradient, grâce au thermocycleur Mastercycleur® Eppendorf (Merck Eurolab, Belgique) permettant automatiquement de tester plusieurs températures en même temps. Les meilleurs résultats ont été obtenus avec les températures choisies par les auteurs. Nous avons donc gardé ces paramètres.

3.3.1.2. Concentration en MgCl₂.

Les concentrations en MgCl₂ ont été contrôlées, mais la concentration recommandée (1.5 mM) donne le meilleur résultat sous forme d'une bande spécifique de 357 pb après la PCR nichée.

3.3.1.3. Nombre de cycles.

Le nombre de cycles a été diminué de façon à raccourcir la longueur de la réaction. En effet, nous sommes passés de cycles de 1min/1min/3min à 60sec/60sec/60sec. sans modifier le résultat. Puisque la longueur de la séquence amplifiée est relativement courte (384 pb pour la 1ère PCR et 357 pb pour la PCR nichée), le temps d'élongation n'a pas besoin d'être si long.

3.3.2. Sensibilité de la PCR.

La sensibilité de la PCR est de 500 fg (Photo III.9). Ceci est un peu moins bon que ce qui est décrit par les auteurs, soit 50 fg (177).

3.3.3. Spécificité de la PCR.

La spécificité de la PCR n'a pas été contrôlée dans la mesure où les essais avaient déjà été réalisés par Yamakami et coll. (177).

3.3.4. Comparaison des protocoles d'extraction.

Plusieurs protocoles d'extraction ont été évalués et comparés entre eux. Ceci a été réalisé sur des suspensions de spores d'*A. fumigatus*.

Chaque protocole a été testé tel quel et en associant une étape préalable utilisant la lyticase, enzyme agissant sur la partie sucrée de la paroi fongique.

Tableau III.5. Comparaison des différents protocoles d'extraction

	Yamakami et coll. (177)		Qiagen		Amplicor sang total		Tripure	
	+	-	+	-	+	-	+	-
lyticase	+	-	+	-	+	-	+	-
cfu/ml	500	500	Contamination des témoins négatifs		200	200	500	500
cfu	50	50	Contamination des témoins négatifs		20	20	50	50

Rôle de la lyticase : Tout d'abord quelle que soit la technique l'utilisation préalable de lyticase n'a pas démontré sa supériorité. Nous avons testé deux concentrations de lyticase (3U et 10 U), en association avec la technique Roche, et les deux concentrations ont donné les mêmes résultats.

Choix du protocole : Les résultats obtenus avec le kit QIAamp® Blood mini kit (Qiagen, Valencia, USA) ont été très décevants et ceci a été confirmé de nombreuses fois. Nous avons obtenu globalement 20% de contamination des échantillons témoins négatifs, extraits en même temps que

des échantillons positifs, comme les suspensions de spores et cela, même dans le cas où les suspensions de spores étaient très peu concentrées.

Pour augmenter la sécurité, nous avons travaillé avec 6 à 8 échantillons à la fois, en aliquotant les réactifs, de façon à ne pas contaminer lors de trop fréquents pipetages. Malgré ces précautions contraignantes, y compris désinfection des surfaces et du matériel utilisé avec utilisation de produits détruisant l'ADN, nous n'avons pas réussi à obtenir de résultat cohérent. Aussi avons-nous renoncé à utiliser ces colonnes d'extraction.

Les trois autres techniques testées ont une sensibilité à peu près équivalente à savoir de 20 à 50 CFU puisque l'on travaille à chaque fois sur 100 µl de prélèvement.

Nous avons cependant choisi la technique de Roche, car les produits sont commercialisés et la technique rapide et aisée. Une technique rapide permet de réduire les étapes et donc, de diminuer les sources de contamination lors de l'extraction.

Enfin, la technique à base d'isothiocyanate de guanidine n'a pas non plus été retenue car elle comporte de nombreuses étapes pour un résultat identique.

3.3.5. Paramètres biologiques.

3.3.5.1. Eléments figurés.

La numération formule sanguine a été réalisée chaque jour de façon à suivre l'effet du Cytosar sur les paramètres sanguins des lapins étudiés.

Le tableau ci-dessous rend compte de la moyenne pour chaque paramètre.

Tableau III.6. Apparition et degré de la neutropénie chez les lapins.

Jour Exp.	Globules blancs			
	<500/ μ l		<100/ μ l	
	Nb de lapins (%)		Nb de lapins (%)	
	Expérience (n=14)	Témoins (n=3)	Expérience (n=14)	Témoins (n=3)
J1	0	0	0	0
J2	0	0	0	0
J3	0	0	0	0
J4	4/11 (36)	0	1/11 (9)	0
J5	10/10 (100)	1/3 (33)	3/10 (30)	0
J6	11/11 (100)	2/3 (66)	8/11 (72)	1/3 (33)
J7	10/10 (100)	3/3 (100)	10/10 (100)	2/3 (66)
J8	7/7 (100)	3/3 (100)	7/7 (100)	2/3 (66)
J9	5/5 (100)	3/3 (100)	5/5 (100)	3/3 (100)
J10	3/3 (100)	3/3 (100)	3/3 (100)	3/3 (100)
J11	Non réalisé	3/3 (100)	Non réalisé	3/3 (100)
J12	Non réalisé	3/3 (100)	Non réalisé	3/3 (100)

Exp. Expérience; Nb : nombre.

A J5 (expérience), tous les lapins infectés sont neutropéniques (<500 leucocytes par μ l).

A J7 (expérience), tous les lapins infectés ont une neutropénie profonde (<100 leucocytes/ μ l).

Le même type de tableau est réalisé ci-dessous avec les chiffres des plaquettes et des globules rouges pour les lapins infectés et pour les lapins témoins.

Tableau III.7. Moyennes de la concentration en hémoglobine (g/dl) et du nombre de plaquettes ($\times 10^3/\mu\text{l}$)

Jour d'expérience	Plaquettes [moyenne ($\times 10^3/\mu\text{l}$)]		Globules rouges (moyenne de l'hémoglobine en g/dl)	
	Lapins d'expérience (n=14)	Lapins témoins (n=3)	Lapins d'expérience (n=14)	Lapins témoins (n=3)
J1	325	327	13.1	12.5
J2	285	290	12.4	11.9
J3	292	304	11.9	11
J4	315	318	11.7	11.1
J5	267	268	10.5	10.6
J6	175	183	10.3	9.8
J7	56	146	9.5	10
J8	16	46	7.1	9.3
J9	21	38	5.9	7.2
J10	27	51	4	7.1
J11	12	69	<4	6.7
J12	Non réalisé	86	Non réalisé	6.2

La thrombopénie s'installe à partir de J7. La lignée rouge est nettement altérée à partir de J8 ($\text{Hb} < 7.1 \text{ g/l}$) en ce qui concerne les lapins infectés.

Chez les lapins non infectés, la thrombopénie s'installe avec un jour de décalage (J8). L'anémie est décalée d'un jour par rapport aux lapins infectés et elle est moins profonde puisqu'elle ne descend pas au dessous de 6.2 g/dl.

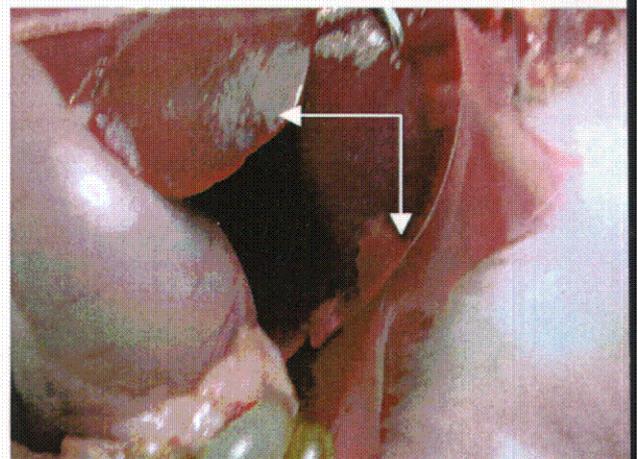
3.3.5.2. Survie.

La moyenne de survie des lapins est la suivante: 7.7 jours (4-11j) pour les lapins infectés et 11.5 jours pour les lapins témoins (10-12j).

Photo III.10. Prélèvement de poumon.
Présence de zones hémorragiques au sein d'un
tissu apparemment sain (flèches).



Photo III.11. Prélèvement de foie. Présence de
zones grisâtres au sein de tissu apparemment
sain (flèches).



le délai de survie est très variable en fonction des lapins. Les témoins ont tous survécu jusqu'à la fin de l'expérience, sauf un.

3.3.5.3. Histologie et culture fongique des organes.

Les organes ont été prélevés dans l'ordre suivant : poumons, cœur, foie, reins, et cerveau. Lorsqu'il y avait des lésions macroscopiques visibles, les tissus ont été prélevés à l'endroit suspect (taches brunâtres, zones hémorragiques)(photos III.10 et III.11). Dans les autres cas, les prélèvements ont été réalisés au hasard.

Une culture positive correspond à la croissance d'*A. fumigatus*. Une histologie est positive en cas de présence de filaments mycéliens septés.

Les résultats exprimés en pourcentage de positivité figurent dans le Tableau III. 8.

Tableau III.8. Résultats histologiques des 5 organes prélevés.

	Histologie : présence de filaments (%)	Culture positive (%)	Histologie et culture: résultats positifs cumulés (%)
Poumon	21	57	64
Foie	64	57	71
Reins	28	50	57
Cœur	0	7	7
Cerveau	0	7	7

Dans 79% des cas, au moins deux organes sont touchés. Il est à noter que dans tous les cas, l'étude histologique des prélèvements pulmonaires a montré un œdème pulmonaire et/ou une pneumonie interstitielle, même en l'absence de filament mycélien.

Tableau III.9. Résultats de l'analyse histologique et de la culture fongique des organes des 14 lapins.

Organe\N° lapin		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
Poumon	Hist.	neg	pos	neg	neg	neg	neg	neg	neg	pos	neg	pos	neg	neg	neg
	Cult.fong.	neg	pos	pos	neg	pos	pos	pos	neg	pos	pos	neg	neg	pos	neg
Foie	Hist.	pos	pos	pos	neg	neg	pos	pos	pos	neg	pos	pos	pos	neg	neg
	Cult.fong.	pos	pos	pos	neg	neg	pos	neg	pos	neg	neg	pos	pos	pos	neg
Rein	Hist.	neg	pos	pos	neg	neg	pos	neg	pos						
	Cult.fong.	neg	pos	pos	neg	neg	neg	neg	neg	pos	pos	neg	pos	pos	pos
Cœur	Hist.	neg													
	Cult.fong.	neg	pos	neg	neg										
Cerveau	Hist.	neg													
	Cult.fong.	neg	pos	neg											

Présence d'œdème et/ou de pneumonie intersticielle ; neg : négatif ; pos : positif ;
 cult.fong. : culture fongique. (histologie négative : absence de filament mycélien).

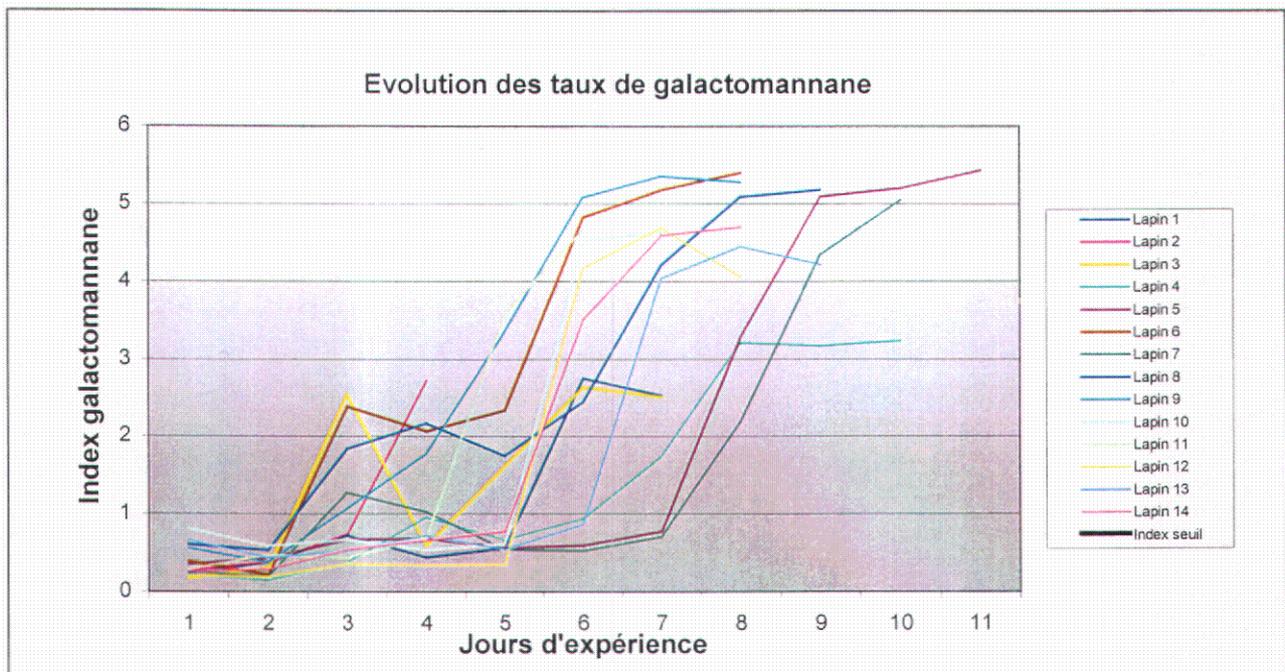
C'est le foie qui est le plus souvent touché, avec 71% de positivité si l'on cumule les résultats de la culture fongique et de l'histologie.

Le cœur et le cerveau sont très rarement atteints.

3.3.6. Résultats de l'antigène galactomannane.

Les courbes ci-dessous (Figure III.2.) témoignent de l'évolution de l'index galactomannane pour chacun des 14 lapins testés, sachant que les lapins témoins n'ont jamais donné de résultat positif.

Figure III.2. Représentation graphique de l'évolution de l'index galactomannane



On peut remarquer que les titres de galactomannane sont ascendants pour tous les lapins infectés par les spores, et ce, jusqu'à leur mort. L'index varie de 2.5 à 5.4 pour les plus élevés. Le taux a tendance à être plus élevé si le lapin vit plus longtemps.

3.3.7. Résultats de la PCR.

3.3.7.1. Résultats sous forme de tableau comparatif PCR/GM.

Les résultats figurent dans le tableau ci-dessous :

Tableau III.10. Résultats obtenus par PCR pour chaque lapin et antigénémie galactomannane.

PCR	L1	L2	L3	L4	L5	L6	L7	L8	L9	L10	L11	L12	L13	L14	PCR
J1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	J1
J2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	J2
J3	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	J3
J4	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	J4
J5	+		+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	J5
J6	-		+	-	-	-	-	-	+	+	+	-	+	-	J6
J7	-		+	-	-	-	-	-	-	+		+	-	-	J7
J8				-	-	+	-	-	+			+	-	-	J8
J9				+	-		-	-					-		J9
J10				+	-		+								J10
J11					-										J11
J12															J12

 Galactomannane positif ; +, PCR positive ; -, PCR négative

Les résultats de la PCR sont plus inconstants que ceux du galactomannane. Une fois positifs, ils ne le restent pas toujours. Ils ont tendance à se positiver dans les derniers jours de vie des lapins.

Dans deux cas, la PCR est positive plus précocément que l'antigène.

Pour les lapins L5, L8 et L14, la PCR reste constamment négative tout au long de l'étude.

A noter que pour ces trois lapins, aucune atteinte histologique du poumon n'a pu être mise en évidence. Pour le L5, on note seulement une culture positive pour le poumon. Pour L8 on note une histologie et une culture positives pour le foie, et, pour L14, on note une histologie et culture positives pour le rein. Soit deux manifestations sur trois extra-pulmonaires et une aspergillose

pulmonaire probable (histologie négative). Ceci pourrait suggérer que l'infection aspergillaire était moins intense ou que les prélèvements étaient inadéquats pour déceler l'infection.

3.3.7.2. Comparaison des résultats PCR versus Galactomannane

Les résultats figurent dans le tableau ci-dessous :

Tableau III.11. Résultats PCR et galactomannane exprimés en %.

Jour d'expé- Rimentation	% de lapins vivants (n)	PCR positive (n)	Galactomannane positif (n)
J1	100 (14)	0	0
J2	100 (14)	0	0
J3	100 (14)	7 (1)	21 (3)
J4	100 (14)	7 (1)	28 (4)
J5	92 (13)	15 (2)	38 (5)
J6	92 (13)	35 (5)	69 (9)
J7	85 (12)	25 (3)	83 (10)
J8	64 (9)	44 (4)	100 (9)
J9	35 (5)	20 (1)	100 (5)
J10	21 (3)	66 (2)	100 (3)
J11	7 (1)	0	100 (1)

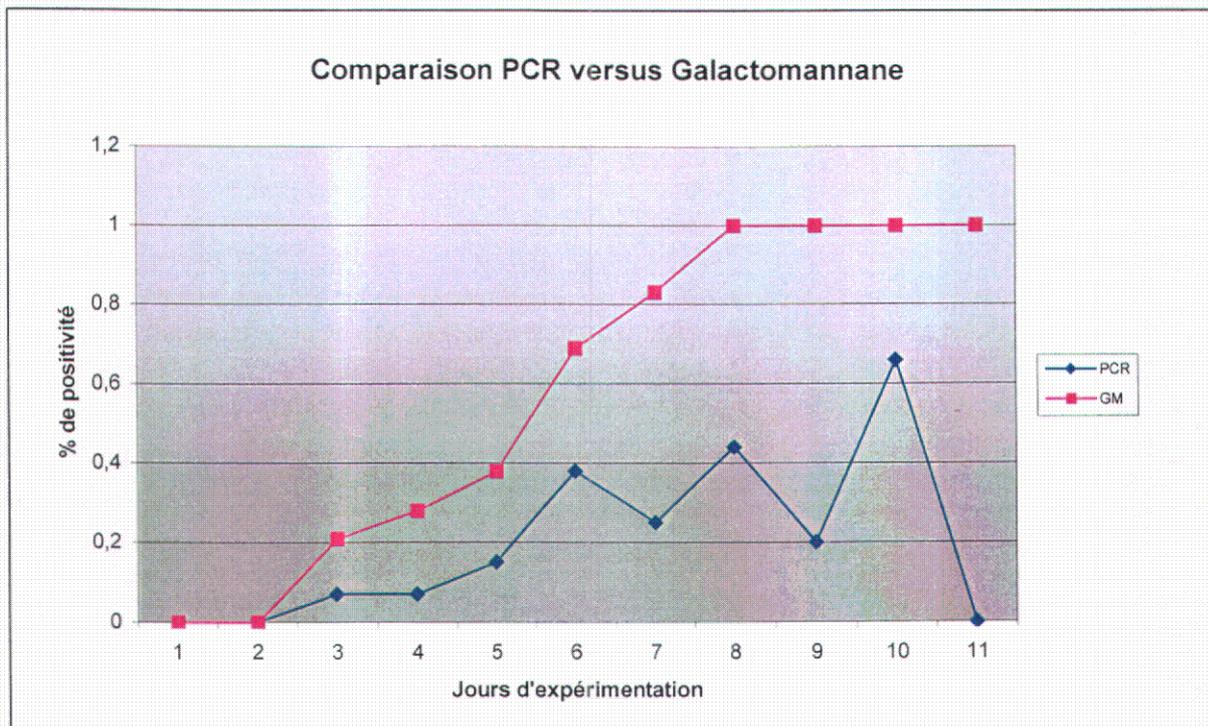
N : nombre

La positivité globale des deux paramètres c'est-à-dire le nombre de résultats positifs (soit 19) sur le nombre de lapins testés (84) est 23% pour la PCR et 56% (49 sur 84) pour le galactomannane.

3.3.7.3. Représentation graphique des résultats PCR versus GM.

Les résultats sont présentés dans la figure III.3.

Figure III.3. Représentation graphique des résultats PCR versus galactomannane.



Le galactomannane et la PCR ne sont jamais positifs avant le jour J1 post-inoculation (J3 d'expérience).

Le pourcentage de lapins ayant un résultat positif en antigène galactomannane augmente de façon constante pour atteindre 100% dès J6 post-inoculation.

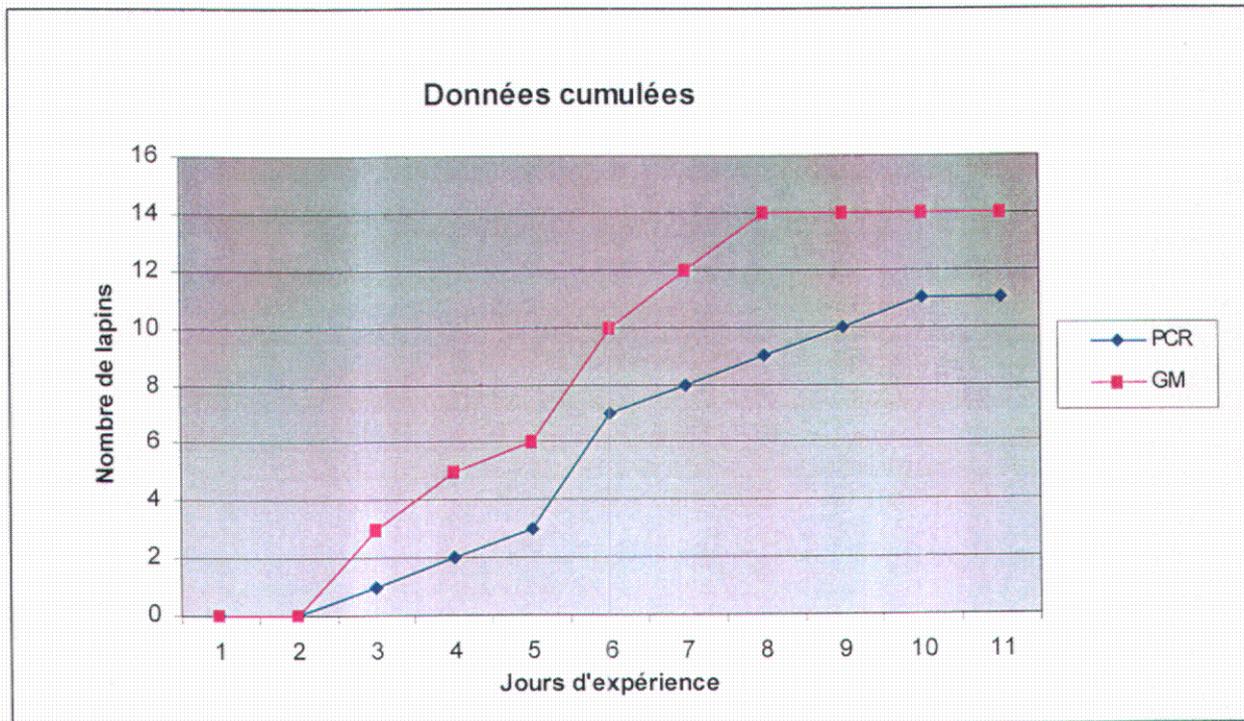
Les résultats de la PCR sont plus inconstants. Le nombre de lapins positifs augmente jusqu'au 4ème jour post-inoculation (J6), puis la courbe s'infléchit pour remonter à J10.

Le graphique suivant montre les mêmes résultats exprimés sous forme de résultats cumulés: on y considère que le lapin est positif s'il l'est au moins une fois.

3.3.7.4. Représentation graphique des résultats cumulés PCR versus GM.

Les résultats sont présentés dans la figure III.4.

Figure III.4. Représentation graphique des résultats cumulés de la PCR versus galactomannane (GM).



Ce graphique permet de constater que si l'on cumule les résultats, les lapins sont détectés en PCR à 80% à J8 post-inoculation (J10 d'expérience) contre 100% par le galactomannane le même jour.

3.3.7.5. Délai moyen de positivité de la PCR par rapport au GM.

La PCR est positive en moyenne au bout de 4,6 jours (post-inoculation) et le galactomannane se positive après 3,4 jours.

3.3.7.6. Précocité de la positivité de la PCR et du galactomannane.

Le tableau-ci dessous rend compte du nombre de fois où un test se positive pour la première fois au moins un jour avant l'autre pour chacun des 14 lapins.

Tableau III.12. Précocité de la positivité de la PCR et du galactomannane (GM).

	GM positif Avant PCR	GM et PCR positifs le même jour	PCR positive Avant GM
% (n=14 lapins)	64 (9)	21 (3)	14 (2)

N : nombre

Ces résultats montrent que dans la majorité des cas le galactomannane se positive plus tôt que la PCR. Cependant la PCR est plus précoce que l'antigène dans deux cas et à chaque fois le résultat positif de la PCR précède d'un jour celui de l'antigène.

3.4. DISCUSSION.

Le modèle animal utilisé dans cette étude a permis d'évaluer plusieurs paramètres permettant de mieux situer la place de la PCR dans le diagnostic de l'aspergillose invasive.

Tout d'abord, les paramètres purement techniques ont été évalués. Ainsi, la sensibilité de la technique PCR que nous avons utilisée sur le sang est apparue moins élevée que celle publiée par les auteurs qui l'ont décrite puisqu'elle est de 0.5 pg au lieu de 0.05 pg (177). Malgré les différentes modifications des conditions de la PCR, la sensibilité de la technique n'a pas pu être améliorée. Certains auteurs ont une sensibilité encore meilleure atteignant 1 à 10 fg (174, 144). D'autres, qui expriment la sensibilité de leur technique en nombre de « colony forming units » ou (cfu)/ml, obtiennent une sensibilité variant de 1 à 10 cfu/ml (174, 45). Becker et coll. (15) qui utilise les mêmes amorces que Einsele et coll (45) obtient une sensibilité de 10 cfu/ml, ce qui est proche de notre sensibilité égale à 20 cfu/ml. Cependant au total, dans l'étude sur modèle expérimental réalisée par cet auteur, les résultats obtenus par PCR ne permettent pas une détection plus précoce de la présence d'*Aspergillus* que la détection de l'antigène galactomannane (15).

En ce qui concerne le choix du milieu biologique pour la détection de la présence d'ADN d'*Aspergillus*, nous avons choisi de travailler sur le sang total plutôt que sur le sérum ou le plasma. En effet, même si les leucocytes et les macrophages sont en nombre réduit en cas d'immunodépression et si leurs fonctions sont altérées, on peut quand même penser que la très faible partie qui a gardé son pouvoir phagocytaire peut héberger des éléments fongiques. En effet, dans la mesure où lors du traitement du sang par la technique d'extraction d'ADN, les tubes sont toujours centrifugés à grande vitesse (15.000 trs/min), il est raisonnable de penser que les éléments fongiques présents dans le plasma sont concentrés dans le culot cellulaire et extraits en même temps que les éléments figurés.

La comparaison avec une extraction sur sérum et plasma serait nécessaire pour définir le milieu où se concentrent les éléments fongiques. Une publication récente de Costa et coll. (33) a montré que le sérum était équivalent au culot leucocytaire alors que le plasma était 10 fois moins sensible pour la détection d'ADN d'*Aspergillus sp.* Loeffler et collaborateurs a également montré que le plasma était un milieu moins adéquat pour la détection d'ADN d'*Aspergillus sp.* que le sang total (89).

Quoiqu'il en soit, beaucoup d'auteurs travaillent sur le sérum (24, 54, 75, 174, 177). Celui-ci est en effet plus facile à recueillir et à conserver sans traitement préalable puisqu'il suffit de le congeler après séparation du caillot, contrairement au sang total qu'il faut traiter immédiatement après réception de l'échantillon, ce qui prend beaucoup plus de temps.

Une autre question à débattre est le volume à utiliser pour l'extraction de l'ADN. Les prises d'essai sont assez variables dans la littérature et, pour ceux qui travaillent sur le sérum, les volumes s'étendent de 100 à 600 µl. Parmi les auteurs qui travaillent sur sang total, certains recommandent l'utilisation d'une quantité de 3 à 7 ml (45). D'autres, par contre, affirment ne pas avoir observé d'amélioration de la sensibilité de la PCR, malgré l'utilisation de quantités croissantes de 0.1, 0.5 à 2.5 ml de sang mélangé à des concentrations constantes de spores (15). Il est possible que leur seuil de sensibilité soit trop haut pour détecter les faibles quantités circulantes et que l'augmentation de la prise d'essai ne puisse pas améliorer le résultat final. En effet, une publication récente sur la quantification d'ADN aspergillaire chez les patients atteints d'aspergillose invasive, fait état de quantité voisines de 5 à 10 cfu/ml pour les plus basses charges fongiques détectables (88).

Différents procédés d'extraction ont été appliqués pour la détection d'ADN *Aspergillus* par PCR. Ceux qui s'appliquent au sang total sont parmi les plus longs, car ils doivent inclure une étape de lyse des globules rouges et d'élimination de l'hémoglobine qui est susceptible d'inhiber la Taq polymérase. Certains auteurs ont décrit des techniques d'extraction comportant une dizaine d'étapes (45). Elles sont efficaces mais excessivement longues et source de contamination. De plus les tampons à préparer sont nombreux et susceptibles de se contaminer lors de la préparation ou de la conservation et ce, même avec des précautions strictes. C'est pour ces raisons que désormais beaucoup d'auteurs qui travaillent à la fois sur sang total ou sur sérum préfèrent utiliser des techniques commercialisées, telles que les colonnes de gel de silice type QIAmp®. Cependant, ces colonnes ne sont pas fermées hermétiquement et lors des diverses centrifugations, des aérosols peuvent se créer et se déposer de façon aléatoire sur les autres colonnes, pouvant entraîner des contaminations.

Au cours de ce travail, quatre techniques d'extraction ont été comparées, et pour chacune d'entre elles une étape préalable utilisant de la lyticase a également été incluse. Cette enzyme qui clive la chitine (N-acétyl galactosamine) permet théoriquement à la protéinase K d'agir plus efficacement

sur la paroi fongique ainsi purifiée de ses polysaccharides. Cependant, dans notre expérience, les résultats n'ont pas été améliorés par l'utilisation de cette enzyme.

Par ailleurs la méthode ayant donné les meilleurs résultats utilise une simple lyse à la protéinase K. C'est une méthode relativement simple et rapide qui a l'avantage d'utiliser uniquement des réactifs commercialisés prêts à l'emploi. Ceci s'effectue totalement en tube fermé et aucune contamination n'a été observée lors des manipulations.

Lors de l'induction de la neutropénie, la réponse des lapins au cytostatique est très variable. La neutropénie ($<500/\mu\text{l}$) est atteinte après 5 jours pour tous les lapins infectés et après 7 jours pour les lapins témoins; de même, la neutropénie profonde est atteinte moins vite pour les lapins témoins (avec encore deux jours de retard sur les lapins témoins). La neutropénie survient donc plus vite chez les lapins infectés que chez les lapins contrôles. Pourtant, *Aspergillus* n'a pas d'effet immunomodulateur décrit dans la littérature, contrairement à d'autres champignons comme *Candida albicans* et *Cryptococcus neoformans*. On peut peut-être expliquer cela par le fait que l'infection fongique entraîne un recrutement accru de neutrophiles au site de l'infection qui n'est pas compensable par une régénération médullaire à cause de l'effet du cytostatique. Ainsi les réserves sont-elles épuisées plus vite chez les lapins infectés.

D'autre part, la sensibilité à l'infection aspergillaire est très variable: certains lapins développent rapidement une maladie invasive fulminante alors que d'autres mettent presque une semaine de plus pour développer une infection fatale. Le lapin 4, qui est négatif pour tous les organes sur le plan histologique et en culture, et le lapin 5, dont aucune coupe histologique examinée n'est positive et par ailleurs dont les résultats en PCR sont tous négatifs, n'offrent pas toutes les garanties pour entrer dans la définition d'aspergillose invasive. L'antigène galactomannane s'est cependant positivé dans les deux cas à J7 (lapin 4) et J8 (lapin 5) et il est demeuré positif jusqu'au décès du lapin dans les deux cas. Pour ces deux lapins, la PCR est positive à J9 et J10 pour le lapin 4, mais est toujours restée négative pour le lapin 5. Ainsi, soit les prélèvements réalisés lors des autopsies n'étaient pas judicieux, soit, en effet, la maladie engendrée n'était pas suffisamment aiguë pour être facilement repérée à l'autopsie. Un plus grand nombre de lapins serait nécessaire pour établir la part des choses avec intervention de vétérinaires anatomopathologistes pour la réalisation de l'autopsie elle-même.

Tableau III.13. Liste des publications comparant antigène galactomannane et PCR et conclusions.

Beckers et coll. (15)	Ag > PCR sang total, modèle: rat.
Bretagne et coll. (24)	Ag > PCR serum, (A.I.)
Kawamura et coll. (75)	PCR serum > Ag (A.I., Aspergillomes)
Williamson et coll. (174)	PCR serum > Ag (A.I.)
Kami et coll. (72)	PCR sang > Ag (A.I.)

A.I. : aspergillose invasive. >: plus précoce ; <: moins précoce

Au cours de notre étude, l'antigène galactomannane s'est positivé dans un délai moyen de 3,4 jours, soit un jour plus tôt que la PCR. Mais, contrairement à celle-ci, une fois positif, l'index continue de monter, alors que la PCR donne des résultats variables. Dans un seul cas (lapin 3), les résultats sont tout à fait superposables à l'antigène galactomannane. Ce cas L3 correspond à une aspergillose invasive rénale et hépatique c'est-à-dire une atteinte tissulaire importante.

Dans les autres cas, les profils PCR sont de trois types: soit un résultat précoce isolé (L1, L13); soit des détections tardives survenant les deux derniers jours de vie du lapin soit 8 cas sur 14 (L2, L4, L6, L7, L9, L10, L11, L12); soit des résultats complètement négatifs (L5, L8, L14).

Dans deux cas, L1 et L13, la PCR est positive un jour plus tôt que l'antigène. D'autres auteurs qui ont travaillé sur des suivis de patients infectés ont également mis une évidence que la circulation d'ADN pouvait être fugace (24, 174).

Pour interpréter nos résultats, on peut suggérer qu'une faible quantité de filaments soient relargués à partir du site de l'infection expliquant les faibles quantités d'ADN qui peuvent en être extraites. Cependant, au fil de l'évolution de la maladie, de plus en plus d'éléments fongiques vont être libérés dans le sang périphérique à partir du site infecté, rendant la détection d'ADN plus facile. D'autre part des ADNses circulantes concourent certainement à la destruction du peu d'ADN qui est libéré dans la circulation à partir de ces filaments. L'antigène galactomannane, quand à lui est relargué naturellement à partir de la paroi du champignon dans les milieux biologiques comme le prouvent les études *in vitro*, indépendamment du relarguage d'élément fongiques dans la circulation, ce qui peut expliquer que les concentrations soient proportionnelles à l'importance de la masse fongique et diminuent lorsqu'un traitement efficace est instauré (122).

Cinq études sont publiées comparant la détection de l'antigène galactomannane en ELISA et la PCR *Aspergillus* sur sérum ou sang total (Tableau III.13). Une étude porte sur un modèle de rat (15) tandis que les autres portent soit sur un suivi de patients neutropéniques à risque (24, 72, 174) soit sur des diagnostics ponctuels de patients suspects de développer une aspergillose invasive ou un aspergillome (75). Pour deux des auteurs la PCR, se positive plus tardivement que l'antigène galactomannane (15, 24). Ainsi, ces deux auteurs travaillant sur des milieux différents (sérum et sang total), avec des cibles différentes (ADN mitochondrial (24) et (ARN ribosomal 18S) (15) et sur des modèles différents (humain et rat), aboutissent au même type de résultat. Tous les deux travaillent par ailleurs sur des prises d'essai relativement faibles, à savoir 0.5 ml de sang total (15) et 0.2 ml de sérum (24).

L'étude de Kawamura et coll. (75) est une étude ponctuelle qui concerne principalement des cas d'aspergillomes et non d'aspergillose invasive et n'est donc pas superposable à notre étude.

L'étude de Williamson et coll (174), porte sur un suivi de patients d'unité d'hématologie ayant développé une aspergillose invasive. Elle montre un pourcentage extrêmement élevé de positivité de la PCR (62%), comparativement à l'antigène galactomannane (20 %). Jamais l'antigène ne précède la PCR en positivité. De plus, la PCR reste parfois positive pendant de longues périodes (200 jours pour le patient n°7 de leur étude) même si la positivité est parfois intermittente d'un prélèvement à l'autre chez un même patient. Ces auteurs travaillent sur sérum (600 µl), avec pour cible les gènes de l'ARN ribosomal 23S et la technique d'extraction utilisée est la même que celle de Bretagne et coll. (24), si ce n'est qu'elle utilise de la lyticase préalablement. Il semble donc que le choix de la cible et des amorces soit primordial dans le développement d'une technique très sensible pour la détection d'ADN d'*Aspergillus*.

Dans l'étude de Kami et coll. (72) dont la cible sont les gènes de l'ARN ribosomal 18S, une meilleure sensibilité est observée pour la PCR par rapport à l'antigène galactomannane avec 79% de sensibilité versus 58%. Cependant, un pourcentage non négligeable de faux positifs (8%) est rapporté chez les patients témoins, ce qui n'a pas été observé par les 4 auteurs précédemment cités et qui donne une valeur prédictive positive égale à 79% alors que l'antigène galactomannane a une valeur prédictive positive plus élevée (86%).

Nous n'avons pas réalisé de suivi de patients à risque qui permettrait d'évaluer la place de la PCR dans le diagnostic de l'aspergillose invasive.

En conclusion, les différentes études de la littérature et notre étude sur le lapin permettent de suggérer l'utilisation de la PCR sur sérum ou sang total en complément de la détection de l'antigène galactomannane sérique par ELISA dans le diagnostic de l'aspergillose invasive. L'antigène galactomannane est un test fiable et dont l'index augmente au cours de l'évolution de la maladie dans notre modèle expérimental. Il serait intéressant de réaliser une étude sur l'évolution des deux paramètres au cours du traitement. En effet, à ce jour aucune étude ne permet de prédire l'évolution de la PCR.

CHAPITRE IV.

4. CHAPITRE IV. LA RESISTANCE AUX ANTIFONGIQUES EST-ELLE MARQUEUR DE PATHOGENICITE ?

4.1. INTRODUCTION.

L'étude de la sensibilité *in vitro* a été réalisée afin de savoir si les souches avaient une sensibilité différente selon qu'elles étaient environnementales, invasives ou colonisantes.

4.2. MATERIEL ET METHODES .

4.2.1. Souches d'*Aspergillus fumigatus* : origines.

Cent six souches d'*A. fumigatus* ont été sélectionnées de la façon suivante: 81 isolats cliniques de patients colonisés, 18 isolats cliniques de patients ayant développé une aspergillose invasive et 7 souches issues de l'environnement. De plus, 3 souches de référence d'*A. fumigatus* ont été incluses provenant de l'Institut Scientifique de la Santé publique (ISSP), Département de Microbiologie, Section de Mycologie avec les références suivantes: IHEM 5734, IHEM 6149, et IHEM 13935 (itraconazole-résistante).

Les souches de l'environnement ont été collectées au centre Hospitalier Universitaire du Sart-Tilman (au laboratoire, dans des chambres de patients et dans les couloirs).

Par contre, pour les souches invasives et les souches de colonisation, comme la collection n'était pas suffisante, 20 souches supplémentaires ont été obtenues auprès du service de Microbiologie des Cliniques Universitaires de Mont Godinne (Yvoir).

4.2.2. Culture des souches d'*A. fumigatus*.

Les souches sont soit conservées à +4°C pour un temps limité (quelques semaines), soit congelées dans du lait écrémé à -80°C.

Elles sont cultivées sur Sabouraud-dextrose-agar (Oxoid, Unipath LTD, Basingstoke, UK), selon les recommandations du document NCCLS M38-P (114) c'est-à-dire repiquées deux fois sur ce

milieu afin de s'assurer de leur vitalité. Les cultures sont incubées 48 heures à 35°C, puis placées à 28°C de façon à obtenir des spores en quantité abondante.

4.2.3. NCCLS M38-P.

Les tests ont été réalisés en microdilution selon la technique de référence NCCLS M38-P (114).

4.2.3.1. Milieu de culture.

Le milieu utilisé est le RPMI 1640 (Roswell Park Memorial Institute) (Gibco BRL, Life technologies, USA) tamponné avec du MOPS (3[N-Morpholino] propane sulfonic acide) (Sigma, St Louis, USA). La préparation de ce milieu de culture est détaillée dans l'annexe 7 « milieux de culture ».

4.2.3.2. Antifongiques.

Quatre antifongiques ont été testés: amphotéricine B (AmB), itraconazole (Itra), voriconazole (Vor) et posaconazole (Posa). Ils ont été fournis respectivement par les fabricants suivants à savoir Bristol-Myers-squibb, USA (AmB), Janssens Pharmaceutica (Itra), Pfizer, New-York, USA (Vor), et Schering Plough, Kenilworth, USA (Posa).

Tous les antifongiques ont été dissous dans l'acide diméthyl-sulfonique (DMSO) avant leur dilution dans le RMI tamponné.

Les concentrations testées sont les suivantes: 0.031 à 16 µg/ml pour AmB, Itra et Vor ; et 0.004 à 4 µg/ml pour posaconazole. Les dilutions ont été réalisées de deux en deux à partir de la plus élevée, directement dans la microplaque de 96 puits. Les plaques utilisées sont des plaques stériles à fonds plat, avec couvercle (Greiner, Frickenhausen, Allemagne).

4.2.3.3. Méthodologie.

4.2.3.3.1. Préparation des solutions stock d'antifongiques.

Les solutions stock ont été préparées à la concentration de 12,8 mg/ml c'est-à-dire que l'on pèse 12.8 mg de chaque antifongique que l'on dissout dans 1 ml de DMSO. Elles sont conservées à -80°C avant utilisation.

4.2.3.3.2. Préparation des solutions de travail d'antifongiques.

Une dilution au 1/40 est réalisée en prélevant 50 μl de la solution stock que l'on dilue dans 1,950 ml de RPMI tamponné. Elle est suivie d'une dilution au 1/10 toujours dans du RPMI tamponné de façon à obtenir une solution de travail à 32 $\mu\text{g/ml}$.

4.2.3.3.3. Préparation des suspensions fongiques.

Les spores d'*Aspergillus* sont prélevées grâce à un écouvillon et sont introduites dans 2 à 3 ml de liquide physiologique à 0.025% de Tween 80 (Sigma, St. Louis, USA) de façon à dissocier les spores entre elles. La suspension est ajustée à 0.5 % Mc Farland en utilisant un spectrophotomètre ce qui correspond à 80-82% de transmission. La concentration de spores est alors d'environ $0.4 \cdot 10^4$ à $5 \cdot 10^4/\text{ml}$.

Après 3 minutes de sédimentation afin que les plus gros agrégats se déposent au fond du tube, le surnageant est prélevé à la pipette Pasteur et introduit dans un tube stérile qui est mélangé par Vortex pendant 15 secondes, pour séparer les conidies les unes des autres.

Une dilution au 1/50 est réalisée en prélevant 250 μl de suspension fongique qui sont introduits dans 12.5 ml de RPMI tamponné.

4.2.3.3.4. Préparation des microplaques.

Les microplaques contiennent 96 puits répartis en 8 rangées de 12 puits numérotées de A, B, C, D, E, F, G, H. La distribution du tampon et des solutions fongiques est réalisée sous hotte à flux laminaire jusqu'à introduction de la solution de spores.

Chaque antifongique est testé en double et la moyenne des deux CMI est calculée.

Les rangées A et B sont utilisées pour l'amphotéricine B.

les rangées C et D pour l'itraconazole.

les rangées E et F pour le voriconazole

les rangées G et E pour le posaconazole

Les dilutions sont réparties de la rangée 1 à 10.

Le puits 11 sert de témoin positif de croissance et contient 100 μ l de RPMI et 100 μ l de suspension de spores.

Le puits 12 sert de témoin négatif, il contient 200 μ l de RPMI.

La préparation des dilutions d'antifongiques est réalisée de la façon suivante:

Du puits 1 à 11 : 100 μ l de RPMI

Puits 1 : 100 μ l de solution de travail de l'antifongique concerné

Après mélange par aspiration refoulement, un volume de 100 μ l est repris et déposé dans le second puits et ainsi de suite jusqu'au puits 10, dont les 100 μ l excédentaires sont jetés. Une dilution de 2 en 2 est ainsi réalisée des puits 1 à 10.

4.2.3.4. Incubation des microplaques.

Les microplaques sont placées en chambre humide à 35°C pendant 46 à 50 heures.

4.2.3.5. Détermination des concentrations minimales inhibitrices (CMI).

4.2.3.5.1. Lecture visuelle.

Deux modes de détermination des CMI ont été employés: la méthode recommandée par le NCCLS c'est-à-dire une méthode visuelle ; la seconde est une méthode de lecture spectrophotométrique à 630 nm.

Scores: les scores utilisés pour l'interprétation sont ceux recommandés par la méthode NCCLS à savoir absence de croissance (score 0) pour l'AmB et 50% de réduction de la croissance du puits témoin positif (score 2) pour les azoles qui sont pour la plupart fongistatiques et pour lesquels on accepte la persistance d'une turbidité au delà de la CMI, car on considère que celle-ci demeure, quelque soit la concentration de l'antifongique.

En fait, pour les azoles, seul l'itraconazole entre dans les recommandations NCCLS, cependant, par assimilation, nous avons adopté les mêmes critères pour les autres azoles.

4.2.3.5.2. Lecture spectrophotométrique.

Pour la lecture spectrophotométrique, le même système de scores a été appliqué. Après soustraction de la valeur du puits témoin négatif, et calcul de la moyenne des deux puits (chaque concentration étant réalisée en double) les densités optiques sont analysées.

En ce qui concerne l'amphotéricine B, la CMI correspond à la valeur du dernier puits dont la densité optique est identique à celle du puits témoin négatif (absence de croissance).

En ce qui concerne les azoles, la CMI correspond à la valeur du dernier puits où la densité optique est inférieure ou égale à 50% de la valeur du puits témoin positif.

4.2.4. Etude statistique.

Pour interpréter les résultats nous avons utilisé les tests statistiques suivants: le test de kappa de Cohen qui permet la comparaison de deux moyennes et les tests Anova 1 et 2 qui permettent également de comparer les moyennes. Le test Anova 1 permet de comparer des moyennes de groupes identiques et le test Anova 2 permet de comparer des moyennes de groupes différents.

4.3. RESULTATS.

Toutes les valeurs des CMI obtenues sont présentées dans l'annexe 1.

4.3.1. Moyenne des CMI.

Les résultats figurent dans le tableau suivant :

Tableau IV.1. Moyennes géométriques des CMI des 4 antifongiques vis à vis des isolats d'*A. fumigatus* (n=106) : comparaison entre les lectures visuelles et spectrophotométriques.

Lecture	Amphotéricine B		Itraconazole		Voriconazole		Posaconazole	
	Visuelle	630 nm	Visuelle	630 nm	Visuelle	630 nm	Visuelle	630 nm
Moyenne des CMI ($\mu\text{g/ml}$)	0.67	0.64	0.37	0.39	0.27	0.28	0.02	0.01
Ecart ($\mu\text{g/ml}$)	0.25-2	0.12-2	0.06-1	0.06-1	0.06-1	0.06-1	0.01-0.12	0.01-0.12

1. Il n'y a pas de différence significative entre les lectures visuelles et spectrophotométriques ($p < 0.05$).
2. Au sein des azoles, le posaconazole a les CMI les plus basses ($p < 0.001$).

4.3.2. CMI₉₀.

Les valeurs des CMI₉₀ figurent dans le tableau suivant. Elles représentent la valeur en deça de laquelle sont situées 90% des résultats de CMI.

Tableau IV.2. CMI₉₀ des 4 antifongiques: comparaison entre les lectures visuelle et spectrophotométrique.

Lecture	Amphotéricine B		Itraconazole		Voriconazole		Posaconazole	
	Visuelle	630 nm	Visuelle	630 nm	Visuelle	630 nm	Visuelle	630 nm
CMI₉₀ (µg/ml)	0.5	0.5	0.5	1	0.5	0.5	0.03	0.03
Ecart (µg/ml)	0.25-2	0.12-2	0.06-1	0.06-1	0.06-1	0.06-1	0.007-0.12	0.007-0.12

Les CMI₉₀ ont les mêmes valeurs sauf pour l'itraconazole dont la lecture spectrophotométrique est une dilution plus élevée ce qui ne constitue pas une différence significative.

4.3.3. Moyenne géométrique des CMI en fonction de l'origine des isolats.

La moyenne géométrique a été calculée en classant les isolats par origine de façon à voir s'il y avait une différence notable. La moyenne a été calculée uniquement par lecture visuelle qui est le mode de lecture de référence.

Tableau IV.3. Moyenne géométrique des CMI par lecture visuelle.

Origine des isolats (n=106)	CMI (µg/ml)	Amphotericine B	Itraconazole	Voriconazole	Posaconazole
Environnement (n=7)	Moyenne	0.74	0.37	0.25	0.02
	Ecart	0.5-1	0.125-1	0.125-0.5	0.062-0.015
Colonisation (n=81)	Moyenne	0.61	0.43	0.43	0.02
	Ecart	0.25-2	0.125-1	0.125-1	0.007-0.031
Invasion (n=18)	Moyenne	0.67	0.36	0.27	0.02
	Ecart	0.25-2	0.25-1	0.125-0.5	0.007-0.125

Les moyennes ne diffèrent pas significativement selon l'origine des souches ($p > 0.05$).

4.3.4. Moyenne des CMI obtenues pour les souches témoins.

Les CMI obtenues sont présentées dans le tableau suivant :

Tableau IV.4. Moyenne des CMI obtenues par lecture visuelle pour les souches contrôles tout au long de l'étude.

Souches de référence	CMI ($\mu\text{g/ml}$)	Amphotéricine B	Itraconazole	Voriconazole	Posaconazole
IHEM 5734	Moyenne	1	0.125	0.5	0.031
	Range	0.5-1	0.125-0.250	0.25-1	0.015-0.12
IHEM 13935	Moyenne	1	≥ 16	0.125	0.5
	Range	0.5-1		0.125-0.25	0.25-0.5
IHEM 6149	Moyenne	0.5	0.25	0.25	0.031
	Range	0.25-1	0.125-0.5	0.125-0.5	0.015-0.062

Les CMI ne diffèrent pas significativement selon l'origine des souches. Ainsi la résistance ou la sensibilité ne semblent pas être un marqueur de pathogénicité.

4.3.5. Souches résistantes mises en évidence.

Parmi les 106 souches, trois souches résistantes vis à vis de l'amphotéricine B ont été isolées.

Tableau IV.5. Résistance de trois souches d'*A.fumigatus* vis à vis de l'amphotéricine B.

N° des souches	Origine des souches	Amphotéricine B CMI ($\mu\text{g/ml}$)	Evolution du patient
16	Invasive	2	Décédé d'aspergillose invasive
23	Colonisation	2	Survie sans traitement
35	Colonisation	2	Survie sans traitement

Aucune souche n'a démontré de résistance vis à vis des azoles mise à part la souche de contrôle itraconazole-résistante.

4.4. DISCUSSION.

Si l'on compare les résultats de cette étude réalisée par la méthode de référence NCCLS M38-P (114) avec ceux publiés dans la littérature, on s'aperçoit que les valeurs obtenues sont très proches.

En effet, pour l'amphotéricine B, deux auteurs obtiennent la même CMI₉₀ vis à vis de souches d'*A. fumigatus* soit 0.5 µg/ml (94, 64). Quand elles sont exprimées sous forme de moyennes géométriques les valeurs des CMI sont plus variables. Ainsi, Moore et coll. () obtient une moyenne de 0.38 µg/ml sur 50 isolats cliniques d'*A. fumigatus*, ce qui est un peu plus bas que notre valeur moyenne de 0.67 µg/ml mais reste à moins d'une dilution d'écart et ne change pas le profil de sensibilité des souches. Arian et coll. (8) obtient une moyenne de 1.33 µg/ml avec une fourchette de valeurs variant de 1 à 2. Le nombre de souches testées est un peu faible (n=24) et de plus les valeurs sont particulièrement élevées dans l'ensemble puisqu'elles s'échelonnent de 1 à 2 µg/ml. Il faut noter que dans cette étude le milieu de culture, RPMI 1640, est supplémenté avec 2% de glucose ce qui peut, peut-être, expliquer des valeurs de CMI plus élevées.

En ce qui concerne les azoles, nos valeurs sont très proches des CMI publiées dans la littérature sauf pour l'itraconazole, drogue pour laquelle Hennequin et coll. (64) obtient une CMI₉₀ très basse (0.06 µg/ml) sur 73 isolats cliniques d'*A. fumigatus*. La méthodologie diffère cependant par une incubation plus courte (24 heures), ce qui devrait abaisser les valeurs des CMI et une lecture au score 1 (75% de réduction de la croissance du témoin positif), ce qui devrait par contre hausser ces valeurs. Cette différence ne changerait cependant pas le classement des souches parmi les souches sensibles.

D'autres auteurs par contre, obtiennent des résultats très proches de ceux observés dans cette étude (8, 48, 94, 101). Manavathu et coll. (94) obtient des valeurs tout à fait identiques pour tous les antifongiques testés, sauf pour le posaconazole pour lequel les valeurs sont 10 fois plus élevées avec une CMI₉₀ de 0.25 µg/ml, notre valeur étant de 0.03 µg/ml. Comme les valeurs seuil de ce nouvel azolé ne sont pas encore définies, il est difficile de savoir si cette variation changerait le profil de sensibilité.

Pour le voriconazole et le posaconazole les CMI moyennes publiées sont tout à fait superposables aux résultats présentés ici (8, 25). Les CMI de ces deux nouveaux azolés sont significativement

plus basses que celles de l'itraconazole, toutes souches confondues. De plus, les CMI de ces deux azolés sont beaucoup plus basses pour la souche itraconazole-résistante avec 0.125 µg/ml pour le voriconazole et 0.5 µg/ml pour le posaconazole même si ce dernier montre une CMI dix fois plus élevée par rapport à la moyenne (0.02 µg/ml).

Dans la littérature, seule une augmentation de 2 à 3 fois la CMI moyenne du posaconazole est rapportée pour les souches itraconazole-résistantes (94). En ce qui concerne le voriconazole, Arikan et coll. (8) obtient une bonne activité *in vitro* sur les souches itraconazole-résistantes avec une CMI moyenne de 0.18 µg/ml sur 2 isolats d'*A. fumigatus* itraconazole-résistants. L'efficacité clinique ne peut cependant pas être déduite de ces résultats *in vitro*, car il n'y a pas à ce jour de corrélation entre la sensibilité *in vitro* et *in vivo*.

Par ailleurs, les résultats présentés ici montrent que la standardisation de la méthode NCCLS peut être améliorée par l'utilisation d'un automate pour la lecture de la croissance des souches. Cette technique spectrophotométrique évite la variabilité liée au lecteur et donne une meilleure reproductibilité des résultats. Il n'est pas toujours facile, en effet, d'évaluer à l'œil une réduction de croissance de 50 ou 75 % par rapport à un témoin de croissance. La méthode spectrophotométrique permet d'éviter cet écueil en donnant des valeurs qui sont interprétables dans la majorité des cas. En cas de divergence, il faut cependant refaire le test. Cette étude a nécessité de répéter un test pour un antifongique à 5 reprises, ce qui représente 1,1% des tests et est tout à fait acceptable.

Très peu d'auteurs ont utilisé la lecture spectrophotométrique dans les tests de sensibilité *in vitro* pour *Aspergillus sp.* Dannaoui et coll. (34) a comparé la méthode NCCLS par lecture visuelle et spectrophotométrique à 490 nm sur 180 souches de différentes espèces d'*Aspergillus sp.* vis à vis de deux antifongiques. Il obtient une corrélation de 99% pour l'amphotéricine B et de 95 à 98% selon les espèces, pour l'itraconazole, drogue pour laquelle il utilise le score 1 c'est-à-dire 75% de réduction de croissance.

Une variante colorimétrique a été également appliquée aux tests de sensibilité *in vitro* des champignons filamenteux vis à vis d'antifongiques. Il s'agit en général d'ajouter un sel de tétrazolium qui pénètre dans la membrane des cellules intactes et est transformé en dérivés colorés. La production de ces dérivés est proportionnelle à la quantité de champignons viables dans les puits.

Meletiadis et coll. (101) ont comparé l'utilisation d'un sel de tétrazolium le 3-(4,5-diméthyl-2-thiazolyl)-2,5-diphényl-2H-tétrazolium bromide (MTT) dans les tests de sensibilité *in vitro* et a montré une bonne corrélation avec les méthodes de références NCCLS correspondantes pour les champignons (NCCLS M38-P) et les levures (NCCLS M27-A).

Cependant ces techniques spectrophotométriques ne sont pas très novatrices et ne sont que des variantes très proches de la méthode NCCLS. La question est de savoir si la méthode de référence apporte des résultats corrélés avec la clinique.

En ce qui concerne les résultats de ce travail, peu de différences sont observées sur les 106 souches étudiées, puisque quelque soit l'antifongique testé, les isolats ont des valeurs qui ne diffèrent pas significativement. La corrélation avec les résultats cliniques n'a pas été réalisée, car la plupart des souches ont été collectées tardivement dans le cours de l'aspergillose développée par les patients; il aurait été hâtif de conclure à une absence de corrélation *in vitro-in vivo* alors que l'échec thérapeutique correspondait davantage à un diagnostic tardif et donc une mise sous traitement retardée. D'autre part, comme seule une souche résistante est apparue parmi les souches responsables d'aspergillose invasive, cette étude ne semblait pas nécessaire.

En ce qui concerne l'amphotéricine B, seules trois souches ont une CMI égale à 2, ce qui est à la limite du seuil de résistance admis pour cette molécule. Pour les azoles, aucune résistance n'a été mise en évidence parmi les 106 isolats. Dans la littérature, certains auteurs soulignent l'absence de corrélation entre les tests de sensibilité *in vitro* et l'évolution *in vivo* sur modèle animal (69, 107) et concluent sur l'intérêt limité de réaliser de tels tests pour guider le traitement du patient.

La situation semble différente pour l'itraconazole depuis que Denning et coll. (40), ont décrit trois souches d'*A. fumigatus* itraconazole-résistantes *in vitro*, et *in vivo* sur modèle murin. Les auteurs affirment que les souches sauvages peuvent être naturellement résistantes à cet antifongique et qu'il est nécessaire de réaliser un test *in vitro* avant de mettre un patient sous cet antifongique.

Par ailleurs, les données (non publiées) concernant le voriconazole montrent qu'il n'y a pas de corrélation entre les tests *in vitro* et l'évolution clinique (Peter Troke, Pfizer, « 6ème TIFI », Prague, 2001). Ainsi, des souches avec des CMI basses peuvent engendrer des infections qui n'évoluent pas favorablement sous traitement et inversement, des infections dues à des souches

avec CMI hautes peuvent être traitées sans problème. Jusqu'à présent, seules des CMI $\geq 3 \mu\text{g/ml}$ devraient faire renoncer à un traitement par le voriconazole.

Peu de données concernent le posaconazole et encore aucune souche résistante n'a été rapportée.

Très récemment, l'équipe espagnole d'Espinel-Ingroff a publié une étude multicentrique réalisée dans 8 centres sur la sensibilité *in vitro* des *Aspergillus sp.* vis à vis de 4 azoles (itraconazole, posaconazole, voriconazole et ravuconazole) (48). La méthode NCCLS M38-P a été utilisée avec quelques variantes: le milieu RPMI 1640 ou le milieu AM3, supplémentés ou non avec 2% de glucose, une incubation de 24, 48, ou 72 heures et une lecture aux scores 0 ou 2. Les conclusions sont très intéressantes, puisque l'utilisation de la méthode NCCLS M38-P avec le RPMI standard, une incubation de 48 heures et une lecture au score 0 ont donné les meilleures corrélations entre les 8 centres. De plus, cette étude a permis de distinguer les souches itraconazole-résistantes dont la CMI était supérieure à $8 \mu\text{g/ml}$. De même, pour le voriconazole, il a été montré que les souches engendrant une infection cliniquement résistante avaient des CMI plus élevées (2 à $8 \mu\text{g/ml}$) que les souches sensibles (0.12 à $2 \mu\text{g/ml}$).

En conclusion, cette étude *in vitro* montre que les CMI les plus basses sont obtenues pour le posaconazole. D'autre part, la lecture spectrophotométrique est très bien corrélée avec la lecture visuelle et peut aisément la remplacer.

A la question, la résistance est-elle un facteur de pathogénicité, il apparaît, dans la mesure où il n'y a pas de corrélation entre les valeurs des CMI et l'origine des souches que le profil de sensibilité d'une souche ne soit en aucun cas un marqueur de pathogénicité.

CONCLUSION GENERALE

5. CONCLUSION GENERALE

Le but de ce travail était d'évaluer la place de la PCR *Aspergillus* dans le diagnostic de l'aspergillose invasive.

La première étude réalisée sur les lavages broncho-alvéolaires a établi clairement la nécessité d'inclure la PCR *Aspergillus* dans le diagnostic de l'aspergillose invasive. Pour que ce test soit utile, il faut cependant que la réponse soit rendue dans les 24 à 48 heures après la réception du prélèvement. Or, à l'heure actuelle, seules les nouvelles technologies permettant de détecter les produits d'amplification en temps réel offrent cette possibilité. En effet, ces techniques plus rapides permettent d'augmenter la fréquence des analyses et par conséquent la diversité des recherches par PCR.

Dans le cadre de pathologies opportunistes où la rapidité du diagnostic étiologique est souvent cruciale, l'association de la recherche de cibles différentes est un atout appréciable. On peut ainsi envisager de rechercher par PCR, en association, *Aspergillus*, Cytomégalovirus, Toxoplasme, *Pneumocystis carinii*, le virus herpes simplex... sur le même prélèvement. Le développement de puces à ADN applicables au secteur de la microbiologie (ce qui est loin d'être encore le cas) rendra la batterie infectieuse investiguée encore plus large.

Cependant, si la recherche au niveau des lavages broncho-alvéolaires est importante dans le cadre de l'apparition de troubles respiratoires chez un patient immunodéprimé, la détection de l'agent infectieux, avant l'apparition de signes cliniques notables permettra de traiter les pathologies infectieuses de façon plus efficace. Dans le cadre des aspergilloses invasives, la détection de l'antigène galactomannane est pour le moment le seul paramètre qui semble toutefois utile selon les données de la littérature. La PCR *Aspergillus* ne fait pas l'unanimité des publications. L'étude réalisée ici sur modèle animal a permis de montrer que la PCR *Aspergillus* était outil complémentaire, à réaliser en parallèle avec l'antigénémie galactomannane, dans la mesure où les deux tests ne sont pas toujours positifs en même temps.

En effet, peu d'études portent sur le suivi de patients immunodéprimés par PCR *Aspergillus* avec détection simultanée de l'antigène galactomannane. Peu de centres, en effet, réalisent la recherche d'ADN *Aspergillus* par PCR, arguant le risque important de contamination des réactifs utilisés en PCR et donc de faux positifs. La commercialisation de kits PCR complets permettra sans doute de

remédier à ce problème. Cependant, pour la plupart des microbiologistes, la priorité de la détection des champignons in vasifs vient après celle de la recherche des bactéries et des virus.

Les perspectives immédiates de ce travail sont donc la développement d'une PCR en temps réel et sa comparaison aux deux techniques précédemment développées. Son évaluation sur tous les liquides biologiques sera nécessaire à la fois en terme de diagnostic ponctuel que dans le cadre de suivi de patients à risque en parallèle avec d'autres recherches de pathogènes opportunistes.

D'autre part, une meilleure connaissance du génome d'*Aspergillus* qui fait l'objet d'un séquençage dans le cadre d'un projet européen, permettra sans doute d'améliorer la définition des cibles à utiliser lors du choix des amorces et donc de rendre les techniques PCR encore plus performantes.

Ainsi, le diagnostic et le traitement de la pathologie aspergillaire sont en pleine évolution. D'une part l'arsenal thérapeutique s'ouvre à de nouvelles molécules moins toxiques que le « gold standard » l'amphotéricine B et néanmoins tout aussi efficaces sinon davantage. D'autre part les outils moléculaires qui doivent désormais faire partie de la routine des laboratoire hospitaliers ouvre la perspective d'un diagnostic plus rapide ce qui augmente les chances de succès d'une chimiothérapie plus précoce et mieux ciblée.

BIBLIOGRAPHIE

6. BIBLIOGRAPHIE

1. Abruzzo G.K., C. Gill, A. Flattery, L. Kong, C. Leighton, J. Smith, V. Pikounis, K. Bartizal, H. Rosen. 2000. Efficacy of the echinocandin caspofungin against disseminated aspergillosis and candidiasis in cyclophosphamide-induced immunosuppressed mice. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 44:2310-2318.
2. Aisner J., Schimpff S.C., Bennett J.E., Young, P.H. Wienik P.H. 1976. *Aspergillus* infections in cancer patients. Association with fire proofing materials in a new hospital. *Jama*, 235:411-412.
3. Aisner J., J. Murillo, S.C. Schimpff and A.C. Steere. 1979. Invasive aspergillosis in acute leukaemia: correlation with nose cultures and antibiotic use. *Ann. Intern. Med.*, 90:4-9.
4. Aminati R., A. Sato et al., .1992. Effects of *Aspergillus* species cultures filtrates on human respiratory ciliated epithelium *in vitro*. *Am. Rev. Resp. Dis.*, 145:45-48.
5. Aminati R., G. Taylor, E. N. Elezis, C. Llewellyn-Jones, J. Mitchell, F. Kuze, P.J. Cole,, and R. Wilson. 1995. Purification and characterisation of factors produced by *Aspergillus fumigatus* which affect human ciliated respiratory epithelium. *Infect. Immun.* 63:3266-3271.
6. Annaissie E.J., S.F. Costa. 2001. Nosocomial aspergillosis is waterborne. *Clin. Infect. Dis.*, 33:1546-1548.
7. Ansorg R., E. Heinstschel von Heinegg, P.M. Ratt. 1994. *Aspergillus* antigenuria compared to antigenemia in bone marrow transplant recipients. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.*, 13:582-589.
8. Arikan S., M. Lozano-Chiu, V. paetznick, S. nangia, J.H. Rex. 1999. Microdilution susceptibility testing of amphotericin B, itraconazole, and voriconazole against clinical isolates of *Aspergillus* and fusarium species. *J. Clin. Microbiol.*, 37:3946-3951.
9. Arrese Estrada J., Stynen D., Goris A. and G.E. Pierard. Identification immuno-histochemique d'*Aspergillus* par l'anticorps EB-A1. *Annal. Pathol.*, 10 :198-200.
10. Ascigu S., J.H. Rex, B. De Pauw, J.E. Bennett, J. Bille, F. Crockert, D.W. Denning, J.P. Donnelly, J.E. Edwards, Z. Erjavec, D. Fiere, O. Lortholary, J. maertens, J.F. Meis, T.F. Patterson, J. Ritter, D. Selleslag, P.M. Shah, D.A. Stevens and T.J. Walsh, on behalf of the Invasive Fungal Infections Cooperative Group of the European Organization for Research and Treatment of Cancer

- and Mycoses Study Group of the National Institute of Allergy and infectious diseases. 2002. Defining opportunistic invasive fungal infections in immunocompromised patients with cancer and hematopoietic stem cell transplants: an international consensus. *Clin. Infect. Dis.*, 34:7-14.
11. Badillet G., C. de Bièvre, E. Guého. Champignons contaminants des cultures. Champignons opportunistes. Atlas clinique et biologique. Tome II : champignons filamenteux. Varia (Eds), Paris, 1987.
 12. Bardana E.J. 1980. The clinical spectrum of aspergillosis . 2. Epidemiology, pathogenicity, infections in animals and immunology of *Aspergillus*. *Crit. Rev. Clin. Lab. Sci*, 13-21:84.
 13. Bart-Delabesse E., A. Marmorat-Khuong, J.M. Costa, M.L. Dubreuil-Lemaire, S. Bretagne. 1996. Detection of *Aspergillus* DNA in bronchoalveolar lavage fluid of AIDS patients by polymerase chain reaction. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.*, 15, 24.
 14. Beaune G., F. Bienvenu, Pondarre C., Bienvenu J., Souillet G. 1998. Serum procalcitonine rise in only slight in two cases of disseminated aspergillosis. *Infection* 26:168-169.
 15. Becker M.J., S. De Marie, D. Willems, H.A. Verbrugh, I. Bakker-Woudenberg. 2000. Quantitative galactomannan detection is superior to PCR in diagnosing and monitoring invasive pulmonary aspergillosis in an experimental rat model. *J. Clin. Microbiol.*, 38:1434-1438.
 16. Berenguer J.E., M.C. Allende, J. Lee, K. Garret, C. Lyman, N.M. Ali, J. Bacher, P.A. Pizzo and T.J. Walsh. 1995. Pathogenesis of pulmonary aspergillosis-granulocytopenia versus cyclosporine-methylprednisolone induced immunosuppression. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, 152:1079-1086.
 17. Bocquet P., G. Brückner. 1994. Lutte intégrée contre l'aspergillose au niveau d'un hôpital ou d'un groupement hospitalier. *Pathol. Biol.*, 42, 730-731.
 18. Bodey G.P., Vartarian S. Aspergillosis. 1989. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.*, 8, 413-437.
 19. Bodey G.P., B. Buelmann, W. Duguid, D. Gibbs, H. Hanak, M. Hotchi, G. Mall, P. Martino, F. Meunier, S. Milliken, S. Naoes, M. Okudaira, D. Scevola, J. Van't Wout. 1992. Fungal infections in cancer patients: an international autopsy survey. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.*, 11:99-109.
 20. Bogaerts M., D.J. Winston, E.J. Bow, G. Garber, A.C. Rebolli, A.P. Schwarzer, N. Nowitzky, A. Boehme, E. Chwetzoff, K. De Beule, Itraconazole study group. 2001. Intravenous

and oral itraconazole versus intravenous amphotericin B deoxycolate as empiric therapy for persistent fever in neutropenic patients with cancer who are receiving broad-spectrum antibacterial therapy. 2001. *Ann. Int. Med.*, 135:412-422.

21. Burnie J.P. and R.C. Matthews. 1991. Heat shock protein 88 and *Aspergillus* infection. *J. Clin. Microbiol.*, 25:5-9.

22. Bretagne, S., J.M. Costa, A. Marmorat-Khuong, F. Poron, C. Cordonnier, M. Vidaud, and J. Fleury-Feith. 1995. Detection of *Aspergillus* species DNA in bronchoalveolar lavage samples by competitive PCR. *J. Clin. Microbiol.* 33:1164-1168.

23. Bretagne, S., A. Marmorat-Khuong, J. Kuentz, J.P. Latgé, E. Bart-Labesse, and C. Cordonnier. 1997. Serum galactomannan antigen testing by sandwich ELISA: practical use in neutropenic patients. *J. Infect.*, 35:7-13.

24. Bretagne, S., J.M. Costa, E. Bart-Delabesse, N. Dhédin, C. Rieux, and C. Cordonnier. 1998. Comparison of serum galactomannan antigen detection and competitive polymerase chain reaction for diagnosing invasive aspergillosis. *Clin. Infect. Dis.* 26: 104-112

25. Cacciaoupuoti A., D. Loebenberg, E. Corcoran, F. Menzel, E. Moss, C. Norris, M. Michalski, K. Raynor, J. Halpern, C. Mendrick, B. Arnold, B. Antonacci, R. Parmegiani, T. Yarosh-Tomaine, G. Miller, R. Hare. 2000. *In vitro* and *in vivo* activities of SCH 56592 (posaconazole), a new triazole antifungal agent, against *Aspergillus* and *Candida*. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 44:2017-2022.

26. Caillot D., O. Casanovas, A. Bernard, J.F. Couaillier, C. Durand, B. Cuisenier, E. Solary, F. Piard, T. Petrella, A. Bonnin, G. Couillault, M. Dumas and H. Guy. 1997. Improved management of invasive pulmonary aspergillosis in neutropenic patients using early thoracic computed tomographic scan and surgery. *J. Clin. Oncol.* 15:139-147.

27. Caillot D., H. Bassaris, A. McGeer, C. Arthur, H.G. Prentice, W. Seifert, and K. De Beule. 2001. Intravenous itraconazole followed by oral itraconazole in the treatment of invasive pulmonary aspergillosis in patients with haematologic malignancies, chronic granulomatous disease, or AIDS. *Clin. Infect. Dis.*, 33:e83-e89.

28. Chandler F., W. Kaplan, L. Ajello. A color atlas and text book of the histopathology of mycotic diseases. Wolfe medical publication, Ltd, 1980.

29. Chuchana P. 1991. Réaction de polymérisation en chaîne : méthodologie générale. *Ann. Biol. Clin.*, 50:703-708.
30. Cohen J. 1991. Clinical manifestations and management of aspergillosis in the immunocompromised patient, *Fungal infection in the compromised patient*, eds Warnock D.W., Richardson M.D., 2nd edn, John Wiley and Sons, Chichester, 117-152.
31. Collective name: Center for disease control and prevention; the infectious diseases society of America; the American society of blood and marrow transplantation. 2000. Guidelines for preventing opportunistic infections among hematopoietic stem cell transplant patients. *Biol. Blood Marrow Transplant*, 6:659-713; 715;717-727; quiz 729-33.
32. Commers J., K.J. Rochibaud, P.A. Pizo et al.1984. New pulmonary infiltrates in granulopenic patients being treated with antibiotics. *Pediatric infectious diseases* 3:423-428.
33. Costa C., D. Vidaud, M. Olivi, E. Bart-Delabesse, m. Vidaud and S. Bretagne. 2001. Development of two real-time quantitative TaqMan PCR assays to detect circulating *Aspergillus fumigatus* DNA in serum. *J. Microbiol. Methods*, 44:263-269.
34. Dannaoui E., F. Persat, M.F. Monier., E. Borel, M.A. Piens, S. Picot. 1999. Use of spectrophotométric reading for *in vitro* antifungal susceptibility testing of *Aspergillus* spp. *Can J. Microbiol.*, 45:871-874.
35. Debeaupuis J.P., Sarfati J., Chazalet V., Latgé J.P. 1997. Genetic diversity among clinical and environmental isolates of *Aspergillus fumigatus*. *Infect. Immun.*, 19:3080-5.
36. De Bièvre C. *Aspergillus*. Cours de Mycologie médicale 1989. Institut Pasteur de Paris.
37. Deeg H.J., R. Strob, E.D. Thomas, et al. 1985. Cyclosporine as prophylaxis for graft-versus-host disease: a randomized study in patients undergoing marrow transplantation for acute nonlymphoblastic leukaemia. *Blood*, 65:1325-1334.
38. De Hoog G.S. and J. Guarro. 1995. Atlas of clinical fungi, Centraalbureau voor Schimmelcultures, Baarn, 720.
39. Denning D.W. D.A. Stevens. 1990. Antifungal and surgical treatment of invasive aspergillosis: revue of 2.121 published cases. *Rev. Infect. Dis.*, 12 :1147-1201.
40. Denning D.W., K. Venkateswarlu, K.L. Oakley,, M.J. Anderson, N.J. Manning, D.A. Stevens, D.W. Warnock, and S.L. Kelly. 1997. Itraconazole resistance in *Aspergillus fumigatus*. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 41 :1364-1368.

41. Denning D.W. , E.G. Evans, C.C. Kibbler, M.D. Richardson, M.M. Roberts, T.R. Rogers, D.W. Warnock, R.E. Warren. 1997. Guidelines for the investigation of invasive fungal infections in haematological malignancy and solid organ transplantation. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.*, 16 :424-436.
42. Denning D.W. 1998. Aspergillosis. *Clin. Infect. Dis.*, 26 :781-803.
43. De Repentigny L., S. Petitbois, M. Boushira, E. Michaliszyn, S. senechal, N. Gendron and S. Montplaisir. 1993. Acquired immunity in experimental murine aspergillosis is mediated by macrophages. *Infect. Immun.*, 61:3791-3802.
44. De Repentigny L. 1992. Serodiagnosis of candidiasis, aspergillosis and cryptococcosis. *Clin. Infect. Dis.*, 14(suppl): S11-S22.
45. Einsele, H., H. Hebart, G. Roller, J. Löffler, I. Rothenhofer, C.A. Muller, R.A. Bowden, J.A- Van Burik, D. Engelhard, L. Kanz, and U. Schumacher. 1997. Detection and identification of fungal pathogens in blood by using molecular probes. *J. Clin. Microbiol.* 35: 1353-1360.
46. Escott G.M., D.J. Adams. 1995. Chitinase activity in human serum and leukocytes. *Infect. Immun.*, 63:4770-4773.
47. Espinell-Ingroff A. 1998. Comparison of in vitro activities of the new triazole SCH56592 and echinocandins MK-0991 (L-743, 872) and LY303366 against opportunistic filamentous and dimorphic fungi and common and emerging yeast pathogens. *J. Clin. Microbiol.*, 36:1950-2956.
48. Espinell-Ingroff A., M. Bartlett, V. Chaturvedi, M. Ghannoum, K.C. Hazen, M.A. Pfaller, M. Rinaldi, T.J. Walsh. 2001. Optimal susceptibility testing conditions for detection of azole resistance in *Aspergillus* spp.: NCCLS collaborative evaluation. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 45:1828-1835.
49. Fontaine T., C. Simenel, G. Dubreucq, O. Adam, M. Delepiere, J. Lemoine, C. E. Vorgias, M. Diaquin, J.P. Latgé. 2000. Molecular organization of the alkali-insoluble fraction of *Aspergillus fumigatus* cell wall. *The J. Biol. Chem.*, 275:27594-27607.
50. Frosco M. T. Chase and J.D. McMilan. 1992. Purification and properties of the elastase from *Aspergillus fumigatus*. *Infect. Immun.*, 60:728-734.
51. Furman A.C., K.A. Sepkowitz and R. Soave. Acquired immunodeficiency syndrome; p.716-784. in R. Reese and R.F. Betts (ed), *Practical approach to infectious diseases*, 4th ed., Little Brown and company, Boston, Massachusetts.

52. Gage A., Dean D.C. 1970. Aspergillus infection after cardiac surgery. Arch. Surg., 101-384-387.
53. Geftter W., S. Albelda S., G. Talbot, S. Gerson, P. Cassileth, W. Miller. 1984. Invasive pulmonary aspergillosis and acute leukaemia. Limitations in the diagnostic utility of the air crescent sign. Radiology, 157:605-610.
54. Golbang N., J.P. Burnie and R.C. Matthews. 1999. A polymerase chain reaction enzyme immunoassay for diagnosing infection caused by *Aspergillus fumigatus*. J. Clin. Pathol., 52:419-423.
55. Goodley J.M., Y.M. Clayton, J.R. Hay. 1994. Environnemental sampling for aspergilli during building construction on a hospital site. J. Hosp.Infect., 26:27-35.
56. Grillot R., B. Lebeau, P. Ambroise-Thomas. 1994. L'aspergillose invasive: conduite du diagnostic mycologique. Patholo. Biol., 42 :675-682.
57. Grocott R.G. 1955. A stain for fungi in tissue sections and smears using Gomori's methenamine-silver nitrate technique. Am. J. Clin. Pathol., 25:975-979.
58. Guillemain R., V. Lavarde, C. Amrein, P. chevalier, A. Guinvarc'h and D. Glotz. 1995. Invasive aspergillosis after transplantation. Transplant. Proc., 27:1307-1309.
59. Hagensee M.E., J.E. Bauwens, B. Kjos, R.A. Bowden. 1994. Brain abscess following marrow transplantation: experience at the Fred Hutchinson cancer research Center, 1984-1992. Clin. Infect. Dis., 19:402-408.
60. Hawksworth D.L. Kingdom fungi: fungal phylogeny and systematics, P. 43-65. In Microbiology and microbial infections. Volume 4. Medical mycology. Topley and Wilson's. L. Ajello & R.J. Hay (eds), 9th ed., London, 1998.
61. Haynes K.A., and T.R. Rogers. 1994. Retrospective evaluation of a latex agglutination test for diagnosis of invasive aspergillosis in immunocompromised patients. Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis., 13 :670-674.
62. Hayette M.P., D. Vaira, F. Suzin, P. Boland, G. Christiaens, P. Melin and P. de Mol. 2001. detection of aspergillus species DNA by PCR in bronchoalveolar lavage fluid. J. Clin. Microbiol., 39:2338-2340.

63. Hearn V.M.1988. Serodiagnosis of Aspergillosis., Pp.43-71. In H. Vanden Bossche, D.W.R. Mackenzie and G. Cauwenbergh (ed.), *Aspergillus* and aspergillosis. Plenum Press, New York, N.Y.
64. Hennequin C., N. Benailly, C. Silly, M. Sorin, P. Scheinmann, G. Lenoir, J.L. Gaillard, P. Berche. 1997. *In vitro* susceptibilities to amphotericin B, itraconazole and miconazole of filamentous fungi isolated from patients with cystic fibrosis. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 41:2064-2066.
65. Hensel M., H.N. Arst, Aufauvre-Brewn A. and D.W. Holden. 1998. The role of the *Aspergillus fumigatus* area gene in invasive pulmonary aspergillosis. *Mol. Gen. Genet.*, 258:553-557.
66. Herold C.J., J. Kramer, K. Sertl, P. Kahls, R. Maller, H. Imhof, D. Tscholakoff. 1989. Invasive pulmonary aspergillosis: evaluation with MR imaging. *Radiology*, 173:717-721.
67. Hruban R.H., M.A. Meziane, E.A. Zerhouni, P.S. Wheeler, Dumler J.S., G.M. Hutchings. 1987. Radiologic-pathologic correlation of the halo sign in invasive pulmonary aspergillosis. *J. Comput. Assist. Tomogr.* 11:534-536.
68. Jaffe H.W., D.J. Bregman, R.M. Selik. 1983. Acquired immunodeficiency syndrome in the United States: The first 1000 cases. *J. Infect. Dis.*, 148:339-345.
69. Johnson E., K. Oakley, S. Radford, C. Moore, P. Warn, D. Warnock, D. Denning. 2000. Lack of correlation of *in vitro* amphotericin B susceptibility testing with outcome in a murine model of *Aspergillus* infection. *J. Antimicrob. Chemother.*, 45:85-93.
70. Jones, M.E., A.J. Barnes, B.A. Oppenheim, P. Balagopal, G.R. Morgenstern., and J.H. Scarffe. 1998. PCR-ELISA for the early diagnosis of invasive pulmonary *Aspergillus* infection in neutropenic patients. *J. Clin. Pathol.* 51, 652-656.
71. Kahn F., Jones M.J., England D.M. 1986. The role of broncho-alveolar lavage in the diagnosis of invasive pulmonary aspergillosis. *Am. J. Clin. Pathol.*, 86:518-523.
72. Kami M., T. Fukui, S. Ogawa, Y. Kazuyama, U. Machida, Y. Tanaka, Y. Kanda, T. Kashima, Y. Kamazaki, T. Hamaki, S. Mori, H. Akiyama, Y. Mutou, H. Sakamaki, K. Osumi, S. Kimura, H. Hirai. 2001. Use of real-time PCR on blood samples for diagnosis of invasive aspergillosis. *Clin. Infect. Dis.*, 33:1504-1512.

73. Kappe R., A. Schulze-Berge A.n H.G. Sonntag. 1996. Evaluation of eight antibody tests and one antigen test for the diagnosis of invasive aspergillosis. *Mycosis*, 39:13-23.
74. Kappe R., D. Rimek. Laboratory diagnosis of *Aspergillus fumigatus*-associated diseases, p. 88-104. Dans "Contribution to microbiology, Vol.2, *Aspergillus fumigatus* Biology, clinical aspects and molecular approaches to pathogenicity". Brackage A., B. Jahn, A. Schmidt. (Ed.), 1999, Karger, Basel, Switzerland.
75. Kawamura S., S. Maesaki, T. Noda, Y. Hirakata, K. Tomono, T. Tashiro, S. kohno. 1999. Comparison between PCR and detection of antigen in sera for diagnosis of pulmonary aspergillosis. *J. Clin. Microbiol.*, 37:218-220
76. Koshland D.E. 1989. The molecule of the year. *Science*, 246:1541.
77. Kozel T.R. 1996. Activation of the complement system by pathogenic fungi. *Clin. Microbiol. Rev.*, 9:34-46.
78. Kramer M.R., D.W. Denning, S.E. Marshall, Ross D.J., G. Berry, N.J. Lewinston, D.A. Stevens, and J. Theodore. 1991. Ulcerative tracheobronchitis after lung transplantation. A new form of invasive aspergillosis. *Am. Rev. respir. Dis.*, 144:552-556.
79. Kuhlman J.E., E.K. Fishman, S. Siegelman. 1985. Invasive pulmonary aspergillosis in acute leukaemia: characteristic findings on CT, the CT halo sign, and the role of CT in early diagnosis. *Radiology*, 157:611-614.
80. Kwok S. and R. Higuchi. 1989. Avoiding false positives with PCR. *Nature*, 339 :237-238.
81. Lajonchère J.P., M. Feuillade De Chauvin. 1994. Contamination aspergillaire : évaluation des mesures de prévention et surveillance de l'environnement. *Pathologie biologique*, 42 :718-729.
82. Lass-Flörl, J. Aigner, E. Gunsilius, A. Petzer, D. Nachbaur, G. Gastl, H. Einsele, J. Löffler, M. Sdierich and R. Würzner. 2001. Screening for *Aspergillus spp.* using the polymerase chain reaction of whole blood samples from patients with haematological malignancies. *Br. J. Haematol*, 113:180-184.
83. Latgé J.P. 1995. Tools and trends in the detection of *Aspergillus fumigatus*. *Curr. Top. Med. Mycol.*, 6:245-281.
84. Latgé J.P. 1999. *Aspergillus* and aspergillosis. *Clin. Microbiol. Rev.*, 12:310-350.
85. Levitz S.M., T.P. Farrell. 1990. Human neutrophil degranulation stimulated by *Aspergillus fumigatus*. *J. Leukoc. Biol.*, 47:170-175.

86. Loeffler, J., H. Hebart, U. Schumacher, H. Reitze, and H. Einsele. 1997. Comparison of different methods for extraction of DNA of fungal pathogens from cultures and blood. *J. Clin. Microbiol.* 35: 3311-3312.
87. Loeffler J., H. Hebart, S. Sepe, U. Schumacher, T. Klingebiel, and H. Einsele. 1998. Detection of PCR-amplified fungal DNA by using a PCR-ELISA system. *Medical mycology*, 36:275-279.
88. Loeffler J., N. Henke, H. Hebart, D. Schmidt, L. Hagemeyer, U. Schumacher, and H. Einsele. 2000. Quantification of fungal DNA by using fluorescence energy transfer and the light cycler system. *J. Clin. Microbiol.* 38:586-590.
89. Loeffler J., H. Habart, U. Brauchle, U. Schumacher and H. Einsele. 2000. Comparison between plasma and whole blood specimens for detection of *Aspergillus* by PCR. *J. Clin. Microbiol.*, 38:3830-3833.
90. Lortholary O., M.C. Mejohas, B. Dupont, J. Cadranel, D. Salmon-Ceron, D. Peyramond, D. Simonin. 1993. Invasive aspergillosis in patients with acquired immunodeficiency syndrome: report of 33 cases. *Am. J. Med.*, 95:177-187
91. Machetti M., M. Feasi, N. Mordini, B. Van Lint, J.P. Latgé, J. Sarfati and C. Viscoli. 1998. Comparison of an enzyme immunoassay and a latex agglutination system for the diagnosis of invasive aspergillosis in bone marrow transplant recipients. *Bone Marrow transplant*, 31:917-921.
92. Madan T.P., P. Eggleton, U. Kishore, P. Strong, S. Aggrawal, P.U. Sarma, and K. B. Reid. 1997. Binding of pulmonary surfactant proteins A and D to *Aspergillus fumigatus* conidia enhances phagocytosis and killing by human neutrophils and alveolar macrophages. *Infect. Immun.*, 65:3171-3179.
93. Maertens J., J. Verhagen, H. Demuynck, P. Brock, G. Verhoef, P. Vandenberghe, J. Van Eldere, J. Verbist and M. Bogaerts. 1999. Autopsy controlled prospective evaluation of serial screening circulating galactomannan by a sandwich enzyme-linked immunosorbent assay for hematological patients at risk for invasive aspergillosis. *J. Clin. Microbiol.*, 37:3223-3228.
94. Manavathu E.K., J. Cutright, D. Loebenberg, P. Chandrasekhar. 2000. A comparative study of the *in vitro* susceptibilities of clinical and laboratory selected resistant isolates of *Aspergillus* spp. To amphotericin B, itraconazole, voriconazole and posaconazole (SCH 56592). *J. Antimicrob. Chemother.*, 46:229-234.

95. Manso E., M. Montillo, G. De Sio, S. D'Amico, G. Discepoli, and P. leoni. 1994. Value of antigen and antibody detection in the serological diagnosis of invasive aspergillosis in patients with haematological malignancies. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect.Dis.*, 30:756-760.
96. Margulis L., K.V. Schwartz. 1988. *Five kingdoms*, 2nd edn, Freeman and Co., New-York, 1-376.
97. Martin P.J., J.A. Hansen, R. storb, E.D. Thomas. 1985. A clinical trial of *in vitro* depletion of T cells in donor marrow for prevention of acute graft-versus-host disease. *Transplant. Proc.* 17:486-487.
98. Matthews R., J.P. Burnie, A. Fox and S. tabaqchali. 1985. immunoblot analysis of serological responses in invasive aspergillosis. *J. Clin. Microbiol*, 38:1300-103.
99. Mayer J.M., Nimer L., Carroll K. 1992. Isolated pulmonary aspergillar infection in cardiac transplant recipients: case report and review. *Clin. Infect. Dis.*, 15:698-700.
100. Melchers, W.J.G., P.E. Verweij, P. van den Hurk, A. van Belkum, B. De Pauw, J. Hoogkamp-Korstanje, and J.F.G.M. Meis. 1994. General primer-mediated PCR for detection of *Aspergillus* species. *J. Clin. Microbiol.* 32:1710-1717.
101. Meletiadis J., J.F. Meis, J.W. Mouton, J.P. Donnelly, P.E. Verweij. Comparison of NCCLS and 3-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide (MTT) methods of *in vitro* susceptibility testing of filamentous fungi and development of a new simplified method. 2000. *J. Clin. Microbiol.*, 38:2949-2954.
102. Meyohas M.C., P. Roux, J.L. Poirot, J.L. Meynard, J. Frottier. 1994. Aspergillose au cours du syndrome d'immunodéficience acquise. *Pathol. Biol.*, 42:6447-651.
103. Micheli P. 1729. *Nova plantarum genera juxta turnefortu methodum disposita*, Florence 234.
104. Milosev B., Davidson C.M., Gentles J.C., Sandison A.T. 1966. Aspergillosis of the paranasal sinuses and orbit in northern Sudanese. *Lancet*, 1:746-747.
105. Minamoto G.Y., T.F. Barlam, and N.J. 1992. Invasive aspergillosis in patients with AIDS. *Clin. Infect. Dis.*, 14 :66-74.
106. Moore C., C. Walls, D. Denning. 2000. In vitro activity of the new triazole BMS-207147 against *Aspergillus* species in comparison with itraconazole and amphotericin B. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 44: 441-443.

107. Mosquera J., P.A. Warn, J. Morrissey, C.B. Moore, C. Gil-Lamainere, D.W. Denning. 2001. Susceptibility testing of *Aspergillus flavus*: inoculum dependence with itraconazole and lack of correlation between susceptibility to amphotericin B *in vitro* and outcome *in vivo*. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 45:1456-1462.
108. Müllbacher A. and R. D. Eichner. 1984. Immunosuppression *in vitro* by a metabolite of a human pathogenic fungus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81:3835-3837.
109. Müllbacher A., P. Waring and R. D. Eichner. 1985. Identification of an agent in cultures of *Aspergillus fumigatus* displaying anti-phagocytic and immuno-modulating activity *in vitro*. *J. Gen. Microbiol.*, 131:1251-1258.
110. Mullis K.B., F. Faloona, S. Scharf , R. Saiki, G. Horn, H.A. Erlich. 1986. Specific enzymatic amplification of DNA *in vitro*: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.*, 51:263-273.
111. Mullis K.B., F. Faloona; 1987. Specific synthesis of DNA *in vitro* via a polymerase catalysed chain reaction. *Methods Enzymol.*, 155:335-350.
112. Nakao A., M. Yasui, T. Kawagoe, H. tamura, S. Tanaka, and H. Takagi. 1997. false positive endotoxemia derives from gauze glucan after hepatectomy for hepatocellular carcinoma with cirrhosis. *Hepatogastroenterology*, 44:1413-1418.
113. Nash G., R. Irvine, R.L. Kerschmann and B. Herndier. 1997. Pulmonary aspergillosis in acquired pulmonary deficiency syndrome: autopsy study of an emerging pulmonary complication of human immunodeficiency virus infection. *Human pathology*, 28:1268-1275.
114. National Committee for Clinical Laboratory Standards. 1997. reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of conidium-forming filamentous fungi. Proposed standard M38-P. National Committee for clinical Laboratory Standards, Wayne, Pa.
115. Nolard N. Risques d'aspergillose invasive et contamination de l'environnement. 1994. *Pathologie Biologie*, 42 :706-710.
116. Obayashi T., M. Yoshida ,D. H. Tamura, J. Aketagawa, S. tanaka and T. Kawai. 1992. determination of plasma β 1-3glucan: a new diagnosis aid to deep mycosis. *J. med. Vet. Mycol.*, 30:275-280.
117. Odds F.C., F. Van Gerven, A. Espinel-Ingroff, M.S. Barlett, M.A. Ghannoum, M.V. Lancaster, M.A. Pfaller, J.H. Rex, M.G. Rinaldi, T.J. Walsh. 1998. Evaluation of possible

correlations between antifungal susceptibilities of filamentous fungi *in vitro* and antifungal treatment in animal infection models. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 42:282-288.

118. Odds F., M. Oris, P. Van Dorsselaer, F. van Gerven. 2000. Activities of an intravenous formulation of itraconazole in experimental disseminated *Aspergillus*, *Candida*, and *Cryptococcus* infections. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 44:3180-3183.

119. Overdijk B.G., J. Van Stijn and F. Odds. 1996. Chitinase levels in guinea pigs blood are increased after systemic infection by *Aspergillus fumigatus*. *Glycobiology*, 6:627-634.

120. Paris S.E., E. Boisvieux-Ulrich, B. Crestani, O. Oucine, D. Taramelli, L. Lombardi, and J.P. Latgé. 1997. Internalization of *Aspergillus fumigatus* conidia by epithelial and endothelial cells. *Infect. Immun.*, 65:1510-1514.

121. Patel R. and C. Paya. 1997. Infections in solid-organ recipients. *Clin. Microbiol. Rev.*, 10:86-124.

122. Patterson T.F., P. Minitier, Patterson J.E., J.M. Rapoport and V. T. Andriole. Aspergillosis antigen detection in the diagnosis of invasive aspergillosis. 1995. *J. Infect. Dis.*, 171:1553-1558.

123. Persing D.H., T.F. Smith, F.C. Tenover and T.J. White. 1993. Diagnostic molecular microbiology. Principles and applications. American society for microbiology, Washington.

124. Peterson D.E. and S.C. Schimpf. 1989. *Aspergillus* sinusitis in neutropenic patients with cancer: a review. *Biomed. Pharmacother.*, 43:307-312.

125. Petheram E.S., R.M.E. Seal. 1976. *Aspergillus* prosthetic valve endocarditis. *Thorax*, 31:380-390.

126. Piens M.A., J. Troncy, M.C. Nicolle, A. Mercatello, D. Fiere, M. Mojon. Aspergilloses invasives chez des patients atteints d'hémopathies malignes. 1993. A propos de 29 observations. *J. Mycol. Medic.*, 3:79-83.

127. Potter M. 2001. European experience with oral solution and intravenous itraconazole. *Oncology (Huntingt)*, 15 (11 suppl 9):27-32.

128. Raper K.B. and D.I. Thom. 1965. The genus *Aspergillus*, William and Wilkins Co, Baltimore M.A., 686.

129. Reddy, L.V., A. Kumar, and V.P. Kurup. 1993. Specific amplification of *Aspergillus fumigatus* DNA by polymerase chain reaction. *Mol. Cell. Probes* 7:121-126.

130. Reichard U., S. Büttner, H. Eiffert, F. Staib and R. Röchel. 1990. Purification and characterisation of an extracellular serine protease from *Aspergillus fumigatus* and its detection in tissue. *J. Med. Microbiol.*, 33:243-251.
131. Richardson M.D. *Aspergillus* and *Penicillium* species. Chap 16, 281-312. *In* Microbiology and microbial infections. Topley and Wilson's. Volume 4. Medical mycology. L. Ajello & R.J. Hay (eds), 9th ed., London, 1998.
132. Rohrlich P., J. Sarfati, P. Mariani, M. Duval, A. Carol, C. saint-Martin, E. bingen , J.P. Latgé and E. Vilmer. 1996. Prospective sandwich-linked immunosorbent assay for serum galactomannan: early predictive value and clinical use in invasive aspergillosis. *Pediatr. Infect. Dis.*, 15:232-237.
133. Roilides E., K. Uhlig, D. Venzon, P.A. Pizzo, and T.J. Walsh. 1993. Enhancement of oxidative response and damage caused by human neutrophils to *Aspergillus fumigatus* hyphae by granulocyte-stimulating factor and γ interferon. *Infect. Immun.*, 61:1185-1193.
134. Roilides E., T. Robinson, T. Sein, P. Pizzo, T.J. Walsh. 1994. *In vitro* et *ex vivo* effects of cyclosporin A on phagocytic host defences against *Aspergillus fumigatus*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 38:2883-2888.
135. Saiki, R.K., S.J. Scharf , F. Faloona, K.B. Mullis, G.T. Horn, and H.A. Erlich. 1985. Enzymatic amplification of β -globin sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* 230: 1350-1354.
136. Saiki, R.K., D.H. Gelfand, S. Stoffel, S.J. Scharf, R. Higuchi, G.T. Horn, K.B. Mullis and H.A. Erlich. 1988. primer-directed amplification of DNA with a thermostable DNA probes. *Science*, 239:487-491.
137. Schaechter M. Biology of infectious agents. p.19-61. *Dans* Mechanisms of microbial disease, third edition. M. Schaechter, N. Cary Engelberg, B. I. Eisenstein, G. Medoff (eds), Lippincott Williams & Wilkins, 1999, Baltimore, USA.
138. Schaffner A. 1984. Acquired immune deficiency syndrome: is disseminated aspergillosis predictive of underlying cellular immune deficiency? *J. Infect. Dis.*, 149 :822-829.
139. Schaffner A. 1985. Therapeutic concentrations of of glucocorticoids suppress the antimicrobial activity of human macrophages without impairing their responsiveness to γ -interferon. *J. Clin. Microbiol.*, 76:1755-1764.

140. Schaffner A. 1989. Experimental basis for the clinical epidemiology of fungal infections. A review. *Mycoses*. 32:499-515.
141. Scharf S.J., G.T. Horn, H.A. Erlich. 1986. Direct cloning and sequence analysis of enzymatically amplified genomic sequences. *Science*, 233:1076-1078.
142. Segretain J. 1970. Les moisissures de l'air de Paris. *Bull. Soc. Fr. Myc. Med.*. 18:7.
143. Serody J.S. and T.C. Shea. 1997. Prevention of infections in bone marrow transplant recipients. *Inf. Dis. Clin. North America*, 11:459-477.
144. Skladny, H., D. Buchheidt, C. Baust, F. Krieg-Schneider, W. Seifarth, C. Leib-Mosch, and R. Hehlmann. 1999. Specific detection of *Aspergillus* species in blood and bronchoalveolar lavage samples of immunocompromised patients by two-step PCR. *J. Clin. Microbiol.* 37:3865-3871.
145. Simmonds E.J., Littlehood J.M., V. Hopwood, E.G.V. Evans. 1994. *Aspergillus fumigatus* colonisation and population density of place of residence in cystic fibrosis. *Arch, Dis. Child*, 70, 139-140.
146. Spreadbury, C., D. Holden, A. Aufauvre-Brown, B. Brainbridge, and J. Cohen. 1993. Detection of *Aspergillus fumigatus* by polymerase chain reaction. *J. Clin. Microbiol.* 31: 615-621.
147. Staib F., M. Seibold, M. Grosse. 1989. *Aspergillus* findings in AIDS patients suffering from cryptococcosis. *Mycosis*, 32:516-523.
148. Storm G and E. Van Eltern. Biopharmaceutical aspects of lipids formulations of Amphotericin B. 1997. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.*, 16:64-73.
149. Staples C.A., E.Y. Kang, J.L. Wright, P. Philips, N.L. Muller. 1995. Invasive pulmonary aspergillosis in AIDS: radiographic, CT, and pathologic findings. *Radiology*, 196:409-414.
150. Sturtevant J. and J.P. Latgé. 1992. Participation of complement in the phagocytosis of the conidia of *A. fumigatus* by human polymorphonuclear cells. *J. Infect. Dis.*, 166:580-586.
151. Stynen D., A. Goris, J. Sarfati, and J.P. Latgé. 1995. A new sensitive sandwich enzyme-linked immunosorbent assay to detect galactofuran in patients with invasive aspergillosis. *J. Clin. Microbiol.*, 33:497-500.
152. Sulahian A., M. Tabouret, P. ribaud, J. Sarfati, E. Gluckman, J.P. Latgé and F. Derouin. 1996. Comparison of an enzyme immunoassay and latex agglutination test for the detection of galactomannan in the diagnosis of invasive aspergillosis. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.*, 15:139-145.

153. Sullivan K.M. 1987. Immunoglobulin therapy in bone marrow transplantation. *Am.L J. Med.*, 83:34-45.
154. Symoens F., S. Bertout, M.A. Piens, J. Burnod, F. Renaud, N. Nolard, F. Chapuis, R. Grillot, EBGA Network. 2001. A longitudinal study of lung transplant recipients infected with *Aspergillus*: genetic polymorphism of *A. fumigatus*. *Transpl. infect.*, 20:970-978.
155. Tabone M. D., H. Vu-Thien, J.P. Latgé., J. Landman-Parker, P. Perez-Castignoli, D. Moissenet and G. Leverger. 1997. Value of galactomannan detection by sandwich enzyme linked immnosorbent assay in the diagnosis and follow-up of invasive aspergillosis. *Opport. Pathog.*, 9:7-13.
156. Talbot G.H., A. Huang and M. Provencher. 1991. Invasive *Aspergillus* rhinosinusitis in patients with acute leukaemia. *Rev. Infect. Dis.*, 13:219-232.
157. Tang C.M., J. Cohen and D.W. Holden. 1992. An *Aspergillus fumigatus* alkaline protease mutant constructed by gene disruption is deficient in extracellular elastase activity. *Mol. Microbiol.*, 6:1663-1671.
158. Tang C.M., D.W. Holden, A. Aufauvre Brown, J. Cohen. 1993. The detection of *Aspergillus spp.* by the polymerase chain reaction and its evaluation in bronchoalveolar lavage fluid. *Am. Rev. Respir. Dis.*, 148:1313-1317.
159. Tang C.M., J. Cohen, T. Krausz, S. Van Noorden and D.W. Holden. 1993. the alkaline protease of *Aspergillus fumigatus* is not a virulence determinant in two murine models of the invasive pulmonary aspergillosis. *Infect. Immun.*, 61:1650-1656.
160. Thau N., N. Monod, B. Crestani, C. Rolland, G. Tronchin, J.P. Latgé and S. Paris. 1994. Rodletness mutants of *Aspergillus fumigatus*. *Infect. Immun.*, 62:4380-4388.
161. Tomee J.F.C., G.P.M. Mannes, W. Van der Bij, T.S. Van der werf, W.J. De Boer, G.H. Koëter, H.F. Kauffman. 1996. Serodiagnosis and monitoring of *Aspergillus* infection after lung transplantation. *Ann. Intern. Med.*, 125:197-201.
162. Trull A.K., J. Parker, R.E. Warren. 1985. IgG enzyme linked immunosorbent assay for diagnosis of invasive aspergillosis: retrospectice study over 15 years of transplant patients. *J. Clin. Pathol.*, 38:1045-1051.

163. Van Zutphen L.F.M., V. Baumans, A.C. Beynen. 1993. Principles of laboratory animal science. A contribution to the humane use and care of animals and to the quality of experimental results. Elsevier (Ed), Amsterdam, the Netherlands.
164. Verweij, P.E., J.F. Meis, P. Van den Hurk, B. De Pauw, J.A.A. Hoogkamp-Korstanje, and W.J. Melchers. 1994. Polymerase chain reaction as a diagnostic tool for invasive aspergillosis: evaluation in bronchoalveolar lavage fluid from low risk patients. *Serodiagn. Immunother. Infect. Dis.*, 6:203-208.
165. Verweij, P.E., D. Stynen, A.J.M. M. Rijs, B.E. De Pauw, J.A.A. Hoogkamp-Korstanje, and J.F.G.M. Meis. 1995. Sandwich enzyme linked immunosorbent assay compared with Pastorex latex agglutination test for diagnosing invasive aspergillosis in immunocompromised patients. *J. Clin. Microbiol.* 33:1912-1914.
166. Verweij, P.E., J.P. Latgé, A.J.M. M. Rijs, W.J. Melchers, B.E. De Pauw, J.A.A. Hoogkamp-Korstanje, and J.F.G.M. Meis. 1995. Comparison of antigen detection and PCR assay using bronchoalveolar lavage fluid for diagnosing invasive pulmonary aspergillosis in patients receiving treatment for haematological malignancies. *J. Clin. Microbiol.*, 33, 3150-3153.
167. Verweij P.E., E.C. Dompeling, J.P. Donnelly, A.V. Schattenberg, and J.F. Meis. 1997. Serial monitoring of *Aspergillus* antigen in the early diagnosis of invasive aspergillosis with two examples. *Infection*, 25:86-89.
168. Verweij P.E., Z. Erjavec, W. Sluiters, W. Goessens, M. Rozenberg-Arska, Y.J. Debets-Ossenkopp, H.F. Guiot and J.F. Meis. 1998. Detection of antigen in sera of patients with invasive aspergillosis: intra- and inter-laboratory reproducibility. *J. Clin. Microbiol.*, 36:1612-1616.
169. Vogeser M., A. Haas, D. Aust and G. Ruckdeshel. 1997. Postmortem analysis of invasive aspergillosis in a tertiary care hospital. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.*, 16:1-6.
170. Wallace J.M., R. Lim, B.L. Browdy, P. Hopewell, J. Glassroth, M; Rosen, L. Reichman, P. Kvale and Pulmonary complication of HIV group. 1998. Risk factors and outcomes associated with identification of *Aspergillus* on respiratory specimens from persons with HIV diseases. *Chest*, 114:131-137.
171. Walsh T.J. 1990. Invasive pulmonary aspergillosis in patients with neoplastic diseases. *Sem. in Resp. Inf.* 5:111-122.

172. Walsh T.J. and B.H. Bulkey. 1982. *Aspergillus* pericarditis in the immunocompromised patient: a clinico-pathologic study. *Cancer*, 5:111-122.
173. Walsh T.J., J. Karp and P.A. Pizzo. 1996. Fungal infections of the respiratory tract. p. 235-268. *In* Kibbler C.C., D.W.R. Mackenzie and F.C. Odds (ed.), *Principles and practice of clinical mycology*, John Wiley & Sons Ltd.
174. Williamson E., J. Leeming, H. Palmer, C. Steward and D. Warnock. 2000. Diagnosis of invasive aspergillosis in bone marrow transplant recipients by polymerase chain reaction. *Br. J. Haematol.*, 108:132-139.
175. Whittaker R.H. 1969. New concepts of kingdoms of organisms. *Science*, 163: 150-163.
176. Witteveen C.F., M. Venhuis and J. Visser. 1992. Localization of glucose and catalase activities in *Aspergillus niger*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 58:1190-1194.
177. Yamakami, Y., A. Hashimoto, I. Tokymatsu, and M. Nasu. 1996. PCR detection of DNA specific for *Aspergillus* species in serum of patients with invasive aspergillosis. *J. Clin. Microbiol.* 34: 2464-2468.
178. Yamakami, Y., A. Hashimoto, E. Yamagata, Kamberi P., Karashima R., Nagai H., and M. Nasu. 1998. Evaluation of PCR for detection DNA specific for *Aspergillus* species in sera of patients with various forms of pulmonary aspergillosis. *J. Clin. Microbiol.* 36:3619-3623.
179. Young R.C., J.E. Bennet. Invasive aspergillosis: absence of antibody response. 1971. *Am. Rev. Resp. Dis.*, 104:710-716.

ANNEXES

**ANNEXE 1 : Valeurs des CMI des 4 antifongiques vis à vis des 106
souches d'*Aspergillus fumigatus* .**

Tableau A. Valeurs des CMI des 106 souches d'*A. fumigatus* vis à vis des 4 antifongiques testés.

N° souche	Amphotéricine B		Itraconazole		Voriconazole		Posaconazole	
	0,03125 à 16 µg/ml		0,03125 à 16 µg/ml		0,03125 à 16 µg/ml		0,004 à 16 µg/ml	
	Lecture visuelle	630 nm	Lecture visuelle	630 nm	Lecture visuelle	630 nm	Lecture visuelle	630 nm
	48 H	48 H	48 H	48 H	48 H	48 H	48 H	48 H
	CMI (µg/ml)	CMI (µg/ml)	CMI (µg/ml)	CMI (µg/ml)	CMI (µg/ml)	CMI (µg/ml)	CMI (µg/ml)	CMI (µg/ml)
1	1	0,5	0,5	0,5	0,25	0,25	0,01563	0,01563
2	1	1	0,25	0,5	0,25	0,25	0,01563	0,01563
3	0,25	0,5	0,25	0,5	0,25	0,25	0,03125	0,03125
4	0,5	0,5	0,25	0,25	0,25	0,25	0,01563	0,01563
5	1	1	0,25	0,25	0,25	0,25	0,01563	0,01563
6	1	0,5	0,25	0,5	0,25	0,5	0,03125	0,03125
7	1	1	0,25	0,25	0,25	0,25	0,01563	0,01563
8	1	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,01563	0,01563
9	1	1	0,5	0,5	0,25	0,25	0,03125	0,03125
10	0,5	0,5	0,25	0,25	0,25	0,25	0,03125	0,03125
11	0,25	0,25	0,25	0,25	0,0625	0,0625	0,01563	0,01563
12	0,5	0,5	0,25	0,25	0,25	0,5	0,01563	0,01563
13	1	1	0,25	0,25	0,25	0,25	0,01563	0,03125
14	1	1	0,25	0,25	0,25	0,25	0,03125	0,0625
15	1	1	0,5	0,5	0,25	0,25	0,03125	0,01325
16	2	2	0,5	0,5	0,25	0,25	0,01563	0,01563
17	1	1	0,5	0,5	0,25	0,25	0,03125	0,03125
18	1	1	0,25	0,25	0,25	0,25	0,01563	0,01563
19	1	1	0,5	0,5	0,25	0,25	0,01563	0,01563
20	1	1	0,5	0,5	0,25	0,25	0,01563	0,03125
21	1	1	0,5	0,5	0,125	0,25	0,03125	0,0625
22	1	1	1	1	0,125	0,125	0,03125	0,03125
23	2	2	0,25	0,25	0,25	0,25	0,03125	0,03125
24	1	1	0,5	0,5	0,5	0,25	0,01563	0,01563
25	1	1	0,25	0,25	0,25	0,25	0,03125	0,03125
26	0,5	0,5	0,25	0,25	1	1	0,03125	0,0625
27	1	1	0,25	0,25	0,25	0,25	0,03125	0,03125
28	0,5	0,5	0,5	0,25	0,25	0,25	0,01563	0,01563
29	0,5	0,5	0,5	0,5	0,25	0,25	0,01563	0,03125
30	0,5	0,5	0,5	0,5	0,25	0,25	0,03125	0,03125
31	1	1	0,5	0,5	0,25	0,25	0,01563	0,01563
32	0,5	0,5	0,5	0,5	0,25	0,5	0,01563	0,01563
33	1	1	0,5	0,5	0,25	0,25	0,03125	0,03125
34	0,5	0,5	0,5	0,5	0,25	0,5	0,03125	0,03125

N° de souche en vert: environnement; N° en rouge: invasion; N° en noir: colonisation.

Tableau A. Valeurs des CMI des 106 souches d'*A. fumigatus* vis à vis des 4 antifongiques testés.

	Amphotéricine B		Itraconazole		Voriconazole		Posaconazole	
	0,03125 à 16 µg/ml		0,03125 à 16 µg/ml		0,03125 à 16 µg/ml		0,004 à 16 µg/ml	
	Lecture visuelle	630 nm	Lecture visuelle	630 nm	Lecture visuelle	630 nm	Lecture visuelle	630 nm
N° souche	48 H	48 H	48 H	48 H	48 H	48 H	48 H	48 H
	CMI (µg/ml)	CMI (µg/ml)	CMI (µg/ml)	CMI (µg/ml)	CMI (µg/ml)	CMI (µg/ml)	CMI (µg/ml)	CMI (µg/ml)
35	2	2	0,5	0,5	0,25	0,25	0,01563	0,01563
36	0,5	0,5	0,5	0,5	0,25	0,25	0,03125	0,03125
37	0,5	0,5	0,5	0,5	0,25	0,25	0,01563	0,01563
38	1	2	0,5	0,5	0,5	0,5	0,01563	0,01563
39	0,5	0,5	0,5	0,25	0,5	0,5	0,03125	0,03125
40	1	1	0,5	0,5	1	1	0,03125	0,03125
41	0,25	0,25	0,5	0,25	0,25	0,25	0,01563	0,01563
42	1	1	1	1	0,25	0,25	0,03125	0,03125
43	1	1	0,125	0,25	0,5	1	0,03125	0,03125
44	0,25	0,5	0,25	0,25	0,25	0,25	0,01563	0,01563
45	0,5	0,5	0,25	0,125	0,25	0,25	0,01563	0,01563
46	0,5	0,5	0,25	0,25	0,5	0,5	0,01563	0,01563
47	0,25	0,25	0,25	0,25	0,5	0,5	0,03125	0,03125
48	0,5	0,5	0,25	0,25	0,25	0,25	0,01563	0,01563
49	0,5	0,5	0,5	0,5	0,25	0,25	0,03125	0,03125
50	0,5		0,25	0,125	0,25	0,125	0,0625	0,0625
51	0,5	0,5	0,25	0,25	0,25	0,25	0,01563	0,01563
52	0,5	0,5	0,5	0,5	0,25	0,25	0,03125	0,03125
53	1	1	1	1	0,25	0,25	0,01563	0,03125
54	0,5	0,5	0,0625	0,0625	0,25	0,25	0,01563	0,01563
55	0,25	0,25	0,25	0,25	0,125	0,0625	0,03125	0,03125
56	1	1	0,25	0,25	0,25	0,25	0,125	0,125
57	0,5	0,5	0,25	0,25	0,5	0,5	0,03125	0,03125
58	1	1	0,5	1	0,25	0,25	0,01563	0,01563
59	0,5	0,5	0,5	0,25	0,25	0,25	0,01563	0,01563
60	1	0,5	1	1	0,5	0,5	0,03125	0,0625
61	0,5	0,5	0,25	0,5	0,25	0,25	0,03125	0,03125
62	1	0,5	0,25	0,25	0,5	0,5	0,03125	0,03125
63	1	1	0,5	0,5	0,125	0,125	0,01563	0,01563
64	1	0,5	0,5	0,5	0,25	0,25	0,0312	0,0312
65	1	0,5	0,25	0,25	0,125	0,125	0,0156	0,0156
66	1	1	0,5	0,5	0,5	0,5	0,0156	0,0156
67	1	1	0,5	1	0,5	0,5	0,01563	0,01563

N° de souche en vert: environnement; N° en rouge: invasion; N° en noir: colonisation.

Tableau A. Valeurs des CMI des 106 souches d'*A. fumigatus* vis à vis des 4 antifongiques testés.

N° souche	Amphotéricine B		Itraconazole		Voriconazole		Posaconazole	
	0,03125 à 16 µg/ml		0,03125 à 16 µg/ml		0,03125 à 16 µg/ml		0,004 à 16 µg/ml	
	Lecture visuelle	630 nm	Lecture visuelle	630 nm	Lecture visuelle	630 nm	Lecture visuelle	630 nm
	48 H	48 H	48 H	48 H	48 H	48 H	48 H	48 H
	CMI (µg/ml)	CMI (µg/ml)	CMI (µg/ml)	CMI (µg/ml)	CMI (µg/ml)	CMI (µg/ml)	CMI (µg/ml)	CMI (µg/ml)
68	1	1	1	1	0,25	0,25	0,0078	0,0078
69	0,5	0,5	0,25	0,25	0,25	0,25	0,01563	0,01563
70	1	1	1	1	0,25	0,25	0,01563	0,01563
71	0,25	0,25	0,25	0,25	0,125	0,125	0,0078	0,0078
72	0,5	0,5	0,25	0,25	0,25	0,25	0,0078	0,01563
73	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,01563	0,0156
74	1	2	0,25	0,5	0,25	0,25	0,01563	0,01563
75	1	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,03125	0,03125
76	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,01563	0,03125
77	1	1	0,5	0,5	0,25	0,5	0,03125	0,03125
78	1	1	0,5	0,5	0,25	0,25	0,01563	0,01563
79	1	1	1	0,5	0,125	0,125	0,01563	0,01563
80	1	1	0,125	0,125	0,25	0,25	0,01563	0,01563
81	1	1	0,5	0,5	0,5	0,5	0,01563	0,01563
82	1	1	0,125	0,25	0,25	0,25	0,03125	0,01563
83	0,5	0,5	1	1	0,5	0,5	0,03125	0,03125
84	1	1	1	1	0,5	0,5	0,03125	0,03125
85	0,5	0,5	0,25	0,25	0,125	0,25	0,03125	0,01563
86	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,03125	0,03125
87	0,5	0,5	0,125	0,125	0,125	0,125	0,0078	0,0078
88	0,5	0,5	0,25	0,5	0,25	0,25	0,0078	0,0078
89	1	1	0,25	0,5	0,125	0,25	0,0078	0,0078
90	0,5	0,5	0,5	0,5	0,25	0,25	0,0078	0,0078
91	0,5	0,5	0,25	0,25	0,25	0,25	0,0078	0,0078
92	1	0,5	0,25	0,5	0,25	0,25	0,0078	0,0078
93	0,25	0,25	1	1	0,5	0,5	0,01563	0,01563
94	0,5	0,5	0,5	0,5	0,25	0,25	0,01563	0,01563
95	0,5	0,5	0,5	0,5	0,25	0,25	0,01563	0,01563
96	0,25	0,125	0,5	0,5	0,5	0,5	0,125	0,125
97	0,5	0,5	0,5	0,5	0,25	0,25	0,03125	0,03125
98	0,5	0,5	0,5	0,5	0,125	0,25	0,0078	0,0078
99	0,5	0,5	0,5	0,5	0,25	0,25	0,01563	0,01563
100	0,25	0,25	0,25	0,25	0,125	0,25	0,03125	0,03125
101	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,01563	0,01563

N° de souche en vert: environnement; N° en rouge: invasion; N° en noir: colonisation.

Tableau A. Valeurs des CMI des 106 souches d'*A. fumigatus* vis à vis des 4 antifongiques testés.

N° souche	Amphotéricine B		Itraconazole		Voriconazole		Posaconazole	
	0,03125 à 16 µg/ml		0,03125 à 16 µg/ml		0,03125 à 16 µg/ml		0,004 à 16 µg/ml	
	Lecture visuelle	630 nm	Lecture visuelle	630 nm	Lecture visuelle	630 nm	Lecture visuelle	630 nm
	48 H	48 H	48 H	48 H	48 H	48 H	48 H	48 H
	CMI (µg/ml)	CMI (µg/ml)	CMI (µg/ml)	CMI (µg/ml)	CMI (µg/ml)	CMI (µg/ml)	CMI (µg/ml)	CMI (µg/ml)
102	0,5	0,5	0,5	0,5	0,25	0,25	0,03125	0,01563
103	0,5	0,5	0,125	0,125	0,125	0,125	0,01563	0,01563
104	0,5	0,5	0,25	0,25	0,25	0,125	0,01563	0,01563
105	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,03125	0,03125
106	0,5	0,5	0,25	0,25	0,25	0,25	0,0078	0,0078
moyenne des 106 souches	0,666693	0,642561	0,374985	0,387448	0,270408	0,283073	0,020028	0,020797

N° de souche en vert: environnement; N° en rouge: invasion; N° en noir: colonisation.

ANNEXE 2 :Lettre d'approbation du COMITE D'ETHIQUE.



Université de Liège
Centre Animalier Universitaire
Commission d'éthique

Liège, le 21 juin 2001

Dr. HAYETTE
Microbiologie Médicale
Tour de Pathologie - B23

Cher (ère) Collègue,

Votre dossier intitulé " Diagnostic d'aspergillose pulmonaire invasive chez le lapin: antigénémie versus Polymerase chain reaction (PCR)" a été examiné par la Commission d'Ethique en date du 6 avril 2001 et a reçu le numéro 51.

La Commission a émis un avis favorable .

Nous vous prions de croire, Cher (ère) Collègue, en l'expression de nos sentiments les meilleurs.

Professeur B. NICKS.
Président de la Commission d'Ethique.

ANNEXE 3 : Article publié dans une revue internationale

(Journal of Clinical Microbiology)

Detection of *Aspergillus* Species DNA by PCR in Bronchoalveolar Lavage Fluid

MARIE-PIERRE HAYETTE,^{1*} DOLORES VAIRA,² FABRICE SUSIN,¹ PASCAL BOLAND,¹
GENEVIÈVE CHRISTIAENS,¹ PIERRETTE MELIN,¹ AND PATRICK DE MOL¹

Service de Microbiologie Médicale¹ and Service de Transfusion,² Tour de Pathologie B23, Université de Liège,
B-4000 Liège, Belgium

Received 20 November 2000/Returned for modification 7 February 2001/Accepted 22 March 2001

The usefulness of a nested PCR assay for detection of *Aspergillus* sp. DNA was evaluated in 177 bronchoalveolar lavage (BAL) fluid specimens. This test was accurate both to diagnose culture-negative BAL fluid specimens from patients with invasive pulmonary aspergillosis and to confirm culture-positive samples. However, it did not differentiate between infection and colonization.

Diagnosis in the early stages of invasive pulmonary aspergillosis (IPA) is very difficult, as clinical and radiological signs are nonspecific and the sensitivity of fungal cultures is low (40 to 60%), even when combined with direct microscopic examination (2, 5). Circulating-antigen detection may contribute to the diagnosis. However, up to 8% false positives are reported (11). Other antigens are under investigation as diagnostic tools (6), but attention has now turned to molecular methods. The role of PCR assay of bronchoalveolar lavage (BAL) fluid for diagnosing IPA does not clearly emerge in the literature (1, 3, 7, 9, 10, 14). Therefore, we have evaluated a nested-PCR-based amplification of *Aspergillus fumigatus* DNA that targets the genes encoding alkaline proteases of the fungus to determine the role of PCR in diagnosing IPA from BAL fluid under routine conditions.

Clinical and reference strains were tested to assess the specificity of the method: *A. fumigatus* (three strains), *Aspergillus clavus* (three strains), *Aspergillus niger* (two strains), *Aspergillus nidulans* (two strains), *Aspergillus terreus*, *Aspergillus glaucus*, *Fusarium oxysporum*, *Fusarium solani* (ATCC 10154), *Paecilomyces* spp., *Penicillium* spp., *Pseudallescheria boydii* (two strains), *Trichoderma harzianum* (two strains), *Rhizopus rhizodiformis*, *Mucor* spp., *Candida albicans* (ATCC 10231), and *Candida glabrata* (ATCC 90030). The fungal strains were cultivated on Sabouraud dextrose agar and incubated at 37 or 38°C for up to 5 days, depending on the species. The clinical isolates were identified by macroscopic, microscopic, and culture characteristics (12).

All patients undergoing bronchoscopy at the University Hospital of Liège (Liège, Belgium) during a 12-month period (1997 to 1998) were included in the study. There were 74 immunosuppressed and 103 nonimmunosuppressed patients. Patients were referred to as immunosuppressed if they were under long-term corticotherapy for chronic obstructive pulmonary disease (COPD) ($n = 18$) or other diseases ($n = 13$) or if they had hematological malignancy ($n = 16$), organ transplantation ($n = 5$), AIDS ($n = 3$), or cancer ($n = 19$). Nonimmu-

nosuppressed patients had bronchoscopy for investigation of severe pneumonia. Medical, radiological, histopathological, and microbiological records and autopsy findings were reviewed to assess IPA. Three groups were defined (A, proven or probable aspergillosis [$n = 10$]; B, colonization [$n = 5$]; and C, no evidence of aspergillosis [$n = 162$]) according to the following criteria: proven, histology with hyphal tissue invasion and *Aspergillus*-positive culture of one or more respiratory specimens or of a lung biopsy; probable, *Aspergillus*-positive culture from two or more respiratory samples and positive clinical or radiological findings (pulmonary infiltrates, nodular opacity, cavitation, or persistent fever under broad-spectrum antimicrobial chemotherapy) or positive histology without *Aspergillus*-positive culture; colonization, *Aspergillus*-positive cultures from one or more respiratory samples without clinical or radiological evidence (see above) of respiratory tract infection due to this pathogen; and no evidence of aspergillosis, *Aspergillus*-negative cultures and no clinical or radiological findings (see above) of aspergillosis.

After reception in the laboratory, each BAL fluid specimen was homogenized and separated into two parts: one part (1 to 5 ml) was stored at -20°C until it was analyzed by PCR, and the second part was included in the routine procedure and tested for the presence of bacteria, yeasts, fungi, parasites, and viruses. A PCR assay was performed a minimum of 1 week after sampling, and the clinicians were unaware of the results. The technique used for DNA extraction from fungal culture was adapted from that of Tang et al. (13), except that DNA was resuspended in 30 μl of water containing RNase A at a concentration of 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$. The same technique was used for DNA extraction from yeasts except for the culture, which was made on Sabouraud dextrose agar and incubated for 48 h at 37°C. DNA extraction from BAL fluid was adapted from techniques already published by Tang and colleagues (14) except for two details: (i) 200 μg of proteinase K (Sigma, St. Louis, Mo.) was added to the 500 μl of BAL fluid and buffer and (ii) DNA was dried in a dry-heating block and resuspended in 30 μl of distilled H_2O containing RNase A (50 $\mu\text{g}/\text{ml}$). Positive-displacement pipettes were used throughout, and DNA extraction buffer was extracted in parallel in order to preclude contamination.

We developed a nested PCR using as external primers alp 11

* Corresponding author. Mailing address: Service de Microbiologie Médicale, Tour de Pathologie B23, Université de Liège, B-4000 Liège, Belgium. Phone: 32/43.66.24.36. Fax: 32/43.66.24.40. E-mail: mphayette@ulg.ac.be.

TABLE 1. Clinical data and aspergillosis detection for group A (proven or probable aspergillosis) and group B (colonization) patients

Case no.	Underlying disease ^a	IPA group (disease ^b)	BAL fungal culture	Autopsy performed	BAL PCR results ^c	Outcome ^d
Group A (n = 10)						
1	Hepatic transplantation	Proven (DIS)	<i>A. fumigatus</i>	Yes	+	Died
2	COPD (corticosteroid dependent)	Proven (CNA)	<i>A. fumigatus</i>	Yes	+	Died (AmB)
3	Chronic lymphoid leukemia + COPD	Probable	<i>A. fumigatus</i>	No	+	Died
4	RA (corticosteroid dependent)	Proven	Negative	Yes	+	Died
5	COPD (corticosteroid dependent)	Proven (DIS)	<i>A. fumigatus</i>	Yes	+	Died
6	Gastric carcinoma	Proven	<i>A. fumigatus</i>	Yes	+	Died
7	COPD (corticosteroid dependent)	Proven (CNA)	<i>A. fumigatus</i>	Yes	+	Died
8	Chronic myeloid leukemia blast-crisis	Probable	<i>A. fumigatus</i>	No	+	Alive (Vor)
9	Chronic lymphoid leukemia blast-crisis	Proven	Negative	Yes	+	Died
10	COPD (corticosteroid dependent)	Probable	<i>A. fumigatus</i>	No	+	Died
Group B (n = 5)						
1	Mitral valvulopathy	None	<i>A. fumigatus</i>	No	+	Alive (AmB/It)
2	COPD (corticosteroid dependent)	None	<i>A. fumigatus</i>	No	+	Died
3	COPD (corticosteroid dependent)	None	<i>A. fumigatus</i>	Yes	+	Died
4	COPD (no corticoid)	None	<i>A. fumigatus</i>	No	+	Alive
5	Myelodysplasia blast-crisis	None	<i>A. flavus</i>	Yes	+	Died

^a RA, rheumatoid arthritis.

^b DIS, disseminated aspergillosis; CNA, chronic necrotizing aspergillosis.

^c +, positive.

^d Vor, treatment with voriconazole; AmB/It, treatment with amphotericin B and itraconazole; AmB, treatment with amphotericin B.

5'-AGCACCGACTACATCTAC-3') and alp 12 (5'-GAGATGGTGTGGTGGC-3'). These primers were derived from the sequence of cloned fragments of genes encoding the alkaline proteases (Alp) of *A. fumigatus* and *A. flavus* (14). As internal primers, we chose Alp13 (5'-CTGGCATAACAACGCCGCTG-3') and Alp14 (5'-TTGTTGATCGCAACC-3'), expected to amplify a fragment of 527 bp. The primers were synthesized by Eurogentec, Liège, Belgium. The PCR mixtures were identical for both steps except for MgCl₂. They were carried out in a 50-μl volume containing 10 mM Tris-Cl at pH 8.3, 50 mM KCl, and 1.5 mM MgCl₂ (2.25 mM for the second step), with 20 pmol of both primers, 2.5 mM deoxynucleoside triphosphate (buffer and deoxynucleoside triphosphate were provided by Takara, Otsu, Japan), and 1.25 U of *Taq* polymerase (Takara). A 5-μl volume of DNA was added to the mixture. Positive and negative controls were amplified in parallel to assess the validity of the procedure. Thermal cycling conditions (GeneAmp PCR system 2400; Perkin-Elmer Cetus, Norwalk, Conn.) were identical for both PCRs: 5 min at 94°C; 30 cycles of 30 s at 94°C, 45 s at 63°C, and 2 min at 72°C; and a final extension step of 10 min at 72°C. For the nested PCR, 5 μl of the first amplified product was added to a new reaction mixture and amplified under the same conditions. The final amplified products were analyzed on 1.5% agarose gels stained with ethidium bromide and visualized by UV transillumination. Each sample was investigated for the presence of inhibitors by amplification of the β-globin gene (8).

No band of the expected size (527 bp) was detected with *A. niger*, *A. nidulans*, *A. glaucus*, *A. terreus*, or *A. flavus* or with the other fungal species. However, a band of 690 nm, corresponding to the sequence amplified by the first PCR, was observed for *A. flavus*. The sensitivity of the nested PCR was 25 fg of genomic DNA for *A. fumigatus* by ethidium bromide staining and 10 pg for *A. flavus*. Some BAL fluids (n = 5) were excluded because of lack of amplification of the β-globin gene. The PCR results are reported in Table 1. The sensitivity, specificity, and

positive and negative predictive values of this PCR test for diagnosing IPA were 100, 96, 62, and 100%, respectively. All BAL fluids from patients with IPA were PCR positive. Those from the five cases of *Aspergillus* colonization were PCR and culture positive. In all, six PCR-positive cases were not associated with IPA among the 177 BAL fluid specimens, representing 3.4% false-positive results. Only one false-positive PCR result was induced in group C. Among the three patients with COPD and proven IPA (group A), two patients (cases 2 and 7) presented with chronic necrotizing aspergillosis and one (case 5) presented with disseminated aspergillosis. In two cases (4 and 9), the diagnosis of proven IPA was made at autopsy by histology and *A. fumigatus*-positive culture of a lung biopsy specimen.

In the present study, the PCR always confirmed the culture results, except for two culture-negative BAL fluid specimens, for which diagnosis of aspergillosis was missed and made at autopsy. In both cases, the PCR could have contributed to diagnosing IPA before death. Only one PCR-positive BAL result was observed for a patient with no evidence of aspergillosis: a burn patient who was intubated for 1 month. This false-positive result could be explained by contamination of the BAL fluid during sampling or the PCR process, or it could have been due to the colonization of the respiratory tract by *Aspergillus* spores during intubation. Some authors have reported up to 35% PCR-positive results for patients with no risk or low risk for aspergillosis and who did not develop IPA (1, 3, 9, 10, 14, 15). However, other studies performed in neutropenic patients (4) or in nonimmunosuppressed patients (7) reported no false-positive PCR results for BAL fluids. Among our population, only 3.4% positive PCR results not associated with IPA were observed. Half of the patients (3 out of 6) had COPD. These patients may have had a relatively high level of tracheobronchial colonization, which differs from patients with hematological malignancies, who may have had minimum involvement before developing severe invasive fungal infection.

our study, the major risk factor associated with IPA was corticotherapy associated with COPD. However, the major risk factor for aspergillosis is known to be a prolonged neutropenia, accounting for its high frequency in patients with acute leukemia (2). In fact, in our institution, patients with hematological malignancies benefit from a good follow-up and are often treated early in cases where there is a suspicion of infectious disease.

In conclusion, nested PCR of BAL fluid is an accurate test to diagnose culture-negative patients with IPA, but it does not differentiate between infection and colonization. It is an appropriate method to exclude *Aspergillus* sp. infection in patients at risk of IPA and should be included in routine laboratory practice for this immunocompromised population.

REFERENCES

- Bart-Delabesse, E., A. Marmorat Khuong, J. M. Costa, M. L. Dubreuil-Lemaire, and S. Bretagne. 1996. Detection of *Aspergillus* DNA in bronchoalveolar lavage fluid of AIDS patients by the polymerase chain reaction. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 15:24-25.
- Bodey, G. P., and S. Vartarian. 1989. Aspergillosis. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 8:413-437.
- Bretagne, S., J. M. Costa, A. Marmorat-Khuong, F. Poron, C. Cordonnier, M. Vidaud, and J. Fleury-Feith. 1995. Detection of *Aspergillus* species DNA in bronchoalveolar lavage samples by competitive PCR. *J. Clin. Microbiol.* 33:1164-1168.
- Jones, M. E., A. J. Barnes, B. A. Oppenheim, P. Balagopal, G. R. Morgenstern, and J. H. Scarffe. 1998. PCR-ELISA for the early diagnosis of invasive pulmonary *Aspergillus* infection in neutropenic patients. *J. Clin. Pathol.* 51:652-656.
- Kahn, F. W., J. M. Jones, and D. England. 1985. The role of bronchoalveolar lavage in the diagnosis of invasive aspergillosis. *Am. J. Clin. Pathol.* 86:518-523.
- Latgé, J. P. 1999. *Aspergillus fumigatus* and aspergillosis. *Clin. Microbiol. Rev.* 12:310-350.
- Melchers, W. J. G., P. E. Verweij, P. van den Hurk, A. van Belkum, B. De Pauw, J. Hoogkamp-Korstanje, and J. F. G. M. Meis. 1994. General primer-mediated PCR for detection of *Aspergillus* species. *J. Clin. Microbiol.* 32:1710-1717.
- Saiki, R. K., S. Scharf, F. Faloona, K. B. Mullis, G. T. Horn, and H. A. Erlich. 1985. Enzymatic amplification of β -globin sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* 230:1350-1354.
- Skladny, H., D. Buchheldt, C. Baust, F. Krieg-Schneider, W. Selfarth, C. Leib-Mosch, and R. Hehlmann. 1999. Specific detection of *Aspergillus* species in blood and bronchoalveolar lavage samples of immunocompromised patients by two-step PCR. *J. Clin. Microbiol.* 37:3865-3871.
- Spreadbury, C., D. Holden, A. Aufauvre-Brown, B. Bainbridge, and J. Cohen. 1993. Detection of *Aspergillus fumigatus* by polymerase chain reaction. *J. Clin. Microbiol.* 31:615-621.
- Stynen, D., A. Goris, J. Sarfati, and J. P. Latgé. 1995. A new sensitive sandwich enzyme-linked immunosorbent assay to detect galactofuran in patients with invasive aspergillosis. *J. Clin. Microbiol.* 33:497-500.
- Sutton, D. A., A. W. Fothergill, and M. Rinaldi. 1998. Guide to clinically significant fungi. The Williams & Wilkins Co., Baltimore, Md.
- Tang, C. M., J. Cohen, and D. W. Holden. 1992. An *Aspergillus fumigatus* alkaline protease mutant constructed by gene disruption is deficient in extracellular elastase activity. *Mol. Microbiol.* 6:1663-1671.
- Tang, C. M., D. W. Holden, A. Aufauvre-Brown, and J. Cohen. 1993. The detection of *Aspergillus* spp. by the polymerase chain reaction and its evaluation in bronchoalveolar lavage fluid. *Am. Rev. Respir. Dis.* 148:1313-1317.
- Verweij, P. E., J. F. G. M. Meis, P. van den Hurk, B. E. De Pauw, J. A. A. Hoogkamp-Korstanje, and W. J. G. Melchers. 1994. Polymerase chain reaction as a diagnostic tool for invasive aspergillosis: evaluation in bronchoalveolar lavage fluid from low risk patients. *Serodiagn. Immunother. Infect. Dis.* 6:203-208.

ANNEXE 4 : Posters présentés dans un congrès international

**ICAAC (Intersciences conference on antimicrobial agents and
chemotherapy)**

ICAAC 1999

ICAAC 2001

Introduction

Aspergillus fumigatus is an opportunistic nosocomial pathogen which causes severe to fatal infection in neutropenic patients. The risk of invasive aspergillosis (IA) increases with the duration of neutropenia and can reach 70% after 5 weeks of neutropenia (1).
The diagnostic of IA is one of the most difficult and the gold standard is still based on culture and/or histology results which sensitivity is very low. Recently, molecular biology methods were developed to diagnose aspergillosis in urine, serum, blood and BAL.
We used a nested PCR-based amplification of *A. fumigatus* DNA in BAL fluids that targets the genes-encoding alkaline proteases of the fungus to evaluate the usefulness of PCR to diagnose IA.

Abstract

The usefulness of a nested PCR for detection of *Aspergillus fumigatus* DNA was evaluated in bronchoalveolar lavage (BAL) fluid during a period of two years (1996-1998). The aim of the study was to assess the role of PCR in diagnosing invasive pulmonary aspergillosis (IPA). **Methods:** a nested PCR-based amplification of fragments of genes-encoding alkaline proteases from *Aspergillus fumigatus* was used to test 167 BAL samples. All samples were checked for the absence of amplification inhibitors. Medical, radiological, microbiological records and autopsy findings were reviewed for assessing invasive aspergillosis. All successive patients investigated by BAL were included in the study. They were distributed in three groups: A: proven or probable aspergillosis (n=11); B: colonization (n=9); C: no evidence of IPA (n=154). PCR results were compared to culture detection as gold standard and to clinical data. **Results:** BAL fluids from 10 patients of group A were PCR positive. One case was falsely negative. Among group B, one case was PCR positive, and the second one PCR negative but had negative BAL cultures (only culture positive sputum). No false positive was detected among group C. Comparing to culture, sensitivity was 81%, specificity, 100%, positive predictive value, 100%, and negative predictive value, 99%. **Conclusions:** *Aspergillus fumigatus* PCR in BAL fluid was an accurate test to diagnose culture negative patients with IPA and to confirm culture positive samples; however it doesn't make difference between infection and colonization. 2. It is an appropriate test to exclude *Aspergillus* infection in patients at risk of invasive illness.

Bibliography

- *1. Ribaud P., Esperou-Bourdeau H., Devergie A., Gluckman E. Aspergillose invasive et atypique de moelle. *Path. Biol.*, 1994, 42, 652-655.
- *2. Tang C., Holden D., Aufaivre-Brown, Cohen J. The detection of *Aspergillus* spp. by the polymerase chain reaction and its evaluation in bronchoalveolar lavage fluid. *Am. Rev. Resp. Dis.*, 1993, 148, 1313-1317.

Methods

- Clinical data: all patients undergoing bronchoscopy at the university hospital of Liège between 1996 and 1998 were included in the study and distributed in three groups:
 - A: proven or probable aspergillosis (n=11)
 - B: colonization (n=2)
 - C: no evidence of aspergillosis (n=154)
- BAL fluid specimens: all lavages collected by the microbiological laboratory were included in the study and stored at -20°C before processing. Microbiological examination was directly performed on every sample and results recorded.
- DNA extraction: adapted from Tang et coll. (2).
 - BAL fluid (250µl) + extraction buffer (250µl) containing proteinase K (100 µg); 65°C for 60 min
 - extraction once with phenol:chloroform:isomylalcol (25:24:1) and then with chloroform:isomylalcol (24:1).
 - Precipitation of DNA by ethanol
- Nested PCR: The target DNA corresponds to genes-encoding alkaline proteases from *A. fumigatus* (2).
 - External primers: alp11 and alp12 (2).
 - Internal primers: alp13 (5'-CTGGATACAGCCGGCT-3') alp14 (5'-TTGTTGATCGCAACC-3')
- Product length after amplification: 527 base pairs.
- Mix, (50µl volume): 10mM TRIS-Cl at pH 8.3, 50 mM KCl and 1.5 mM MgCl2 with 100 pmol of both primers and 1.25 U Taq polymerase (Takara Taq, Japan).
- Thermal cycling conditions: 30 cycles at 94°C for 30 sec., 63°C for 45sec., and 72°C for 2 min.
- Products of PCR : analyzed on 1.5% agarose gels, stained with ethidium bromide and visualized by UV transillumination.

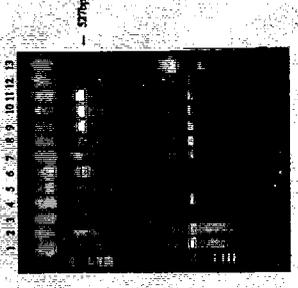


Figure 1. Amplification products on ethidium bromide stained agarose gel. Above: lanes 1-9, 7, 8, negative BAL. Lanes 6, 9: patient 7 from group A. Lanes 10-11: *A. fumigatus* DNA. Lanes 12, 13: reference template (water). Below: beta-globin reference template. Lanes 14-15: patient 7 from group A.

Results

CASE	UNDERLYING DISEASE	IPA	CULTURE		HISTOLOGY		PCR	SURVIVAL
			positive	negative	positive	negative		
GROUP A: IPI or probable IPI (n=11)								
1	Hepatic transplantation	yes	yes	yes	yes	yes	yes	no
2	COPD corticoids dependent	yes	yes	yes	yes	yes	yes	no
3	Hematologic malignancy	yes	yes	no histology	yes	no histology	yes	no
4	Cardiac transplantation	yes	yes	yes	yes	yes	yes	no
5	Atrialitis	yes	yes	yes	yes	yes	yes	no
6	COPD corticoids dependent	yes	yes	yes	yes	yes	yes	no
7	Gastric carcinoma	yes	yes	yes	yes	yes	yes	no
8	COPD corticoids dependent	Probable	yes	yes	yes	yes	yes	no
9	Bone marrow transplantation	yes	yes	yes	yes	yes	no histology	no
10	Hematologic malignancy	yes	yes	yes	yes	yes	yes	no
11	Hematologic malignancy	yes	yes	yes	yes	yes	no histology	yes
GROUP B: colonization (n=2)								
1	Mitral valveulopathy	no	yes	yes	no histology	no histology	yes	yes
2	COPD (no corticoids)	no	yes	yes	no histology	no histology	no	yes
GROUP C: no evidence of aspergillosis (n=154)								
UNDERLYING DISEASE								
164	Respiratory disease	0	0	0	0	0	0	0

Sensitivity and specificity of PCR

IPA	PCR-		PCR+		Sensitivity	Specificity	Predictive values
	1	10	11	156			
NO IPA	155	1	156	156	91%	100%	negative values
	156	11	167	167	negative	positive	99%
							100%

Conclusions

- 1. *A. fumigatus* PCR in BAL fluid was an accurate test to diagnose culture negative patients with IPA and to confirm culture positive samples. However it doesn't make difference between infection and colonization.
- 2. This PCR is an appropriate method to exclude *Aspergillus* infection in patients at risk of invasive illness.

Comparative *in vitro* activity of amphotericin B, itraconazole, voriconazole and posaconazole against *Aspergillus fumigatus*.

M.P. Hayette¹, A. Amadore¹, L. Seidel¹, G. Christiaens¹, M.G. Garrino², P. Melin¹, Y. Glupczynski² and P. De Mol¹.

¹University Hospital of Liège, Liège; ²Mont Godinne University Hospital, Yvoir, Belgium.

Abstract

Background. New azoles have been successfully used as treatment of invasive aspergillosis. The purpose of this study was to compare the *in vitro* activity of posaconazole (Posa) with that of amphotericin B (AmB), itraconazole (itra) and voriconazole (Vor) against *A. fumigatus* isolates according to NCCLS method (M38-P), and to compare visual and spectrophotometric readings for MIC determination. **Methods.** A total of 108 *A. fumigatus* isolates were selected as follows: 81 clinical isolates from colonized patients, 18 from patients with invasive aspergillosis and 7 environmental isolates. Their *in vitro* susceptibility was evaluated by the NCCLS microdilution method (M38-P) in RPMI 1640 medium. Determination of results was made by visual and spectrophotometric readings (630 nm) after 48 hours incubation at 35°C. Three *A. fumigatus* reference strains (HEM 5734, 6149 and 13935) were included as control.

Results. 1. Geometric mean MICs/MIC₅₀ (µg/ml) obtained by visual reading were respectively 0.691 (AmB), 0.370.5 (itra), 0.270.5 (Vor) and 0.020.03 (Posa). 2. MIC values were comparable by spectrophotometric and by visual readings for all antifungal agents tested (p > 0.05) and did not depend on the isolate's origin (p > 0.05). 3. Posaconazole had the lowest MICs (p < 0.001). 4. The itraconazole-resistant reference strain did not give cross resistance with voriconazole and posaconazole. **Conclusion:** Among azoles, posaconazole had a better *in vitro* activity against *A. fumigatus* than did voriconazole or itraconazole. Spectrophotometric reading could replace the less standardized visual reading for NCCLS microdilution method and MIC values obtained were comparable among all *A. fumigatus* isolates.

Introduction

New azoles have been recently introduced in the treatment of invasive aspergillosis. Clinical studies are in progress to compare the efficiency and toxicity of these molecules to the gold standard, amphotericin B.

The purpose of our study was first to determine the MICs of two new azoles, voriconazole (Vor) and posaconazole (posa), against *Aspergillus fumigatus* isolates from diverse origins and to compare the results to amphotericin B (AmB) and itraconazole (itra) MIC values.

Secondly, the aim of the study was to compare the visual reading with a spectrophotometric one in order to enhance the standardisation of the method. E-test was also performed for posaconazole and compared with NCCLS method in a parallel direction.

Materials and methods

Strains: 106 isolates of *A. fumigatus* have been selected as follows: 81 clinical isolates from colonized patients, 18 from patients with invasive aspergillosis and 7 environmental isolates. Three *A. fumigatus* (HEM 5734, 6149 and 13935) reference strains have been included as controls.

Culture: the strains have been cultivated on Sabouraud dextrose agar following the recommendations of the NCCLS M38-P microdilution methodology (1). **NCCLS method:** RPMI 1640 medium (Gibco BRL, Life Technologies, USA) buffered with MOPS (Sigma, St Louis, USA) has been used. All antifungals were dissolved in DMSO before diluting them in the RPMI medium. The concentrations tested were as follows: 0.031 to 16 µg/ml for AmB, itra and Vor; 0.004 to 16 µg/ml for Posa. The drugs were kindly provided as pure powder by their manufacturers: AmB (Bristol-Myers Squibb, USA), itra (Janssen Pharmaceutica, Beerse, Belgium), Vor (Pfizer, New-York, USA), and Posa (Schering Plough, Kenilworth, USA). Determining MICs: reading has been performed according to the NCCLS recommendations (visual reading) with a score 0 for AmB and score 2 for the azoles. A spectrophotometric reading at 630 nm was also performed and compared to the visual reading with the same scoring system.

E-test posaconazole: E-test (AB-biodisk, Solna, Sweden) for posaconazole was performed on RPMI 1640 buffered agar (1.5%). Reading was performed after 24h incubation at 35°C.

Results

MICs geometric means (µg/ml) of *A. fumigatus* isolates (n=106).

Amphotericin B		Itraconazole		Voriconazole		Posaconazole	
Visual	630 nm	Visual	630 nm	Visual	630 nm	Vfs.	630h
0.67	0.64	0.37	0.39	0.27	0.28	0.02	0.02
						0.02	0.01

1. There is no significative difference between visual and spectrophotometric readings (p > 0.05).
2. Among azoles, posaconazole has lower MICs than voriconazole and itraconazole (p < 0.001).
3. E-test and NCCLS results for posaconazole are in agreement (p > 0.05).

MICs geometric means (µg/ml) by visual reading

Origin of isolates	Amphotericin B	Itraconazole	Voriconazole	Posaconazole
Environmental (n=7)	0.74	0.37	0.25	0.02
Colonising (n=81)	0.61	0.43	0.43	0.02
Invasive (n=18)	0.67	0.36	0.27	0.02

3. There is no significative difference according to origin of isolates (p > 0.05).

Discussion and conclusions

The standardisation of the NCCLS M38-P method can be improved by use of spectrophotometric reading. This method avoids the variability due to the reader giving a better reproducibility. However, automatic MICs calculation is needed to speed up the procedure.

Antifungal susceptibility is not a marqueur of pathogenicity for *A. fumigatus* since there is no significative difference between isolates MICs from different origins. Since authors have reported *A. fumigatus* itraconazole-resistant isolates (2), it seems useful to test the susceptibility before treatment particularly for azoles.

Among azoles posaconazole has the lowest MICs values. It is a very promising drug and the ongoing clinical trials will determine if the drug can successfully cure invasive aspergillosis without serious side effects.

Nevertheless the NCCLS method could better be replaced by an easier method for routine laboratory. According to our study and to others authors (3), E-test method could be used for *A. fumigatus* as this methodology gives good correlations with NCCLS method.

References

1. National Committee for clinical Laboratory standards. 1998. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility of conidium-forming filamentous fungi. Proposed standards M38-P. National Committee for clinical laboratory standards, Wayne, Pa.
2. Denning D. et al. 1997. Itraconazole resistance in *Aspergillus fumigatus*. Antimicrob. Agents Chemother., 41, 1364-1368.
3. Szekeley A. and al. 1999. Comparison of E-test and broth microdilution methods for antifungal drug susceptibility testing of molds. J. Clin. Microbiol., 37, 1490-1483.

ANNEXE 5 : Formules de tampons

Bleu de bromothymol

Bleu de bromothymol 250mg
Ficoll..... 15ml
H2O QSP100ml

Dissoudre le bleu dans l'eau puis ajouter la glycérol. Mélanger une nuit par agitateur magnétique.
Conserver à 4°C. A utiliser tel quel en ajoutant 2µl de bleu à 10 µl de produit amplifié.

Bromure d'éthidium (solution stock).

Bromure d'éthidium 1 g
H2O qsp..... 100ml.

Mélanger jusqu'à dissolution complète. Conserver à température ambiante et à l'abri de la lumière.

EDTA 0.5mM

Disodium éthylène diaminetetracétate-2H2O186.12 g
H2Oppiqsp 1l

Ajuster à pH 8 avec NaOH (soit environ 20g) et ajuster le volume à 1 litre.

N.B. Utiliser un agitateur magnétique pour dissoudre la poudre. Le sel d'EDTA ne devient soluble que lorsque le pH est ajusté à 8.

Marqueurs de poids moléculaire (Eurogentec, Belgium).

Marqueur IV (ΦX174 /Hae III) 75µg

Marqueur IV 150µl
Bleu de Bromothymol 120µl Concentration finale du marqueur 0.1µg/µl
H2O ppi 480ml

Marqueur V (Φ X174 /Hinc II digest) 75 μ g

Marqueur V	150 μ l	
Bleu de Bromothymol	120 μ l	<u>Concentration finale du marqueur 0.1μg/μl</u>
H2O ppi	480 μ l	

Tampon d'extraction selon Tang et coll. pour extraction d'*Aspergillus sp.* dans les LBA.

200 mM Tris-HCl pH8	soit 2.42g
0.5M NaCl	soit 2.92g
0.01M EDTA	soit 0.37g
1% SDS	soit 1 ml de solution à 10%
H2O ppi	QSP100ml

Préparer en tube Falcon de 50ml. Stériliser sur filtre 0.2 μ .

Tampon d'extraction selon Yamakami et coll. pour extraction d'*Aspergillus sp.* dans le sang.

100mM KCl.....	soit 0,745 g
20mM Tris-HCl (pH 8.3)	soit 24.22 mg
5mM MgCl2	soit 0.5 ml d'une solution à 1 M (Sigma Aldrich).
0.9% Tween 20	soit 900 μ l
0.2 mg/ml de gélatine	soit 20mg
H2O ppi	qsp100ml

Filtrer sur filtre 0.2 μ .

Tampon de lyticase

50mM Tris pH 7.5	soit 0.302 mg
1 mM EDTA.....	soit 0.015 mg
20% β -mercaptoéthanol	97 μ l
H2O ppi	qsp 50 ml

Filtrer sur filter 0.2 μ .

TBE 5x concentré (Tampon tris-Acide borique-EDTA)

Tris base 54 g
Acide borique 27.4 g
EDTA à 0.5mM pH 8 20ml
H2O ppi qsp 1l
Conserver à température ambiante.

ANNEXE 6 : Protocoles d'extraction de l'ADN

1. Technique modifiée de Yamakami et coll. ()

La composition du tampon de lyse est donnée dans les annexes « tampons ».

Cette technique consiste à mélanger 100 µl d'échantillon avec 100 µl de tampon. La protéinase K est ajoutée extemporanément à la concentration de 200 µg (à la place de 60µg/ml recommandée par les auteurs) soit 20 µl d'une solution à 10 µg/µl. Le mélange est incubé 60 minutes à 65°C puis 30 minutes à 95°C et centrifugé à 12.000 g pendant 10 minutes à +4°C.

Le surnageant est utilisé pour réalisation de la PCR.

2. Technique d'extraction sur colonne QIAamp DNA mini kit, tissue protocole (QIAamp DNA Mini Kit, QIAgen, Allemagne).

1. Ajouter 180 µl de solution ATL au culot de leucocytes et 20 µl de protéinase K (Qiagen). Mélanger par vortex et incuber 3 heures à 55°C.

2. Ajouter 200µl de solution AL, mélanger par vortex et incuber 10 min. à 70°C. Centrifuger quelques secondes pour concentrer tout le liquide dans le fond du tube.

3. Ajouter 200 µm d'éthanol, bien mélanger par vortex. Centrifuger quelques secondes pour concentrer tout le liquide dans le fond du tube.

4. Placer une colonne dans un tube de 2 ml (Qiagen), puis déposer tout le liquide sur la colonne. Fermer le bouchon. Centrifuger 1 min à 8000 rpm.

5. Sortir la colonne du tube et la placer dans un nouveau tube de 2 ml. Déposer 500 µl de solution AW1 (Qiagen). Centrifuger 1 min à 8000 rpm.

6. Sortir la colonne du tube et la placer dans un nouveau tube de 2 ml. Déposer 500 µl de solution AW2 (Qiagen). Centrifuger 1 min à 14.000 rpm.

7. Sortir la colonne du tube recentrifuger 1 min à 14.000 pour éliminer toute trace de AW2.

8. Sortir la colonne du tube. Ajouter 50 µl de solution AE et laisser 5min à température ambiante. Centrifuger 1 min à 14.000 rpm et garder l'éluat. Celui-ci peut être congelé à -20°C ou traité directement en PCR.

3. Technique Amplicor® Whole Blood (Roche).

Le kit Amplicor® Whole Blood est composé de deux réactifs :

BLD WS permet de lyser les globules rouges et d'isoler les leucocytes à partir du sang. Il s'agit d'une solution de phosphate de sodium contenant moins de 0.4% de détergent et de 0.05 % d'azide de sodium.

BLD EXT permet la lyse des leucocytes. Il s'agit d'un tampon Tris-HCl contenant 0.01% de protéinase K, 7.5 mg de MgCl₂, 1% de détergent et 0.05% d'azide sodium.

Technique de lyse des globules rouges :

Le sang total prélevé sur EDTA a été soumis à une lyse des globules rouges par le kit de préparation des échantillons Amplicor® Sang Total (Roche diagnostics, Brandburg, USA), permettant de lyser les globules rouges et blancs en deux étapes séparées et grâce à deux réactifs différents.

1. On mélange 1 volume (500 µl) de sang total à 2 volumes (1 ml) de solution de lyse BLD WS. On mélange 10 à 15 fois par retournement, puis on laisse à température ambiante pendant 5 minutes pour faciliter la lyse. Ensuite, les tubes sont centrifugés pendant 3 minutes à vitesse maximale (15.000 trs/min). Le culot de globules blancs se distingue par sa couleur plus claire. Le surnageant est prélevé et éliminé.

2. Deux volumes de solution de lavage sont ajoutés au culot. On mélange sur Vortex pour remettre en suspension et on mélange de nouveau par retournement 10 à 15 fois. Puis on centrifuge comme précédemment 3 minutes à vitesse maximale (15.000 tr/min).

3. L'étape 2 est répétée encore une fois de façon à éliminer au maximum l'hémoglobine présente dans le prélèvement.

Le culot peut être directement traité pour extraction de l'ADN ou être congelé à -80°C .

Technique de lyse du culot leucocytaire :

Le culot cellulaire est décongelé à température ambiante quelques minutes s'il n'a pu être traité directement.

La méthodologie consiste à ajouter 200 μl de réactif BLD EXT au culot décongelé et de placer le tube fermé au bain marie à 60°C pendant 45 minutes. Le tube est ensuite maintenu à 100°C pendant 30 minutes pour éliminer complètement la protéinase K.

L'échantillon est ensuite centrifugé quelques secondes, pour concentrer l'échantillon au fond du tube. On peut le garder à $+4^{\circ}\text{C}$ jusqu'à la réalisation de la PCR.

4. Technique d'extraction par TriPure.

(TriPure isolation reagent[®], Boehringer Mannheim, Allemagne).

1. Ajouter 1 ml de TriPure à 100 μl de solution à extraire. Incuber 5 min à température ambiante.

2. Ajouter 0.2 ml de chloroforme (0.2 ml par ml de TriPure). Mélanger vigoureusement par vortex. Incuber 15 min à température ambiante.

Centrifuger 15 min à 12.000 g à 4°C .

On obtient trois phases :

- phase supérieure aqueuse (incolore) contenant le RNA.
- interface contenant le DNA de couleur blanche.
- phase inférieure organique (rouge) contenant les protéines.

3. Eliminer la phase supérieure et ajouter 0.3 ml d'éthanol pur pour séparer DNA et protéines (soit 0.3 ml d'éthanol pur par ml de TriPure). Mélanger par inversion et incuber 3 minutes à T°C ambiante.
4. Centrifuger 5 min à 2000g à 4°C. Eliminer le surnageant (protéines).
5. Laver le culot avec une solution de citrate de sodium 0.1M contenant 10 % d'éthanol (1ml de solution par ml de TriPure). Incuber 30 min à température ambiante en mélangeant de temps en temps.
6. Centrifuger 5 min à 2000g à 4°C. Eliminer le surnageant.
7. Répéter l'étape de lavage deux fois.
8. Laver le culot dans une solution d'éthanol à 75% (1.5 à 2 ml par ml de TriPure). Incuber 20 min à T°C ambiante en mélangeant de temps en temps.
Centrifuger 5 min à 2000g à 4°C et éliminer le surnageant.
9. Sécher le culot (dans un bloc chauffant). Dissoudre le culot dans de l'eau. Conserver à 4°C ou congeler à -20°C jusqu'à réalisation de la PCR.

ANNEXE 7 : Milieux de culture

RPMI 1640 (NCCLS M38-P)

Dissoudre 10.4 g de RPMI 1640 (avec glutamine, et sans bicarbonate)(Difco) dans 900 ml d'eau distillée.

Ajouter 2 g de NaHCO₃ (Sigma) et 34.53g de tampon MOPS (Sigma). Ajuster le pH à 7 à l'aide de NaOH 1N. Compléter avec de l'eau pour atteindre un volume final d'un litre.

Filtrer la solution (filtres Nalgène, Nalge Nunc corporation, New York, USA).

Conserver à +4 °C au maximum un mois.

SABOURAUD DEXTROSE AGAR (Oxoid)

Sabouraud dextrose agar 65g

Eau distillée QSP..... 1litre

Peser la poudre et compléter à 1 litre avec de l'eau distillée. Placer sur un barreau magnétique dans le récipient et placer sur un agitateur magnétique. Agiter jusqu'à formation d'une suspension homogène. Chauffer sur un bec bunsen en agitant fréquemment puis distribuer dans les tubes selon les quantités désirées. Autoclaver 30 minutes à 120°C, puis sortir les tubes encore chauds les incliner et les laisser refroidir. Boucher complètement une fois refroidis et conserver à température ambiante.

ANNEXE 8 : Répertoire des tableaux

N°	TITRE	Page ou verso (V)
Tableaux CHAPITRE I		
1	Position systématique des champignons d'intérêt médical	V8
2	Incidence de l'aspergillose invasive d'après Denning (42)	V20
3	Incidence des infections chez les transplantés d'organe solide d'après Patel et Paya (121).	V23
4	Molécules d' <i>Aspergillus fumigatus</i> ayant un rôle potentiel dans la virulence .	V27
5	Profils caractéristiques de l'aspergillose invasive selon les groupes de patients d'après Denning (42)	V35
6	Efficacité des différents types de prélèvements pour le diagnostic d'une aspergillose pulmonaire invasive d'après Kappe et Rimek (74)	V47
7	Efficacité des techniques de détection dans le diagnostic d'une aspergillose pulmonaire invasive (d'après Kappe et Rimek (74)).	V47
8	Analyse réalisées en biologie moléculaire dans le domaine de la microbiologie par les 18 centres de diagnostic moléculaire (CDM)	V58
9	Résultats comparatifs des techniques PCR appliquées au diagnostic des aspergilloses pulmonaires invasives dans les lavages broncho-alvéolaires	V59
10	Résultats comparatifs des techniques PCR appliquées au diagnostic des aspergilloses pulmonaires invasives sur sang périphérique	V60
11	Traitement de 1 ^{ère} et de 2 ^e ligne de l'aspergillose invasive d'après Denning (42).	67
Tableaux CHAPITRE II		
1	Amorces Alp 11, 12, 13, 14	V72
2	Souches fongiques	V72
3	Préparation des mix pour la PCR nichée	79
4	Paramètres de la PCR nichée	80
5	Amorces β -globine	V79
6	Préparation du mix pour la PCR β -globine	81
7	Paramètres de la PCR β -globine	81
8	Résultats concernant les lavages broncho-alvéolaires des groupes A	V84
9	Résultats concernant les lavages broncho-alvéolaires des groupes B	V84

10	Résultats concernant les lavages broncho-alvéolaires des groupes C	V85
11	Comparaison des résultats de la culture pour recherche d' <i>Aspergillus</i> sp. versus PCR dans les groupes A, B et C.	V 85
12	Résultats des cultures des lavages bronchoalvéolaires du groupe C	V85
13	Sensibilité, spécificité, valeurs prédictives positive et négative.	86

Tableaux CHAPITRE III

1	Caractéristiques des amorces Asp5, Asp8, Asp 1 et Asp7.	V91
2	Protocole d'immunodépression des lapins	93
3	Préparation des mix pour la PCR nichée	102
4	Paramètres de la PCR nichée	102
5	Comparaison des différents protocoles d'extraction testés.	105
6	Apparition et degré de la neutropénie chez les lapins	107
7	Moyenne de la concentration en hémoglobine et du nombre de plaquettes des lapins d'expérience et des lapins témoins.	108
8	Résultats histologiques des 5 organes prélevés exprimés en %.	109
9	Résultats de l'analyse histologique et de la culture fongique des organes des 14 lapins	V109
10	Résultats obtenus en PCR versus antigénémie	111
11	Résultats PCR et antigène galactomannane exprimés en %	112
12	Précocité de la positivité de la PCR et du galactomannane	115
13	Listes des publications comparant galactomannane et PCR <i>Aspergillus</i> .	V118

V : verso de la page

N°	Tableaux CHAPITRE IV	Page ou verso (V)
1	Moyenne géométrique des CMI des isolats d' <i>A. fumigatus</i> : comparaison entre les lectures visuelle et spectrophotométrique	126
2	CMI ₉₀ des isolats d' <i>A. fumigatus</i> comparaison entre les lectures visuelle et spectrophotométrique	127
3	Moyenne géométrique des CMI des souches d' <i>A. fumigatus</i> par lecture visuelle	127
4	Moyenne des CMI obtenues par lecture visuelle pour les souches contrôles tout au long de l'étude	128
5	Résistance de 3 souches d' <i>A. fumigatus</i> vis à vis de l'amphotéricine B	128

ANNEXE 9 : Répertoire des Figures

N°	TITRE DES FIGURES	Page ou verso (V)
Figures CHAPITRE I		
1	Représentation schématique du conidiophore et des têtes aspergillaires	V12
2	Représentation schématique de la formation de phialospores.	V12
3	Représentation schématique de la reproduction des ascomycètes	V13
4	Ultrastructure d'une cellule fongique	V14
5	Structure moléculaire de la paroi fongique d' <i>A. fumigatus</i>	V14
6	Représentation temporelle de la survenue des infections chez les greffés de moelle allogénique	V22
7	Rôle de l'immunité naturelle et sa modulation par les agents immunosuppresseurs	V30
8	Etapes nécessaires au développement d'un test diagnostique (galactomannane)	V51
9	Différentes étapes de la PCR	V57
10	Algorithme décisionnel	V61
11	Structure moléculaire de l'amphotéricine B	V63
12	Formulations lipidiques d'amphotéricine B	V63
13	Représentation schématique de la structure moléculaire de l'Ambisome	V63
14	Représentation schématique de la structure moléculaire de l'Abelcet	V63
15	Représentation schématique de la structure moléculaire de l'Amphocil	V63
16	Structure moléculaire de l'itraconazole	V65
17	Structure moléculaire du voriconazole	V65
18	Structure moléculaire du posaconazole	V65
19	Structure moléculaire des échinocandines naturelles	V65
Figures CHAPITRE II		
1	Séquence de Reichard et coll. (130)	V70'

Figures CHAPITRE III

1	Séquence de Melchers et coll. (100)	V90'
2	Représentation graphique de l'évolution de l'index galactomannane	110
3	Représentation graphique des résultats PCR versus galactomannane	113
4	Représentation graphique des résultats cumulés PCR versus galactomannane	114

ANNEXE 10 : Répertoire des Photos

N°	TITRE DES PHOTOS	Page ou verso (V)
Photos CHAPITRE I		
1	<i>Aspergillus fumigatus</i> sure gélose au malt	V10
2	<i>Aspergillus fumigatus</i> sur milieux de Sabouraud et Czapeck	V10
3	A. flavus sur milieux de Sabouraud et Czapeck	V10
4	A. nidulans sur milieux de Sabouraud et Czapeck	V10
5	A. niger sur milieux de Sabouraud et gélose au malt	V10'
6	A. terreus sur milieux de Sabouraud et Czapeck	V10'
7	A. versicolor sur milieu de Sabouraud et gélose au malt	V10'
8	Coupe histologique de filaments mycéliens d' <i>Aspergillus</i> sp. colorés à l'HES	V50
9	Coupe histologique de parenchyme pulmonaire d'aspergillose invasive colorée au Grocott	V50
Photos CHAPITRE II		
1	Electrophorèse des produits d'amplification en fonction de la concentration en MgCl ₂ (1 ^{ème} étape de la PCR nichée)	V82
2	Electrophorèse des produits d'amplification en fonction de la concentration en MgCl ₂ (2 ^{ème} étape de la PCR nichée)	V82
3	Spécificité de la PCR	V83

Photos CHAPITRE III		
1	Cubicule de lapin	V92
2	Médicaments injectés	V92
3	Partie du cou rasée pour injection intra-trachéale	V92
4	Injection intra-trachéale	V92
5	Distribution de gaz isoflurane	V94
6	Cage d'induction	V94
7	Table de travail avec maintien du lapin sous anesthésie gazeuse	V94
8	Prélèvement de sang au niveau de l'oreille du lapin.	V94
9	Sensibilité de la PCR sur sang total	V103
10	Prélèvement de poumon : aspect macroscopique pathologique	V108
11	Prélèvement de foie: aspect macroscopique pathologique	V108

V= verso de la page