

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 : amphotéricine 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.	CMI₉₀.	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>Entomophthorales</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

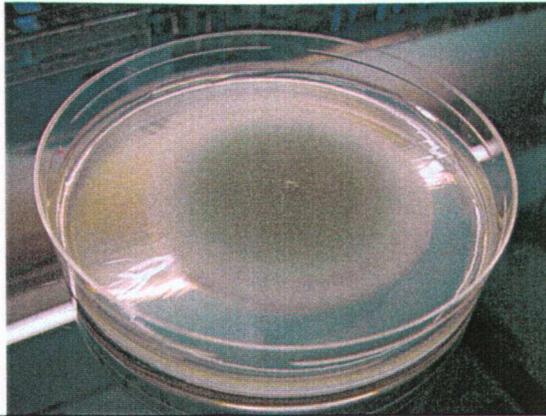


Photo I.1. *A. fumigatus* sur gélose au malt. Culture de 4 jours. Colonie de couleur vert-bleuté. Texture superficielle rase à poudreuse.

Aspergillus fumigatus

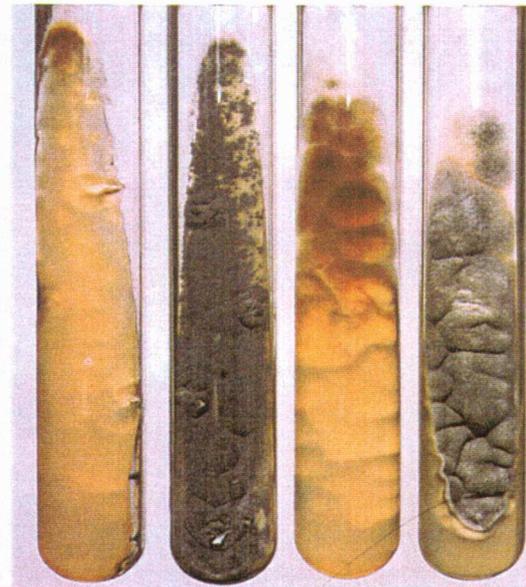


Photo I.2. *A. fumigatus* sur gélose de Sabouraud à gauche et sur milieu de Czapek à droite. Colonie de couleur gris-vert et un revers teinté de rouge. Cette coloration gris vert foncé est caractéristique de l'espèce.

Aspergillus flavus

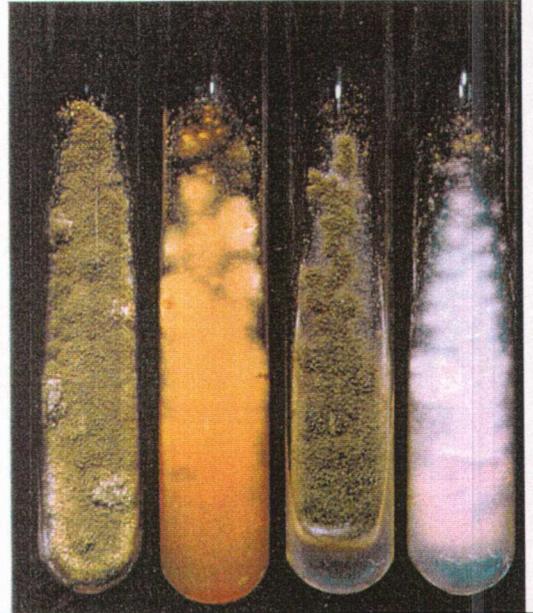


Photo I.3. *A. flavus* sur milieu de Sabouraud à gauche et sur milieu de Czapek à droite. Aspect poudreux et duveteux de couleur vert-jaune.

Aspergillus 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 de *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

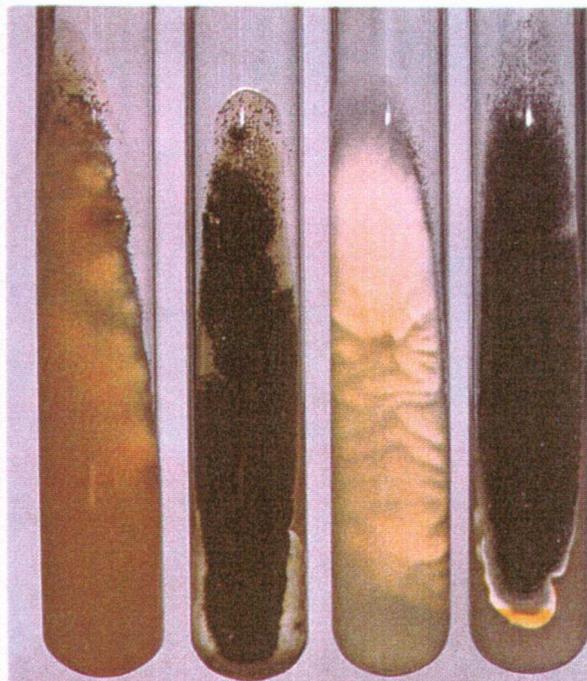


Photo I.5. Colonie poudreuse noire , avec revers beige sur milieu de Sabouraud et revers blanc sur gélose au malt.

A. terreus

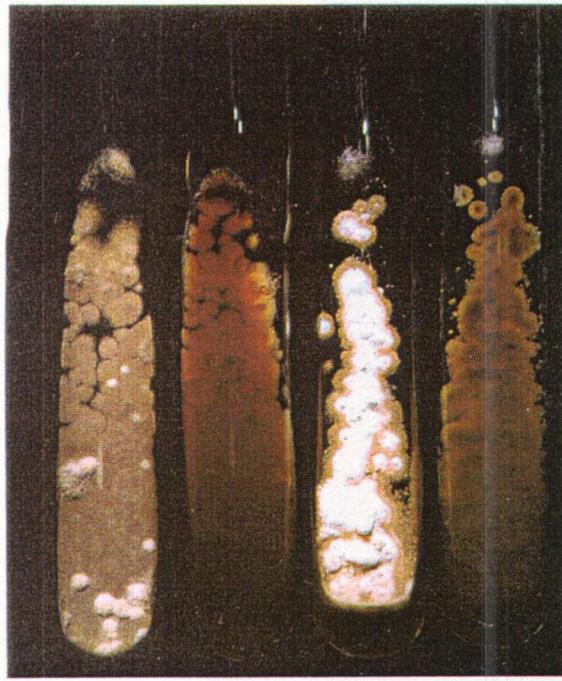


Figure I.6. Colonie veloutée de couleur ocre soutenue caractéristique sur les deux milieux ; revers brun orangé.

A. versicolor

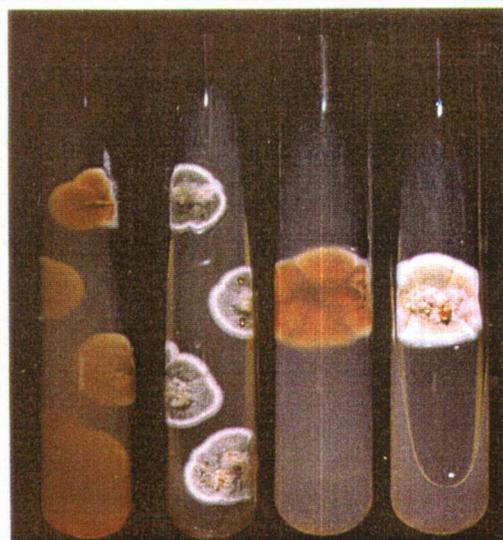


Photo I.7. *A. versicolor*. Culture sur milieu de Sabouraud à gauche et gélose au malt à droite.

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)).

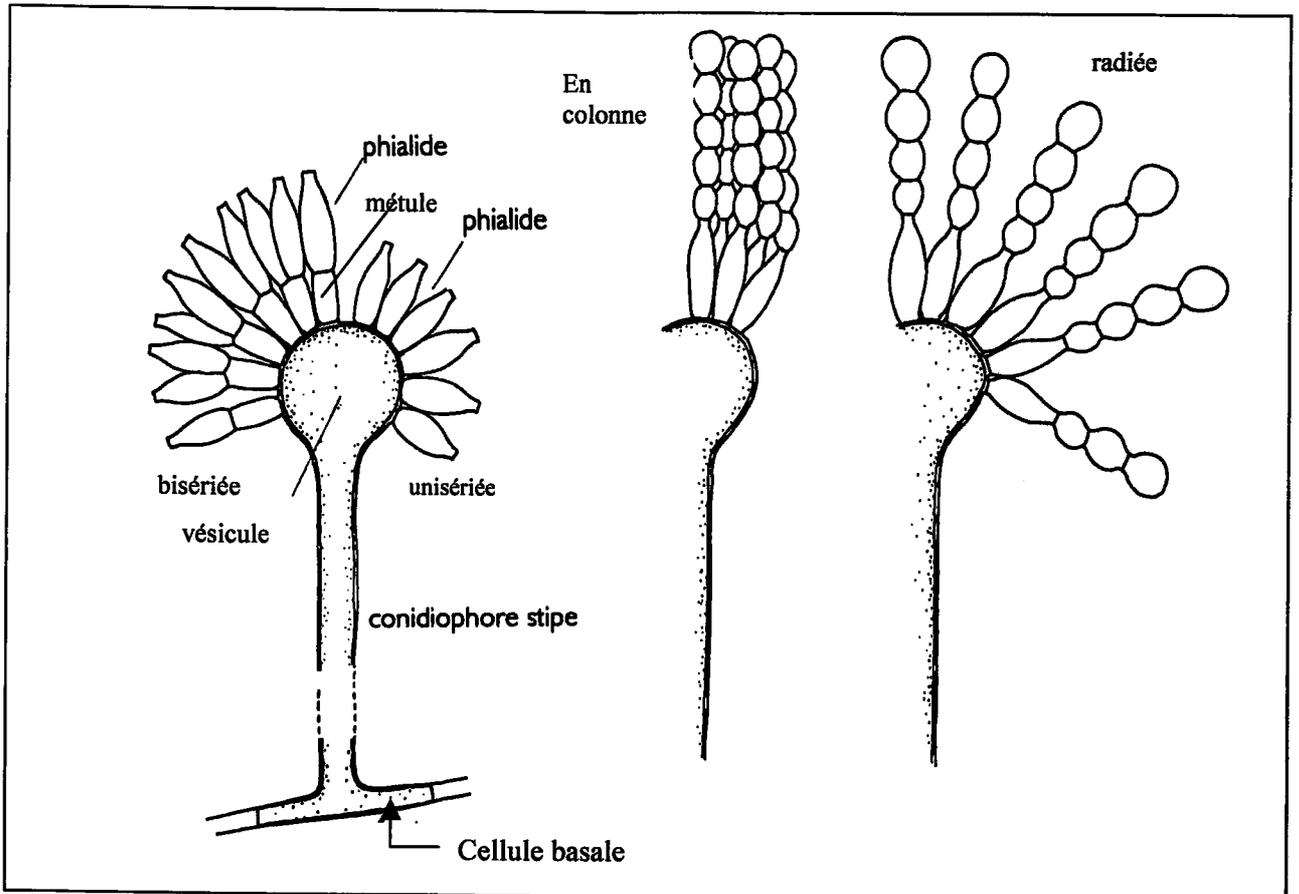
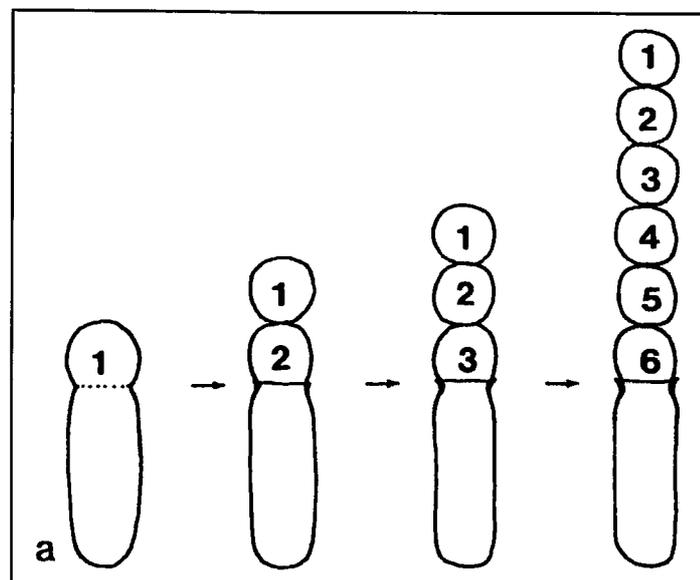


Figure I.2. Représentation schématique de la formation de phialospores chez *Aspergillus*. La première conidie est formée à partir de la paroi interne de la phialide comme celles qui vont succéder (d'après De Hoog et Guarro (38)).



- 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.

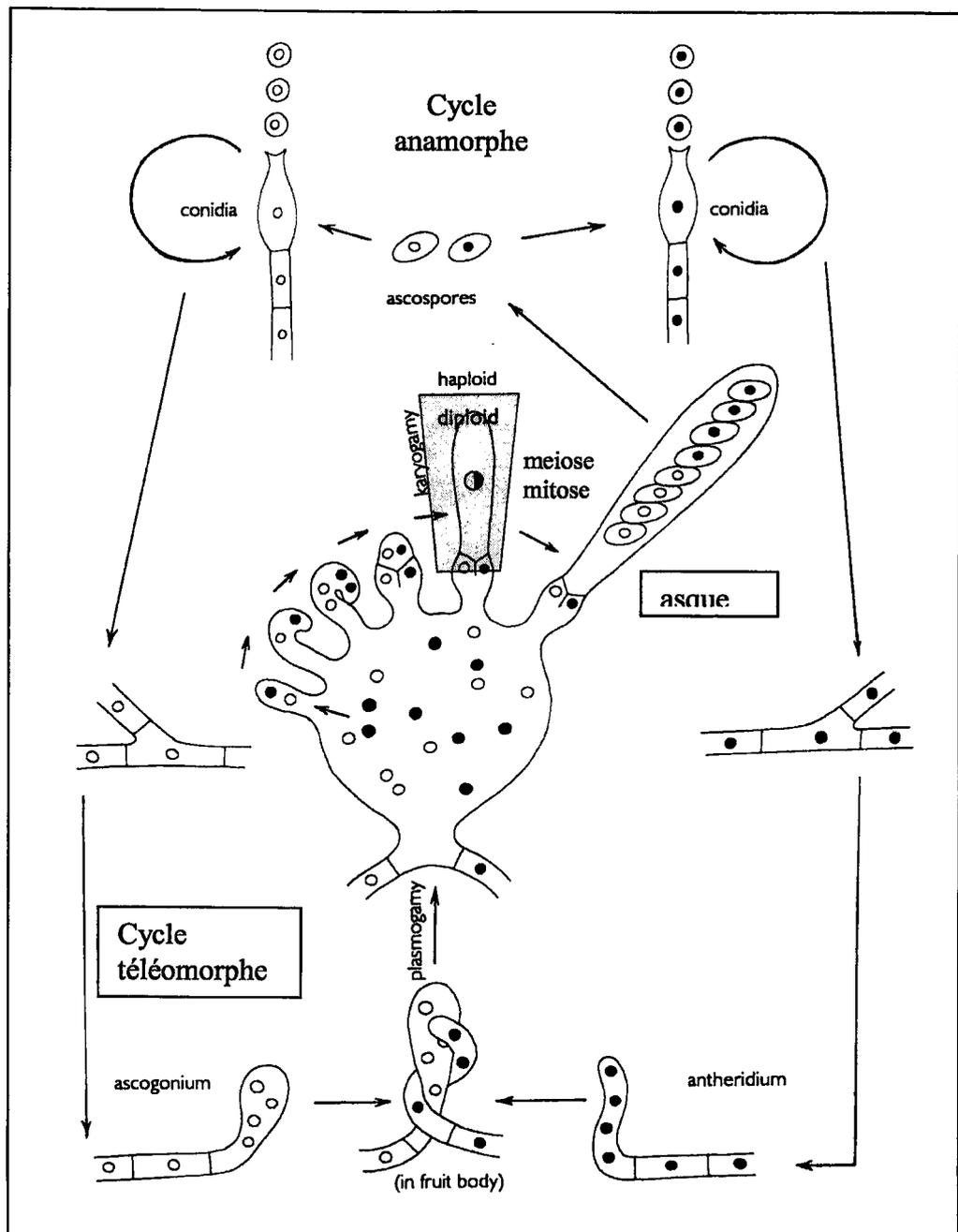
Les métules varient de 5 à 25 μm , elles sont quelquefois septées. Elles sont incolores ou brunâtres. Elles sont également produites simultanément sur la vésicule et produiront par bourgeonnement, une ou plusieurs phialides qui sont les éléments fertiles.

- 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.

Figure I.3. Représentation schématique de la reproduction sexuée et asexuée des ascomycètes. Lorsque les processus sont typiques, ils commencent par conjugaison d'une anthéridie et d'une ascogone, puis par passage des noyaux de l'anthéridie dans l'ascogone. Chez les *Aspergillus* cette séquence est rarement complète. On observe en général une ascogone spiralée qui produit des asques sans fécondation. Les asques sont sphériques et contiennent 8 ascospores. Ils sont généralement produits en grappes et sans ordre. Les ascospores de forme lenticulaire sont parfois colorés en rouge. Les asques sont soit libres soit agrégés dans ou sur une masse de filaments type cleistothèce (structure fermée), apothécie (structure ouverte) ou périthèce (structure avec une ouverture sous forme d'ostiole). Chez les *Aspergillus* avec forme sexuée, on observe essentiellement des cleistothèces . D'après De Hoog et Guarro (38).



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).

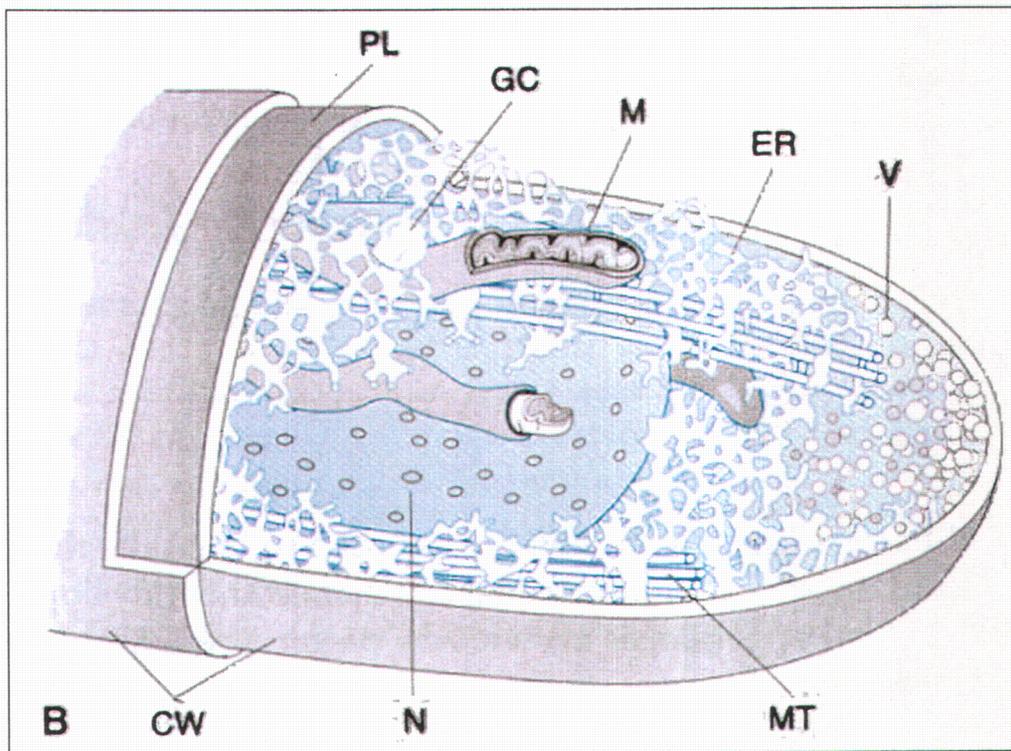
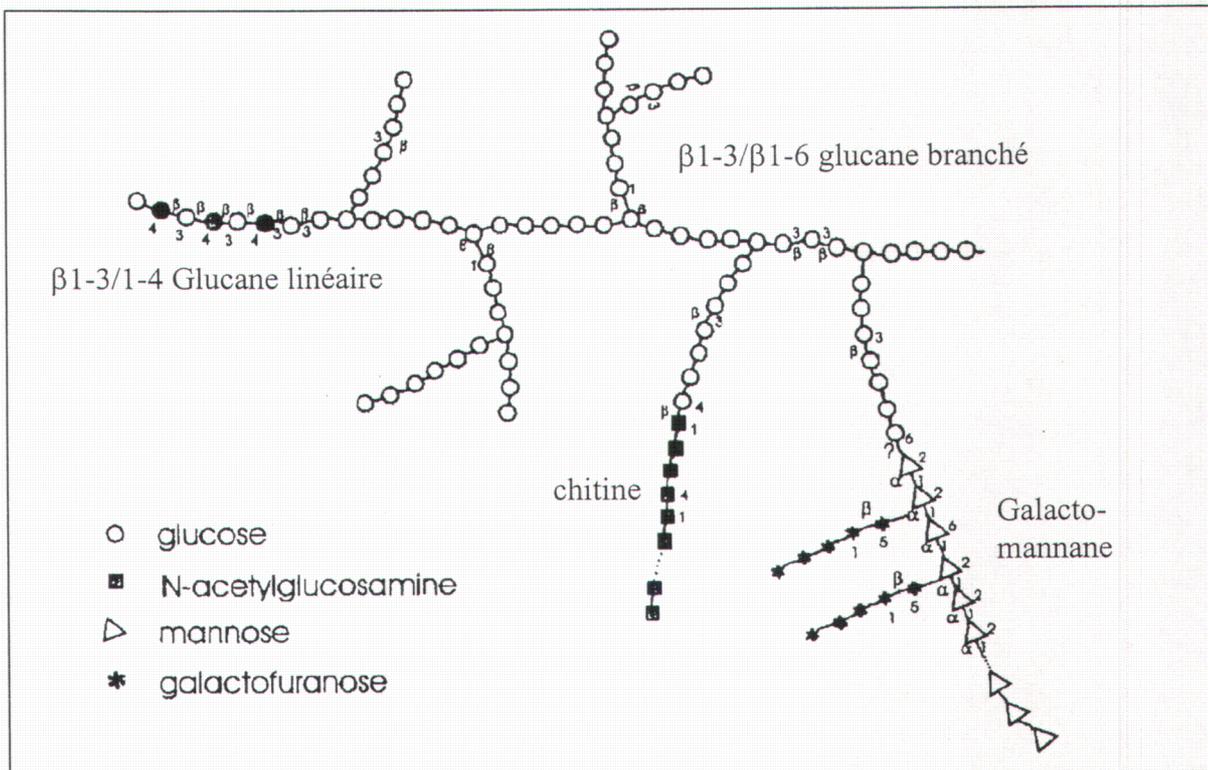


Figure I.5. Structure moléculaire de la paroi fongique d'*A. fumigatus*. D'après Th. Fontaine et coll. (49).



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.

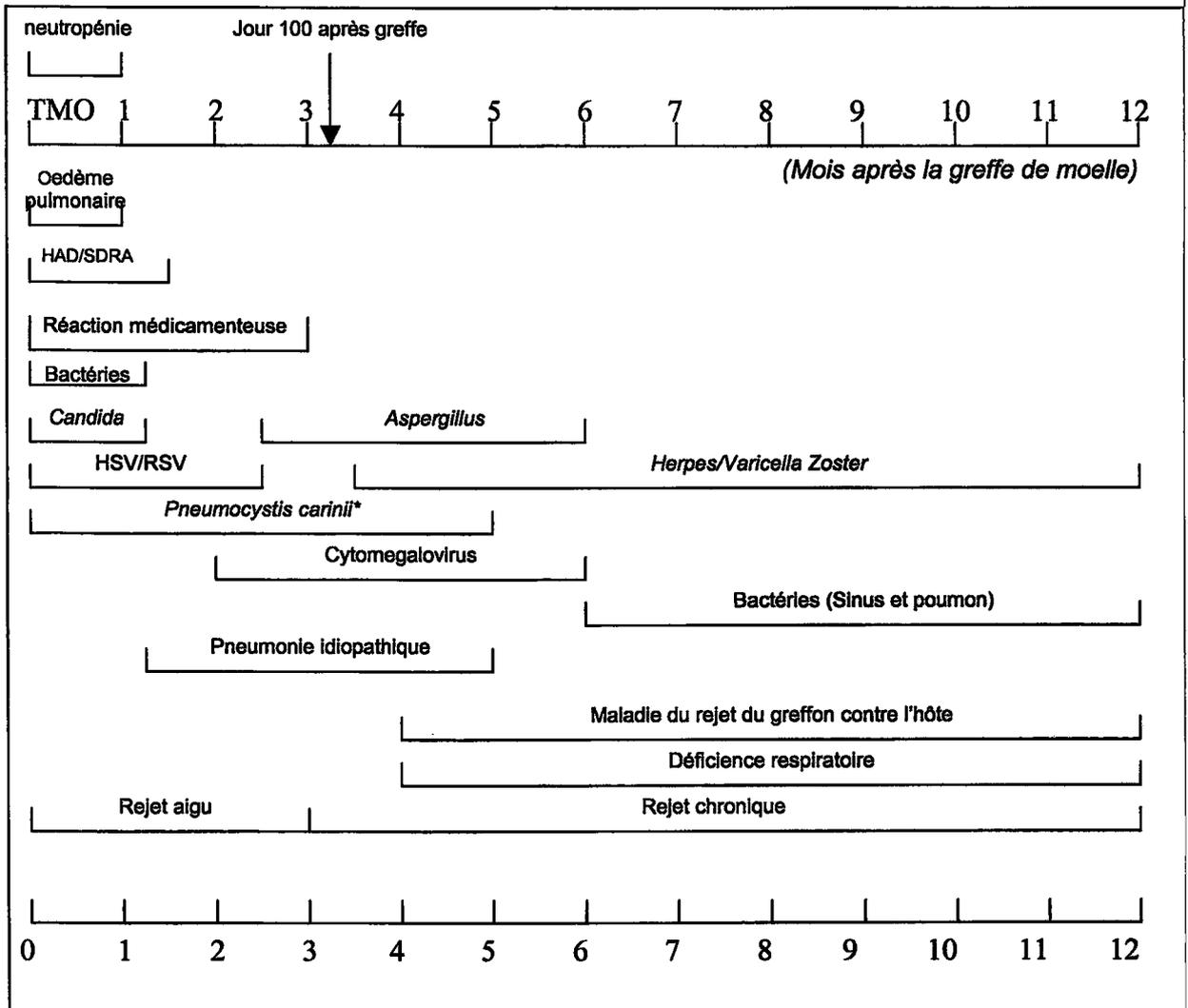
a. Le conditionnement pré-greffe.

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 relais (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.

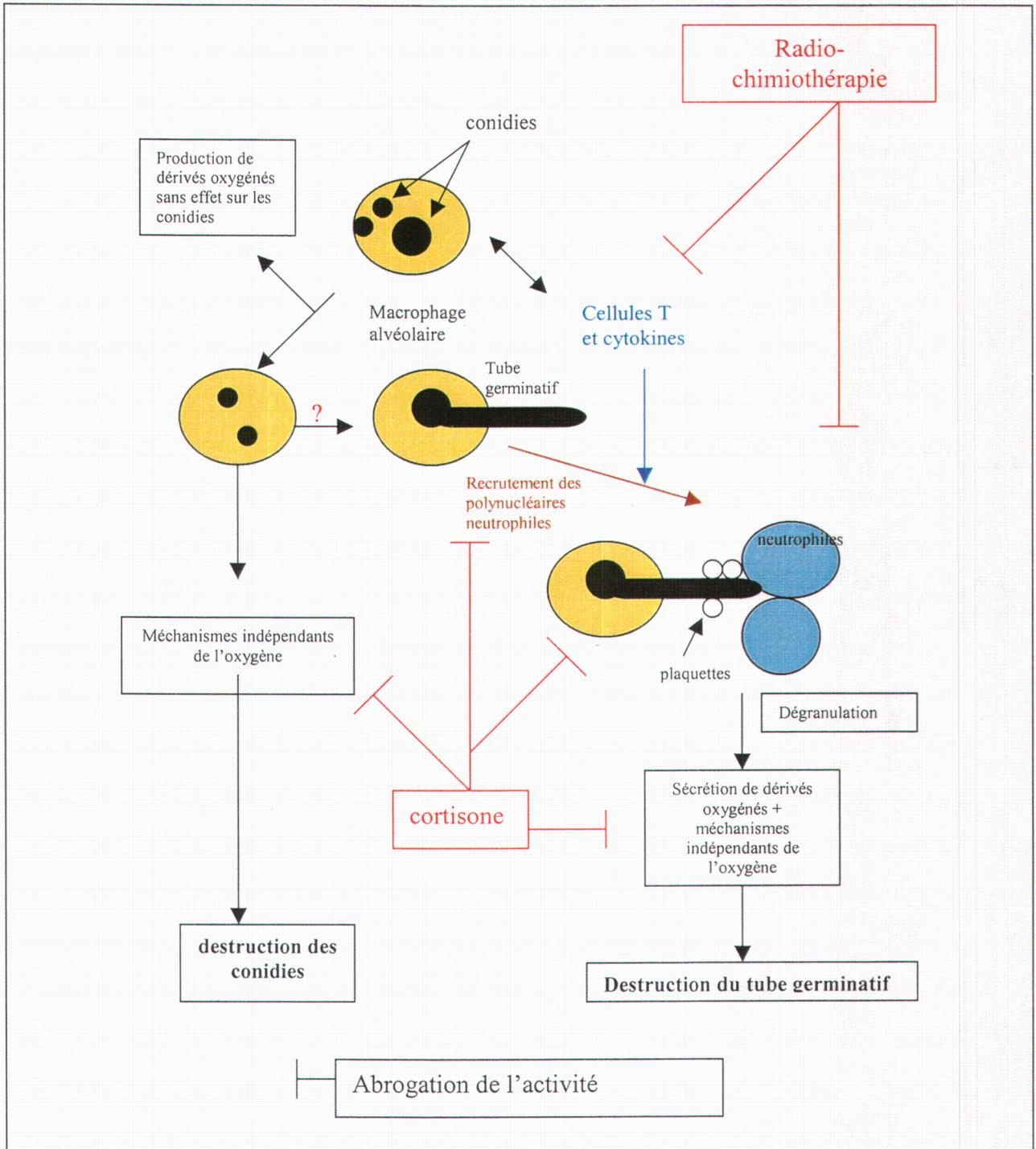
Plus récemment, des expériences ont montré que les enzymes oxydatives pourraient jouer un rôle essentiel dans le processus d'invasion en empêchant l'action des dérivés oxygénés produits par les cellules phagocytaires : trois catalases et deux superoxyde dismutases ont ainsi été caractérisées pour *A.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

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).

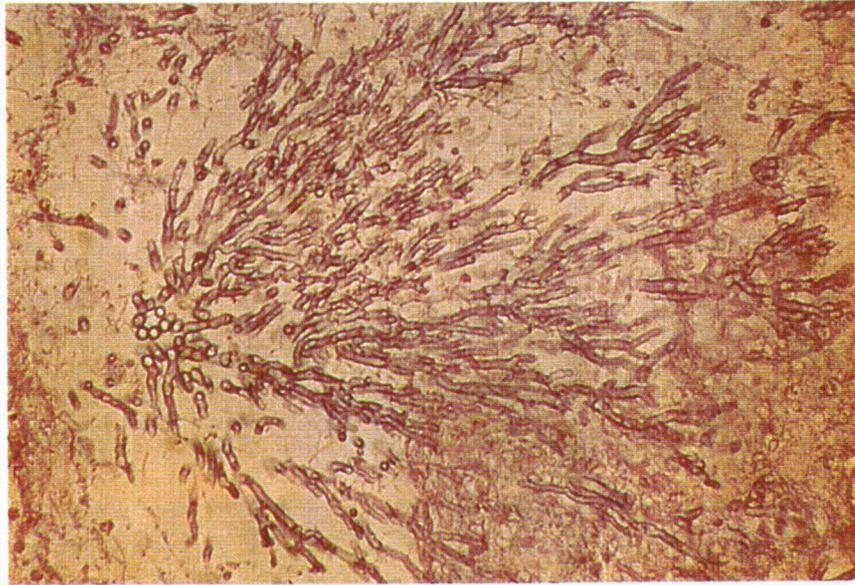
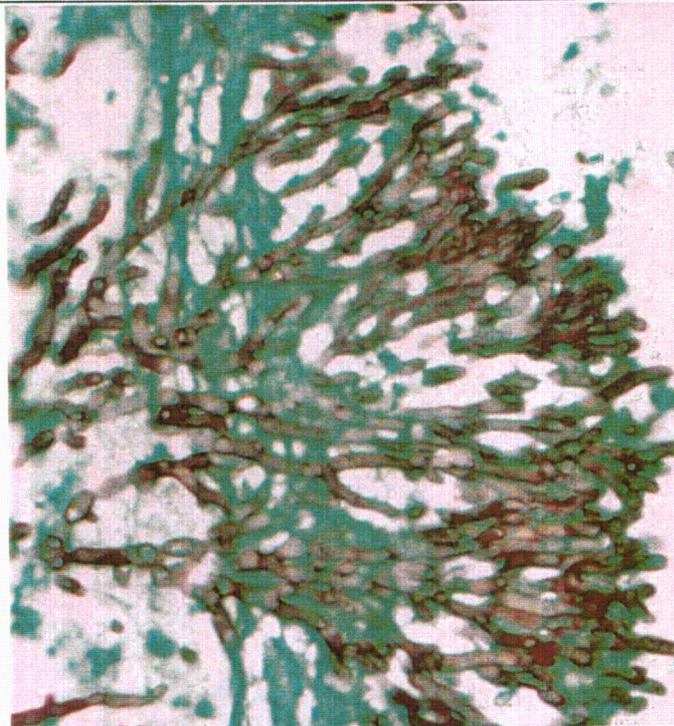


Photo I.9. Coupe histologique d'aspergillose invasive colorée au Grocott d'après Chandler et coll (28).



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.

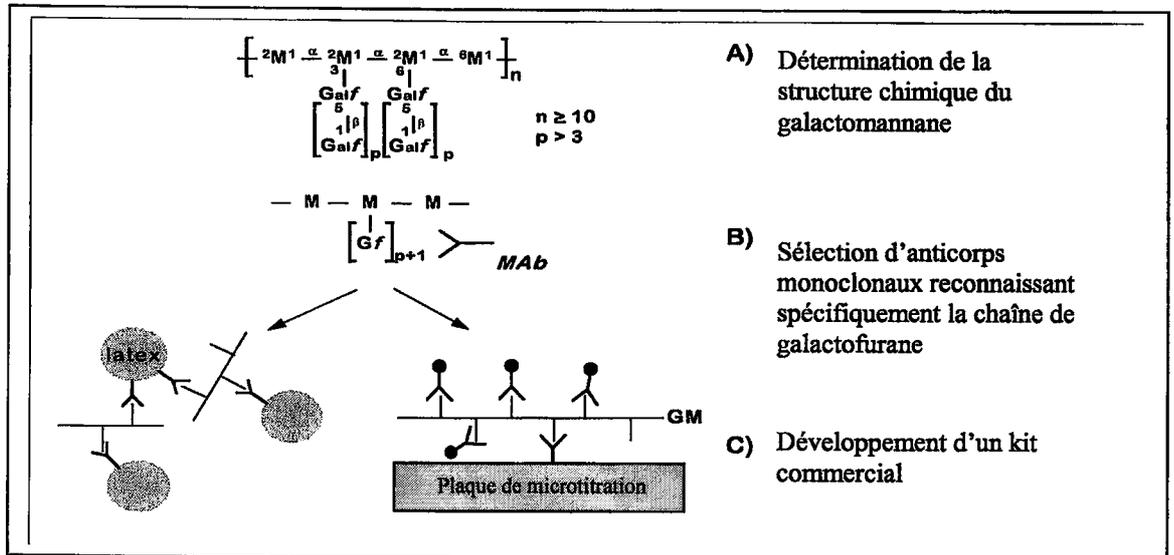
Le gros avantage de la technique E-test[®] est sa facilité d'utilisation, cependant la corrélation *in vitro-in vivo* n'a pas encore été établie et les CMI critiques ne sont pas encore fixées. A l'heure actuelle, il semble cependant que la mise sous itraconazole, antifongique azolé, nécessite de tester 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 galctomannane. 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 :

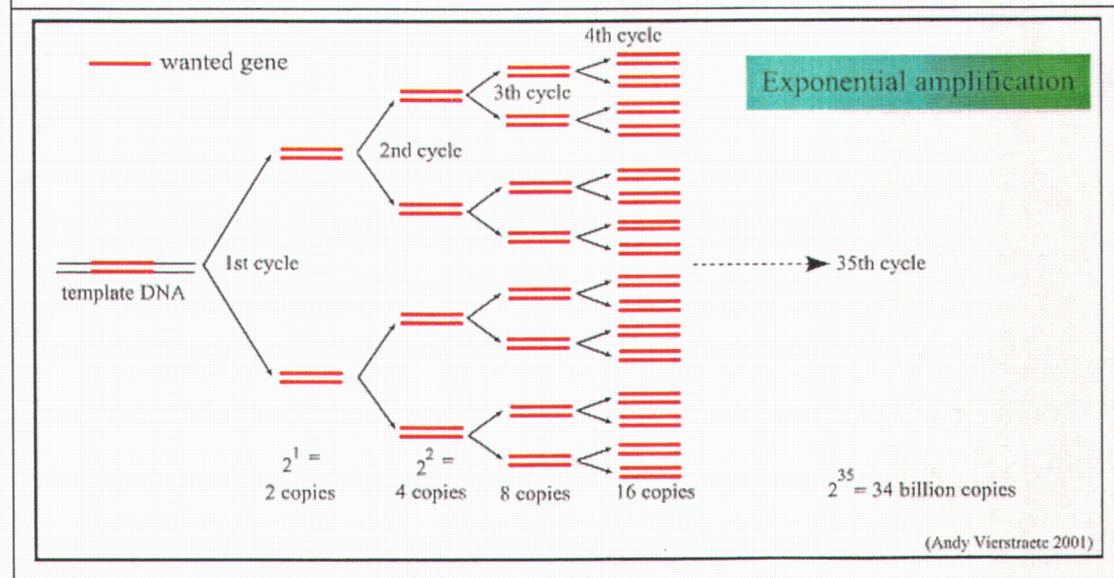
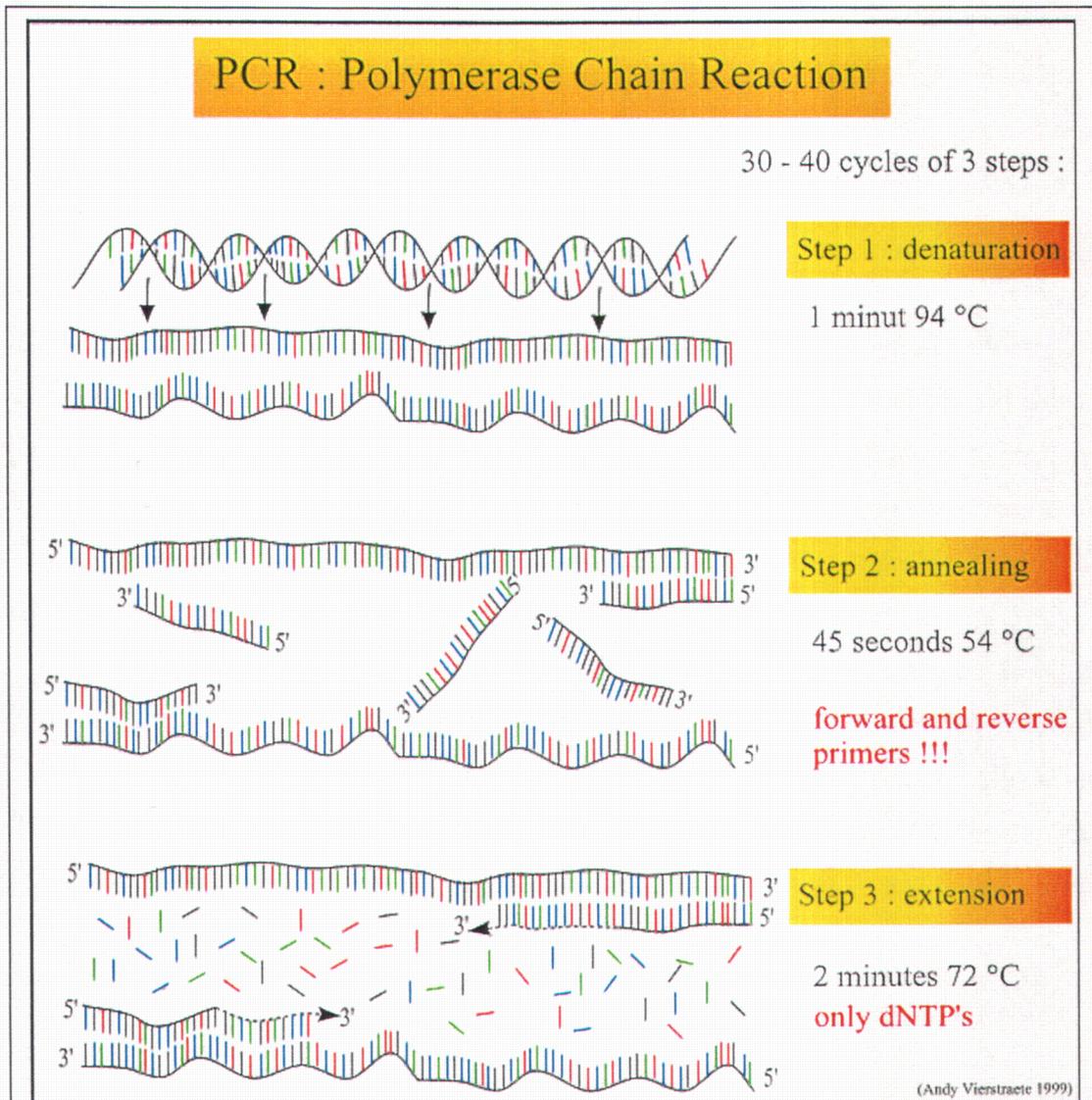
1-de deux amorces oligonucléotidiques appelées « amorces » ou « primers » en anglais.

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 sp.</i> <i>Candida sp.</i> <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).

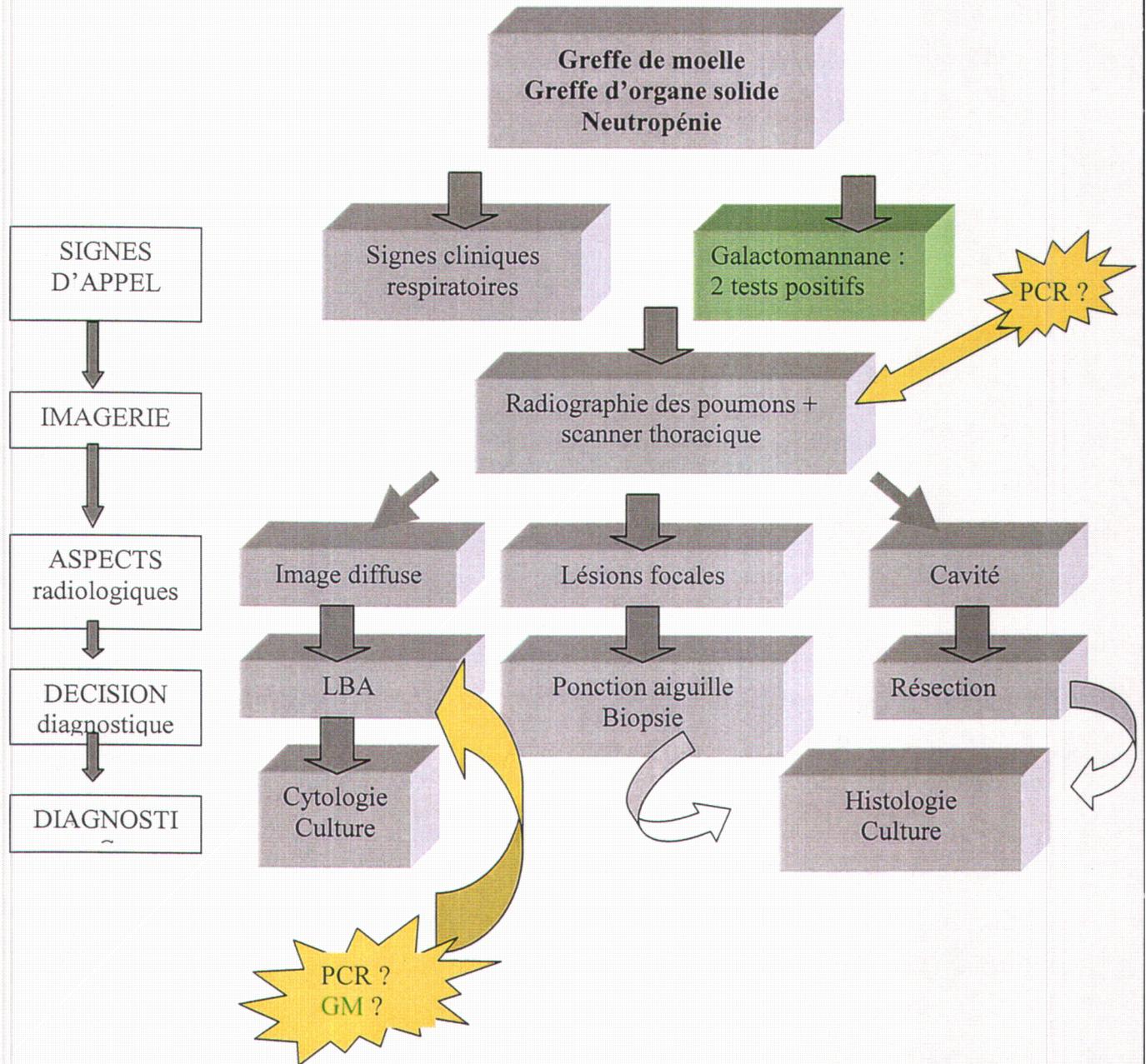
1.6.6. Schéma décisionnel dans le diagnostic des API.

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.

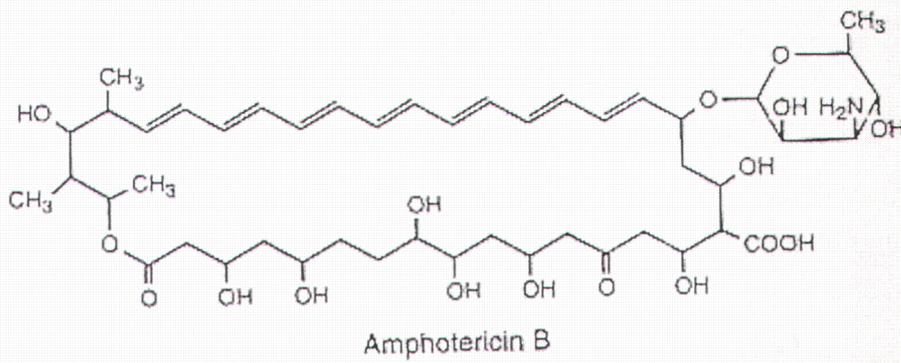


Figure I.12. Formulations lipidiques d'amphotéricine B.

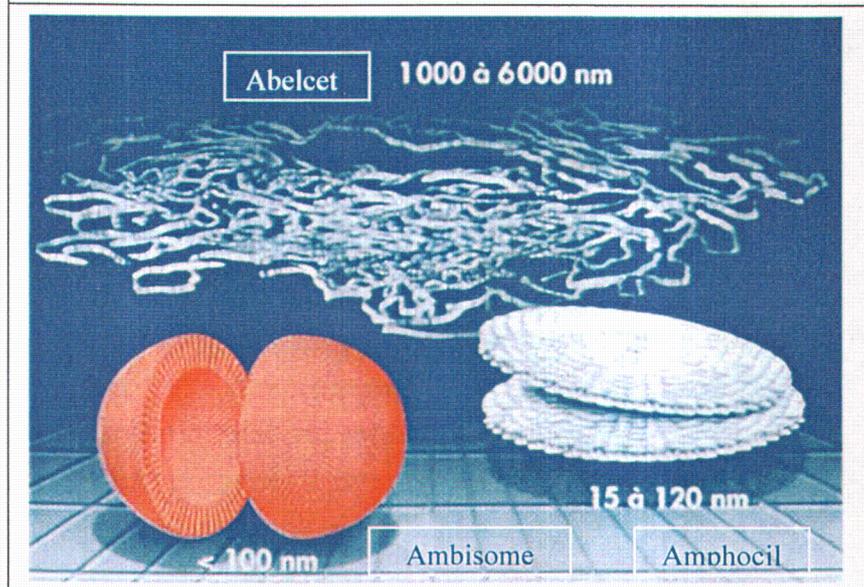


Figure I.13. Ambisome.

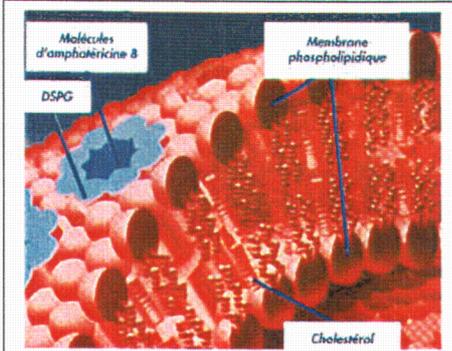


Figure I.14. Abelcet.

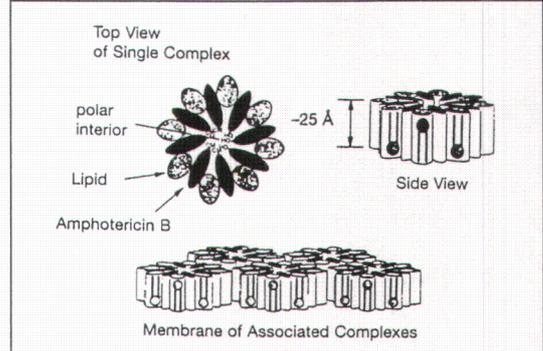
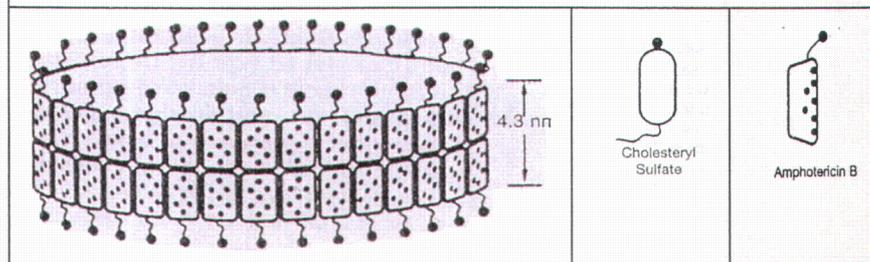


Figure I.15. Amphocil.



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 dimyrystoyl phosphatidylcholine, dimyrystoyl 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).

Figure I.16. Structure moléculaire de l'itraconazole.

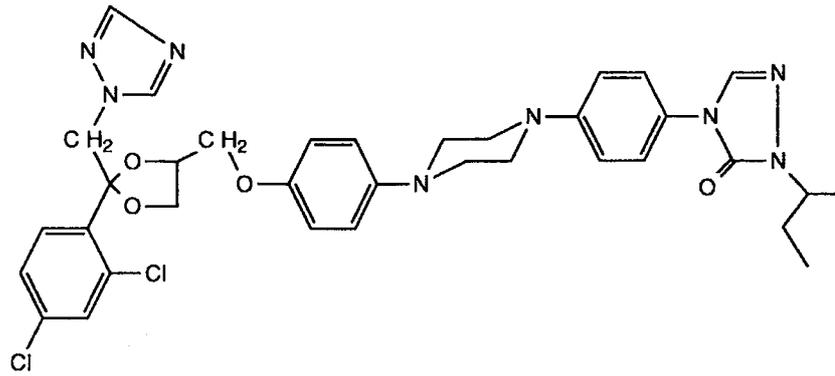


Figure I.17. Voriconazole.

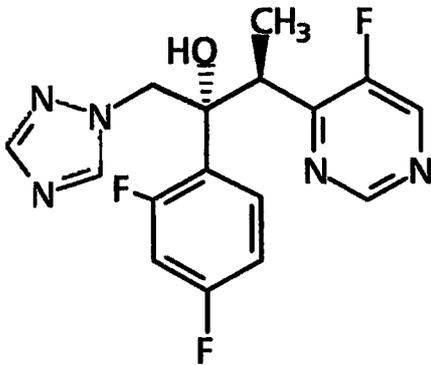
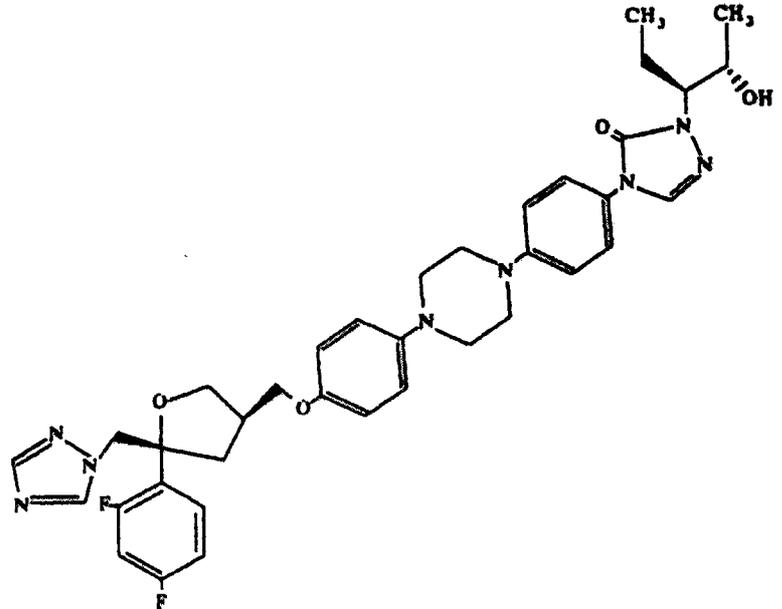
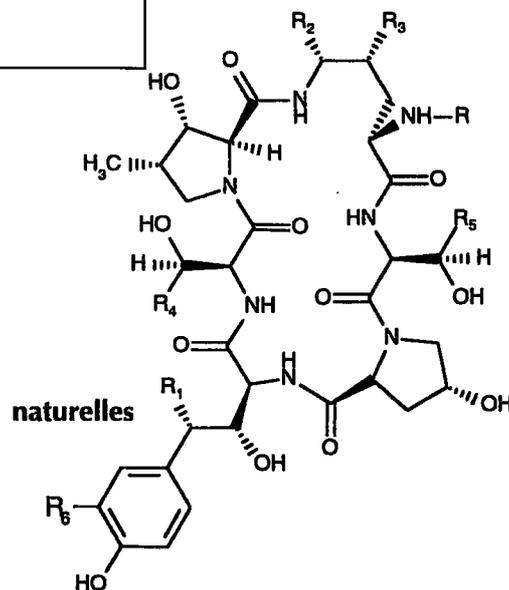


Figure I.18. Posaconazole.



**Figure I.19.
Echinocandines
naturelles.**



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.