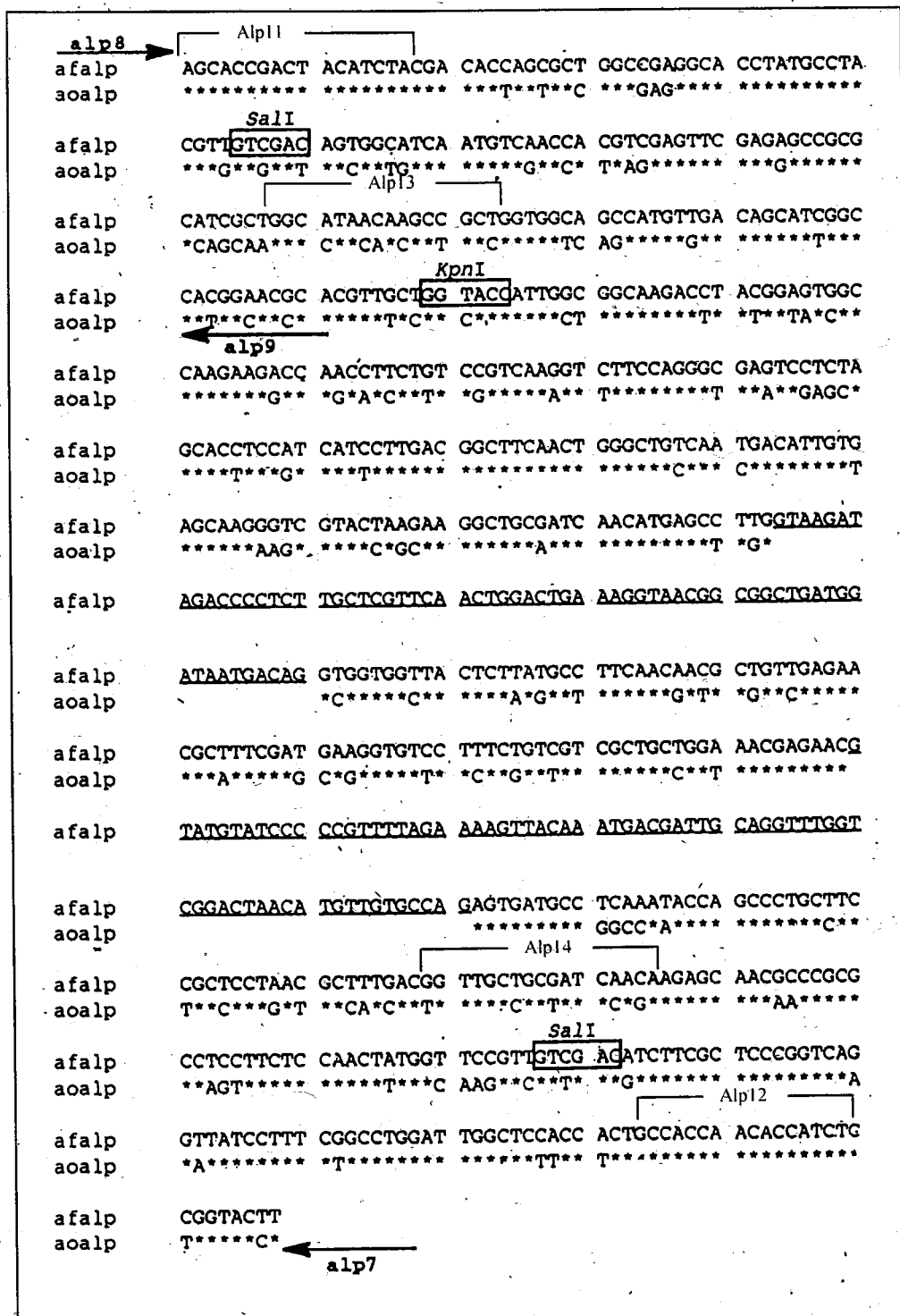


## CHAPITRE II.

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



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

### **2.1. INTRODUCTION.**

#### **2.1.1. Choix de la cible.**

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

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

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

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

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

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

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

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



### **2.1.2. PCR nichée : choix des amorces.**

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

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

## **2.2. MATERIEL ET METHODES.**

### **2.2.1. Cultures fongiques.**

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

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

### **2.2.2. Patients.**

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

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

### 2.2.2.1. Classification des patients selon la co-morbidité.

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

Les 74 patients immunodéprimés l'étaient pour différentes étiologies :

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

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

### 2.2.2.2. Classification des patients selon le risque aspergillaire.

Parmi les 177 patients, trois groupes ont été définis :

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

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

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

#### **Groupe B : colonisation aspergillaire**

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

### **Groupe C : aucune évidence d'aspergillose.**

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

### **2.2.3. Lavages broncho-alvéolaires.**

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

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

### **2.2.4. Protocole d'extraction de l'ADN.**

#### **2.2.4.1. Organisation des « locaux PCR ».**

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

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

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

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

Les trois pièces sont réparties comme suit :

#### **1. Pièce pré-PCR :**

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

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

#### **2. Pièce d'amplification :**

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

#### **3. Pièce pour la PCR nichée.**

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

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

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

Cette étape est cruciale dans la génération des contaminations.

#### **4. Pièce post-PCR :**

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

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

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

#### 2.2.4.2. Extraction de l'ADN génomique des champignons.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

### 2.2.4.4. Dosage de l'ADN extrait.

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

**Le calcul se fait comme suit :**

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

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

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

## **2.2.5. Amplification de l'ADN par PCR.**

### **2.2.5.1. Paramètres de la PCR nichée.**

Les deux PCR successives ont été réalisées selon les mêmes conditions mise à part la concentration de MgCl<sub>2</sub>.

#### **2.2.5.1.1. Préparation du mix.**

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

- Tampon** contenant 10 mM Tris-HCl à pH 8.3, 50 mM KCl et 1.5 mM MgCl<sub>2</sub> (2.25 mM pour la seconde étape de la PCR) (tampon 10x, Takara, Otsu, Japon).
- primers** : 0.4 µM soit 20 pmol, (synthétisés par Eurogentec, Belgique)
- dNTP**: 0.2 mM de chaque déoxynucléotide triphosphate (solution équimolaire à 2.5 mM de dATP, dCTP, dGTP, dTTP (Takara, Otsu, Japon)
- Taq polymérase** (Taq Takara, Otsu, Japon) : 1.25U.

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

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

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

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

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

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

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



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

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

#### 2.2.5.1.2. Cycles d'amplification.

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

**Tableau II.4. Paramètres de la PCR nichée.**

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

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

#### 2.2.6. Amplification du gène de la bêta-globine.

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

### 2.2.6.1. Paramètres de la PCR

#### 2.2.6.1.1. Préparation du mix:

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

-10 mM Tris-HCl à pH 8.3, 50 mM KCl et 1.5 mM MgCl<sub>2</sub> (tampon 10x, Takara, Otsu, Japon).

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

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

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

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

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

#### 2.2.6.1.2. Cycles d'amplification.

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

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

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

## 2.2.6.2. Détection des produits de PCR.

### 2.2.6.2.1. Gel d'agarose.

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

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

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

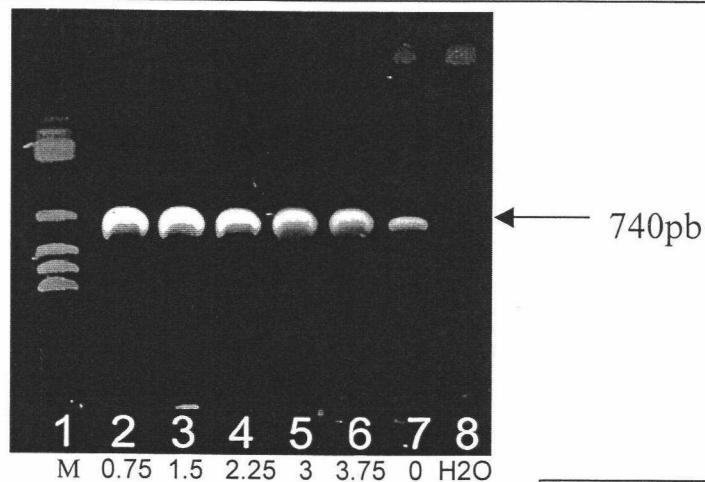
### 2.2.6.2.2. Paramètres de l'électrophorèse.

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

### 2.2.6.2.3. Révélation après électrophorèse.

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

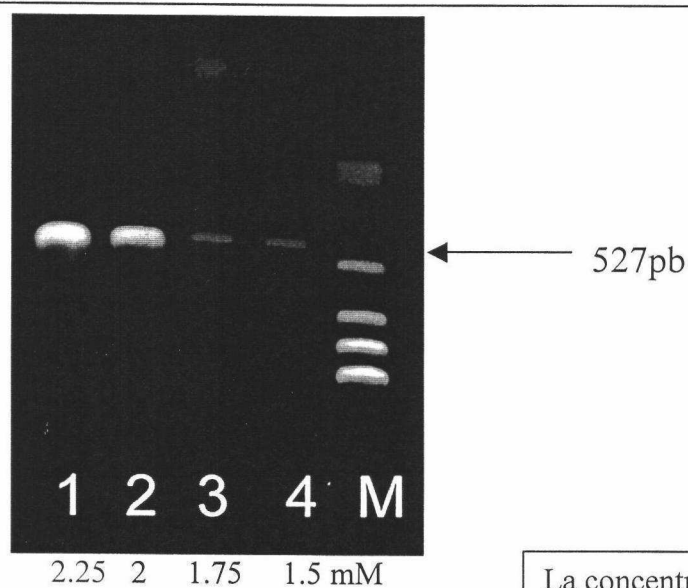
**Photo II.1. Electrophorèse des produits d'amplification d'*A. fumigatus* en fonction de la concentration en  $MgCl_2$ . (1<sup>ère</sup> étape de la PCR nichée, amorces Alp11 et Alp12).**



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

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

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



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

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

## **2.3. RESULTATS.**

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

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

### **2.3.2. Contrôle des paramètres de la 1<sup>ère</sup> étape de la PCR nichée.**

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

#### **2.3.2.1. Température d'hybridation des amorces.**

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

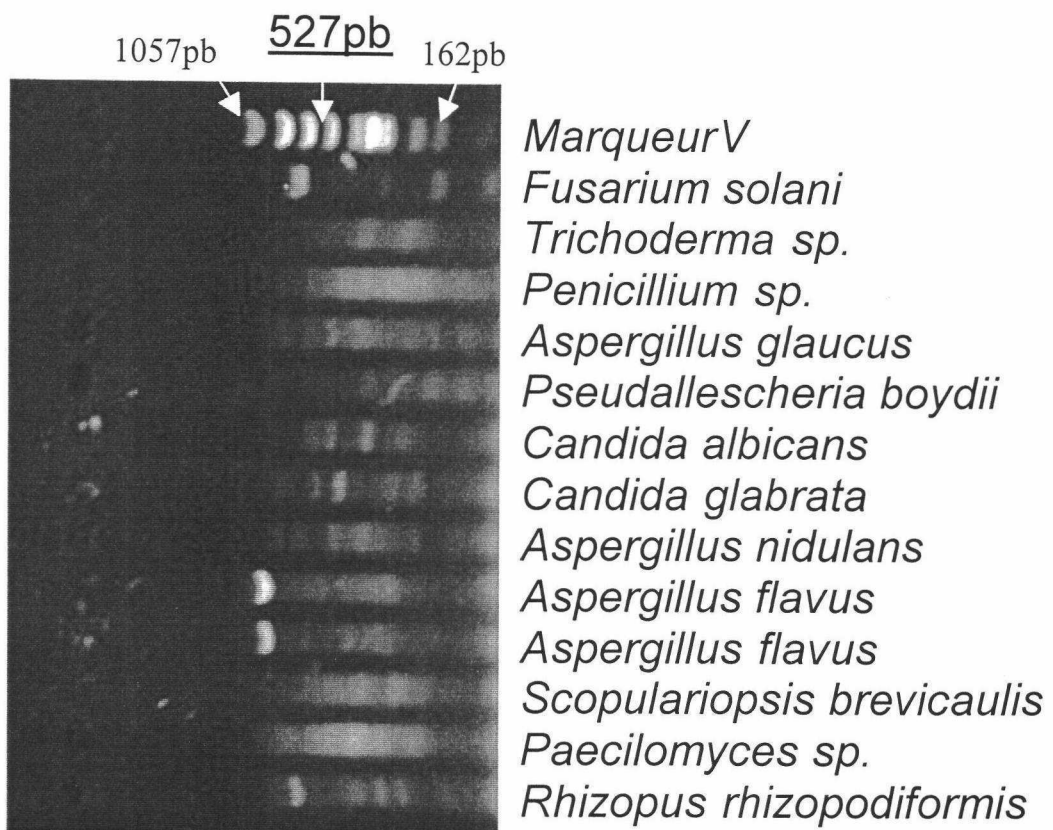
#### **2.3.2.2. Concentration en MgCl<sub>2</sub>.**

La concentration en MgCl<sub>2</sub> a été recontrôlée puisqu'elle dépend de la Taq polymérase utilisée. Nous avons testé de 0 à 3.75 mM (concentration finale dans le mix) et nous avons retenu la concentration de 1.5 mM qui est la concentration de base dans les tampons de PCR (Photo II.1).

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

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

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



### **2.3.3.1. Température d'hybridation des amorces.**

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

### **2.3.3.2. Concentration en MgCl<sub>2</sub>.**

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

### **2.3.3.3. Nombre de cycles d'amplification.**

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

## **2.3.4. Sensibilité de la PCR.**

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

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

## **2.3.5. Spécificité de la PCR.**

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



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

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

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

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

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

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

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

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

### **2.3.6. Evaluation de la PCR sur les lavages bronchoalvéolaires.**

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

### 2.3.6.4. Sensibilité, spécificité et valeurs prédictives.

Les chiffres sont donnés dans le tableau ci-dessous.

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

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

VPP : valeur prédictive positive

VPN : valeur prédictive négative

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

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

## 2.4. DISCUSSION.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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



## CHAPITRE III.



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

#### **3.1. INTRODUCTION**

##### **3.1.1. Choix de l'animal d'expérience.**

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

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

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

##### **3.1.2. Choix de la cible.**

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

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

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

### **3.1.3. Choix des amorces.**

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

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

## **3.2. MATERIEL ET METHODES.**

### **3.2.1. Description du modèle expérimental.**

#### **3.2.1.1. Caractéristiques des lapins.**

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

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

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

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

### 3.2.1.2. Protocole d'immunodépression des lapins.

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

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

Injection de spores d'*A. fumigatus*



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

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

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

La cytarabine a été administrée en sous-cutané à raison de 525mg/m<sup>2</sup> de surface corporelle. Le rapport entre la surface et le poids a été calculé selon la formule :

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

S : surface en cm<sup>2</sup>

K coefficient égal à 8.5 pour le lapin

P poids (g).

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

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

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

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

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

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

#### 3.2.1.3.1. Culture d'*Aspergillus fumigatus*.

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

#### 3.2.1.3.2. Suspension de spores.

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

Le nombre de spores a été compté en cellule de Thoma pour obtenir une concentration de 1 à 5. 10<sup>8</sup> dans un volume de 250 µl.

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



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

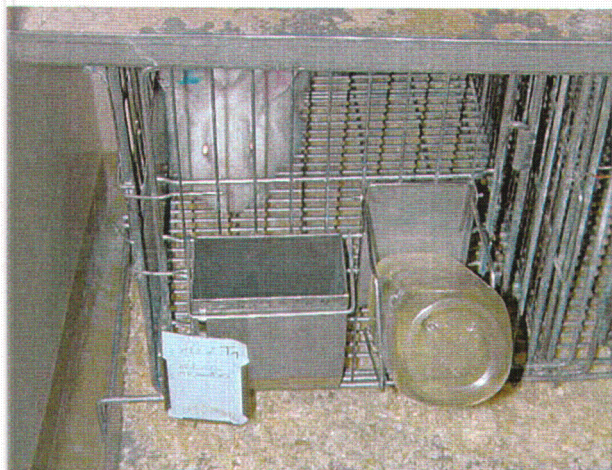


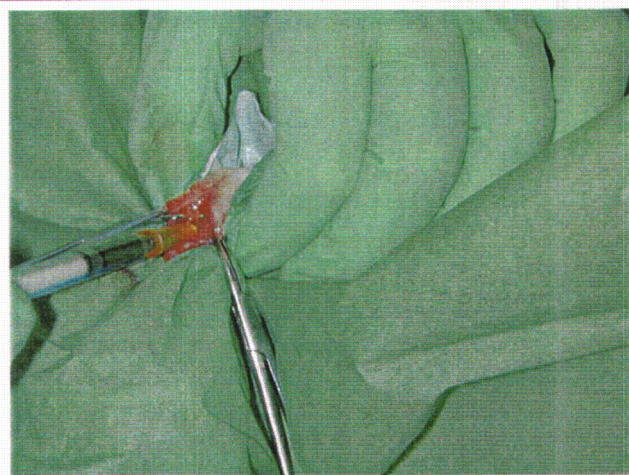
Photo III.2. Cytosar, et antibiotiques injectés au lapin.



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



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





#### 3.2.1.3.3. Injection intra-trachéale des spores.

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

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

#### 3.2.1.4. Protocoles d'anesthésie.

##### 3.2.1.4.1. Anesthésie générale.

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

##### 3.2.1.4.2. Anesthésie gazeuse.

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

##### 3.2.1.4.3. Euthanasie.

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



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

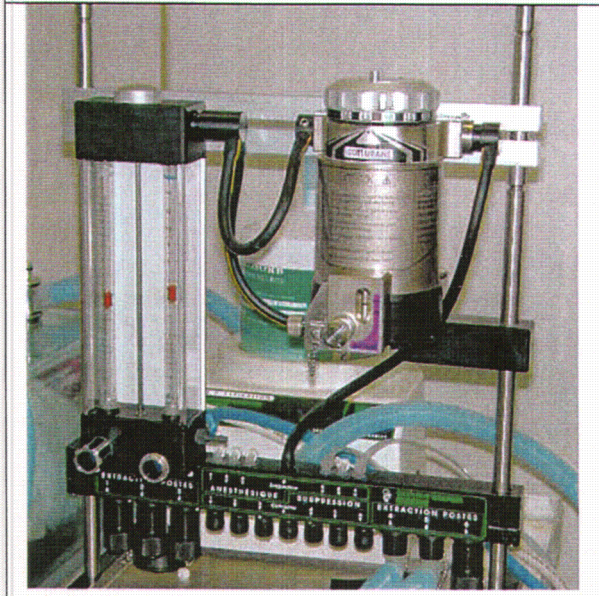


Photo III.6. Cage d'induction dans laquelle le lapin est maintenu de 10 à 15 minutes avant d'être placé sur la table de travail.



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

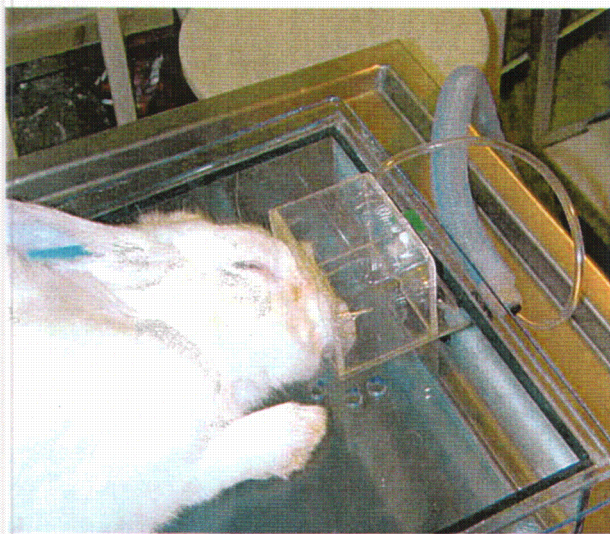
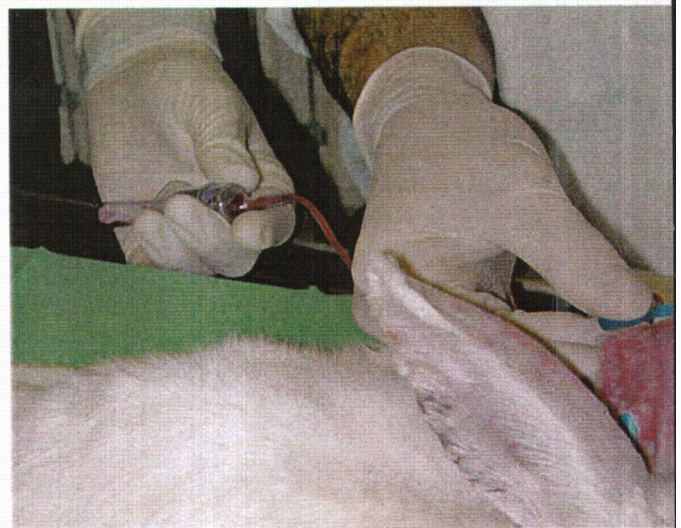


Photo III.8. Prélèvements de sang au niveau de l'oreille du lapin dans des tubes sous vide. Prélèvement au niveau de l'artère ou d'une veine.





### **3.2.2. Prélèvements de sang et analyses réalisées.**

#### **3.2.2.1. Prélèvements de sang.**

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

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

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

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

#### **3.2.2.2. Traitement des tubes de sang.**

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

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

Les tubes de sang anticoagulé étaient aliquotés tels quels pour traitement immédiat (NFS et PCR) ou centrifugés (10 minutes à 3000 trs/min), décantés et le plasma réparti par volume de 200 $\mu\text{l}$  et congelé à  $-80^{\circ}\text{C}$ .

### 3.2.2.3. Numération et formule sanguine (NFS).

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

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

### 3.2.2.4. Antigène galactomannane.

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

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

Le résultat est formulé sous forme d'un index :

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

D.O. = densité optique

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

### 3.2.2.5. Echantillons pour analyse en PCR.

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

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

### **3.2.3. Prélèvements et analyses des organes.**

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

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

#### **3.2.3.1. Analyse histopathologique.**

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

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

#### **3.2.3.2. Culture fongique.**

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

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

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

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

#### **3.2.4.1. Suspension de spores.**

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

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

#### **3.2.4.2. Protocoles d'extraction.**

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

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

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

##### **3.2.4.2.2. Extraction utilisant les colonnes Qiagen®.**

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

##### **3.2.4.2.3. Extraction utilisant le kit Amplicor® sang total.**

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

##### **3.2.4.2.4. Extraction utilisant le Tripure®.**

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

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

#### **3.2.5.1. Lyse des globules rouges.**

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

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

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

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

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

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

Le « réactif d'extraction », appelé ainsi dans le kit Amplicor® Sang Total (Roche diagnostics, Brandburg, USA), est une solution de Tris-HCL contenant 1% de détergent, 0.01% de protéinase K, 7.5 mM de MgCl<sub>2</sub> et 0.05% d'azide de sodium.

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

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

### **3.2.6. Amplification de l'ADN par PCR.**

#### **3.2.6.1. Conditions de la PCR.**

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

#### **Préparation du mélange réactionnel (appelé mix):**

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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



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

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

**\*Cycles d'amplification.**

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

**Tableau III.4. Paramètres de la PCR nichée.**

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

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

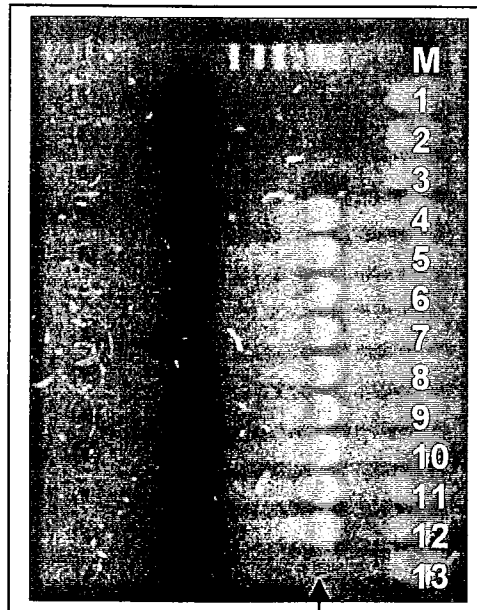
### **3.2.7. Amplification du gène de la bêta-globine.**

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

#### **3.2.7.1. Détection des produits de PCR.**

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

Photo III.9. Electrophorèse des produits d'amplification d'ADN d'*A. fumigatus* (amorces Asp 1, 5, 7, 8). M : marqueur IV. Puits 1 à 3 : H<sub>2</sub>O. Puits 4 à 13 : ADN d'*A. fumigatus* : puits 4 à 6 : 5 ng/ml. Puits 7 à 9: 1 ng/ml. Puits 10 à 12: 0,1 ng/ml. Puits 13: 0.01ng/ml.



357pb

### **3.3. RESULTATS.**

#### **3.3.1. Contrôle des paramètres de la PCR.**

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

##### **3.3.1.1. Température d'hybridation des amorces.**

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

##### **3.3.1.2. Concentration en MgCl<sub>2</sub>.**

Les concentrations en MgCl<sub>2</sub> ont été contrôlées, mais la concentration recommandée (1.5 mM) donne le meilleur résultat sous forme d'une bande spécifique de 357 pb après la PCR nichée.

##### **3.3.1.3. Nombre de cycles.**

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

#### **3.3.2. Sensibilité de la PCR.**

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

### 3.3.3. Spécificité de la PCR.

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

### 3.3.4. Comparaison des protocoles d'extraction.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

### **3.3.5. Paramètres biologiques.**

#### **3.3.5.1. Eléments figurés.**

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

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

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

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

Exp. Expérience; Nb : nombre.

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

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

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

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

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

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

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

### 3.3.5.2. Survie.

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



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

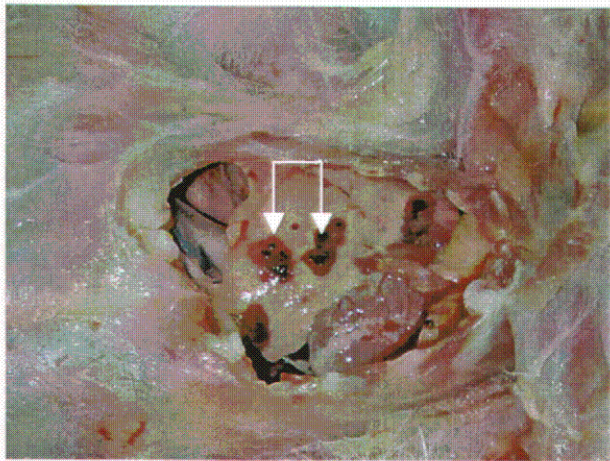
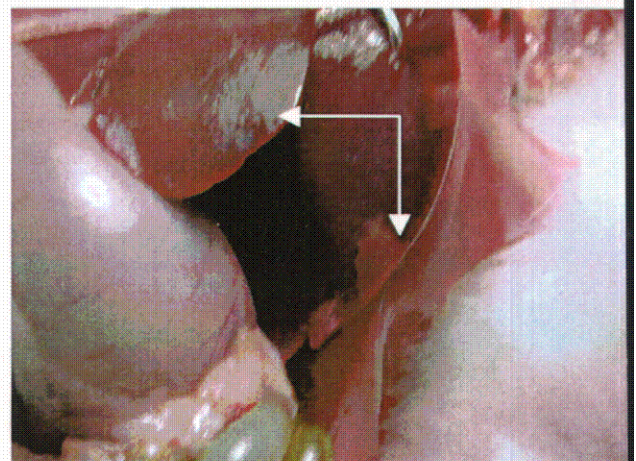


Photo III.11. Prélèvement de foie. Présence de  
zones grisâtres au sein de tissu apparemment  
sain (flèches).



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

### 3.3.5.3. Histologie et culture fongique des organes.

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

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

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

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

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

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



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

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

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

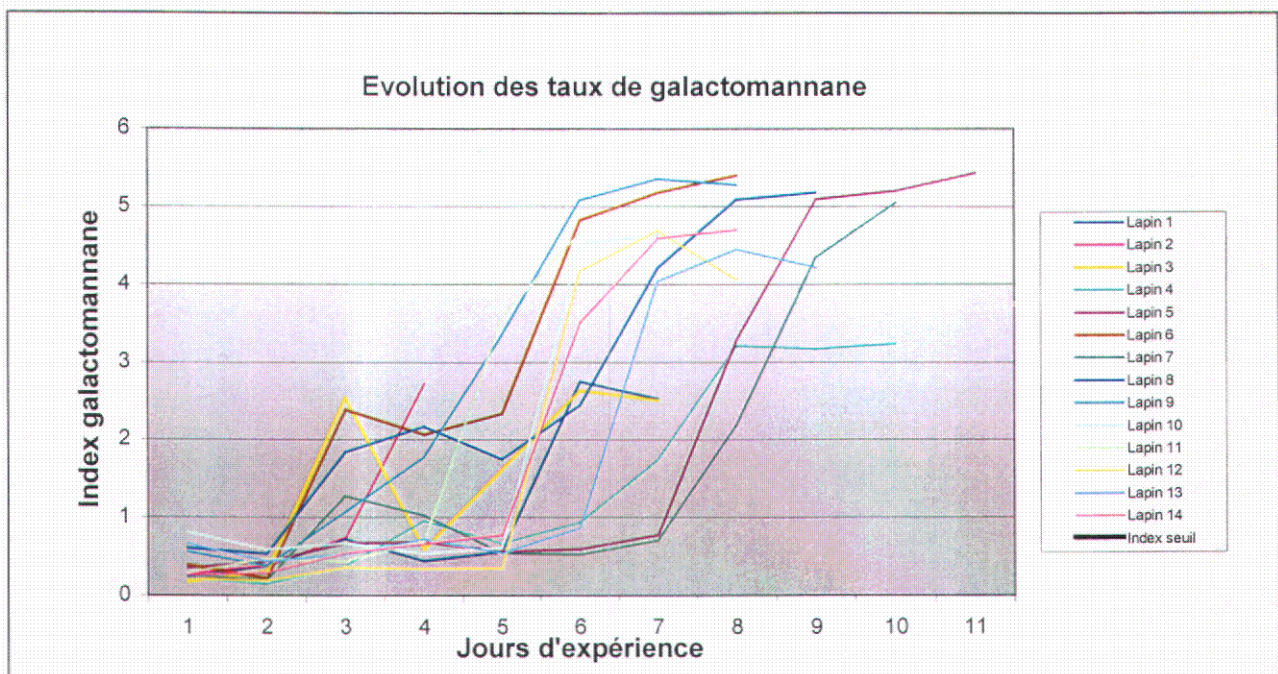
C'est le foie qui est le plus souvent touché, avec 71% de positivité si l'on cumule les résultats de la culture fongique et de l'histologie.

Le cœur et le cerveau sont très rarement atteints.

### 3.3.6. Résultats de l'antigène galactomannane.

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

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



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




### 3.3.7. Résultats de la PCR.

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

Les résultats figurent dans le tableau ci-dessous :

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

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

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

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

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

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

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

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

### 3.3.7.2. Comparaison des résultats PCR versus Galactomannane

Les résultats figurent dans le tableau ci-dessous :

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

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

N : nombre

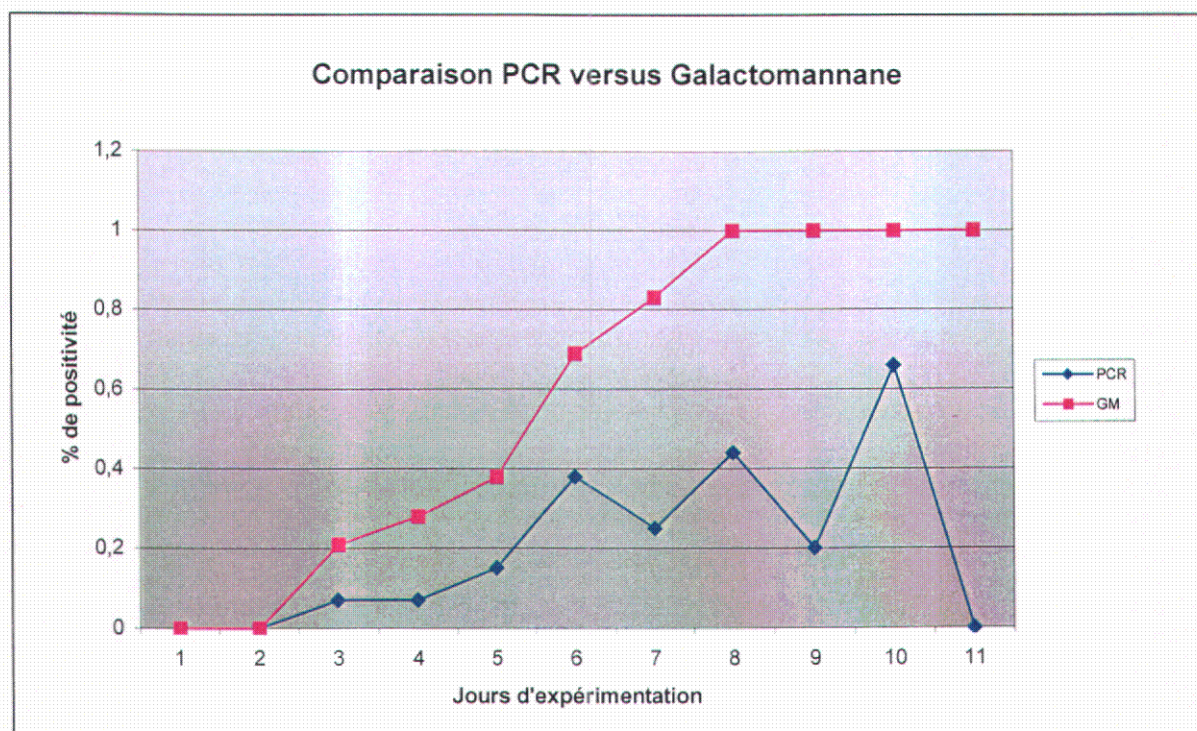
La positivité globale des deux paramètres c'est-à-dire le nombre de résultats positifs (soit 19) sur le nombre de lapins testés (84) est 23% pour la PCR et 56% (49 sur 84) pour le galactomannane.



### 3.3.7.3. Représentation graphique des résultats PCR versus GM.

Les résultats sont présentés dans la figure III.3.

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



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

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

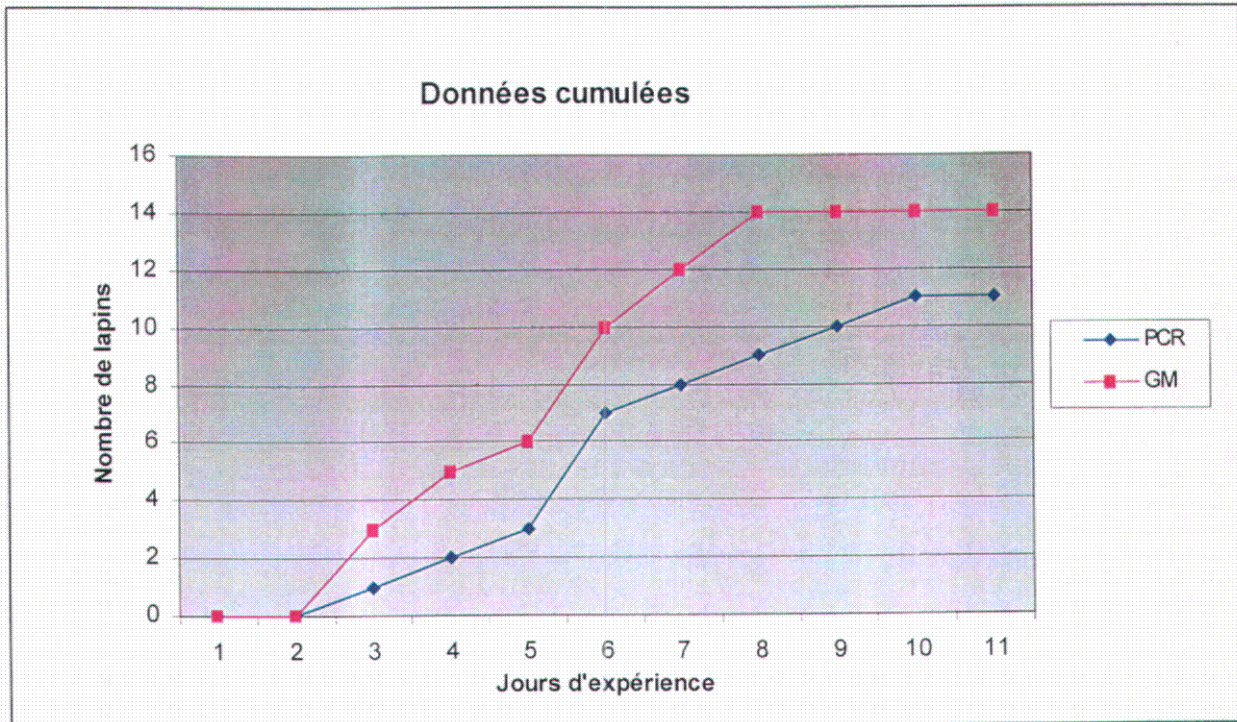
Les résultats de la PCR sont plus inconstants. Le nombre de lapins positifs augmente jusqu'au 4ème jour post-inoculation (J6), puis la courbe s'infléchit pour remonter à J10.

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

### 3.3.7.4. Représentation graphique des résultats cumulés PCR versus GM.

Les résultats sont présentés dans la figure III.4.

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



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

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

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



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

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

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

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

N : nombre

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

### 3.4. DISCUSSION.

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

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

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

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

Quoiqu'il en soit, beaucoup d'auteurs travaillent sur le sérum (24, 54, 75, 174, 177). Celui-ci est en effet plus facile à recueillir et à conserver sans traitement préalable puisqu'il suffit de le congeler après séparation du caillot, contrairement au sang total qu'il faut traiter immédiatement après réception de l'échantillon, ce qui prend beaucoup plus de temps.

Une autre question à débattre est le volume à utiliser pour l'extraction de l'ADN. Les prises d'essai sont assez variables dans la littérature et, pour ceux qui travaillent sur le sérum, les volumes s'étendent de 100 à 600  $\mu$ l. Parmi les auteurs qui travaillent sur sang total, certains recommandent l'utilisation d'une quantité de 3 à 7 ml (45). D'autres, par contre, affirment ne pas avoir observé d'amélioration de la sensibilité de la PCR, malgré l'utilisation de quantités croissantes de 0.1, 0.5 à 2.5 ml de sang mélangé à des concentrations constantes de spores (15). Il est possible que leur seuil de sensibilité soit trop haut pour détecter les faibles quantités circulantes et que l'augmentation de la prise d'essai ne puisse pas améliorer le résultat final. En effet, une publication récente sur la quantification d'ADN aspergillaire chez les patients atteints d'aspergillose invasive, fait état de quantité voisines de 5 à 10 cfu/ml pour les plus basses charges fongiques détectables (88).

Différents procédés d'extraction ont été appliqués pour la détection d'ADN *Aspergillus* par PCR. Ceux qui s'appliquent au sang total sont parmi les plus longs, car ils doivent inclure une étape de lyse des globules rouges et d'élimination de l'hémoglobine qui est susceptible d'inhiber la Taq polymérase. Certains auteurs ont décrit des techniques d'extraction comportant une dizaine d'étapes (45). Elles sont efficaces mais excessivement longues et source de contamination. De plus les tampons à préparer sont nombreux et susceptibles de se contaminer lors de la préparation ou de la conservation et ce, même avec des précautions strictes. C'est pour ces raisons que désormais beaucoup d'auteurs qui travaillent à la fois sur sang total ou sur sérum préfèrent utiliser des techniques commercialisées, telles que les colonnes de gel de silice type QIAmp<sup>®</sup>. Cependant, ces colonnes ne sont pas fermées hermétiquement et lors des diverses centrifugations, des aérosols peuvent se créer et se déposer de façon aléatoire sur les autres colonnes, pouvant entraîner des contaminations.

Au cours de ce travail, quatre techniques d'extraction ont été comparées, et pour chacune d'entre elles une étape préalable utilisant de la lyticase a également été incluse. Cette enzyme qui clive la chitine (N-acétyl galactosamine) permet théoriquement à la protéinase K d'agir plus efficacement

sur la paroi fongique ainsi purifiée de ses polysaccharides. Cependant, dans notre expérience, les résultats n'ont pas été améliorés par l'utilisation de cette enzyme.

Par ailleurs la méthode ayant donné les meilleurs résultats utilise une simple lyse à la protéinase K. C'est une méthode relativement simple et rapide qui a l'avantage d'utiliser uniquement des réactifs commercialisés prêts à l'emploi. Ceci s'effectue totalement en tube fermé et aucune contamination n'a été observée lors des manipulations.

Lors de l'induction de la neutropénie, la réponse des lapins au cytostatique est très variable. La neutropénie ( $<500/\mu\text{l}$ ) est atteinte après 5 jours pour tous les lapins infectés et après 7 jours pour les lapins témoins; de même, la neutropénie profonde est atteinte moins vite pour les lapins témoins (avec encore deux jours de retard sur les lapins témoins). La neutropénie survient donc plus vite chez les lapins infectés que chez les lapins contrôles. Pourtant, *Aspergillus* n'a pas d'effet immunomodulateur décrit dans la littérature, contrairement à d'autres champignons comme *Candida albicans* et *Cryptococcus neoformans*. On peut peut-être expliquer cela par le fait que l'infection fongique entraîne un recrutement accru de neutrophiles au site de l'infection qui n'est pas compensable par une régénération médullaire à cause de l'effet du cytostatique. Ainsi les réserves sont-elles épuisées plus vite chez les lapins infectés.

D'autre part, la sensibilité à l'infection aspergillaire est très variable: certains lapins développent rapidement une maladie invasive fulminante alors que d'autres mettent presque une semaine de plus pour développer une infection fatale. Le lapin 4, qui est négatif pour tous les organes sur le plan histologique et en culture, et le lapin 5, dont aucune coupe histologique examinée n'est positive et par ailleurs dont les résultats en PCR sont tous négatifs, n'offrent pas toutes les garanties pour entrer dans la définition d'aspergillose invasive. L'antigène galactomannane s'est cependant positivé dans les deux cas à J7 (lapin 4) et J8 (lapin 5) et il est demeuré positif jusqu'au décès du lapin dans les deux cas. Pour ces deux lapins, la PCR est positive à J9 et J10 pour le lapin 4, mais est toujours restée négative pour le lapin 5. Ainsi, soit les prélèvements réalisés lors des autopsies n'étaient pas judicieux, soit, en effet, la maladie engendrée n'était pas suffisamment aiguë pour être facilement repérée à l'autopsie. Un plus grand nombre de lapins serait nécessaire pour établir la part des choses avec intervention de vétérinaires anatomopathologistes pour la réalisation de l'autopsie elle-même.

**Tableau III.13. Liste des publications comparant antigène galactomannane et PCR et conclusions.**

Beckers et coll. (15)	Ag > PCR sang total, modèle: rat.
Bretagne et coll. (24)	Ag > PCR serum, (A.I.)
Kawamura et coll. (75)	PCR serum > Ag (A.I., Aspergillomes)
Williamson et coll. (174)	PCR serum > Ag (A.I.)
Kami et coll. (72)	PCR sang > Ag (A.I.)

A.I. : aspergillose invasive. >: plus précoce ; <: moins précoce

Au cours de notre étude, l'antigène galactomannane s'est positivé dans un délai moyen de 3,4 jours, soit un jour plus tôt que la PCR. Mais, contrairement à celle-ci, une fois positif, l'index continue de monter, alors que la PCR donne des résultats variables. Dans un seul cas (lapin 3), les résultats sont tout à fait superposables à l'antigène galactomannane. Ce cas L3 correspond à une aspergillose invasive rénale et hépatique c'est-à-dire une atteinte tissulaire importante.

Dans les autres cas, les profils PCR sont de trois types: soit un résultat précoce isolé (L1, L13); soit des détections tardives survenant les deux derniers jours de vie du lapin soit 8 cas sur 14 (L2, L4, L6, L7, L9, L10, L11, L12); soit des résultats complètement négatifs (L5, L8, L14).

Dans deux cas, L1 et L13, la PCR est positive un jour plus tôt que l'antigène. D'autres auteurs qui ont travaillé sur des suivis de patients infectés ont également mis une évidence que la circulation d'ADN pouvait être fugace (24, 174).

Pour interpréter nos résultats, on peut suggérer qu'une faible quantité de filaments soient relargués à partir du site de l'infection expliquant les faibles quantités d'ADN qui peuvent en être extraites. Cependant, au fil de l'évolution de la maladie, de plus en plus d'éléments fongiques vont être libérés dans le sang périphérique à partir du site infecté, rendant la détection d'ADN plus facile. D'autre part des ADNses circulantes concourent certainement à la destruction du peu d'ADN qui est libéré dans la circulation à partir de ces filaments. L'antigène galactomannane, quand à lui est relargué naturellement à partir de la paroi du champignon dans les milieux biologiques comme le prouvent les études *in vitro*, indépendamment du relarguage d'élément fongiques dans la circulation, ce qui peut expliquer que les concentrations soient proportionnelles à l'importance de la masse fongique et diminuent lorsqu'un traitement efficace est instauré (122).

Cinq études sont publiées comparant la détection de l'antigène galactomannane en ELISA et la PCR *Aspergillus* sur sérum ou sang total (Tableau III.13). Une étude porte sur un modèle de rat (15) tandis que les autres portent soit sur un suivi de patients neutropéniques à risque (24, 72, 174) soit sur des diagnostics ponctuels de patients suspects de développer une aspergillose invasive ou un aspergillome (75). Pour deux des auteurs la PCR, se positive plus tardivement que l'antigène galactomannane (15, 24). Ainsi, ces deux auteurs travaillant sur des milieux différents (sérum et sang total), avec des cibles différentes (ADN mitochondrial (24) et (ARN ribosomal 18S) (15) et sur des modèles différents (humain et rat), aboutissent au même type de résultat. Tous les deux travaillent par ailleurs sur des prises d'essai relativement faibles, à savoir 0.5 ml de sang total (15) et 0.2 ml de sérum (24).

L'étude de Kawamura et coll. (75) est une étude ponctuelle qui concerne principalement des cas d'aspergillomes et non d'aspergillose invasive et n'est donc pas superposable à notre étude.

L'étude de Williamson et coll (174), porte sur un suivi de patients d'unité d'hématologie ayant développé une aspergillose invasive. Elle montre un pourcentage extrêmement élevé de positivité de la PCR (62%), comparativement à l'antigène galactomannane (20 %). Jamais l'antigène ne précède la PCR en positivité. De plus, la PCR reste parfois positive pendant de longues périodes (200 jours pour le patient n°7 de leur étude) même si la positivité est parfois intermittente d'un prélèvement à l'autre chez un même patient. Ces auteurs travaillent sur sérum (600 µl), avec pour cible les gènes de l'ARN ribosomal 23S et la technique d'extraction utilisée est la même que celle de Bretagne et coll. (24), si ce n'est qu'elle utilise de la lyticase préalablement. Il semble donc que le choix de la cible et des amorces soit primordial dans le développement d'une technique très sensible pour la détection d'ADN d'*Aspergillus*.

Dans l'étude de Kami et coll. (72) dont la cible sont les gènes de l'ARN ribosomal 18S, une meilleure sensibilité est observée pour la PCR par rapport à l'antigène galactomannane avec 79% de sensibilité versus 58%. Cependant, un pourcentage non négligeable de faux positifs (8%) est rapporté chez les patients témoins, ce qui n'a pas été observé par les 4 auteurs précédemment cités et qui donne une valeur prédictive positive égale à 79% alors que l'antigène galactomannane a une valeur prédictive positive plus élevée (86%).

Nous n'avons pas réalisé de suivi de patients à risque qui permettrait d'évaluer la place de la PCR dans le diagnostic de l'aspergillose invasive.

En conclusion, les différentes études de la littérature et notre étude sur le lapin permettent de suggérer l'utilisation de la PCR sur sérum ou sang total en complément de la détection de l'antigène galactomannane sérique par ELISA dans le diagnostic de l'aspergillose invasive. L'antigène galactomannane est un test fiable et dont l'index augmente au cours de l'évolution de la maladie dans notre modèle expérimental. Il serait intéressant de réaliser une étude sur l'évolution des deux paramètres au cours du traitement. En effet, à ce jour aucune étude ne permet de prédire l'évolution de la PCR.