



HAL
open science

Étude par cytométrie de flux de la phagocytose de conidies aspergillaires par des leucocytes humains : influence de l'infection à cytomégalovirus

Alexandrine Pastor

► **To cite this version:**

Alexandrine Pastor. Étude par cytométrie de flux de la phagocytose de conidies aspergillaires par des leucocytes humains : influence de l'infection à cytomégalovirus. Sciences pharmaceutiques. 2001. dumas-01247081

HAL Id: dumas-01247081

<https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-01247081>

Submitted on 21 Dec 2015

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il n'a pas été réévalué depuis la date de soutenance.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact au SICD1 de Grenoble : **thesebum@ujf-grenoble.fr**

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10

<http://www.cfcopies.com/juridique/droit-auteur>

<http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm>



1^{er} exemplaire

UNIVERSITE JOSEPH FOURIER
FACULTE DE PHARMACIE DE GRENOBLE

Année : 2001

N° d'ordre :

7067

Etude par cytométrie en flux de la phagocytose de
conidies aspergillaires par des leucocytes humains.
Influence de l'infection à Cytomégalovirus.

Thèse
présentée pour l'obtention du Doctorat en Pharmacie
Diplôme d'état

Alexandrine PASTOR

Née le 20 Décembre 1974 à Annecy (74).

Thèse soutenue publiquement le 14 décembre 2001 à 11h devant le jury
composé de :

Madame le Professeur R. GRILLOT

UFR de Pharmacie Grenoble
Président du jury

Mademoiselle le Docteur D. ALDEBERT

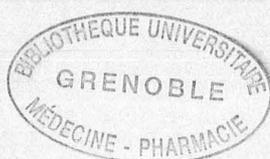
UFR de Pharmacie Grenoble
Directeur de thèse

Monsieur le Docteur J. BOUTONNAT

UFR de Médecine Grenoble
CHU de Grenoble,

Monsieur le Docteur J. P. BRION

UFR de Médecine Grenoble
CHU de Grenoble,



UNIVERSITE JOSEPH FOURIER
FACULTE DE PHARMACIE DE GRENOBLE
Domaine de la Merci 38700 LA TRONCHE

Doyen de la Faculté

M. le Professeur P. DEMENGE

Vice Doyen

M. le Professeur J. CALOP

PROFESSEURS DE PHARMACIE

ALARY	Josette	Chimie Analytique
BAKRI	Abdelaziz	Pharmacie Galénique
BENOIT-GUYOD	Jean-Louis	Chimie Toxicologie et Eco-toxicologie
CALOP	Jean	Pharmacie Clinique et Bio-technique
CUSSAC	Max	Chimie Thérapeutique
DECOUT	Jean-Luc	Chimie Générale
DEMENGE	Pierre	Physiologie/Pharmacologie
DROUET	Emmanuel	Microbiologie-Immunologie
FAVIER	Alain	Biochimie
GOULON	Chantal	Physique-Pharmacie
GRILLOT	Renée	Parasitologie
MARIOTTE	Anne-Marie	Pharmacognosie
RIBUOT	Christophe	Physiologie-Pharmacologie
ROUSSEL	Anne-Marie	Biochimie
SEIGLE-MURANDI	Françoise	Botanique et Cryptogamie
STEIMAN	Régine	Biologie Cellulaire
WOUESSIDJEWÉ	Denis	Pharmacie Galénique

UNIVERSITE JOSEPH FOURIER
FACULTE DE PHARMACIE DE GRENOBLE
Domaine de la Merci 38700 LA TRONCHE

Doyen de la Faculté

M. le Professeur P. DEMENGE

Vice Doyen

M. le Professeur J. CALOP

MAITRES DE CONFÉRENCE DE PHARMACIE

ALDEBERT	Delphine	Parasitologie
ALLENET	Benoît	Pharmacie Clinique
BARTOLI	Marie-Hélène	Pharmacie Clinique et Biotech.
BOUMENDJEL	Ahcène	Pharmacognosie
BURMEISTER	Wilhelm	Physique
CARON	Cécile	Biologie Moléculaire
CHARLON	Claude	Chimie Pharmacie
DELETRAZ	Martine	Droit Economie pharmaceutique
DIJOUX-FRANCA	M.-Geneviève	Pharmacognosie
DURMORT-MEUNIER	Claire	Virologie moléculaire structur
ESNAULT	Danielle	Chimie Analytique
FAURE	Patrice	Biochimie C
FAURE-JOYEUX	Marie	Physiologie-Pharmacologie.
FOUCAUD-GAMEN	Jacqueline	Bactériologie-Virologie.
GEZE	Annabelle	Pharmacotechnie Galénique
GILLY	Catherine	Chimie Thérapeutique
GUIRAUD	Pascale	Biologie cellulaire
GROSSET	Catherine	Chimie analytique
HININGER-FAVIER	Isabelle	LBSO-Biochimie C
KRIVOBOK	Serge	Botanique-Cryptogamie
MORAND	Jean-Marc	Chimie thérapeutique
NICOLLE	Edwige	Chimie organique
PERA	Marie-Hélène	Chimie organique
PEYRIN	Eric	Chimie Analytique Alimentaire
PINEL	Claudine	Parasitologie
RAVEL	Anne	Chimie Analytique
RIBUOT	Diane	Physio. Pharmaco
RICHARD	Jean-Michel	Chimie Toxico-Ecotoxicologie
RIONDEL	Jacqueline	Physiologie Pharmacologie
TAILLANDIER	Georges	Chimie organique
VILLEMAIN	Danièle	Physique Pharmacie
VILLET	Annick	Chimie analytique

UNIVERSITE JOSEPH FOURIER FACULTE DE MEDECINE DE GRENOBLE

Domaine de la Merci 38700 LA TRONCHE

Doyen de la Faculté
Vice-Doyen
Assesseurs

M. le Professeur J. L. DEBRU
M. le Professeur J. P. CHIROSSEL
M. le Professeur J. LEBEAU
M. le Professeur J.P. ROMANET
M. le Professeur B. SELE

PROFESSEURS DES UNIVERSITES - PRATICIENS HOSPITALIERS

@AMBLARD	Pierre	Dermato. Vénérologie	HOSTEIN	Jean	Hépto-Gastro-Entérol.
AMBROISE-THOMAS	Pierre	Parasitologie et Mycol.	JOUK	Pierre-Simon	Biologie du Dévelop. et de la reproduction.
BACHELOT	Ivan	Endocrinologie et Maladies Métaboliques	JUVIN	Robert	Rhumatologie
BACONNIER	Pierre	Biostatistiques et Informatique Méd.	LAVIEILLE	Jean-Pierre	O.R.L.
BARGE	Michel	Neurochirurgie	LE BAS	François	Biophys. et Trait. de l'Image.
BARRET	Luc	Médecine Légale	LEBEAU	Jacques	Stomat. et Chirurgie Maxillo-Faciale
BAUDAIN	Philippe	Radiologie et Imag. Méd.	LEROUX	Dominique	Génétique
BEANI	J.-Claude	Dermatologie, Vénérologie	LETOUBLON	Christian	Chirurgie Générale
BENABID	M.-Louis	Biophys. et Trait. de l'image	LEVERVE	Xavier	Thérapeutique
BENSA	J. Claude	Immunologie	LEVY	Patrick	Physiologie
BERNARD	Pierre	Gynéco et Obstétrique	LUNARDI	Joël	Biochimie et Bio. Molécul.
BESSARD	Germain	Pharma. Fondamentale	MACHIECOURT	Jacques	Cardio. et Maladie Vascul.
BLIN	Dominique	Chir. Thor. et Cardio Vascul.	MAGNE	Jean-Luc	Chir. Vasculaire
BOLLA	Michel	Radiothérapie	MALLON	J. Michel	Méd. du Trav. et Risques Prof.
BOST	Michel	Pédiatrie	MASSOT	Christian	Médecine Interne
BOUCHARLAT	Jacques	Pédo Psychiatrie	MERLOZ	Philippe	Chir. Ortho. et Traumatol.
BOUGEROL	Thierry	Psychiatrie d'adultes	MICLOUD	Max	Maladies Infect. et Trop.
BRAMBILLA	Christian	Pneumologie	MOREL	Françoise	Bioch. et Biol. Moléculaire
BRAMBILLA	Elisabeth	Anatomie et Cyto. Pathol.	MOUILLON	Michel	Ophtalmologie
BRICHON	P.Yves	Chir. Thor. et Cardio.Vasc.	MOUSSEAU	Mireille	Cancérologie
CARPENTIER	Françoise	Thérapeutique	MOUJRET	François	Chir. Plast.Reconst. et Esth.
CARPENTIER	Patrick	Méd. Interne	PASQUER	Basile	Anat. et Cyto.Pathol.
CESBRON	Jean-Yves	Immunologie	PASSAGIA	J.-Guy	Anatomie.
CHAMBAZ	Edmond	Biologie Cellulaire	PAYEN de LA		
CHARACHON	Robert	O.R.L.	GARANDERIE	J. François	Anesthésiologie
CHIROSSEL	J. Paul	Anatomie	PELLAT	Jacques	Neurologie
CINQUIN	Philippe	Biostatistique et Inf. Méd.	PIHELIP	Xavier	Rhumatologie
COLONB	Maurice	Immunologie	PISON	Christophe	Pneumologie
CORDONNIER	Daniel	Néphrologie	POLACK	Benoît	Hématologie
COULOMB	Max	Radiologie et Imagerie Méd.	POLLAK	Pierre	Neurologie
DEBRU	Jean-Luc	Médecine Interne	PONS	Jean-Claude	Gynécologie et Obstétrique
DE GAUDEMARIS	Régis	Méd. du Trav. et des risques professionnels.	RAMBAUD	Pierre	Pédiatrie
DEMONGEOT	Jacques	Biostatistique et Inf. Med.	RAMBEAUD	J. Jacques	Urologie
DESCOTES	Jean-Luc	Urologie	RAPHAEL	Bernard	Stomato. et Chirurgie Maxillo-faciale
DUPRE	Alain	Chirurgie Générale	REYT	Emile	O.R.L.
DYON	J.François	Chirurgie Infantile	ROMANET	J. Paul	Ophtalmologie
FAGRET	Daniel	Bioph et Trait. Image	SARAGAGLIA	Dominique	Chir. Orthopédique et Traumatologique
FAURE	Claude	Anatomie	SCHAERER	René	Cancérologie
FAVROT	Marie C.	Cancerologie CLB Lyon	SEIGNEURIN	Daniel	Histo.embryo.cytogénét. Reproduction
FERRETTI	Gilbert	Radiologie centrale	SEIGNEURIN	J. Marie	Bactério-Viro - Hygiène.
FEUERSTEIN	Claude	Physiologie	SELE	Bernard	Biologie du Développement et de la Reproduction
FOURNET	Jacques	Hépto-Gastro-Entéro.	SOTTO	J. Jacques	Hématologie et Transfusion
FRANCO	Alain	Médecine Interne	STAHL	J. Paul	Maladies Infect. et Trop.
FRANCOIS	Patrice	Épidém., Écon. de la Sant. et Prévention.	VANZETTO	Gérald	Clin./Urgences Cardio.
GARNIER	Philippe	Pédiatrie	VIALTEL	Paul	Néphrologie
GIRARDET	Pierre	Anesth. et Réa. Chir.	VROUSOS	Constantin	Radiothérapie
GOULLIER-FLEURET	Andrée	Parasitologie et Mycologie	VUILLIEZ	J.-Philippe	Biophys./Méd. Nucléaire
GUIDICELLI	Henri	Chirurgie Vasculaire	ZARSKI	J.Pierre	Hépto-Gastro-Entérol.
GUIGNIER	Michel	Réanimation Médicale			
HADJIAN	A.-Jean	Biochimie et biol.Mol			
HAJMI	Serge	Nutrition			
HOMMEL	Marc	Neurologie.			

A mon père, mon ange gardien ...

A ma mère, avec tout mon amour,

A Aurélia,

A Julien,

*A ma famille et mes amis
pour leur patience
et leur soutien inconditionnel.*

Je remercie vivement :

Monsieur le Professeur P. Ambroise-Thomas pour m'avoir accueilli au sein de son laboratoire. Qu'il trouve dans ce travail le témoignage de mon profond respect.

Madame le Professeur R. Grillot, pour avoir accepté de présider le jury de cette thèse, et pour m'avoir permis de mener ce travail dans d'excellentes conditions.

Monsieur le Docteur J. Boutonnat, pour avoir accepté de juger cette thèse, de m'avoir permis d'utiliser le cytomètre du service de cytologie du CHU et surtout pour ces nombreux conseils.

Monsieur le Docteur J.P. Brion pour avoir accepté de juger ce travail.

Mademoiselle le Docteur Delphine Aldebert pour avoir guidé mes premiers pas dans la recherche, pour ses conseils, sa patience, et la confiance qu'elle m'a témoignée.

Je tiens à remercier également Madame le Docteur P. Pavese pour m'avoir fournie les prélèvements de patients

Et un grand merci à l'ensemble de l'équipe du laboratoire de Parasitologie Mycologie de l'hôpital et de la faculté, pour leur nombreux conseils, leur sympathie et leur bonne humeur.

Je tiens à remercier également la Fondation pour la Recherche Médicale pour le soutien financier qu'ils m'ont apporté au cours de mon DEA, duquel une partie de ce travail s'inspire.

Sommaire

ABREVIATIONS	10
INTRODUCTION	11
1. <i>Aspergillus fumigatus</i>	14
1.1. Genre <i>Aspergillus</i>	14
1.1.1. Historique	14
1.1.2. Classification	14
1.1.3. Description	15
1.2. Mode de contamination et maladies respiratoires aspergillaires	17
1.2.1. L'aspergillome	17
1.2.2. Aspergillose broncho-pulmonaire allergique	17
1.2.3. Aspergillose chronique nécrosante	17
1.2.4. Aspergillose pulmonaire invasive	18
1.3. Défense anti-aspergillaires	19
1.3.1. La clairance muco-ciliaire	19
1.3.2. La réponse immunitaire	19
1.3.3. Rappel sur le « burst oxydatif »	19
2. <i>Facteurs favorisant la survenue d'une aspergillose.</i>	25
2.1. L'environnement	25
2.2. Facteurs propres au micromycète	26
2.2.1. Accessibilité au site infectieux	27
2.2.2. Capacité d'adaptation	27
2.2.3. Molécules impliquées dans la pathogénicité	27
2.2.4. Epidémiologie moléculaire	29
2.3. Facteurs conditionnants la réceptivité de l'hôte	31
2.3.1. Neutropénie profonde	32
2.3.2. Allogreffe de moelle osseuse	32
2.3.3. Transplantation d'organe et corticothérapie au long cours à forte dose	33
2.3.4. Infection à cytomégalovirus	33
3. <i>L'aspergillose invasive</i>	39
3.1. Différentes manifestations pathologiques de l'aspergillose invasive	39
3.1.1. L'aspergillose pulmonaire invasive	39
3.1.2. Autres formes d'aspergillose invasive	40
3.2. Présentation clinique	41
3.3. Traitement	41
3.3.1. Amphotéricine B	42
3.3.2. Itraconazole	44
3.3.3. Voriconazole	45
3.3.4. Caspofungine	46

MATERIEL ET METHODES	47
1. Etude du burst oxydatif des leucocytes humains.	49
1.1. Matériel	49
1.1.1. Réactifs et fluorochromes	49
1.1.2. Les souches d' <i>Aspergillus</i> et les cellules	50
1.2. Protocole	53
1.3. La cytométrie en flux	55
1.3.1. Principe	55
1.3.2. Un cytomètre	55
1.3.3. Les paramètres analysés	56
1.3.4. Analyse par cytométrie	57
1.4. Analyse stastistique	58
2. Etude de l'adhérence et de l'expression de récepteurs	59
2.1. Matériel	59
2.1.1. Cellules THP-1	59
2.1.2. Cellules MRC5	59
2.1.3. La souche virale	60
2.1.4. PMA	60
2.1.5. Anticorps	60
2.2. Méthodes	61
2.2.1. Production de virus	61
2.2.2. Infection par le HCMV de cellules THP-1	63
2.2.3. Détection des cellules infectées par immunofluorescence indirecte	64
2.2.4. Etude de l'adhérence des conidies aux macrophages	65
2.2.5. Etude de l'expressions des intégrines CR1, CR3, CR4 à J11	66
RESULTATS	69
1. Etude du burst oxydatif des leucocytes	70
1.1. Mise au point de la méthode de cytométrie en flux	70
1.1.1. Choix du protocole	70
1.1.2. Concentration en conidies	70
1.1.3. Précision de la méthode	72
1.1.4. Intervalle de réponse	72
1.2. Réponse selon le stade et l'état des conidies	74
1.2.1. Conidies tuées et conidies prégermées tuées	74
1.2.2. Conidies vivantes et conidies tuées	76
1.2.3. Conidies vivantes et conidies vivantes opsonisées	76
1.3. Réponse selon les souches d'<i>Aspergillus fumigatus</i> et le génotype	77
1.3.1. Souches typées du laboratoire	77
1.3.2. Souches typées EBGA et souches référencées	80

1.4. Réponse selon les espèces d' <i>Aspergillus</i>	83
1.5. Etude de la réponse oxydative chez différents patients	85
2. Influence du HCMV sur l'adhérence des conidies aspergillaires aux macrophages et sur l'expression des récepteurs au complément	87
2.1. Infection des cellules THP-1 différenciées par le HCMV	87
2.2. Adhérence des conidies	89
2.3. Expression des intégrines	91
DISCUSSION	94
1. Etude du burst oxydatif des leucocytes	95
1.1. Mise au point de la méthode par cytométrie en flux	95
1.2. Variabilité individuelle	97
1.3. Réponse selon l'état et le stade des conidies	97
1.4. Réponse selon la souche et le génotype	98
1.5. Réponse selon l'espèce	100
1.6. Réponses oxydatives des différents patients	101
2. Etude de l'influence de l'infection à HCMV sur l'adhérence et l'expression de récepteurs	102
2.1. Adhérence	102
2.2. Expression des intégrines CR3 et CR4	102
CONCLUSION	104
BIBLIOGRAPHIE	107
ANNEXES	113

Abréviations

API : Aspergillose Pulmonaire Invasive
HEPA : High-Efficiency Particulate Air
AI : Aspergillose Invasive
ABPA : Aspergillose Broncho-Pulmonaire Allergique
PNN : PolyNucléaires Neutrophiles
IL : InterLeukines
TNF : Tumor Necrosis Factor
HCMV : Cytomégalovirus Humain
AmB : Amphotéricine B
AMM : Autorisation de Mise sur le Marché
ATU : Autorisation Temporaire d'Utilisation
PBS : Phosphare Buffer Saline
PMA : Phorbol Myristate Acetate
DMSO : DiMethylSulfOxyde
DHR-123 : DiHydroRhodamine 123
IP : Iodure de Propidium
SSDP : Sequence Specific DNA Primers
IHEM : Institute of Hygiène and Epidémiology Mycology of Belgium
RAPD : Random Amplified polymorphic DNA.
MLEE : Multilocus Enzyme Electrophoresis
EBGA : European Group of Research on Biotypes and Genotypes of *A. fumigatus*
ERO : Espèces Réactives de l'Oxygène.
CMF : Cytométrie en flux
FSC : Forward SCatter
SSC : Side SCatter
IMF : Intensité Moyenne de Fluorescence
SVF : Sérum de Veau Fœtal
DMEN : Dulbeccos Modified Eagle Medium
FITC : IsoThioCyanate de Fluorescéine
u.a. : unité arbitraire
IRF : Index Relatif de fluorescence
ufp : unité formant plaque

Introduction

Aspergillus fumigatus est un micromycète très largement répandu dans l'environnement. Sa niche écologique préférentielle est la matière végétale qu'il contribue à dégrader. Ce champignon se propage dans la nature par l'émission de très nombreuses conidies de petites tailles, aisément disséminées par le vent et facilement inhalables. Chez le sujet sain, les diverses lignes de défense, telle l'épuration bronchique muco-ciliaire, divers facteurs humoraux et surtout les cellules phagocytaires de l'immunité non-adaptative (macrophages et polynucléaires) permettent l'élimination rapide de ces conidies (Latzgé, 1999). En revanche chez des patients présentant des altérations des fonctions phagocytaires (qualitative et/ou quantitative) *A. fumigatus* est un « opportuniste » redoutable car il peut être à l'origine d'aspergillose pulmonaire invasive (API) ou d'aspergillose disséminée, et notamment au cours des neutropénies profondes et prolongées et des corticothérapies prolongées. Dans 70% des cas, l'API est d'origine nosocomiale (Lebeau *et al.*, 1996) et sa morbidité dépend de la pathologie sous-jacente, du stade évolutif de la maladie, du traitement et des facteurs environnementaux (Conférence de consensus, 2000).

En milieu hospitalier, prévenir la survenue de l'API chez les patients à risque est très difficile car il n'y a pas de chimioprophylaxie efficace. La seule prévention applicable consiste à soustraire ces malades à l'exposition aux conidies aspergillaires par hébergement dans des secteurs hautement protégés (High-Efficiency Particulate Air : HEPA, flux laminaire), malheureusement réservés à des patients à très haut risque (chimiothérapie des leucémies aiguës, allogreffes de moelle osseuse).

Il est donc essentiel d'arriver à définir chez les patients un facteur de risque individuel afin de prédire la survenue éventuelle d'une aspergillose invasive. En effet si l'on sait que la fonction phagocytaire liée aux macrophages alvéolaires et aux polynucléaires neutrophiles joue chez l'hôte immunocompétent un rôle capital dans la défense anti-aspergillaire, de très nombreuses inconnues persistent dans les mécanismes intimes de la phagocytose et de la destruction des conidies (« burst oxydatif »).

Notre objectif est d'étudier, sur un modèle *in vitro* et à partir d'échantillon de sang total de sujets immunocompétents, certaines étapes essentielles de la phagocytose des conidies aspergillaires : l'adhérence (étape préalable à l'internalisation des conidies) et le « burst oxydatif ». Le but final de ce travail original est donc de définir un indice permettant « de quantifier et de qualifier » la capacité de phagocytose d'un patient donné et ainsi d'obtenir une notion prédictive de sa réponse à une stimulation aspergillaire et du risque éventuel de développer une infection aspergillaire.

1. Aspergillus fumigatus et aspergillose invasive

1.1. Le genre *Aspergillus*

1.1.1. Historique

La description du genre *Aspergillus* a été réalisée en 1729 par Peir Antonio Micheli, directeur du jardin des plantes à Florence, qui choisit cette appellation d'après l'évidente ressemblance entre la tête aspergillaire et le goupillon liturgique (Grillot *et al.*, 1996). La prise de conscience de la capacité de ces moisissures a provoqué chez l'homme une infection fulminante ne date que de la seconde moitié du vingtième siècle. Il y a eu à ce jour, approximativement 150 espèces d'*Aspergillus* décrites, dont seize sont reconnues comme des pathogènes potentiels chez l'homme (Denning, 1997). *Aspergillus fumigatus* est responsable de la majorité de ces infections (90% des cas), viennent ensuite *A. flavus* (5 à 10%), *A. niger* (2 à 3%) puis *A. nidulans*, *A. terreus*...(Verweij *et al.*, 1997).

1.1.2. Classification

Les *Aspergillus* sont des champignons filamenteux microscopiques dont la classification repose en pratique sur leur mode de reproduction (sexuée ou asexuée). La plupart se reproduisent de façon asexuée. Ils font partie des Deutéromycètes (champignons imparfaits), de la classe des Hyphomycètes, de la famille des Moniliaceae et du genre *Aspergillus* (Kwon-Chung *et al.*, 1992).

Le genre *Aspergillus* compte 8 espèces possédant une reproduction sexuée comme *A. nidulans* (*Emericella nidulans*) : celles-ci font partie des Ascomycètes et appartiennent à l'ordre des Eurotiales et à la famille des Trichocomaceae (Kwon-Chung *et al.*, 1992).

1.1.3. Description

En culture sur milieu Sabouraud, les colonies d'*A. fumigatus* sont planes, poudreuses (texture liée à l'abondance des conidies) et se colorent en vert avec la production des conidies, devenant gris fumé en quelques jours. Le revers de la colonie est de couleur très variable, d'incolore à rouge foncé en passant par le jaune, vert ou brun (Kœnig, 1995). A l'examen microscopique, on note que la tête aspergillaire est compacte.

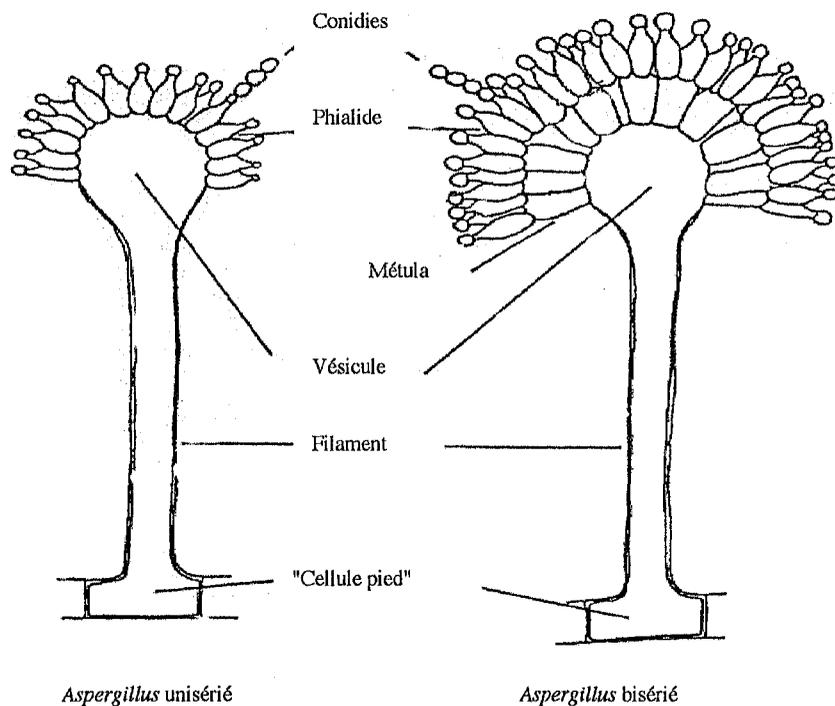
Les champignons du genre *Aspergillus* sont constitués de deux parties distinctes : le mycélium et la tête aspergillaire. Le mycélium est formé de nombreux filaments septés et ramifiés. A partir d'une cellule particulière, appelée « cellule-pied », se dresse à angle droit un filament non cloisonné, appelé conidiophore (Figure 1).

Figure 1 : Photographie au microscope électronique à balayage d'une tête aspergillaire (Confrontation mycologique Jensen-Cilag, Décembre 1994, n° 2)



Sur l'extrémité du conidiophore, souvent évasée ou elliptique, se forment des phialides. Selon les espèces, les phialides sont portées soit directement sur le renflement, la moisissure est alors dite unisériée (*A. fumigatus*), soit sur une couche intermédiaire de cellules spécialisées appelées « métula », la moisissure est alors dite bisériée (*A. flavus*) (Delorme *et al.*, 1997). Du col des phialides naissent des conidies unicellulaires arrondies, de 2 à 5 μm de diamètre. La première conidie formée à partir de la paroi interne des phialides est immédiatement repoussée par la seconde, et ainsi de suite. Il s'ensuit une série de conidies disposées en chaînettes facilement détachables. L'ensemble : vésicule du conidiophore, phialides et la colonne de conidies, constitue la tête aspergillaire, structure qui caractérise le genre *Aspergillus* (Latgé *et al.*, 1994) (Figure 2).

Figure 2 : Schéma représentant *Aspergillus*. (*Aspergillus, biologie and industrial applications*, Bennett J.W. & Klich M.A., Butterworth-Heineman, 1992)



1.2. Mode de contamination et maladies respiratoires aspergillaires

A. fumigatus est un micromycète saprophyte dont les conidies hydrophobes sont facilement dispersées dans l'air. La voie de contamination la plus fréquente est la voie aérienne, la porte d'entrée du champignon chez l'homme se faisant par inhalation des conidies. L'appareil broncho-pulmonaire est le plus souvent concerné par les maladies aspergillaires (70 à 80% des cas d'AI) mais les aspergilloses sinusiennes sont également fréquentes. Plus rarement, une contamination directe peut être responsable d'une infection cutanée, telles que les otomycoses du conduit auditif et les surinfections de lésions cutanées (brûlures) (Anofel, 1998).

L'inhalation de conidies peut conduire dans certains cas à des infections variées. Cependant, quatre formes principales sont classiquement individualisées (Grillot *et al.*, 1996).

1.2.1. L'aspergillome ou «truffe aspergillaire»

Il est la conséquence de la colonisation sans invasion de cavités broncho-pulmonaires ou pleurales préexistantes (ancienne caverne tuberculeuse, kyste pulmonaire...). Cette mycose, qui survient chez des malades immunocompétents, ne donne pas lieu à une dissémination (Anofel, 1998).

1.2.2. L'aspergillose broncho-pulmonaire allergique (ABPA)

Elle est une broncho-pneumopathie d'origine immuno-allergique, déclenchée par l'exposition répétée à l'inhalation des conidies aspergillaires chez des sujets asthmatiques ou mucoviscidosiques (Grillot, 1996). Elle correspond à des manifestations d'hypersensibilité du tractus broncho-pulmonaire vis-à-vis de l'antigène aspergillaire.

1.2.3. L'aspergillose chronique nécrosante (semi-invasive)

Elle survient chez des patients modérément immunodéprimés (diabète, corticothérapie à faible dose au long cours) ou dans un contexte de maladie broncho-pulmonaire chronique (mucoviscidose). La maladie peut évoluer vers l'aspergillose pulmonaire invasive ou l'aspergillome (Denning, 1997).

1.2.4. L'aspergillose pulmonaire invasive (API)

Elle atteint les patients immunodéprimés. *Aspergillus* envahit le parenchyme pulmonaire de proche en proche. Après effraction vasculaire, le champignon est susceptible de se propager dans tout l'organisme et de provoquer, dans 20 à 30% des cas une atteinte cérébrale, cardiaque, cutanée ou osseuse (Kœnig, 1995) (Figure 3).

*Figure 3 : Biopsie cérébrale : hyphes typiques d'A. fumigatus.
(G X 480 : coloration Musto) (Service de Parasitologie, CHU-Grenoble).*



1.3. Les défenses anti-*Aspergillus* de l'hôte

Aspergillus est un champignon naturellement peu pathogène car les moyens de défense de l'organisme, vis-à-vis de l'agresseur, sont très efficaces en l'absence d'immunodépression. Plusieurs lignes de défense mécanique et cellulaire sont successivement mises en jeu afin d'éliminer ou de neutraliser les micro-organismes inhalés par l'homme (Aldebert *et al.*, 2001) (Figure 4 et 5).

1.3.1. La clairance muco-ciliaire

Après piégeage dans le mucus de l'épithélium bronchique, les conidies remontent grâce aux mouvements des cils vibratiles et sont éliminées par le tractus digestif. De ce fait, seule une petite partie des conidies inhalées gagne les territoires broncho-alvéolaires (Latgé, 1999).

1.3.2. La réponse immunitaire

Elle représente le mécanisme de défense le plus important lors d'infections aspergillaires, et de l'aspergillose invasive en particulier. Elle s'exerce sur tous les stades du développement du champignon, faisant intervenir plusieurs types de cellules :

- **Les macrophages alvéolaires** vont phagocyter les conidies récemment inhalées, inhiber leur germination et les tuer.
- **Les polynucléaires neutrophiles (PNN) et les monocytes** peuvent tuer *in vitro* les hyphes mais aussi les conidies qui auraient échappé à la clairance muco-ciliaire et aux macrophages (Rex *et al.*, 1990 ; Latgé, 1999).
- **Les lymphocytes** seront, quant à eux, responsables d'une immunité spécifique, faisant intervenir le système des anticorps, et la sécrétion de cytokines (Levitz *et al.*, 1985 ; Slight *et al.*, 1996).

Figure 4 : Mécanismes d'élimination des conidies aspergillaires inhalées

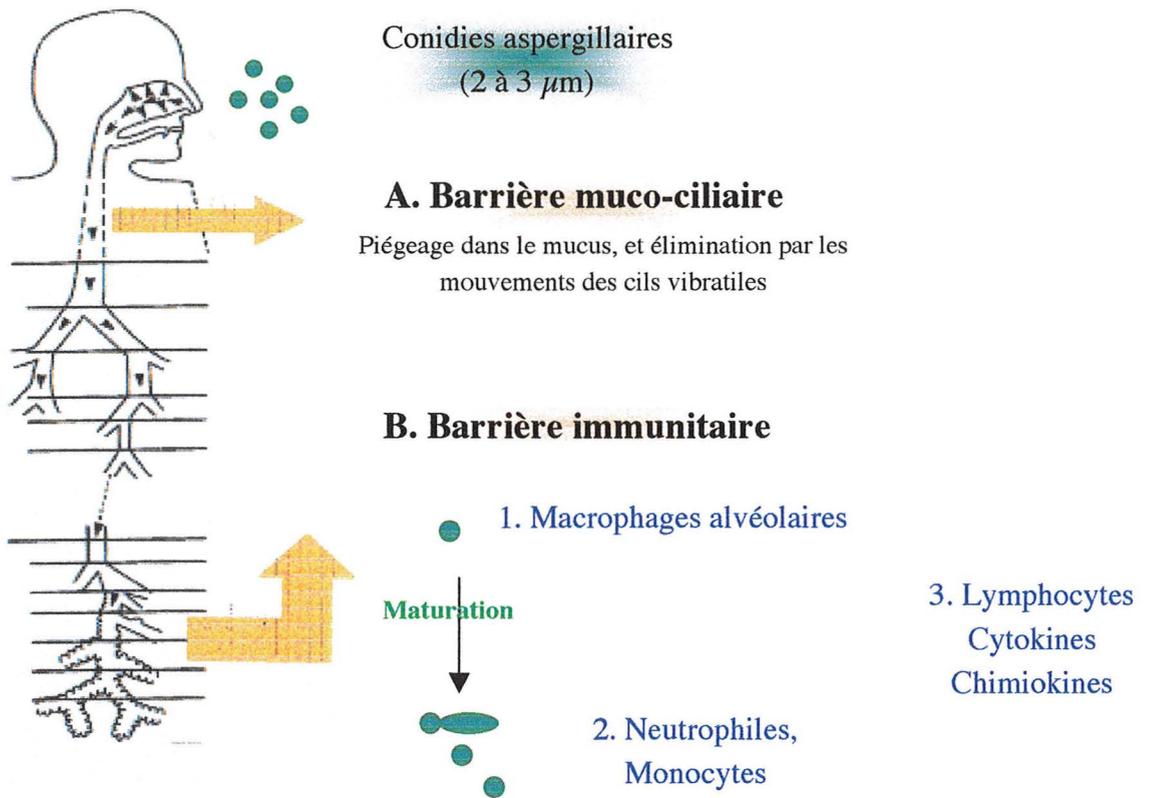
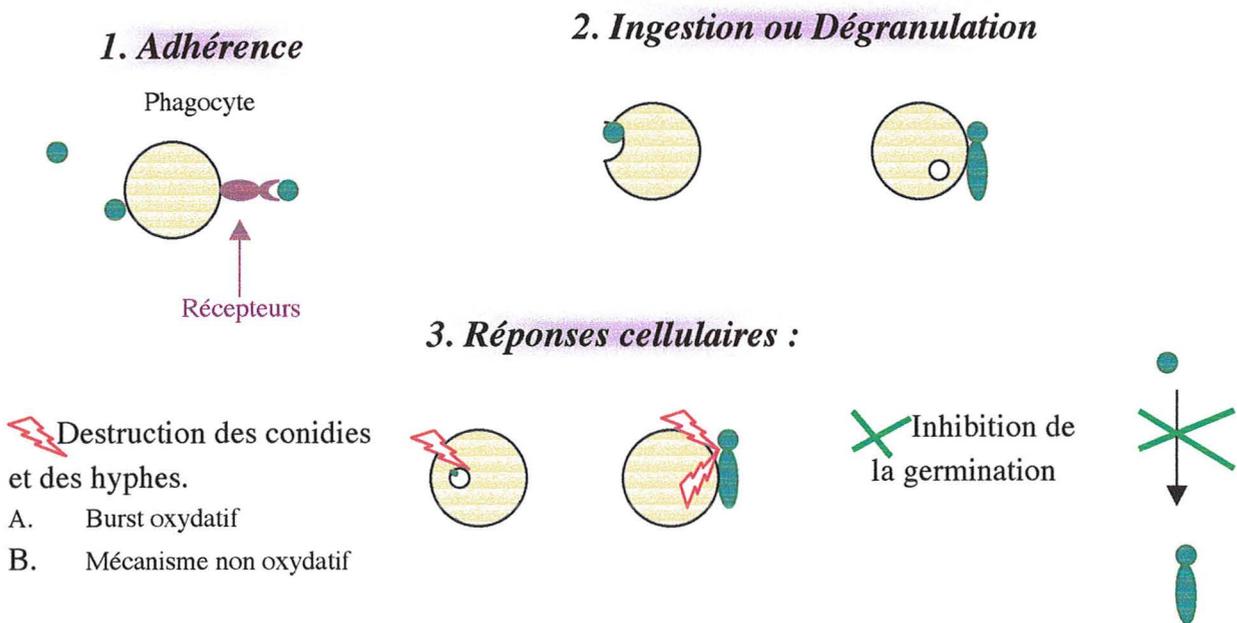


Figure 5 : Différentes étapes de l'élimination des conidies par les phagocytes

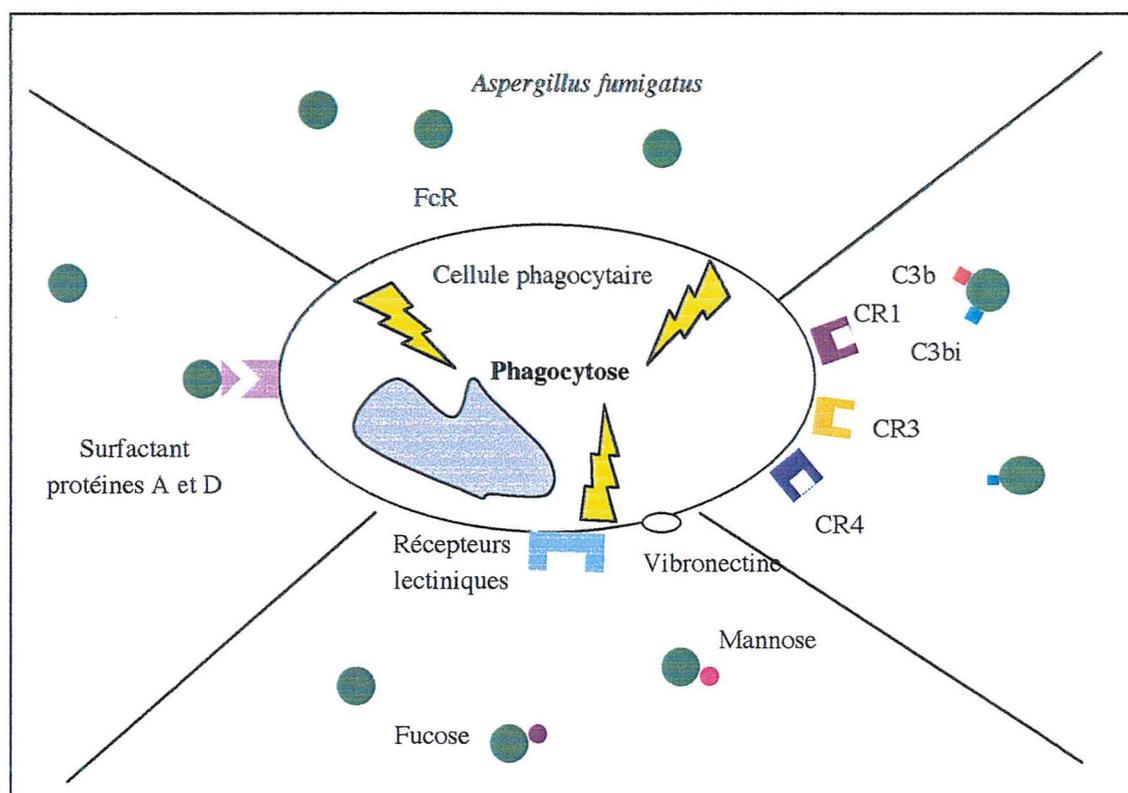


L'activation de la voie alterne du complément C3b et la libération du chimio-attractant C5a attire les cellules phagocytaires vers le site inflammatoire (Kappe *et al.*, 1992 ; Sturtevant *et al.*, 1992). La présence des anticorps IgG anti-*Aspergillus* ne semble jouer qu'un rôle secondaire dans la phagocytose (Sturtevant *et al.*, 1992).

Les travaux concernant le rôle des cytokines dans la réponse immunitaire anti-*Aspergillus* sont très récents. *A. fumigatus* et *A. flavus* induisent une production significative de TNF α et d'IL1 par rapport aux espèces d'*Aspergillus* moins pathogènes. Ces deux cytokines ont pour effet d'activer les fonctions anti-microbiennes des cellules phagocytaires et d'induire la sécrétion d'IL8 par le macrophage alvéolaire et le monocyte (Taramelli *et al.*, 1996). De plus, l'IL8 est un puissant chimio-attractant qui conduit à la migration des polynucléaires neutrophiles vers le site inflammatoire (Richardson *et al.*, 1995).

Les phagocytes expriment trois types de récepteurs membranaires destinés à fixer les cibles biologiques opsonisées par C3b et C3bi : CR1 (CD35), CR3 (CD18/CD11b ou MAC-1) et CR4 (CD18/CD11c ou p150,95). CR3 et CR4 sont deux récepteurs de la famille des $\beta 2$ intégrines, très proche l'un de l'autre, leur spécificité pour le C3bi dépend de la présence de cations divalents (Ross *et al.*, 1992). Plusieurs études ont mis en évidence l'importance de CR3 et CR4 dans la phagocytose des particules opsonisées par C3bi (Ross *et al.*, 1992). L'opsonisation des cibles biologiques par C3bi, secondairement reconnue par les récepteurs CR3 et CR4 présents à la surface de ces macrophages, permet donc une meilleure reconnaissance et une phagocytose plus efficace (Bouchara *et al.*, 1999) (Figure 6).

Figure 6 : Mécanismes d'adhérence des conidies aspergillaires aux cellules phagocytaires. Quatre groupes de molécules augmentant l'adhérence des conidies aux cellules phagocytaires ont été décrits : 1) les anticorps spécifiques anti-*A. fumigatus*, mais cette voie ne paraît pas impliquée dans le processus de la phagocytose ; 2) certains composants du complément, C3b, C3bi ; 3) certaines lectines ; 4) le surfactant SP-A et SP-D. (D'après Aldebert et al., 2001)



Les cellules phagocytaires coopèrent pour éliminer le champignon par deux mécanismes distincts :

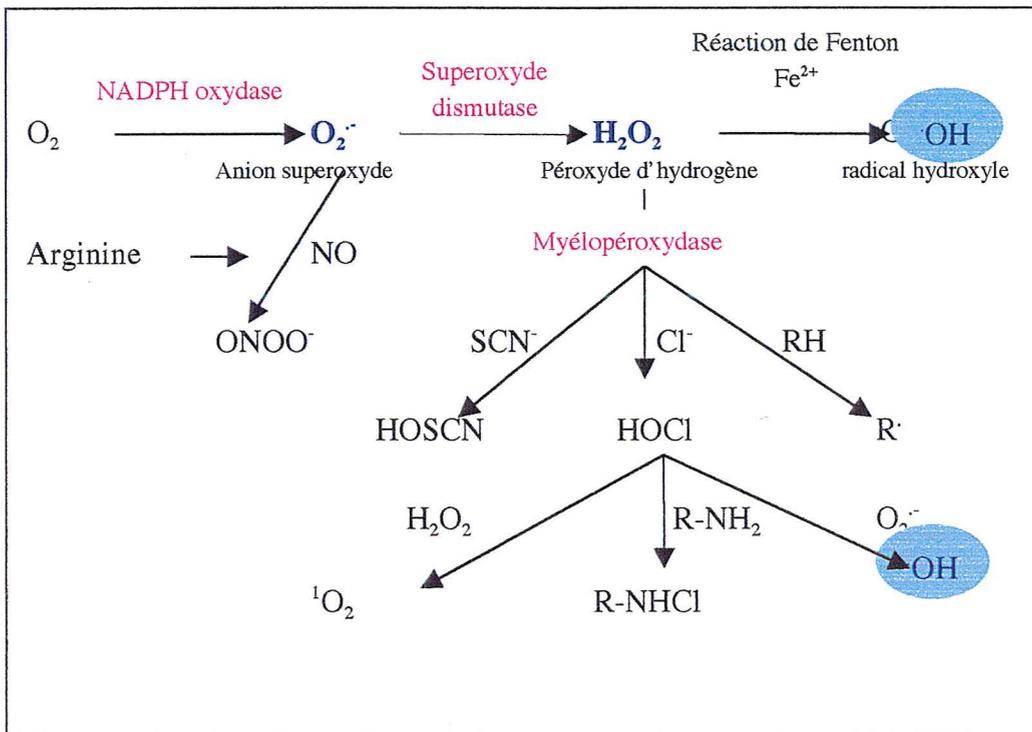
- **Un mécanisme oxydatif** : production de métabolites réactifs de l'oxygène ayant un pouvoir fongicide et bactéricide. Une étude montre que les conidies ou les hyphes sécrèteraient une substance capable d'inhiber le « burst oxydatif » des leucocytes (Waldorf *et al.*, 1984 ; Muramaya *et al.*, 1996).
- **Un mécanisme non oxydatif** : intervention de diverses enzymes et autres produits cytotoxiques. Il semble jouer un rôle important dans la fongicidie (Latgé, 1999).

1.3.3. Rappel sur le «burst oxydatif»

Le terme de « burst » se réfère à une série d'événements métaboliques qui prend place dans le phagocyte exposé à différents stimuli. Ce groupe d'événements souligne les systèmes de destruction dépendant de l'oxygène utilisés par le phagocyte (Babior, 1984 ; Morel *et al.*, 1991). Le « burst oxydatif » consiste en l'augmentation de:

- la capture de l'O₂
- la production de l'O₂^{•-}
- la production d'H₂O₂
- l'activité de la voie des hexoses monophosphates

Figure 7 : Voies de formation des radicaux libres de l'oxygène



Ces quatre événements distincts dépendent de l'activité d'un système enzymatique unique : la NADPH oxydase. Ce système catalyse la réduction de l'oxygène en superoxyde en utilisant NADPH comme donneur d'électrons. De nombreux agents, particules ou produits solubles peuvent activer le phagocyte. Le « burst oxydatif » survient généralement après un simple contact du stimulus avec la surface du phagocyte, de 30 à 60 secondes, sans phagocytose ni dégranulation. Toute la consommation d' O_2 et la production de superoxyde résultent directement de l'activité de ce système. La production d' H_2O_2 et l'activation de la voie des hexoses monophosphates sont secondaires à cette activité.

Le but du « burst oxydatif » est de fournir une batterie d'agents oxydants qui peuvent être utilisés pour la destruction des microorganismes, en particulier : O_2^- , H_2O_2 , OH^* qui vont réduire différents complexes, modifier la perméabilité membranaire et inhiber certaines enzymes.

2. Facteurs favorisant la survenue des aspergilloses

A. fumigatus est un micromycète opportuniste dont la faculté à envahir les tissus de l'organisme hôte dépend essentiellement des conditions locales ou générales de l'hôte. La survenue d'une aspergillose survient lors d'un déséquilibre entre les trois composants :

- L'environnement,
- Les facteurs propres au champignon,
- Les facteurs conditionnant la réceptivité de l'hôte.

2.1. Environnement

A. fumigatus est un micromycète ubiquitaire qui colonise les supports les plus variés. Il est présent sur les débris organiques de toute nature, dans le sol, sur des végétaux en décomposition, et également dans l'environnement et l'habitat de l'homme. L'abondance des conidies dans l'environnement immédiat d'un hôte « à risque » favorise la rencontre avec l'agent infectieux et par conséquent le développement de l'infection aspergillaire. En milieu hospitalier, ce micromycète représente un danger permanent pour les malades immunodéprimés. La concentration de conidies dans l'atmosphère est influencée par la saison et le climat (10^{-1} à 10^6 conidies/m³), les mois d'hiver étant les plus favorables à la dissémination des conidies. Lors de travaux en milieu hospitalier, la remise en suspension de conidies habituellement présentes sur des supports inertes a été identifiée comme un facteur de risque (Conférence de consensus, 2000). Les systèmes de traitement de l'air, comme la climatisation, constituent une parfaite niche écologique pour *A. fumigatus* et un moyen idéal pour répandre ses conidies dans l'environnement (Grillot *et al.*, 1990). La mise en place d'une filtration de haute efficacité, positionnée en sortie centrale supprime les concentrations en micro-

organismes. Plusieurs hôpitaux ont relevé une diminution du nombre d'AI après installation de systèmes de conditionnement d'air efficaces (Conférence de consensus, 2000). Il est maintenant acquis que les patients à haut risque aspergillaire (longue durée d'agranulocytose) doivent être protégés dans des chambres où l'air est parfaitement maîtrisée (filtre HEPA, flux laminaire). *Aspergillus* trouve dans le milieu hospitalier d'autres réservoirs potentiels. Certains matériaux d'isolation, les plantes en pot ou fleurs séchées et substances alimentaires (condiments, thé, céréales) peuvent servir de substrat au développement du champignon. L'environnement immédiat du patient demande donc un contrôle rigoureux, tout particulièrement lors de travaux dans ou à proximité de l'hôpital (Conférence de consensus, 2000). Cependant, malgré une surveillance accrue, des épidémies d'aspergilloses sont parfois rapportées dans des services d'hématologie, où les patients ne bénéficiaient pas de secteurs totalement protégés.

La prévention des infections aspergillaires invasives chez les malades « à risque » consiste donc à soustraire ces malades à l'exposition de conidies aspergillaires. Mais, en pratique, ces mesures très contraignantes ne sont applicables qu'à certains patients (neutropénie prolongées : greffe de moelle osseuse, leucémie aiguë).

2.2. Facteurs propres au micromycète

L'immunodépression de l'hôte ne suffit pas à expliquer toute la pathogénicité d'*A. fumigatus*. Un certain nombre de facteurs particuliers tels que, l'accessibilité au site infectieux, la capacité d'adaptation du micromycète dans des situations extrêmes et la production de certaines molécules impliquées dans l'adhésion et l'invasion tissulaire, semblent favoriser son développement dans le tissu pulmonaire.

2.2.1. Accessibilité au site infectieux

La petite taille des conidies (2 à 3 μm) leur permet de pénétrer profondément dans le tractus respiratoire jusqu'aux alvéoles pulmonaires.

2.2.2. Capacité d'adaptation

La température optimale de croissance pour *A. fumigatus* est de 37°C. Il possède également la capacité de pousser jusqu'à plus de 55°C (thermophilie), faculté que ne possèdent pas les espèces aspergillaires moins pathogènes. La température est un facteur important de pouvoir invasif de plusieurs autres pathogènes fongiques tels que *Histoplasma capsulatum* et *Blastomyces dermatidis* (Denning *et al.*, 1993). *A. fumigatus* est également caractérisé par sa capacité à résister à des milieux fortement chargés en sels (osmophilie) et à se développer sous forme filamenteuse dans des milieux faiblement oxygénés (micro-aérophilie).

2.2.3. Molécules impliquées dans la pathogénicité

Ce micromycète possède un « arsenal » de molécules ou de substances qui permettent aux conidies d'adhérer aux tissus pulmonaires (fibronectine, laminine, collagène) puis d'envahir les tissus (protéases et toxines), mais également d'agir sur certaines étapes de l'immunité anti-aspergillaire (Aldebert *et al.*, 2001).

2.2.3.1. Adhésion

L'adhésion aux tissus de l'hôte constitue l'étape clé dans le développement de l'infection. Différentes protéines ou glycoprotéines ont été proposées comme ligands cellulaires, notamment le fibrinogène (Annais *et al.*, 1992) et la laminine (Tronchin *et al.*, 1993). Les conidies se lieraient aux dépôts de fibrine formés sur les épithéliums endommagés en réponse à la réaction inflammatoire, ou directement à la laminine de la membrane sous-épithéliale. Le fibrinogène constituerait ainsi pour le champignon un moyen de « déguisement antigénique ». Bouchara *et al* (1999) ont également montré

que parmi une trentaine de moisissures saprophytes appartenant à des groupes différents, seuls certains *Aspergillus* pathogènes et en particulier *A. fumigatus*, fixent de manière significative le fibrinogène humain.

2.2.3.2. Invasion tissulaire

A. fumigatus semble sécréter principalement deux types de molécules (protéases et toxines) qui lui permettraient d'envahir le tissu pulmonaire et d'échapper à la réponse immunitaire de l'hôte.

– Les protéases

L'élastine étant le principal composant de la paroi pulmonaire (30%), des enzymes ayant une activité élastolytique constituent des facteurs probables de virulence. Ces enzymes ont fait l'objet de très nombreux travaux plus ou moins contradictoires qui ont soit prouvé leur rôle dans la pathogénicité, soit contredit cette hypothèse.

Actuellement, trois familles de protéases extracellulaires produites par *A. fumigatus* ont été purifiées et caractérisées biochimiquement : les sérines protéases (Monod *et al.*, 1991), les métallo-protéases (Monod *et al.*, 1993) et les protéases aspartiques (Reichard *et al.*, 1995). D'autres protéases sont actuellement explorées.

Leur rôle est de dégrader les tissus de l'hôte et d'inhiber localement la réponse immunitaire. En effet, une protéase sécrétée par les conidies est capable de cliver le C3 du complément et d'interférer ainsi sur l'opsonisation des conidies (Sturtevant *et al.*, 1992). Cependant, la spécificité de cette protéase chez les espèces pathogènes d'*Aspergillus* et la nature de cette protéine restent actuellement à définir.

– Les toxines

A. fumigatus produit un grand nombre de toxines, dont certaines peuvent jouer un rôle dans l'invasion tissulaire en mettant en jeu des mécanismes interférant avec la réponse immunitaire (réduction des battements ciliaires et altération de l'épithélium

bronchique). Actuellement, en fonction de leur rôle, trois types de toxines ont été décrites : la restrictoxine (Lamy *et al.*, 1991), l'aflatoxine et la gliotoxine (Kappe *et al.*, 1992) et l'hémolysine.

2.2.3.3. Résistance à l'immunité anti-aspergillaire

Outre les facteurs décrits précédemment, les hyphes d'*A. fumigatus* produisent *in vitro* un inhibiteur du composant C5a de la voie alterne du complément. Cet inhibiteur serait un phospholipide qu'*A. fumigatus* et *A. flavus* produiraient en quantité plus importante que des espèces relativement moins pathogènes (Latgé *et al.*, 1994).

Des études récentes montrent que la pigmentation des conidies serait impliquée dans des phénomènes de résistance aux espèces réactives de l'oxygène (Jahn *et al.*, 2000). Les souches dépourvues de pigments seraient plus sensibles que les autres.

D'autres substances libérées par *A. fumigatus*, mais encore non caractérisées, entraînent une réduction du chimiotactisme des polynucléaires neutrophiles par interaction avec des éléments contractiles du cytoplasme cellulaire et une diminution de la libération des radicaux oxygénés.

L'ensemble de ces observations non exhaustives montre que ce champignon peut se protéger en modifiant directement différentes étapes du processus de phagocytose (adhérence, internalisation, fongicidie), mais aussi en modifiant l'état d'activation des cellules phagocytaires. En effet, des facteurs diffusibles d'*A. fumigatus* inhibent la production par les macrophages de TNF α , d'IL-6 mais pas de IL-1 α .

2.2.4. Epidémiologie moléculaire

La recherche de facteurs de pathogénicité chez cet opportuniste n'a été entreprise que depuis peu de temps et les résultats restent encore limités. Néanmoins, l'ensemble des données suggère qu'il ne semble pas exister chez ce micromycète un facteur conditionnant de façon prépondérante la virulence du champignon. Une action combinée de certains des facteurs précédemment décrits expliquerait le potentiel de

pathogénicité d'*A. fumigatus*, d'autant plus que le champignon possède un ensemble de particularités peu présentes, voire absentes, chez des espèces moins pathogènes. La majorité des facteurs envisagés ne sont pas indispensables à ce saprophyte dans son habitat habituel et il est probable que la pression de sélection de l'hôte favorise l'acquisition de certains facteurs de pathogénicité. Etant donné que toutes les souches existantes dans l'environnement n'ont pas été en contact avec les tissus de l'hôte, cela soulève la question suivante : toutes les souches d'*A. fumigatus* présentes dans l'environnement possèdent-elles les mêmes aptitudes pour envahir les tissus humains ? Dans l'affirmative, l'étude d'une seule souche ne peut pas permettre d'élucider les facteurs de pathogénicité. Il est donc nécessaire de déterminer s'il existe une variabilité de la pathogénicité. Devant les difficultés rencontrées dans l'étude des facteurs de pathogénicité et afin de mieux comprendre la répartition d'*A. fumigatus* dans l'environnement, différentes équipes ont tenté une approche épidémiologique du pouvoir pathogène.

Appréhender l'étude de ce champignon impose la recherche d'une éventuelle biodiversité intra-spécifique de l'espèce *A. fumigatus*. L'approche épidémiologique peut permettre d'étudier la répartition des souches dans l'environnement, de caractériser les souches responsables des formes invasives, d'observer s'il existe une prévalence de certaines souches dans l'environnement et éventuellement d'identifier la source de contamination.

Divers essais de biotypages de souches d'*A. fumigatus* ont initialement fait appel aux techniques conventionnelles (caractéristiques morphologiques, profils protéiques) (Symoens et al., 1993). Or celles-ci reposent sur des caractéristiques phénotypiques essentiellement variables sous l'influence de facteurs environnementaux difficiles à maîtriser (conditions de culture, de stockage...). Les études ainsi réalisées ne sont donc pas utilisables pour différencier les souches. En revanche, les méthodes de typages fondées sur l'analyse du génome permettent d'éviter ces inconvénients. Plusieurs méthodes moléculaires ont été appliquées au typage d'*A. fumigatus* : la longueur de

fragments de restriction (RFLP : Restriction Fragment Length Polymorphisms), les isoenzymes (MLEE : Multi-Locus Enzyme Electrophoresis), les Séquences Moyennement Répétées (MRSs), l'amplification aléatoire (RAPD : Random Amplified Polymorphic DNA) et la SSDP (Séquence Specific DNA Primer), qui consiste en une amplification avec cinq marqueurs SSDP différents conduisant à différencier 32 génotypes (Mondon *et al.*, 1997) et les microsatellites (Bart-Delabesse *et al.*, 2001).

Les différents résultats publiés sont parfois contradictoires, mais tous mettent en évidence une très large biodiversité d'*A. fumigatus*. Les méthodes moléculaires utilisées ont présenté un pouvoir de discrimination variable, mais aucune d'elles ne s'est imposée par rapport aux autres, leurs différentes caractéristiques étant plutôt complémentaires. La combinaison de ces méthodes a fourni un meilleur pouvoir de discrimination (Bertout *et al.*, 2001). Il est donc nécessaire d'utiliser plusieurs méthodes pour caractériser une souche issue d'une infection aspergillaire et de tenter de déterminer la source de l'infection.

2.3. Facteurs conditionnant la réceptivité de l'hôte.

Aspergillus possède la faculté d'échapper aux différentes barrières immunitaires : le développement de l'aspergillose invasive est alors le résultat d'un déséquilibre qui s'établit entre l'hôte et le micromycète (Aldebert *et al.*, 2001).

Les AI sont des infections nosocomiales dans 60% des cas, survenant chez des patients « à risque », essentiellement lors de l'altération de la réponse phagocytaire (Lebeau *et al.*, 1996). Le risque aspergillaire est particulièrement élevé dans les agranulocytoses prolongées, les leucémies aiguës, les chimiothérapies anticancéreuses, les transplantations d'organe et les greffes de moelle osseuse, les corticothérapies au long cours (Conférence de consensus, 2000)

Les patients atteints de granulomatose septique chronique familiale, sont aussi des populations à risque (25 à 40%), non pas à cause d'une déficience quantitative des

macrophages et des polynucléaires mais en raison de l'altération de leur fonction (Denning, 1997). L'aspergillose invasive au cours du SIDA est moins fréquente qu'au cours des hémopathies malignes (0 à 12%), mais sa fréquence a augmenté, probablement du fait de l'allongement de la survie des patients, l'infection survient tardivement dans l'évolution de la maladie ($CD4 < 50 /mm^3$) (Löffler *et al.*, 1999).

2.3.1. Neutropénie profonde

Les chimiothérapies réalisées lors du traitement des leucémies aiguës provoquent des phases de neutropénie profonde ($PNN < 0,5$ G/l exceptionnellement $< 0,1$ G/l) et prolongée (> 12 jours) (Verweij *et al.*, 1997). La fréquence de l'AI est alors de 5 à 25% (Denning, 1997). Le risque aspergillaire est de 1% par jour entre le 6^{ème} et le 22^{ème} jour de neutropénie (Conférence de consensus, 2000), il augmente de 4% par jour après 3 semaines de neutropénie, après 5 semaines, il est de 70% (Conférence de consensus, 2000). A l'heure actuelle, l'utilisation de facteurs de croissance hématopoïétiques et les autogreffes de cellules souches hématopoïétiques ont permis de réduire de façon sensible la durée de l'aplasie chimio-induite, ce qui se traduirait, selon certains auteurs, par une diminution de nombre des aspergilloses (Conférence de consensus, 2000).

2.3.2. Allogreffe de moelle osseuse

L'allogreffe de moelle osseuse entraîne une période d'aplasie profonde pendant laquelle le malade est protégé sous un flux luminaire. La reconstitution hématopoïétique est relativement rapide et la durée de neutropénie profonde excède rarement quinze jours. Cette reconstitution rapide, associée à la protection apportée par le flux, fait que le greffé médullaire présente assez peu de risques de contracter l'aspergillose, durant cette période. C'est après sa sortie, alors qu'il est exposé au traitement (corticoïdes et immunosuppresseurs) pour lutter contre le rejet du greffon, que le risque est le plus élevé (Conférence de consensus, 2000). Les AI surviennent 2 à 3 mois après la transplantation, ainsi, la période de risque se prolonge après la récupération

hématologique (Conférence de consensus, 2000). La fréquence est de 6,4% (Aldebert *et al.*, 2001).

2.3.3. Transplantations d'organe et corticothérapie au long cours à forte dose

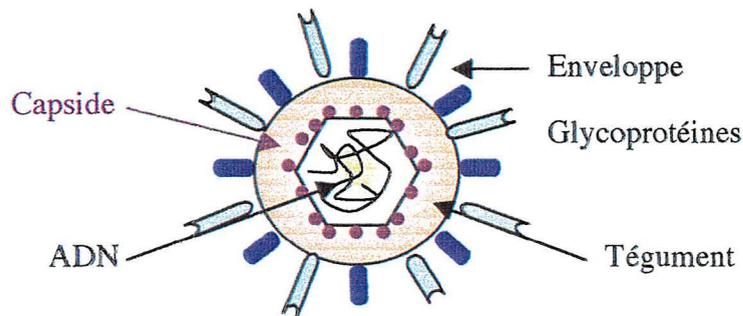
L'augmentation du nombre de transplantations d'organe ces dernières décennies, conjointement à la prescription d'immunosuppresseurs puissants, dont les corticoïdes, a entraîné des incidences croissantes des cas d'AI. La fréquence est de 0,7% chez le transplanté rénal, 6,2% chez le transplanté cardiaque et de 8,4% chez le transplanté pulmonaire (Aldebert *et al.*, 2001, Conférence de consensus, 2000) (cf. annexe). En effet, les greffés pulmonaires présentent un risque accru du fait de l'altération des mécanismes de défenses locaux (Conférence de consensus, 2000).

2.3.4. Le cytomégalovirus

Deux études cas-témoins, dont une avec analyse multivariée, soulignent le rôle favorisant majeur d'une infection à cytomégalovirus humain (HCMV) dans la survenue d'une AI (Husni *et al.*, 1998 ; Yeldandi *et al.*, 1995). Le rôle direct du virus sur l'intégrité des barrières anatomiques respiratoires et son rôle immunomodulateur sont là encore évoqués. Le cytomégalovirus humain ou Herpesvirus 5, virus spécifique de l'homme, appartient à la famille des Herpesviridae et à la sous-famille des bêta-herpesviridae (spécificité d'hôte étroite, cycle infectieux long, infection latente dans de nombreux tissus).

La structure de la particule virale est commune à la famille des Herpesviridae. Le génome est protégé par une capside icosaédrique, elle-même entourée par un tégument et une enveloppe. Le diamètre du HCMV est compris entre 180 et 200nm.

Figure 8 : Schéma du cytomégalovirus



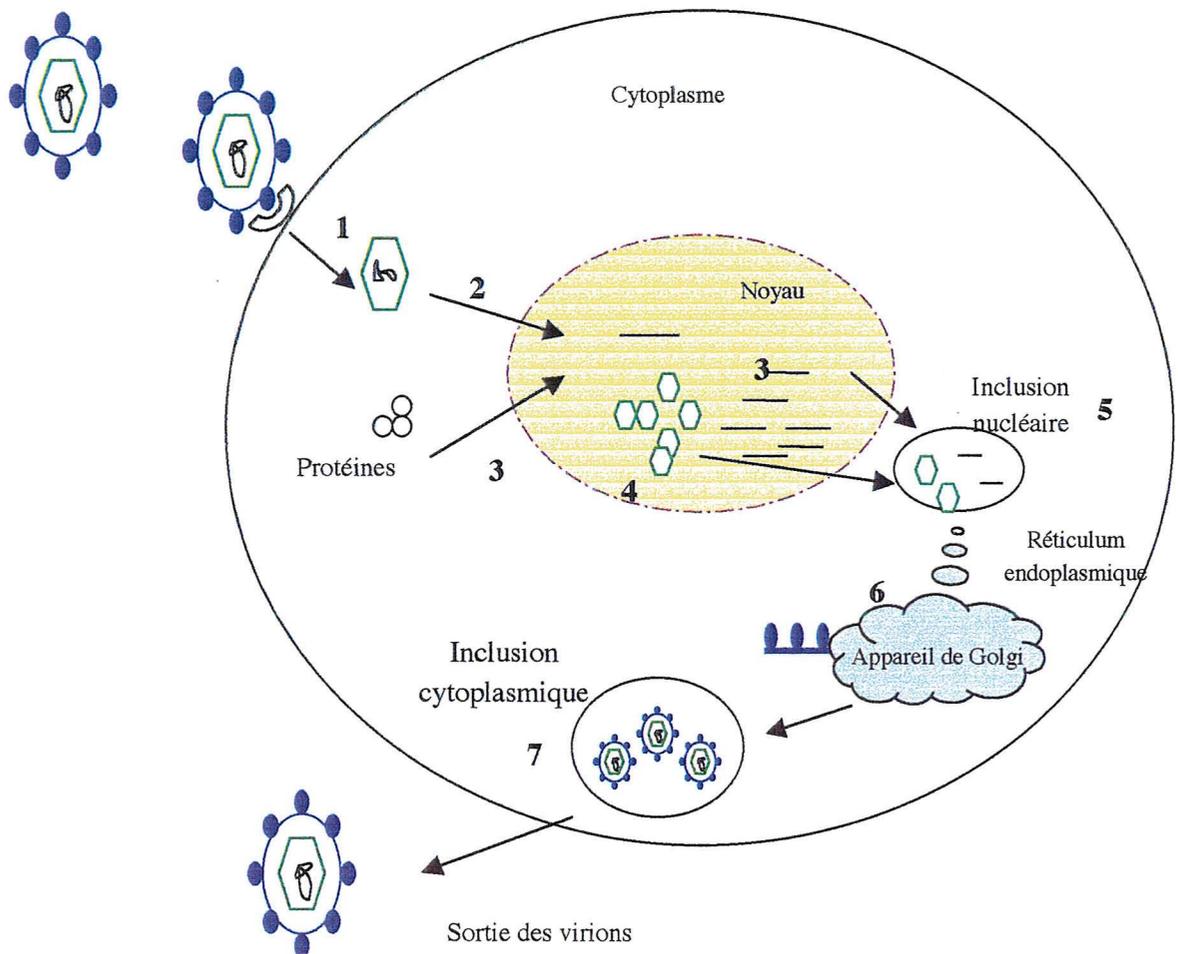
2.3.4.1. Cycle viral (Schéma)

Après fixation du HCMV sur la cellule cible, l'enveloppe virale fusionne avec la membrane cellulaire. La capside libérée dans le cytoplasme est transportée jusqu'au pore nucléaire. Un complexe ADN viral-protéines pénètre dans le noyau. La ppU183 ou pp65 tégumentaire fait partie des protéines activement transportées dans le noyau avant toute transcription virale. Dans la cellule permissive, la réplication virale prend place dans le noyau où l'ADN viral devient détectable en 48 heures. Les protéines virales sont synthétisées dans le cytoplasme et assemblées sous la forme de capsides immatures dans le noyau de la cellule. L'accumulation de ces capsides forme l'inclusion nucléaire. Les capsides immatures incorporent l'ADN viral, s'enveloppent à partir du feuillet interne de la membrane nucléaire et migrent dans le cytoplasme. Les virions infectieux sont libérés 120 heures environ après le début de l'infection.

La transcription des gènes viraux est séquentielle et peut être schématiquement découpée en trois phases : très précoce (0-2^{ème} heure), précoce (2^{ème}-20^{ème} heure) et tardive (au-delà de la 20^{ème} heure). La phase de transcription très précoce aboutit à la synthèse des protéines très précoces qui ont essentiellement une fonction régulatrice de la réplication virale. Les protéines précoces correspondent principalement aux enzymes de la réplication virale. Les protéines tardives sont structurales.

Figure 9 : Représentation du cycle viral du cytomégalovirus.

1) Fixation du virus à des récepteurs membranaires et fusion des membranes ; 2) La capside est transportée vers le noyau ; 3) synthèse cytoplasmique de protéines et d'ADN dans le noyau ; 4) synthèse de capsides immatures ; 5) Inclusion nucléaire des capsides immatures et de l'ADN viral ; 6) Maturation des capsides dans Golgi ; 7) Inclusion cytoplasmique et libération des virions



2.3.4.2. Physiopathologie

Ce virus est ubiquitaire et l'infection est fréquente, puisque 60 à 100% des adultes ont des anticorps anti-HCMV. La contamination se produit au contact étroit de malades ou des porteurs asymptomatiques excréant le virus. Ce dernier est retrouvé dans les urines, la salive, le pharynx, les larmes et le sperme.

Après pénétration dans l'organisme, les particules virales se disséminent dans différents organes, par l'intermédiaire des leucocytes, plus particulièrement des polynucléaires et des cellules types monocytes-macrophages. Le contrôle immunitaire de l'infection à HCMV est essentiellement à médiation cellulaire. Des lymphocytes T HCMV-spécifiques exercent une fonction cytotoxique sur les cellules infectées et une fonction de recrutement de cellules inflammatoires. Cependant, le HCMV est un virus remarquable car il emploie de multiples mécanismes pour échapper aux réponses immunitaires à médiation cellulaire. Une étude montre par exemple que le virus se mettrait à l'abri d'une surveillance immunitaire par séquestration de CC-chimiokines de l'environnement de la cellule infectée. Par ce système, le virus pourrait bloquer l'infiltration de lymphocytes se trouvant déjà en place. Grâce à ces différentes stratégies, le HCMV est un redoutable envahisseur passant inaperçu (Bodaghi *et al.*, 1998).

Ce virus semble posséder un effet immunosuppresseur direct potentialisant les infections à germes opportunistes (*Pneumocystis carinii*, bacilles à GRAM négatif) (Colimon *et al.*, 1997). Pendant la phase aiguë de l'infection, on observe une immunodépression profonde, qui ne peut s'expliquer par la simple infection et destruction des cellules du système immunitaire. Le HCMV semble inverser le rapport CD4/CD8, induire une neutropénie, provoquer le dysfonctionnement des lymphocytes T et modifier la sécrétion des cytokines. Il se pourrait donc bien que l'entrée du virus lui-même, puisse altérer le comportement de la cellule (Schooley *et al.*, 1983).

Chez un sujet sain, la primo-infection s'exprime au maximum par un syndrome mononucléosique bénin. Après cette primo-infection, le virus persiste indéfiniment dans

l'organisme, le génome viral est retrouvé dans les cellules sanguines, mais également dans les macrophages présents dans les tissus. Le poumon est quantitativement le site de latence préférentiel. En cas d'altération du système immunitaire, le HCMV peut se réactiver et provoquer une importante morbidité et mortalité. Le virus se multiplie au sein des cellules épithéliales, des macrophages et des cellules endothéliales des capillaires, sans entraîner de cytolysse massive de ces cellules. Les lésions tissulaires sont dues à des destructions de cellules infectées par des cellules immunes (Colimon *et al.*, 1997). Un sujet infecté de manière latente peut être réinfecté par un virus exogène ; il s'agit souvent d'une infection iatrogène comme dans les cas de greffe ou de transfusion.

L'infection à HCMV est redoutée chez des patients recevant une greffe d'organe ou de cellules hématopoïétiques. Le traitement immunodépresseur, incontournable dans ces situations, induit une réactivation du virus présent chez le receveur ou dans le greffon. Le contrôle immunitaire de l'infection est défaillant, le virus dissémine et prend pour cible les organes sensibles. Les tableaux cliniques les plus sévères sont observés chez les greffés de moelle osseuse et greffés cœur-poumons.

2.3.4.3. Traitement de l'infection

La molécule la plus utilisée est le Ganciclovir (GCV), analogue de la guanosine. Sa structure chimique est proche de celle de l'Aciclovir. Il est actif, *in vitro*, sur tous les herpès virus, son activité anti-HCMV est cent fois supérieure à celle de l'aciclovir.

Pour être actif, le GCV doit être phosphorylé. Le gène UL97 du HCMV produit une kinase responsable de la phosphorylation du ganciclovir.

La toxicité de cette molécule (notamment au niveau médullaire) et l'apparition de résistance constituent un frein à son utilisation.

2.3.4.4. Cytomégalo­virus et aspergillose invasive

Le HCMV a été associé à l'augmentation des infections opportunistes tant bactériennes que fongiques. Il a été clairement identifié comme facteur de risque pour les maladies opportunistes, indépendamment d'autres facteurs tels les traitements immunosuppresseurs, l'usage d'antibiotiques et le recours aux transfusions sanguines (Gorensek *et al.*, 1988). Le rôle direct du HCMV dans l'augmentation des infections fongiques, (George *et al.*, 1997 ; Wagner *et al.*, 1995), notamment de l'aspergillose invasive (Husni *et al.*, 1998), a aussi été démontré à plusieurs reprises. Les mécanismes précis mis en œuvre par le HCMV pour favoriser l'apparition de cette dernière sont totalement inexplorés, bien que l'action immunosuppressive du HCMV a été démontrée dans de nombreuses études (Husni *et al.*, 1998). Les cibles potentielles du virus ne sont pas identifiées dans l'aspergillose invasive. L'inversion du rapport CD4/CD8, la neutropénie, le dysfonctionnement des lymphocytes T et les modifications dans la sécrétion des cytokines sont évoqués, mais la liste n'est pas exhaustive (Schooley *et al.*, 1983). Le développement d'un modèle sur souris devrait permettre d'évaluer leur importance en pratique.

3. L'aspergillose invasive

A. fumigatus est responsable chez des sujets immunodéprimés d'une infection gravissime : l'aspergillose invasive (AI). Ce champignon filamenteux pénètre par les voies respiratoires conduisant, dans 80% des cas, à l'aspergillose pulmonaire invasive. Les filaments mycéliens ayant envahi le parenchyme pulmonaire, le micromycète, grâce à son tropisme vasculaire, peut se propager par voie hématogène et conduire dans 20 à 30% des cas à une aspergillose viscérale disséminée, définie comme une atteinte de deux ou plus organes non contigus. Les principaux organes atteints sont alors, le cerveau (10-20%), le tube digestif, le foie, les reins et le cœur (Denning, 1997).

3.1. Les différentes manifestations pathologiques

3.1.1. L'aspergillose pulmonaire invasive

Dans la plupart des cas, le champignon attaque directement la muqueuse bronchique, souvent au niveau des bronches distales. L'épithélium bronchique, est alors nécrosé avant d'être remplacé par une couronne de filaments mycéliens envahissants de proche en proche tant le parenchyme pulmonaire que les vaisseaux adjacents. Les filaments obstruant les artères et les artérioles entraînent une thrombose responsable d'un infarctus localisé (Rau, 1997). La lésion est triangulaire et souvent en cible formant une nécrose ischémique entourée d'un liseré hémorragique (Rau, 1997). Ces champignons sécrètent des toxines nécrosantes qui facilitent leur dissémination. Ils progressent dans le tissu pulmonaire et finissent par gagner une lumière vasculaire, ouvrant la voie à la dissémination hématogène de l'infection avec apparition de localisations secondaires à distance du foyer initial (os, peau, système nerveux, foie, endocarde...). Mais, l'extension peut aussi se faire par contiguïté vers d'autres organes de voisinage (plèvre, péricarde...)(Denning, 1997).

3.1.2. Autres formes d'aspergillose invasive

3.1.2.1. Aspergillose invasive sinusienne

Les atteintes représentent environ 15% des cas d'AI, associées ou non à une atteinte pulmonaire. Elles peuvent être asymptomatiques ou responsables d'une symptomatologie souvent unilatérale (obstruction nasale ou rhinorrhée, douleurs rétro-orbitaires et sinusiennes, œdème et/ou hématome facial parfois exophtalmie) (Schwartz *et al.*, 1997).

3.1.2.2. Aspergillose cérébrale

Le cerveau est atteint dans 10 à 20% des cas d'AI, soit par dissémination hémotogène, soit par extension d'un foyer sinusien. Son pronostic est particulièrement sombre avec un taux de mortalité de 95-100% (Ferber *et al.*, 1994). Elle se caractérise par le développement sous forme d'abcès du cerveau et/ou du cervelet, unique ou multiple, exceptionnellement sous forme d'abcès médullaires ou de méningite (Verweij *et al.*, 1997).

3.1.2.3. Aspergillose cardiaque

Elle se présente sous la forme d'un ou plusieurs abcès myocardiques, avec parfois une atteinte coronarienne responsable d'un véritable infarctus. Plus rarement, il s'agit d'une péricardite (Denning, 1997).

Aspergillus présente un important tropisme vasculaire, la dissémination hémotogène peut atteindre tous les organes. L'atteinte digestive est très fréquente principalement au niveau de l'œsophage et du colon. Les lésions se traduisent par de multiples ulcérations avec, dans certains cas, des perforations ou des hémorragies massives (Ferber *et al.*, 1994). L'atteinte rénale est également possible, survenant dans les formes disséminées et se traduisant par des microabcès et des infarctus (Ferber *et al.*, 1994). L'atteinte

osseuse est rare et concerne surtout les vertèbres, le sternum et les os long. Elle se traduit par une ostéolyse mouchetée (Ferber *et al.*, 1994). Les localisations cutanées secondaires sont peu fréquentes mais très évocatrices par leur aspect en pustules évoluant vers la nécrose.

3.2. Présentation clinique

Le tableau clinique de l'API est celui d'une pneumopathie aiguë infectieuse. Cette pneumopathie aspergillaire est souvent bilatérale associée fréquemment à une fièvre (>38,5°C) persistante malgré une antibiothérapie à large spectre, une dyspnée et une toux sèche (Conférence de consensus, 2000).

Les signes cliniques, lorsqu'ils sont présents, n'ont rien de spécifique. La toux est sèche, parfois accompagnée d'une expectoration hémato-poïétique évocatrice. Le patient peut se plaindre de douleurs thoraciques, irradiant vers l'épaule, évoquant une douleur pleurale. L'examen pulmonaire peut retrouver des râles crépitants et bronchiques.

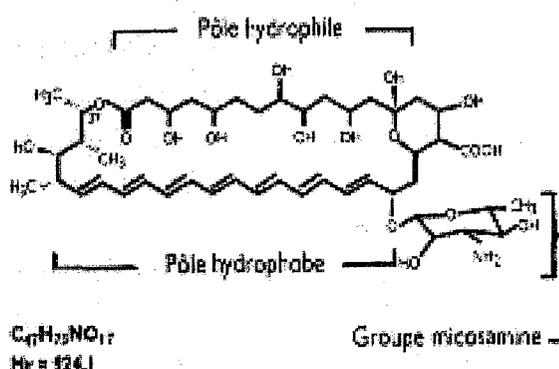
3.3. Traitement

L'aspergillose pulmonaire invasive est l'une des infections fongiques causant le plus de décès chez les patients immunodéprimés, avec un taux de mortalité rapporté dans la littérature de 50 à 100% (Denning, 1997). La gravité de l'aspergillose invasive justifie, devant un tableau clinique et des signes radiologiques évocateurs, survenant chez un sujet immunodéprimé en aplasie profonde et prolongée, la mise en route d'un traitement empirique, sans attendre la confirmation mycologique (Yeni, 1994). Le traitement repose sur l'administration d'antifongiques ayant pour but de limiter l'extension de l'infection en attendant la restauration des défenses immunitaires indispensables à la guérison (Yeni, 1994), associée ou non à une intervention chirurgicale. Il repose sur deux antifongiques principaux : l'amphotéricine B et l'itraconazole.

3.3.1. Amphotéricine B

L'amphotéricine B déoxylate (Fungizone®), de la famille des macrolides polyéniques, est l'antifongique de référence pour le traitement de l'AI. Cet antifongique à usage systémique agit par liaison à l'ergostérol de la membrane des cellules fongiques, entraînant des troubles de la perméabilité conduisant à la mort des cellules (cité par Grillot, 1999). L'association de l'amphotéricine B (AmB) au déoxycholate de sodium permet une formulation soluble dans l'eau et administrable par voie intraveineuse (l'absorption digestive de l'AmB est quasiment nulle).

Figure 9 : Structure chimique de l'amphotéricine B



La dose recommandée est de l'ordre de 0,7 mg/kg/j, mais des doses plus élevées, jusqu'à 1,5 mg/kg/j, peuvent être utilisées chez les immunodéprimés au risque d'accroître les effets indésirables (réactions d'intolérance générale immédiate, troubles métaboliques, mais surtout insuffisance rénale) (Yeni, 1994).

A l'heure actuelle, ce médicament voit son utilisation limitée par la fréquence et la sévérité des effets indésirables centrés sur l'atteinte rénale. Les propriétés de l'AmB ont permis d'envisager son association avec des structures lipidiques.

Trois formulations ont été développées :

- **La forme liposomale de l'AmB (Ambisome®)** doit être administrée en perfusion intraveineuse à la dose recommandée de 3 mg/kg/j. Les liposomes permettent de libérer l'AmB directement au niveau de la paroi des cellules fongiques. Les fortes

concentrations d'antifongique au niveau du site d'action permettent d'obtenir une activité fongicide. La meilleure tolérance immédiate et la plus faible toxicité rénale permettent l'utilisation de doses plus élevées que lors de l'emploi de Fungizone® (Chavanet, 1997).

- **La forme complexe phospholipidique de l'AmB (Abelcet®)** doit être administré en perfusion intraveineuse à la dose recommandée de 5 mg/kg/j. Cette formulation lipidique en ruban présente une tolérance immédiate identique à celle de la Fungizone®. En revanche, les insuffisances rénales sont retardées (Chavanet, 1997). L'efficacité clinique à la dose de 5 mg/kg/j est la même que celle de la Fungizone® à la dose de 0,6 et 1 mg/kg/j (Chavanet, 1997).
- **La forme dispersion colloïdale de l'AmB (Amphocil™)** nécessite une autorisation temporaire d'utilisation (ATU). Elle doit être administré en perfusion intraveineuse à la dose recommandée de 4 mg/kg/j (Hiemenz *et al.*, 1996). Cette formulation lipidique en disque a une toxicité immédiate similaire à celle de la Fungizone® mais la toxicité rénale est moins importante (Chavanet, 1997).

Globalement, seule l'Ambisome® semble bien tolérée. Les deux autres formes présentent les mêmes réactions d'intolérance immédiate que la Fungizone® mais la toxicité rénale est moins fréquente. De plus, ces trois formulations ont, à fortes doses (3 à 5 mg/kg/j), une efficacité semblable à l'AmB conventionnelle à dose normale (0,6 à 1 mg/kg/j). Le gain est la réduction de la toxicité rénale. Enfin, ces formes lipidiques sont très onéreuses (Yeni, 1994). Ces nouvelles formulations seront donc réservées aux adultes et enfants ayant développés une insuffisance rénale sous AmB ou au cas d'altération préexistante et persistante de la fonction rénale ou encore en cas d'échec de fortes posologies de Fungizone® (Chavanet, 1997).

La meilleure tolérance permet d'administrer des doses plus élevées et d'obtenir une activité supérieure à celle de l'AmB conventionnelle dont la dose ne peut pas être augmentée. On note alors une amélioration de l'index thérapeutique de l'AmB lipidique

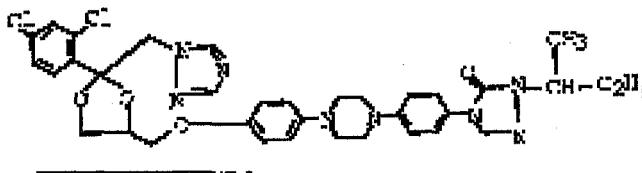
par réduction de la toxicité rénale. Les formulations lipidiques représentent une arme thérapeutique supplémentaire pour lutter contre l'AI, particulièrement chez les immunodéprimés qui ont besoin de fortes doses d'AmB, qui ne sont pas toujours bien tolérées (Hiemenz *et al.*, 1996).

D'autres associations lipidiques ont été envisagées dont la dilution directe, simple et peu coûteuse de la Fungizone® dans une émulsion Intralipide 20%®. Pour une efficacité similaire, on note une nette diminution de la toxicité, ce qui permet d'augmenter les doses (Chavanet, 1997). Depuis le développement des formes lipidiques, cette utilisation, hors autorisation de mise sur le marché (AMM), n'est plus utilisée et même déconseillée.

3.3.2. Itraconazole (Sporanox®)

L'itraconazole est un antifongique à large spectre de la classe des triazolés ayant une excellente activité anti-aspergillaire et une faible toxicité. Le produit s'administre par voie orale à raison de 200 à 400 mg/j. Le pouvoir fongicide de l'itraconazole est dû à son action spécifique sur le cytochrome P₄₅₀ des champignons. L'inhibition du cytochrome P₄₅₀ bloque le système enzymatique (C14 α -déméthylase) qui permet la transformation du lanostérol en ergostérol, constituant lipidique essentiel de la membrane fongique (Grillot, 1999).

Figure 10 : Structure chimique de l'itraconazole



L'expérience est encore limitée pour préciser la place de l'itraconazole par rapport à l'AmB lors du traitement de l'AI. On peut noter son intérêt en relais de l'AmB ; un chevauchement des deux traitements pendant 1 à 2 semaines étant nécessaire compte

tenu du délai d'action de l'itraconazole. Il peut également constituer une alternative à l'AmB en cas d'intolérance.

L'absorption intestinale, variant d'un sujet à l'autre, certains échecs thérapeutiques peuvent être rapportés à des concentrations sériques insuffisantes, il conviendra donc de faire des dosages sériques d'itraconazole après 10 à 15 jours de traitement (Yeni, 1994). Chez les patients sous traitement immunosuppresseur (la ciclosporine), l'utilisation d'itraconazole doit se faire avec prudence. En effet, cette molécule présente une interaction métabolique avec la ciclosporine (inhibition enzymatique), qui peut être responsable d'une augmentation importante des concentrations plasmatiques de l'immunosuppresseur. Inversement, la ciclosporine agit sur le métabolisme de l'itraconazole (induction enzymatique) responsable d'une diminution des taux plasmatiques de ce produit et des difficultés d'adaptation des posologies de chacun de ces médicaments (Guillemain *et al.*, 1994).

Une nouvelle forme galénique, Sporanox® solution buvable, destinée au traitement des candidoses oro-pharyngées, 5 à 10 fois mieux résorbées que la forme actuelle a été développée en emprisonnant l'itraconazole dans des cyclodextrines (Yeni, 1994). Dans certains cas, du fait de sa meilleure résorption, les médecins font le choix de la prescrire dans le traitement de l'AI. A l'heure actuelle, on s'intéresse à une formulation administrable par voie intraveineuse qui permettrait de traiter les patients ayant une adsorption digestive aléatoire ou des troubles de la conscience (Yeni, 1994).

3.3.3. Voriconazole (UK-109, 496)

Le voriconazole est un dérivé triazolé de 3^{ème} génération à activité fongicide contre tous les *Aspergillus*, à la fois actif par voie orale et parentérale et très bien toléré (Cuenca-Estrella *et al.*, 1998). Cet antifongique à large spectre est aujourd'hui en attente d'AMM et a une ATU.

D'après une étude *in vitro*, la concentration minimale inhibitrice (CMI) du voriconazole est sensiblement plus faible que celle de l'itraconazole et de l'AmB vis-à-vis d'*A. fumigatus* (Cuenca-Estrella *et al.*, 1998). Sur le modèle animal, le voriconazole est également plus actif que l'itraconazole et l'AmB contre *A. fumigatus* (De Pauw, 1998). Les résultats préliminaires des études cliniques, montre que ce nouvel antifongique est efficace dans le traitement des infections disséminées à *Aspergillus* (Cuenca-Estrella *et al.*, 1998). D'après une étude menée sur des patients atteints d'aspergillose invasive, la dose initiale de 12 mg/kg/j pendant 4 à 24 semaines doit être envisagé (De Pauw, 1998).

3.3.4. Caspofungine

La caspofungine, dérivé semi-synthétique de l'échinocandine, est un antifongique disponible en France uniquement en ATU nominative. Elle agit en altérant la formation de la paroi des champignons comme *Aspergillus* par inhibition de l'enzyme 1,3 bêta-D-glucane synthase. Un mécanisme qui rappelle celui des bêta-lactamines chez les bactéries. (Hoang, 2001)

Il existe de nombreux antifongiques actuellement en cours de développement, cependant aucun des nouveaux antifongiques actuellement disponibles en clinique ne semble capable de stériliser les lésions invasives constituées de filaments (Yeni, 1994). Ceci souligne l'intérêt d'un diagnostic précoce. C'est en effet à la phase initiale de l'infection que l'on peut espérer obtenir le meilleur résultat thérapeutique (Yeni, 1994). De plus, ce diagnostic précoce permettrait de réduire les traitements empiriques de façon à limiter le nombre de malades traités par des antifongiques et exposés à leurs effets indésirables (Serevens *et al.*, 1997).

Pour le CHU de Grenoble, le budget des antifongiques est passé en 2 ans de 1.9 à 4 MF. Une « meilleure sélection » des patients permettrait de réduire le coût des antifongiques à l'hôpital (Serevens *et al.*, 1997) ; mais le diagnostic précoce de certitude est difficile à obtenir.

Matériel
et
méthodes

La première étape de ce travail consiste à développer une technique de cytométrie en flux permettant de quantifier le « burst oxydatif » des leucocytes humains après stimulation par des conidies d'*A. fumigatus*. Dans un premier temps, il s'agit de mettre au point la technique sur des sujets sains.

Ce test nous permet alors d'analyser la réponse à :

- *A. fumigatus* selon le stade et l'état des conidies (conidies vivantes, conidies tuées, conidies opsonisées vivantes, conidies prégermées tuées),
- *A. fumigatus* selon la souche et le génotype,
- des espèces d'*Aspergillus* différentes (*A. flavus*, *A. niger*, *A. terreus*),

et surtout d'appréhender la réponse des cellules phagocytaires à *A. fumigatus* ainsi que de vérifier si ce test peut être utilisé dans le suivi biologique des patients à risque d'AI, le but étant de qualifier et quantifier le risque aspergillaire.

Dans la deuxième étape, nous étudions l'influence d'une infection à HCMV sur l'adhérence des conidies aspergillaires à la surface des macrophages, et l'expression de récepteurs $\beta 2$ intégrines CR3 et CR4, susceptibles, d'intervenir dans l'adhérence des conidies aspergillaires.

1. Etude du busrt oxydatif des leucocytes

1.1. Matériel

1.1.1. Réactifs et fluorochromes

1.1.1.1. PBS (Phosphate Buffer Saline) (Biomérieux)

Il est utilisé comme témoin négatif parce qu'il est dénué d'activité stimulante pour les cellules. Il est aussi utilisé pour les dilutions.

1.1.1.2. PMA (Phorbol Myristate Acetate) (Sigma)

Il est utilisé comme témoin positif par stimulation de la protéine kinase C. Il est stocké à -20°C dans du DMSO à 1 mg/ml et utilisé à une concentration de 300 ng/ml.

1.1.1.3. Escherichia coli (BusrtTest® Orpegen Pharma)

Une suspension de *E. coli* stabilisés, opsonisés, à $10^7/\text{ml}$ est utilisée comme témoin biologique positif. La suspension à $10^9/\text{ml}$ est conservée à -20°C

1.1.1.4. Fluorochromes

- **Une solution-mère de dihydrorhodamine 123 (DHR-123) (Sigma) à 2 mM dans du DMSO est préparée. La DHR-123 est aliquotée et stockée à -20°C . Une solution de travail est préparée par dilution au $1/10^{\text{ème}}$ de la solution stock dans du PBS. Elle est utilisée à une concentration finale de $0,45\ \mu\text{M}$.**

- **La solution stock d'iodure de propidium (IP)** (Sigma) à 0,5 mg/ml dans du PBS est préparée et conservée à 4°C à l'abri de la lumière. Une solution de travail est préparée tous les jours par dilution au 1/10^{ème} dans du PBS, elle est utilisée à une concentration finale de 0,3 ng/ml.

1.1.1.5. Cellules

Les cellules étaient obtenues par prélèvement de sang veineux sur des adultes volontaires sains (de l'établissement français du sang ; EFS) ou malades (du service de réanimation médicale du CHU de Grenoble). Les prélèvements sont collectés sur héparinate de lithium.

1.1.2. Les souches d'Aspergillus

Les souches sont maintenues sur gélose Sabouraud-Chloramphénicol et conservées à 4°C.

1.1.2.1. Aspergillus fumigatus

- Culture

Pour les expériences, *A. fumigatus* est cultivé sur gélose Sabouraud-Chloramphénicol à 37°C pendant 5 jours. Les conidies sont récupérées dans du sérum physiologique stérile avec du Tween 20 à 0,1%, puis lavées trois fois, remises en suspension sous formes d'un inculum à 10⁸ conidies/ml et conservées à 4°C.

- Souches

- **Souche 7977 (ALP+)** : référencée CBS 144 89 (Centraal Bureau voor Schimmelculture) isolée d'un patient atteint d'aspergillose invasive pulmonaire (fournie par le Dr M. Monod, CHU Vaudois, Lausanne). (ALP+ : souche possédant une sérine protéase de 33kDa)

- **Souche 9860** : référencée CBS 386 75 = WB 5384 (IHEM), un mutant albinos provenant de l'environnement (fournie par le Dr F Symoens, Scientific institute of public health-Louis Pasteur, Bruxelles).
- **Souches référencées de l'équipe du Dr Kwon-Chung** : souche sauvage isolée d'un patient ayant développé une aspergillose invasive fatale, à partir de laquelle l'équipe de Know-Chung a développé des souches mutantes (fournies par le Dr H.F. Tsai, National institute of Allergy and Infections Diseases, Bethesda, Maryland) (Tsai *et al.*, 1998).
 - B-5233 : souche sauvage
 - B-5233/RGD 12-8 : souche délétée du gène *alb1*. (albinos)
 - RGD 12-8/PKS33-3 : souche *alb-1* reconstituée.

Ces souches sont cultivées sur un milieu minimum *Aspergillus* (cf. annexe).

- **Souches typées du laboratoire** : provenant de broncho-aspiration de patients ayant une aspergillose pulmonaire invasive prouvée, probable ou possible. Ces souches ont été génotypées par la technique de typage SSDP mise au point au laboratoire (Mondon *et al.*, 1997).

Tableau 2 : Numéros, origine et génotype des souches du laboratoire

Numéros	Désignation	Pathologies associées	Génotype
1	CAR P1	Aspergillose invasive prouvée	26
2	ATT M1	Aspergillose invasive prouvée	26
3	JAU A1	Aspergillose invasive prouvée	32
4	DES C2	Aspergillose invasive prouvée	29
5	JAC J1	Aspergilloses invasive prouvée	30
6	MON A1	Colonisation bronchique	25
7	FAU A1	Colonisation bronchique	26
10	DIT P2	Colonisation bronchique	22
11	PLA M1	Colonisation bronchique	29
12	PLA M2	Colonisation bronchique	29

- **Souches typées EBGA (« European Group of Research on Biotypes and Genotypes of *Aspergillus fumigatus* »)** Ces souches sont issues des travaux réalisés au sein d'un réseau multicentrique européen (EBGA) qui a permis de constituer une collection de plusieurs centaines de souches cliniques et environnementales d'*A. fumigatus*, isolées à partir de 112 malades atteints d'infection ou de colonisation aspergillaire (Tableau 18 en annexe). Ces souches, parfaitement documentées, sont conservées lyophilisées dans la collection internationale de l'IHEM à Bruxelles. Les souches d'*A. fumigatus* que nous avons utilisées sont typées par une association des diverses techniques moléculaires (RAPD, SSDP, MLEE) (Symoens *et al.*, 2001 ; Bertout *et al.*, 2001) et le « biotype d'ensemble » résulte de la combinaison des résultats obtenus par les trois méthodes. L'association des trois méthodes de typage permet d'augmenter la discrimination et donc d'affirmer plus précisément le biotype d'une souche par rapport au résultat obtenu avec une seule méthode.

Tableau 3 : Numéros, origine, et biotype des souches EBGA

IHEM	Patient	Pathologies associées	RAPD	SSDP	MLEE	Type
9899	1	Aspergillose pulmonaire invasive prouvée	2	30	ET3	T4
9853	1	Aspergillose pulmonaire invasive prouvée	4	28	ET9	T2
9404	4	Aspergillose bronchique non invasive	2	30	ET4	T8
9403	4	Aspergillose bronchique non invasive	2	30	ET3	T4
14324	7	Colonisation bronchique	2	30	ET3	T4
9851	8	Colonisation bronchique	2	29	ET3	T16
9768	8	Colonisation bronchique	11	30	ET1	T15
9482	8	Colonisation bronchique	3	28	ET4	T14

1.1.2.2. *Aspergillus flavus*, *Aspergillus niger* et *Aspergillus terreus*

Ce sont des souches isolées de patients du CHU de Grenoble, fournies par le laboratoire de Parasitologie (CHU de Grenoble). Elles sont cultivées sur Sabouraud-Chloramphénicol à 25°C et conservées à 4°C.

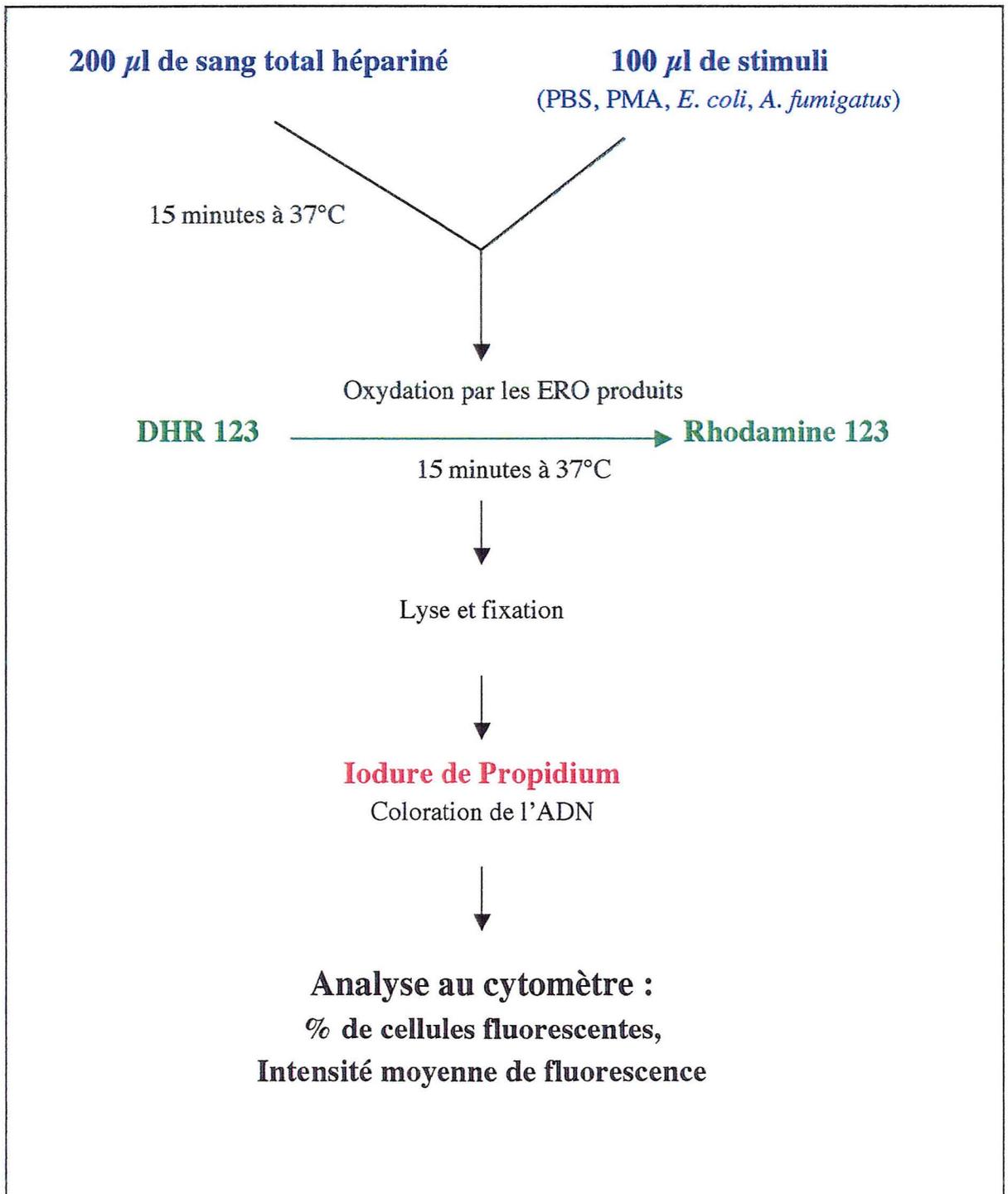
1.1.2.3. Stades et états de conidies

- **Conidies tuées** : Les conidies sont inactivées 20 minutes à l'autoclave à 120°C. La viabilité est contrôlée par culture sur milieu Czapeck modifié (cf. annexe), pendant plusieurs jours à 37°C sans CO₂.
- **Conidies opsonisées** : Les conidies sont incubées 30 minutes à 37°C avec du sérum AB normal ou décomplémenté (30 minutes à 56°C) (sérologie aspergillaire négative). Les conidies sont lavées 3 fois au PBS et resuspendues à 10⁸ conidies/ml et conservées à 4°C.
- **Conidies prégermées** : Les conidies sont incubées 4 heures ou plus, sous agitation à 37°C dans du milieu Czapeck modifié. La germination est observée au microscope et l'incubation est stoppée quand 90% des conidies ont germé.

1.2. Protocole

Le sang total est stabilisé à 4° C pendant 10 minutes. Puis, 200 µl de sang sont ajoutés à 100 µl de stimulus et incubés 15 minutes à 37°C dans des tubes de 5 ml (type 352052 de BD Biosciences). Les leucocytes produisent des espèces réactives de l'oxygène (ERO) dont la formation peut être mesurée par addition de 7,5 µl de DHR-123 pendant 15 minutes à 37°C. Les hématies sont ensuite lysées (FACSlising au 1/10^{ème}, BD biosciences) pendant 20 minutes à température ambiante. La solution de lyse fixe les cellules en les perméabilisant. Après lavage avec du PBS pour stopper la lyse, les tubes sont centrifugés à 1200 tours par minute (5 minutes à 4° C) et mis dans la glace. Avant analyse 20 µl de solution d'IP est ajoutée dans chaque tube. L'oxydation de la DHR-123 en rhodamine-123 est mesurée par cytométrie en flux (FACScalibur, BD Biosciences).

Figure 11 : Protocole d'analyse du «burst oxydatif» de leucocytes humains par cytométrie en flux.



1.3. Cytométrie en flux

1.3.1. Principe

La cytométrie en flux permet d'analyser individuellement chaque cellule d'une population avec possibilité d'étudier plusieurs paramètres simultanément et de manière très rapide (jusqu'à plusieurs milliers de cellules par seconde). Les cellules, en suspension dans un flux liquide, passent devant un faisceau laser. La lumière diffusée et la fluorescence émise sont récupérées et analysées, permettant d'obtenir des informations sur la taille et la structure cellulaires.

1.3.2. Le cytomètre

Il est constitué de plusieurs modules :

1.3.2.1. Un système fluide qui assure la focalisation hydrodynamique des particules en suspension monodispersée jusque dans la chambre d'analyse.

1.3.2.2. Un système optique qui regroupe : la source lumineuse constituée d'un laser ; la chambre d'analyse où les cellules rencontrent le faisceau lumineux ; des systèmes de sélection des signaux (filtres, miroirs) permettant de séparer les signaux lumineux en fonction de leur direction ou de leur longueur d'onde ; et des systèmes de transformation des signaux lumineux en signaux électriques (photomultiplicateurs ou des photodiodes). Cet ensemble permet d'analyser les différents signaux lumineux résultant de l'interaction de la cellule avec le faisceau laser.

1.3.2.3. Un système informatique associé à un convertisseur analogique digital qui permet de traiter les données recueillies.

1.3.3. Paramètres analysés et significations biologiques

1.3.3.1. Lumière diffusée sous un petit angle (<10°) : Forward Scatter (FSC), ce paramètre est fonction de la taille de la cellule.

1.3.3.2. Lumière diffusée sous un grand angle (90°) : Side Scatter (SSC), ce paramètre est fonction du contenu intracellulaire notamment la granularité de la cellule.

1.3.3.3. Lumière émise : les cellules marquées par un ou plusieurs fluorochromes vont émettre dans toutes les directions une ou plusieurs fluorescences qui seront séparées par des miroirs dichroïques et des filtres en fonction de leur longueur d'onde. L'intensité de fluorescence sera proportionnelle au nombre des molécules de fluorochrome fixées sur la cellule.

1.3.4. Analyse par cytométrie

Les cellules sont analysées sur un FACScalibur (BD Biosciences) équipé d'un laser Argon de 15 mW émettant à 488 nm. Tous les paramètres de fluorescence sont enregistrés avec une amplification logarithmique. Pendant les acquisitions, une région est définie sur l'histogramme de fluorescence rouge (IP) basée sur les événements qui ont la même quantité d'ADN qu'une cellule humaine diploïde. Les cellules fixées vont incorporer de l'IP proportionnellement à leur quantité d'ADN, ce qui permet de les différencier des microorganismes et des débris cellulaires. Les cellules sélectionnées sont analysées avec les paramètres taille-structure (FSC vs. SSC) et les populations d'intérêt (granulocytes et monocytes) sont sélectionnées sur cet histogramme. Les cellules stimulées vont produire des radicaux oxygénés capable d'oxyder la DHR-123 en rhodamine 123 ayant une fluorescence verte. Le pourcentage de cellules positives est déterminé en comptant le nombre d'événements en fonction de leur intensité de

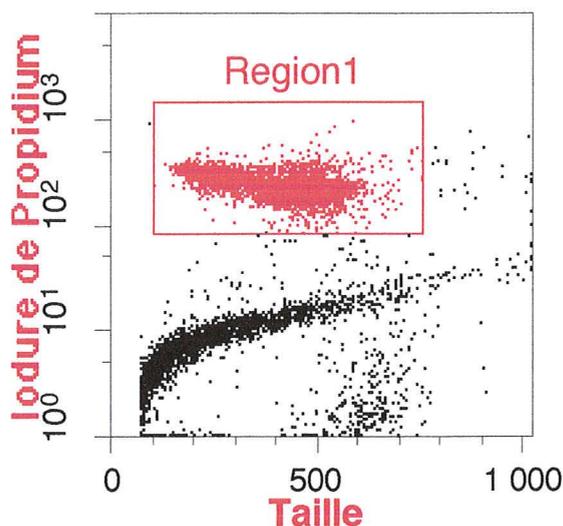
marquage par rapport au témoin PBS. L'intensité moyenne de fluorescence (IMF) est corrélée avec la quantité d'oxydants produits par la cellule.

1.4. Analyse statistique

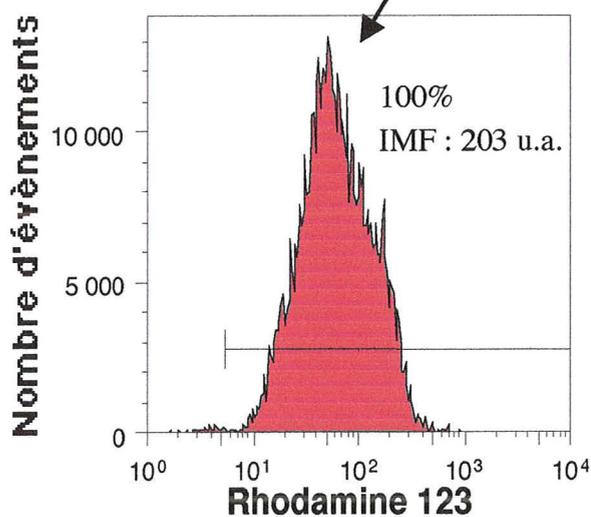
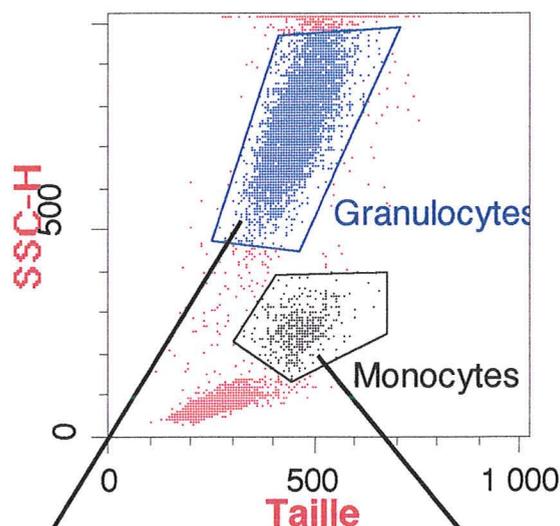
Le test t de Student (distribution bilatérale) ainsi que l'étude de variance ont été utilisés afin de vérifier la valeur statistique des différences observées entre les données obtenues.

Figure 12 : Protocole d'analyse du "burst oxydatif" en cytométrie

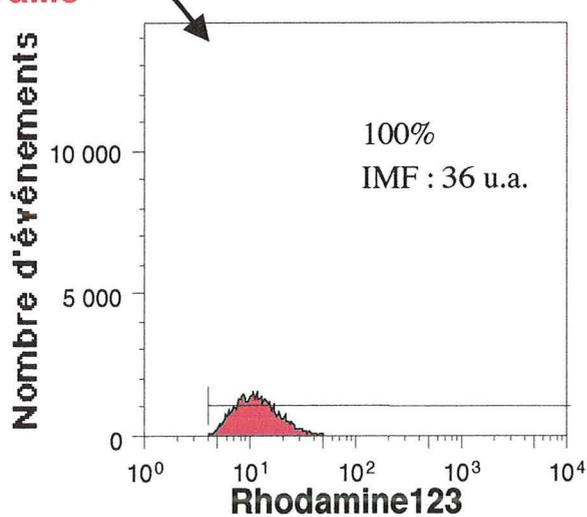
Sélection des événements en fonction de la quantité d'IP incorporée.



Histogramme taille-structure permettant de sélectionner séparément les granulocytes et les monocytes.



Histogramme du nombre de granulocytes en fonction de la quantité de rhodamine 123 fluorescente produite



Histogramme du nombre de monocytes en fonction de la quantité de rhodamine 123 fluorescente produite

2. Etude de l'adhérence et de l'expression de récepteurs au complément CR1, CR3 et CR4.

2.1. Matériel

2.1.1. Cellules THP-1

Elles sont issues d'une lignée monocyttaire. Ces cellules non adhérentes (ATCC 202 TIB) sont cultivées dans un milieu constitué en milieu RPMI 1640 (Sigma, annexe) contenant 10% de sérum de veau fœtal (SVF, Bio-whittaker) décomplémenté à 56°C pendant 30 minutes et filtré (0,22 μ m), additionné de L-glutamine (2 mM final), et 100 UI/ml de pénicilline et 100 μ g/ml de streptomycine (mélange Pénicilline-Streptomycine, Biomérieux).

Les cultures sont maintenues à 37°C dans une atmosphère humide contenant 5% de CO₂. Le repiquage se fait tous les 3 jours.

La numération et la viabilité des cellules sont estimées au moment de chaque repiquage en utilisant le test d'exclusion au bleu de trypan (0,2% en PBS, Fluka).

2.1.2. Cellules MRC5

Les cellules MRC5 sont des cellules de type fibroblastique (ATCC CCL 171, Biomérieux). Les cellules sont mises en culture à 10⁵ cellules/ml dans du DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium, Sigma), pH=7,4 contenant 25 mM d'Hépes, additionné de 2% d'Ultrosor G (sérum synthétique), 4 mM de Glutamine, 500 UI/ml de pénicilline, de 250 μ g/ml de streptomycine (DMEM complet). Les cultures sont conservées à 37°C dans une atmosphère humide contenant 5% de CO₂ jusqu'à l'obtention d'un tapis cellulaire (3 jours environ).

2.1.3. Souche virale

La souche utilisée est la souche Towne, fournie par le Pr E. Drouet (Faculté de Médecine-Pharmacie, Grenoble).

2.1.4. PMA (Phorbol Myristate Acetate) (Sigma)

Le PMA est le produit utilisé pour induire la différenciation des cellules THP-1 en macrophages. Il est conservé à -20°C dans du DMSO à une concentration de 1 mg/ml.

2.1.5. Anticorps

2.1.5.1. Pour la détection du HCMV :

Dans cette étude des anticorps de souris sont utilisés :

- **Anticorps E13** anti-protéine très précoce de 72kDa (fourni par S. Michelson Institut Pasteur, Paris ; dilution au $1/1000^{\text{ème}}$). La protéine reconnue par l'antigène E13 est une protéine qui apparaît dans la phase très précoce du cycle viral.
- **Anticorps anti-protéine pp65** (fourni par S. Michelson, Institut Pasteur, Paris ; dilution au $1/5^{\text{ème}}$). La protéine pp65 est une protéine structurale tardive.
- **Anticorps polyvalent de souris** : immunoglobuline G (IgG) qui sert de contrôle isotypique (Jackson ImmunoResearch Laboratories, dilution au $1/1000^{\text{ème}}$).
- **Conjugué fluorescent** : Anticorps d'âne anti-IgG de souris couplé à l'isothiocyanate de fluorescéine (FITC) (Jackson ImmunoResearch Laboratories). Il est dilué au $1/50^{\text{ème}}$ dans du bleu Evans, soit une concentration finale de 5.10^{-3} mg/ml.

2.1.5.2. Pour la détection des récepteurs au complément

Des anticorps monoclonaux anti-CD11b, anti-CD11c, anti-CD18 et anti-CD35 ainsi que des IgG de contrôles isotypiques marquées à la phycoérythrine (PE) (Pharmingen international) sont utilisés.

2.2. Méthode

2.2.1. Production de HCMV et titration

J0 : mise en culture de MRC5

Un volume de 25 ml de milieu DMEM complet, contenant 10^5 cellules MRC5/ml, est déposé dans des boîtes de culture de 75 cm³ et mis en culture jusqu'à confluence (3 jours) à 37°C et CO₂.

J3 : Infection des cellules

Les cellules à confluence sont lavées 3 fois au DMEM sans Ultrosor G (37°C), infectées avec 10^6 ufp (unité formant plaque) de HCMV, et misent en culture environ 5 jours dans DMEM sans Ultrosor G.

J8 : Récupération du virus

Une fois l'effet cytopathogène observé, le surnageant est récupéré et centrifugé (2000 tours par minutes, 10 minutes).

Le surnageant est récupéré et ultracentrifugé à 4°C : accélération régulière pendant 10 minutes jusqu'à 35000 tours par minute, puis plateau à 35000 tours par minutes pendant 1 heure 20 minutes et décélération régulière pendant 20 minutes (Rotor RP45T, Ultracentrifugeuse 2331 Ultraspinn 70 LKB Bromma).

Le culot est repris dans du DMEM sans Ultrosor G, aliquoté et congelé à -80°C.

Titration

La titration se fait en plaque 96 puits contenant des MRC5 à confluence, lavées et misent en culture avec DMEM sans Ultrosor G.

Infection d'ordre 4: Délivrer 50 µl de virus dilué au 1/100^{ème} dans les 8 puits de la colonne 1 contenant 150 µl de milieu DMEM sans Ultrosor G. Mélanger avec la pipette multi-canaux réglée sur 50 µl puis transférer 50 µl dans la colonne 2. Eliminer les

pointes. Reprendre des pointes propres à chaque colonne. Rejeter à la poubelle 50 μ l de la colonne 11. La colonne 12 étant le témoin cellules non infectées.

Lecture à partir de 4 jours jusqu'à ce qu'il n'y ait plus d'évolution de l'effet cytopathogène (ECP).

Calcul du titre viral

Tableau 3 : Exemple de calcul du titre viral

Dilution	Log de dilution	Puits (+) ECP 100%	Puits (-) Pas ECP	Positif cumulés	Négatifs cumulés	Puits + (%)
1/4 ¹	-0,6	8	0	45	0	100%
1/4 ²	-1,2	8	0	37	0	100%
1/4 ³	-1,8	8	0	29	0	100%
1/4 ⁴	-2,4	6	2	21	2	93,1%
1/4 ⁵	-3,0	5	3	15	5	75%
1/4 ⁶	-3,6	5	3	10	8	55,5%
1/4 ⁷	-4,2	3	5	5	13	27,7%
1/4 ⁸	-4,8	2	6	2	21	8,7%
1/4 ⁹	-5,4	0	8	0	29	0%
1/4 ¹⁰	-6,0	à	8	0	37	0%

- Calcul de Δy

$$\Delta y = (\% \text{ de } + \text{ immédiatement } > \text{ à } 50) - 50 / (\% \text{ de } + \text{ immédiatement } < \text{ à } 50)$$

$$\Delta y = (55,5 - 50) / (55,5 - 27,7) = 0,198$$

- Titre

Titre = valeur de $(\Delta y \times \log \text{ ordre de dilution}) +$ inverse du log de la dilution pour laquelle le pourcentage est immédiatement supérieur ou égal à 50% + inverse du log de la dilution de départ (1/100)

$$\text{Titre} = (0,198 \times \log 4) + 3,6 + 2 = 5,720 \log \text{ DICT } 50/50\mu\text{l}$$

$$\log \text{ DITC } 50/\text{ml} = \log (\text{DITC } 50/50\text{ml} \times 20) = \log (\text{DITC } 50/50\mu\text{l}) = \log 20$$

$$\log \text{ DITC } 50/\text{ml} = 5,720 + \log 20 = 7,02103 \text{ DITC } 50/\text{ml}$$

$$\text{Soit } C = 10^{7,02103} = 1,05 \cdot 10^7 \text{ pfu/ml}$$

2.2.2. Infection par le CMV de cellules THP-1

J0 : stimulation des cellules au PMA (Ibanez *et al.*, 1991)

Dans les puits de plaque 24 puits, 10^6 cellules THP-1/ml sont déposées. Certains puits peuvent contenir des lamelles sur lesquelles les cellules adhéreront. Les cellules sont stimulées par ajout de $10 \mu\text{l}$ de PMA à $10 \mu\text{g/ml}$ dans chaque puit. Après agitation, les cellules sont mises en culture à 37°C sous 5 % de CO_2 .

J1 : lavage des cellules

Les cellules sont lavées trois fois avec du RPMI (37°C), afin d'éliminer le PMA et les cellules non adhérentes, et remises en culture avec 1 ml de RPMI + SVF 10 % par puits.

J5 : changement du milieu de culture

J7 : restimulation avec PMA (Baybutt *et al.*, 1990).

Tous les puits sont traités avec du PMA dans les mêmes conditions que J1.

J8 : infection (Lathey *et al.*, 1991).

Les puits sont rincés avec du RPMI, puis 1ml à 10^6 pfu/ml de virus est déposé dans les puits correspondants.

Les plaques sont centrifugées pendant 1 heure à 2000 tours par minute, puis incubées 1 heure à 37°C sous CO_2 . La suspension virale est ensuite éliminée par une série de lavage avec du RPMI.

2.2.3. Détection des cellules infectées par le HCMV par Immunofluorescence indirecte à J11

- Les cellules sont lavées avec du PBS et fixées avec un mélange contenant 75% d'acétone et 25% de PBS (300 μ l/puits).
- Les plaques sont alors placées à + 4°C pendant 15 minutes.
- Un nouveau lavage au PBS est effectué. Les lamelles sont transférées dans une nouvelle plaque.
- Dans chaque puits est introduit 250 μ l d'une solution de sérum d'âne à 20% dans du PBS. Cette solution reste en contact avec les cellules pendant 30 minutes. L'objectif de cette étape est de saturer les sites non spécifiques.
- Plusieurs lavages au PBS sont effectués avant l'introduction de 250 μ l d'anticorps spécifique dans les puits correspondants (E13 et pp65).
- Pour le témoin négatif, un contrôle isotypique de souris est utilisé.
- Les anticorps restent en contact avec les macrophages pendant deux heures à 37°C.
- Pour éliminer les anticorps libres une série de lavage est nécessaire.
- Le conjugué fluorescent est dilué au 1/50^{ème} dans une solution de bleu Evans au 1/1000000^{ème} et est introduit dans les puits (250 μ l/puits), il reste en contact avec les cellules durant 30 minutes.
- Les puits sont rincés au PBS au moins trois fois.
- Pour améliorer l'observation des cellules au microscope, une goutte de fluoprep (Biomérieux) est déposée sur les lames. Le fluoprep est en contact direct avec le tapis cellulaire fixé sur les lamelles.
- Les lames sont observées avec un microscope à fluorescence (Zeiss MC 80 DX).

2.2.4. Etude de l'adhérence des conidies aux macrophages

J10 : Marquage des conidies

Les conidies récoltées et lavées sont reprises avec une solution de FITC (Sigma) à 3 mg/ml dans du tampon carbonate 0,5M à pH=9,5 (filtrée à 0,22 μ m) et incubées sous agitation une nuit à 4°C.

J11 : Test d'adhérence

- Les conidies sont lavées plusieurs fois au PBS pour éliminer le surplus de FITC, remises en suspension à 5×10^7 conidies/ml.
- Les conidies sont opsonisées si besoin par une incubation de 30 minutes dans du sérum humain AB décomplémenté ou non, sous agitation. Après 3 lavages au PBS, les conidies sont resuspendues à 5×10^7 conidies/ml.
- Sur les macrophages infectés par HCMV, $2,5 \times 10^6$ conidies sont déposées dans les puits correspondants
- Après agitation, les plaques sont incubées 1 heure à 37°C.
- Les plaques sont lavées plusieurs fois au PBS pour éliminer les conidies non adhérentes.
- Les cellules sont récupérées par incubation de 5 minutes à 37°C avec 500 μ l/puits de trypsine 0,1% + EDTA 0,02%, et transférées en tube de 5 ml (type 352052 de BD Bioscience).
- Pour inhiber la trypsine, 1 ml de RPMI + SVF 10% est ajouté.
- Après 2 lavages au PBS, les cellules sont fixées pendant 10 minutes à température ambiante avec Cellfix dilué au 1/10^{ème}.
- Après lavage, les tubes sont mis à 4°C jusqu'à analyse cytométrique.

Analyse au cytomètre

Dans l'étude de l'adhérence des conidies marquées au FITC à la surface des macrophages, les histogrammes correspondant à la fluorescence cellulaire en fonction de la taille permettaient d'individualiser deux populations bien distinctes : 1) une population négative dont la faible fluorescence correspondant au cumul de l'autofluorescence émise par les cellules, 2) une population positive correspondant aux cellules ayant fixées des conidies fluorescentes.

2.2.5. Etude de l'expression des intégrines CR1, CR3 et CR4

- Les cellules sont récupérées comme précédemment, et transférées dans les tubes de 5 ml (type 352052 de BD Bioscience).
- Après 2 lavages au PBS, 20 μ l d'anticorps anti-CD11b, anti-CD11c, anti-CD18 et anti-CD35 à 0,2 mg/ml marqués à la phycoérythrine sont déposés sur les cellules en suspension dans PBS.
- Les tubes sont incubés 30 minutes à 4°C.
- Après 3 lavages au PBS, les cellules sont fixées avec Cellfix (BD Bioscience) dilué au 1/10^{ème} pendant 10 minutes à température ambiante.
- Après lavage, les tubes sont conservés à 4°C jusqu'à analyse cytométrique.

Analyse au cytomètre

Dans l'étude de l'expression des récepteurs CR1, CR3 et CR4, la fluorescence mesurée par le cytomètre après marquage des macrophages par les anticorps spécifiques de CR1 et des sous-unités α et β des CR3 et CR4, correspondait à la somme de trois signaux : l'autofluorescence cellulaire, la fluorescence non spécifique (anticorps fixés sur les récepteurs Fc des immunoglobulines ou sur des sites non spécifiques), et enfin, la fluorescence spécifique. Pour ne prendre en compte que la dernière, une immunoglobuline contrôle est utilisée.

Figure 13 : Schéma du protocole opératoire pour l'étude de l'adhérence des conidies et de l'expression des récepteurs au complément

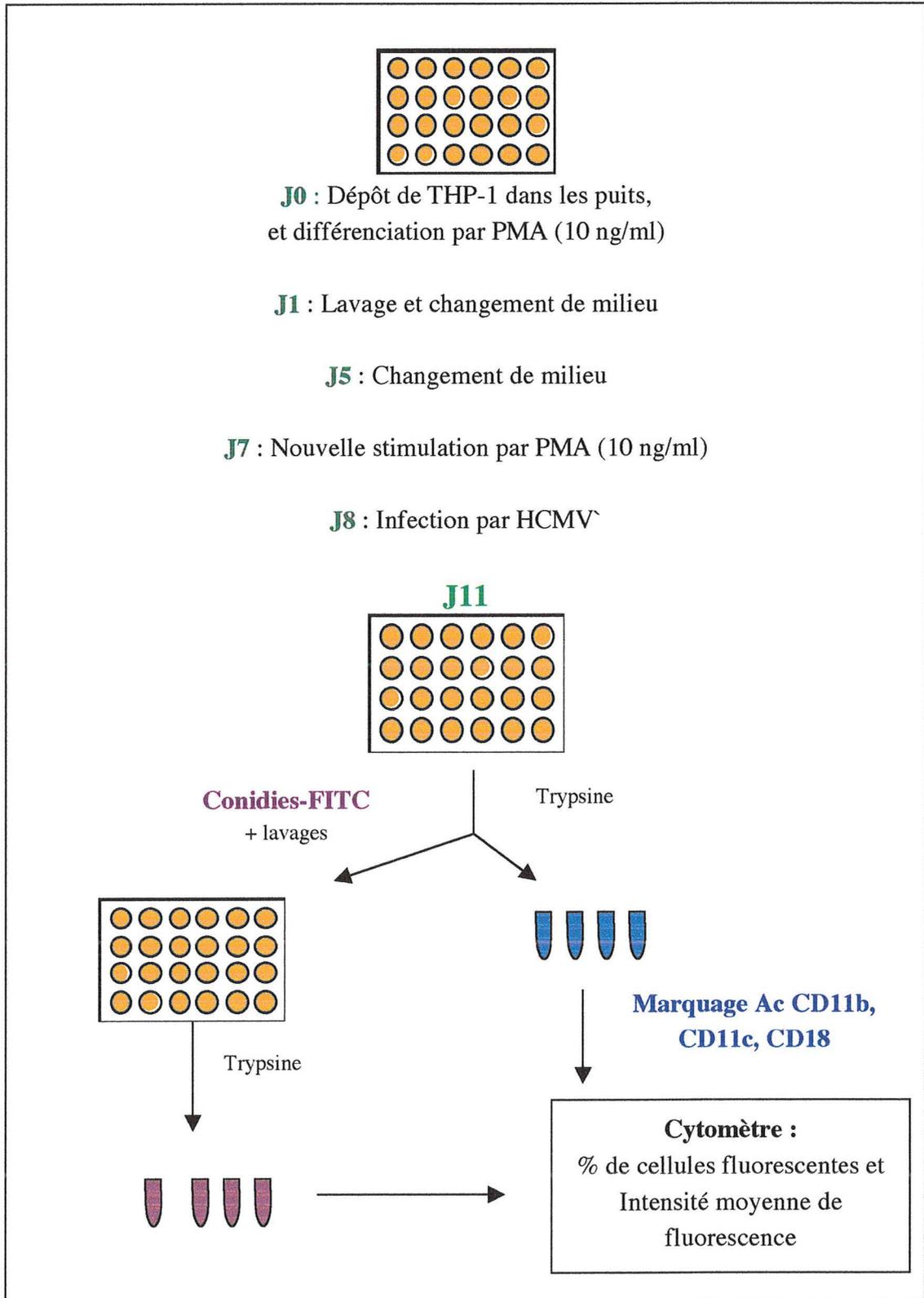
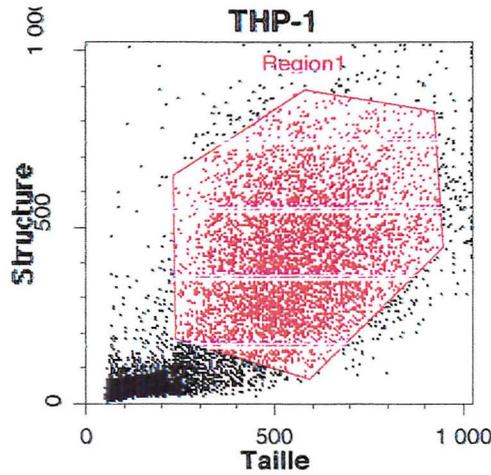
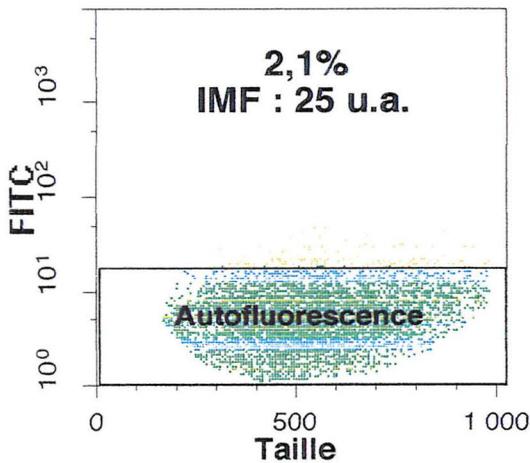


Figure 14 : Protocole d'étude de l'adhérence et de l'expression des récepteurs par cytométrie.

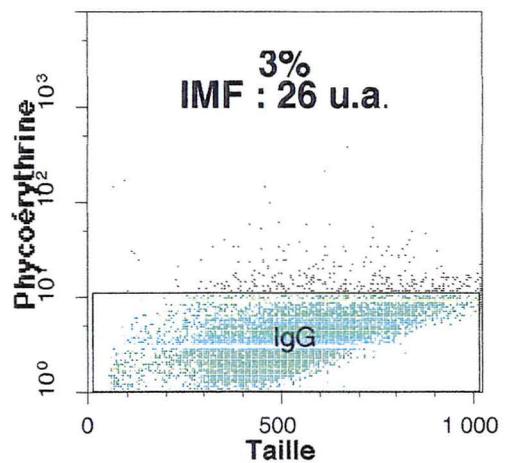
Sélection des cellules sur l'histogramme taille-structure



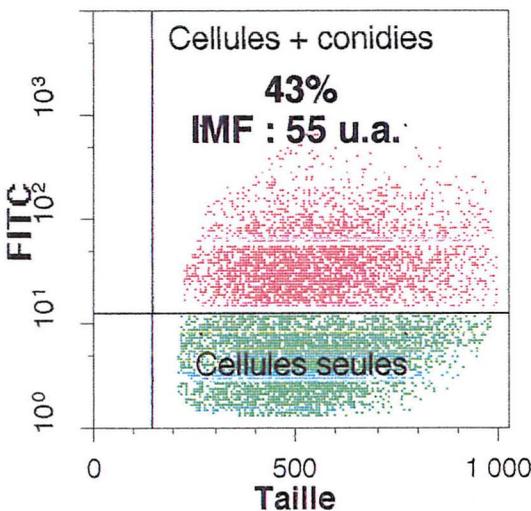
Analyse biparamétrique de l'autofluorescence des cellules en FITC



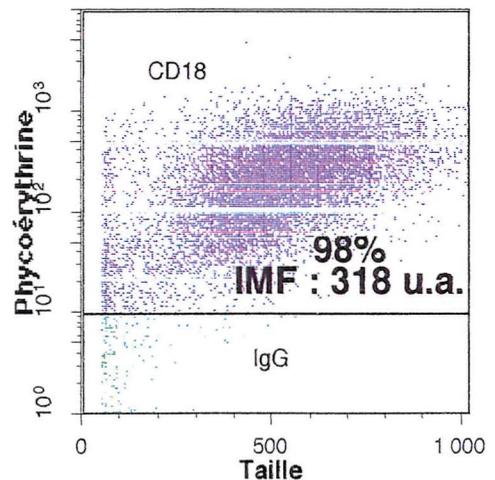
Analyse biparamétrique des cellules fixant l'IgG de contrôle marquée à la phycoérythrine.



Analyse biparamétrique des cellules ayant fixé des conidies marquées au FITC



Analyse biparamétrique des cellules exprimant la sous-unité CD18 (Ac anti-CD18 marqué à la PE)



Résultats

1. Etude du «burst oxydatif» des leucocytes

1.1. Mise au point de la méthode de cytométrie

Le but de notre travail est de mettre au point une technique rapide d'analyse en CMF pour étudier la réponse oxydative des leucocytes en présence d'*Aspergillus fumigatus*.

1.1.1. Choix du protocole.

Une des premières étapes du travail était de définir les différents paramètres intervenant dans la réalisation de ce test.

Le choix de l'utilisation de sang total s'est imposé de part la durée et la complexité des étapes de purification des leucocytes qui ont l'inconvénient d'activer les cellules.

Différents essais de temps d'incubation ont été réalisés pour la stimulation (15, 30 et 45 minutes) et pour la sonde fluorescente (5, 10 et 15 minutes). Une meilleure réponse oxydative des cellules stimulées est obtenue pour un temps d'incubation de 30 minutes (stimulation + sonde), les cellules étant moins altérées.

1.1.2. Concentration en conidies

Une courbe "dose-réponse" est réalisée par incubation de sang total d'un individu sain avec des concentrations croissantes de conidies tuées (10^7 à 10^9 /ml), afin de déterminer le meilleur rapport conidies/cellules.

- Le pourcentage de cellules produisant des ERO augmente avec le nombre de conidies (Figure 15). Un plateau est observé lorsque la concentration devient supérieure à 5×10^8 conidies/ml pour les granulocytes et à 5×10^7 conidies/ml pour les monocytes. Pour une concentration supérieure à 5×10^8 conidies/ml, les monocytes sont altérés et produisent moins d'ERO.

- L'intensité de réponse des cellules stimulées augmente avec la concentration de conidies pour atteindre un plateau à 5×10^8 conidies/ml (Figure 16) aussi bien pour les monocytes que pour les granulocytes.

Figure 15 : Pourcentage de cellules phagocytaires produisant des ERO en fonction de la concentration en conidies tuées (10^7 à 10^9 /ml).

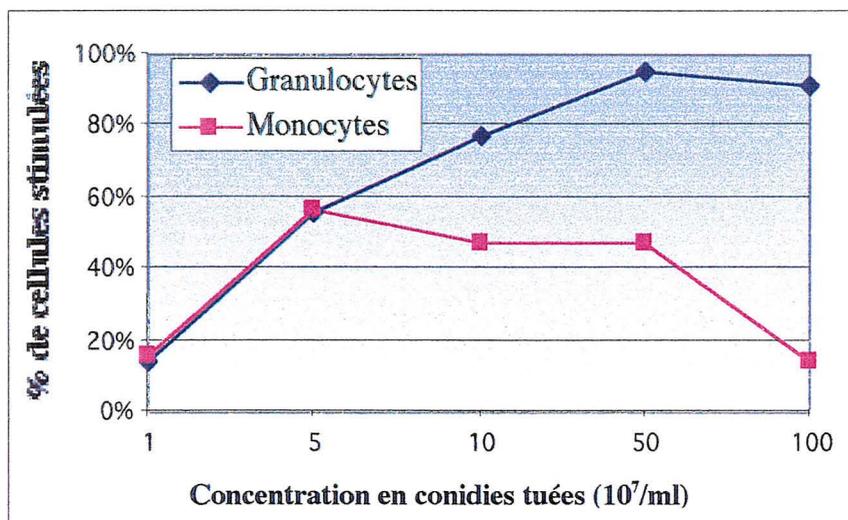
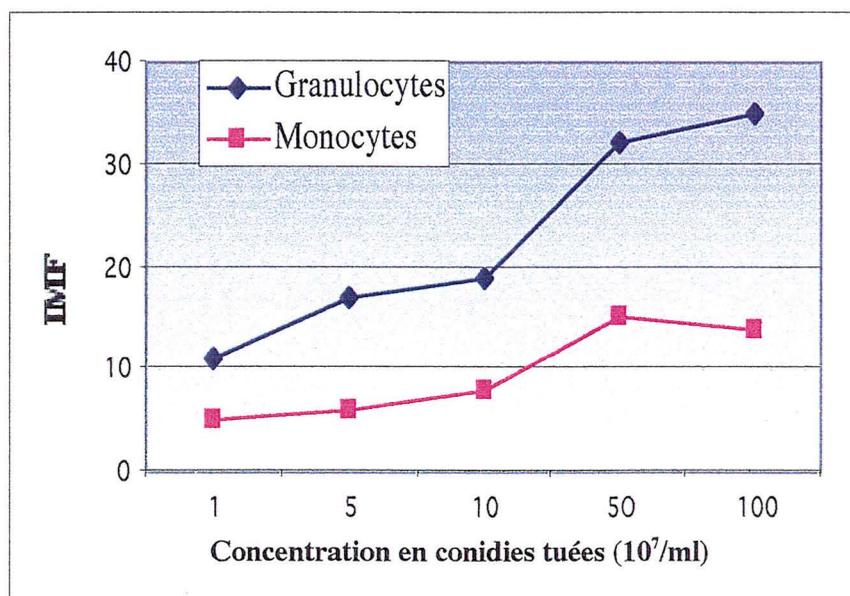


Figure 16 : Intensité moyenne de réponse oxydative (IMF, en unité arbitraire=u.a.), des cellules phagocytaires en fonction de la concentration en conidies tuées (10^7 à 10^9 /ml).



1.1.3. Précision de la méthode

La reproductibilité a été testée en réalisant cinq fois, sur un même échantillon de sang, une stimulation avec du PBS, du PMA ou des conidies tuées (10^8 /ml). Le coefficient de variation calculé, les résultats montrent une très bonne reproductibilité (Tableau 4).

Tableau 4 : Détermination de la précision de la méthode par le calcul du coefficient de variation (CV). Pour cela, à partir d'un même sang les différentes stimulations (PMA et conidies tuées d'*A. fumigatus* (10^8 /ml)) ont été réalisées 5 fois.

CV	% de cellules stimulées		Intensité moyenne de fluorescence	
	Granulocytes	Monocytes	Granulocytes	Monocytes
PMA	0%	2%	9%	10%
<i>A. fumigatus</i>	7%	4%	7%	11%

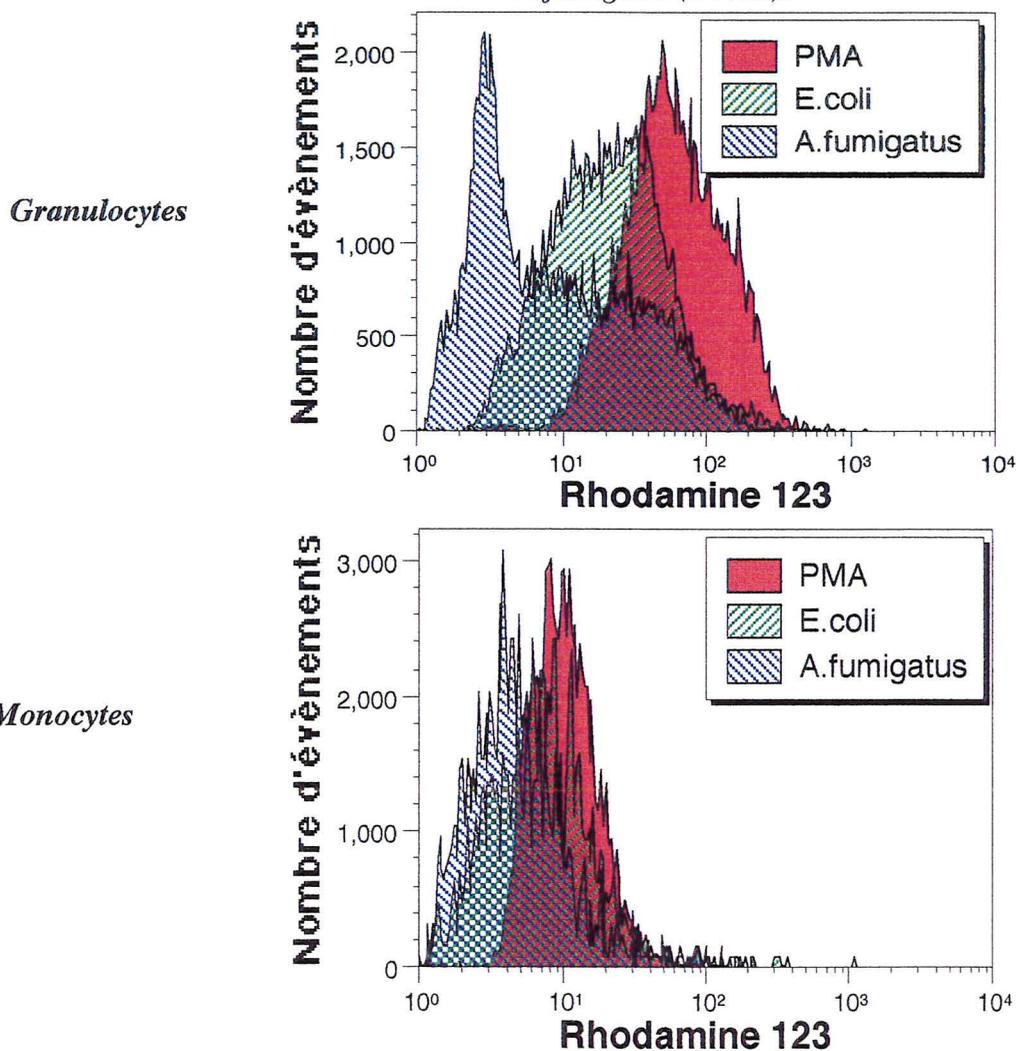
1.1.4. Intervalle de réponse

Sur 34 donneurs sains, un intervalle de réponse oxydative des leucocytes à PMA, à *E. coli* et à des conidies tuées est déterminé (Tableau 5). Lors de la stimulation par des conidies tuées d'*A. fumigatus*, l'intervalle de réponse est large. Pour les monocytes, le pourcentage de cellules stimulées par *A. fumigatus* est compris entre 21% et 100% pour les 34 sujets sains alors que pour *E. coli* ce pourcentage varie entre 63% et 100%. Pour les granulocytes, l'intervalle est toujours plus important pour *A. fumigatus* (60-100%) que pour *E. coli* (90-100%). Le même phénomène est observé lorsque l'on s'intéresse à l'IMF. L'intensité moyenne de stimulation est plus faible pour *A. fumigatus* (4 u.a. à 46 u.a. pour les granulocytes et les monocytes), que pour *E. coli* (16 u.a. à 57 u.a. pour les granulocytes et 8 u.a. à 75 u.a. pour les monocytes). Comme l'illustre l'histogramme de la figure 17, deux populations apparaissent lors de la stimulation par *A. fumigatus* : une population de cellules non stimulées et une population positive dont l'intensité de réponse oxydative est moins importante qu'avec *E. coli* et PMA.

Tableau 5 : Intervalle de réponse oxydative de leucocytes de 34 sujets sains à différents stimuli. (Le seuil est de 3% pour les cellules positives pour le témoin PBS).

Cellules	Stimulus	% de cellules stimulées	IMF
Monocytes	PMA	99-100	15-77
	<i>E. coli</i>	63-100	8-75
	<i>A. fumigatus</i>	21-100	4-45
Granulocytes	PMA	100	49-402
	<i>E. coli</i>	90-100	16-57
	<i>A. fumigatus</i>	60-100	7-46

Figure 17 : Histogrammes du nombre et de l'intensité de réponse de granulocytes et de monocytes stimulés par du PMA, *E. coli* opsonisés tués ($10^8/ml$) et des conidies tuées de *A. fumigatus* ($10^8/ml$).



1.2. Réponse selon le stade et l'état des conidies

A. fumigatus n'étant pas une particule inerte, l'étude de la réponse oxydative des leucocytes en présence des différents états et stades, sous lesquels le champignon peut être retrouvé dans l'organisme, semble intéressante.

1.2.1. Conidies tuées et conidies prégermées tuées

Le pourcentage de cellules stimulées après incubation avec des conidies tuées est de 93% pour les granulocytes, 78% pour les monocytes. Avec des conidies prégermées tuées, il est de 96% pour les granulocytes et 86% pour les monocytes (Figure 18, Tableau 6). Quant à l'intensité de réponse oxydative après stimulation par des conidies prégermées tuées, elle est supérieure aussi bien pour les monocytes que pour les granulocytes à celle obtenue avec les conidies tuées (Figure 19).

Tableau 6 : Pourcentage de granulocytes et de monocytes produisant des espèces réactives de l'oxygène en présence de différents états et stades de conidies aspergillaires.

% de cellules produisant des ERO	Conidies vivantes	Conidies vivantes opsonisées	Conidies tuées	Conidies prégermées tuées
Granulocytes	81%	72%	93%	96%
Monocytes	61%	65%	78%	86%

Figure 18 : Influence du stade prégermé ou non des conidies aspergillaires tuées sur le pourcentage de granulocytes et de monocytes produisant des espèces réactives de l'oxygène (n=7).

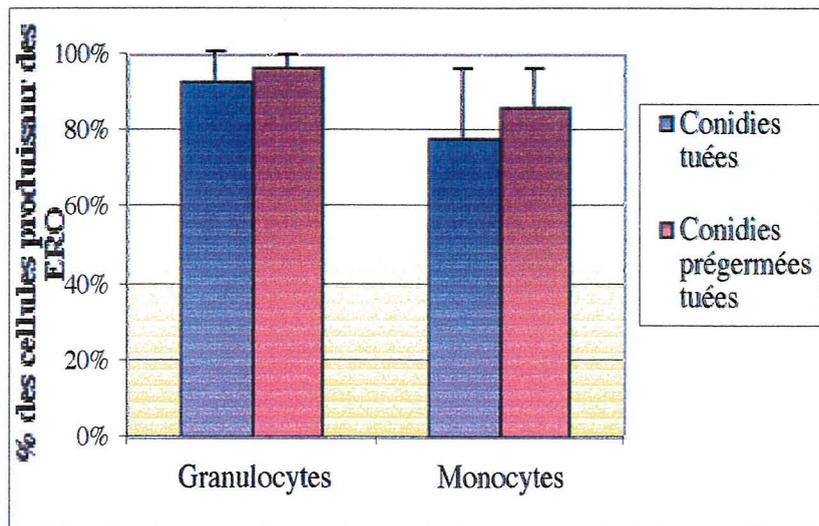
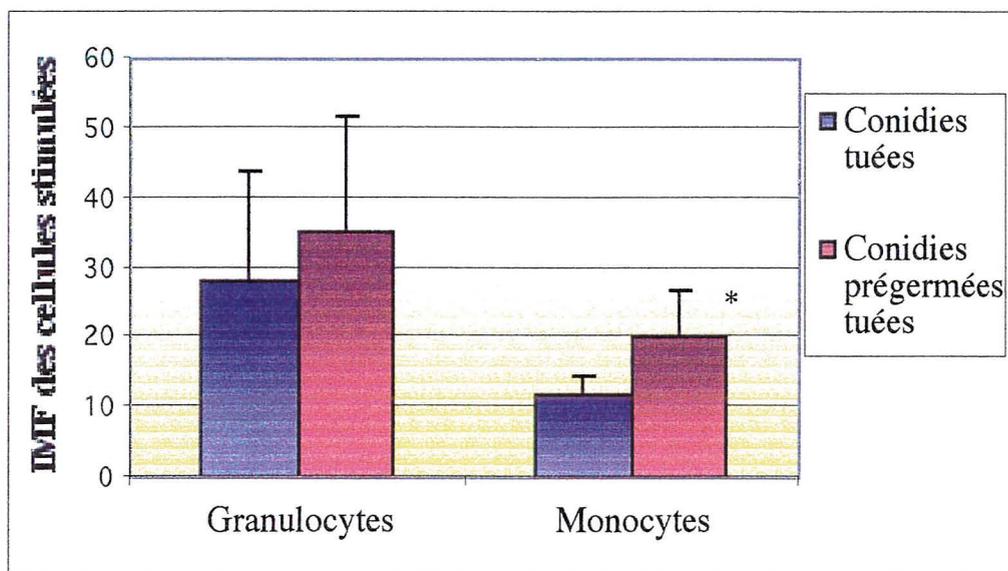


Figure 19 : Influence du stade prégermé des conidies aspergillaires tuées sur l'intensité moyenne de stimulation des granulocytes et des monocytes produisant des espèces réactives de l'oxygène (n=7).

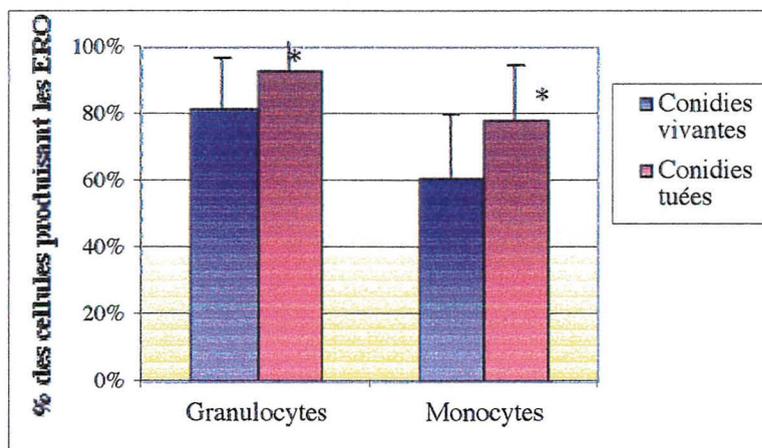


* différence significative ($p < 0,05$) par rapport à la valeur des conidies tuées.

1.2.2. Conidies vivantes et conidies tuées

La stimulation avec des conidies vivantes montre une réponse oxydative significativement plus faible par rapport aux conidies tuées (81% vs 93% pour les granulocytes et 61% vs 78% pour les monocytes) (Tableau 6 et Figure 20).

Figure 20 : Influence de l'état vivant ou tué des conidies aspergillaires sur le pourcentage de granulocytes et de monocytes produisant des ERO (n=7).

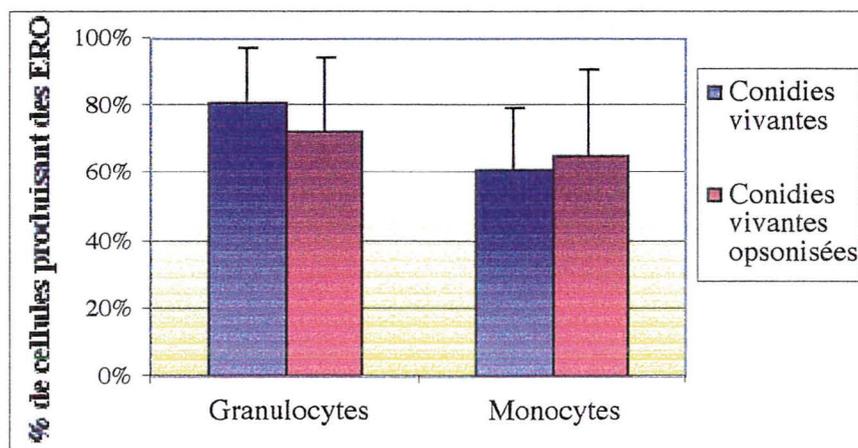


* différence significative ($p < 0,05$) par rapport à la valeur des conidies vivantes

1.2.3. Conidies vivantes et conidies vivantes opsonisées

L'opsonisation des conidies vivantes entraîne une diminution non significative du pourcentage de granulocytes stimulés (Figure 21).

Figure 21 : Influence de l'état opsonisé ou non des conidies aspergillaires vivantes sur le pourcentage de granulocytes et de monocytes produisant des ERO (n=7).



1.3. Réponse selon les souches d'A. fumigatus et le génotype.

Afin de déterminer, s'il existe une modification de la réponse oxydative des leucocytes d'un sujet en fonction de la souche d'*A. fumigatus* utilisée, nous avons étudié la réponse de différents sujets sains à différentes souches typées d'*A. fumigatus*.

1.3.1. Souches typées du laboratoire

Nous avons étudié la réponse oxydative des leucocytes de 8 sujets sains à la stimulation par 10 souches d'*A. fumigatus* issues de 9 patients du CHU de Grenoble et génotypées par la technique de SSDP mise au point au laboratoire (Mondon *et al.*, 1997) (Tableaux 7 et 8).

- ***Réponse selon la souche***
- **Pour une souche d'*A. fumigatus* donnée**, le pourcentage de cellules stimulées varie en fonction des individus. En effet, une souche qui entraîne une faible activation des cellules pour un individu, donne une forte stimulation chez un autre individu. Exemple pour la souche 1 : 24% de granulocytes positifs pour le sujet 6 contre 100% pour le sujet 1.
- **Pour un individu donné**, le pourcentage de cellules stimulées va dépendre de la souche. Un individu peut répondre très bien à une souche et moins à une autre.
Exemple : Pour le sujet 6, 74% de granulocytes positifs avec la souche 7 contre 24% avec la souche 1.
- **Le profil de réponse aux différentes souches** est variable d'un individu à l'autre. En effet, deux individus peuvent répondre à la stimulation par différentes souches de façon très différente. Exemple entre les sujets 6 et 7.
- Si on compare les souches provenant de patients différents atteints d'aspergillose invasive (1 à 5) avec les souches correspondant à une colonisation bronchique,

on ne remarque aucune différence significative. Les souches issues d'AI prouvée n'induisent pas un « burst oxydatif » significativement différent des souches issues de colonisation.

- Les souches 11 et 12 issues du même patient et provenant d'une colonisation bronchique entraînent une réponse oxydative individuelle très voisine dans les granulocytes et les monocytes des 6 sujets testés.

- *Réponse selon le génotype*

Le génotype (obtenu par SSDP) des différentes souches utilisées étant connu, nous avons essayé d'établir un lien entre la capacité des conidies à induire un « burst oxydatif » et le génotype. Parmi les dix souches testées, certaines présentent un génotype identique.

Pour un génotype donné, une variation de la réponse oxydative des cellules est observée en fonction des individus. Exemple pour le **génotype 29** et le sujet 4 : 80% de granulocytes stimulées avec la souche 4 et 47% avec la souche 11.

Pour un individu donné, une variation du pourcentage de cellules stimulées en fonction du génotype est observée.

Pour l'ensemble des individus, il n'apparaît pas de génotype entraînant une stimulation des cellules significativement différentes des autres.

Les souches de même génotype entraînent des réponses différentes chez un même individu. Par exemple : pour le sujet 6, 74% de granulocytes positifs avec la souche 7 contre 24% avec la souche 1 de même génotype. Par contre, les souches 11 et 12 issues du même patient et de même génotype induisent une réponse oxydative individuelle comparable dans les individus testés. Cependant la souche 4 de même génotype ne stimule pas les individus de façon similaire. Une seule technique déterminant ce génotype, nous avons préféré tester des souches ayant un biotype défini par trois techniques différentes.

Tableau 7 : Pourcentage de granulocytes produisant des ERO chez 8 sujets sains après stimulation avec des conidies tuées de différentes souches d'*A. fumigatus* génotypées.

Les souches 1, 2, 7 ont le même génotype SSDP, et les souches 4, 11, 12 ont le même génotype SSDP.

Les souches 11 et 12 proviennent du même patient.

Les souches de 1 à 5 proviennent d'AI prouvée et les souches de 6 à 12 de colonisation bronchique.

Souches entraînant le plus fort pourcentage de granulocytes positifs chez le sujet

Souches entraînant le plus faible pourcentage de granulocytes positifs chez le sujet

Génotype	Sujets		ST 1	ST 2	ST 3	ST 4	ST 5	ST 6	ST 7	ST 8
	Souches									
	PMA		100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%
	<i>E. coli</i>		99%	100%	3%	74%	100%	99%	100%	99%
	ALP+		93%	82%	97%	68%	81%	90%	100%	90%
26	1		100%	95%	36%	18%	46%	24%	68%	58%
26	2		100%	99%	68%	67%	95%	52%	52%	98%
32	3		100%	99%	96%	89%	95%	76%	57%	87%
29	4		87%	81%	78%	80%	98%	61%	94%	96%
30	5		100%	100%	99%	93%	99%	65%	92%	100%
25	6		99%	96%	61%	38%	98%	63%	51%	34%
26	7		99%	89%	72%	62%	100%	74%	79%	85%
22	10		99%	89%	81%	81%	99%	57%	98%	83%
29	11				50%	47%	68%	34%	84%	100%
29	12				42%	50%	85%	50%	88%	99%

Tableau 8 : Pourcentage de monocytes produisant des ERO de 8 sujets sains après stimulation avec des conidies tuées de différentes souches d'*A. fumigatus* génotypées.

Les souches 1, 2, 7 ont le même génotype SSDP, et les souches 4, 11, 12 ont le même génotype SSDP.

Les souches 11 et 12 proviennent du même patient.

Les souches de 1 à 5 proviennent d'AI prouvée et les souches de 6 à 12 de colonisation bronchique.

Souches entraînant le plus fort pourcentage de granulocytes positifs chez le sujet.

Souches entraînant le plus faible pourcentage de granulocytes positifs chez le sujet.

Génotype	Sujets		ST 1	ST 2	ST 3	ST 4	ST 5	ST 6	ST 7	ST 8
	Souches									
	PMA		100%	100%	88%	99%	100%	100%	100%	100%
	<i>E. coli</i>		98%	95%	19%	74%	100%	90%	84%	98%
	ALP+		66%	60%	79%	74%	89%	66%	97%	100%
26	1		96%	55%	68%	17%	71%	25%	100%	100%
26	2		93%	62%	50%	42%	54%	84%	100%	100%
32	3		93%	65%	88%	52%	61%	63%	99%	100%
29	4		70%	66%	84%	72%	94%	82%	100%	100%
30	5		98%	94%	93%	84%	87%	98%	100%	100%
25	6		87%	55%	86%	45%	72%	17%	70%	98%
26	7		85%	60%	88%	56%	76%	50%	99%	100%
22	10		88%	82%	69%	65%	99%	60%	98%	100%
29	11				13%	18%	90%	97%	100%	100%
29	12				21%	12%	89%	96%	100%	100%

1.3.2. Souches EBGA et souches mutantes

Une seule méthode de typage ne permettant pas de définir un profil de réponse oxydatif caractéristique du génotype, l'association de trois méthodes (équipe de l'EBGA) a permis d'affirmer plus précisément le type d'une souche. Parmi les trois techniques, la MLEE (analyse des isoenzymes) étant plus une technique de phénotypage, nous déterminons donc le profil de réponse d'un biotype (Tableaux 9 et 10).

- **Les mêmes variations du pourcentage de cellules stimulées, que précédemment (1.3.1.1. Réponse selon la souche), sont observées en fonction de :**
 - la souche pour un individu, par exemple pour la souche 9482 : 29% de granulocytes positifs pour le sujet 6 contre 100% pour le sujet 1.
 - l'individu pour une souche, par exemple pour le sujet 3, 40% de granulocytes positifs avec la souche 9403 contre 97% avec la souche 14324.
 - Le profil de réponse des individus aux différentes souches, par exemple entre les sujets 6 et 7.
 - En comparant les souches en fonction de leur origine (API ou non), on ne remarque pas de différence significative.
- **Réponse selon le biotype :** nous avons trois souches de même biotype provenant de 3 sujets différents (14324, 9403, 9899). Il semble que la souche 14324 entraîne un fort pourcentage de cellules positives par rapport aux autres souches. Les souches de même biotype 9899 et 9403 n'ont pas le même profil de réponse. En effet, la souche 9403 stimule moins de cellules. Pour les sujets 2, 3 et 6, la souche 9403 est celle qui donne le plus faible pourcentage de cellules stimulées (57%, 40%, 67%) alors que la souche 14324 donne le pourcentage le plus important (100%, 97%, 99%).

- **Réponse selon le type MLEE** : Les souches 9404 et 9482 de même typage MLEE n'entraînent pas la même réponse oxydative dans les cellules des différents individus.
- **La souche 9860 (albinos)** entraîne une forte production d'ERO dans un grand nombre de cellules, quel que soit l'individu. Elle entraîne la stimulation la plus forte et la plus intense par rapport aux autres souches.
- **Souches référencées (fournies par Dr Tsai) :**
 - La souche mutante albinos (B-5233/RGD 12-8) comme la souche 9860 albinos stimule plus et plus efficacement les cellules que la souche sauvage (B-5233) ou la souche reconstituée (RGD012-8/PKS33-3).
 - La souche mutante reconstituée semble induire une production de ERO plus faible que la souche sauvage (61% vs 78%).

Les mêmes types de résultats sont obtenus pour le pourcentage de monocytes stimulés par différentes souches.

Tableau 9 : Pourcentage de granulocytes produisant des ERO chez 10 sujets sains après stimulation avec des conidies tuées de différentes souches d'*A. fumigatus*.
 Les souches **B-5233/RGD 12-8** et **9860** sont des souches mutantes albinos. Les souches **9403, 9899** et

14324 sont de même génotype

Genotype	Sujets Souches	ST1	ST2	ST3	ST4	ST5	ST6	ST7	ST8	ST9	ST10
	PMA	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
	ALP+	57	66	90	86	100	87	100	100	94	100
	RGD012-8/PKS33-3	90	57			89	24	66	73	35	54
	B-5233	92	75			81	76	88	97	49	66
	B-5233/RGD 12-8	100		84	84	99	93	95	100	93	100
	9860	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
4	9899	100	100	49	44			95	100	71	99
2	9853	96	98					100	100	94	100
8	9404	95	88	50	51	100	99	96	100	82	100
4	9403	83	57	40	35	100	67	100	100	80	98
4	14324	100	100	97	46	100	99	100	100	100	100
16	9851	22	100	67	68	100	98	100	100	95	100
15	9768	100	99	74	69	99	99	100	100		
14	9482	100	98	43	29	82	79	97	100	75	98

Tableau 10 : Intensité moyenne de fluorescence en u.a. de granulocytes produisant des ERO chez 10 sujets sains après stimulation avec des conidies tuées différentes souches d'*A. fumigatus* génotypées.

Les souches **B-5233/RGD 12-8** et **9860** sont des souches mutantes albinos. Les souches **9403, 9899** et

14324 sont de même génotype

Genotype	Sujets Souches	ST1	ST2	ST3	ST4	ST5	ST5	ST6	ST8	ST9	ST10
	PMA	237	74	114	21	183	108	85	229	45	132
	ALP+ T	5	13	26	25	20	13	30	45	31	24
	RGD012-8/PKS33-3	12	7			5	5	6	6	6	6
	B-5233	12	8			5	5	8	9	9	6
	B-5233/RGD 12-8	126		10	9	17	13	29	28	23	15
	9860	152	128	100	64	115	48	165	154	179	130
4	9899	81	52	11	10			13	19	19	11
2	9853	17	20					20	20	17	15
8	9404	16	10	10	11	67	27	16	20	17	12
4	9403	15	12	11	13	13	10	16	21	16	10
4	14324	50	54	18	12	37	23	18	25	21	19
16	9851	4	33	13	14	53	22	17	22	22	15
15	9768	34	30	13	14	16	17	21	25		
14	9482	55	49	12	13	9	9	13	18	14	10

1.4. Réponse selon les espèces d'*Aspergillus*

Afin de déterminer si certaines espèces moins pathogènes entraînent une meilleure réponse oxydative des leucocytes nous avons analysé la production d'espèces réactives de l'oxygène par des leucocytes stimulés par des conidies vivantes et tuées d'*A. fumigatus*, *A. flavus*, *A. niger* et *A. terreus*.

A. flavus entraîne une production de radicaux oxygénés dans moins de cellules qu'*A. niger* et *A. fumigatus* (20% vs 95% et 84%). Les cellules produisent aussi moins d'ERO (6,5 u.a. vs 10 u.a. et 16 u.a. en IMF) (figures 22 et 23).

A. niger stimulent fortement la réponse oxydative des leucocytes comme *A. fumigatus*.

Figure 20 : Pourcentage de granulocytes et de monocytes produisant des espèces réactives de l'oxygène après stimulation avec des conidies vivantes ou tuées ($10^8/ml$) de différentes espèces d'*Aspergillus* (n=9).

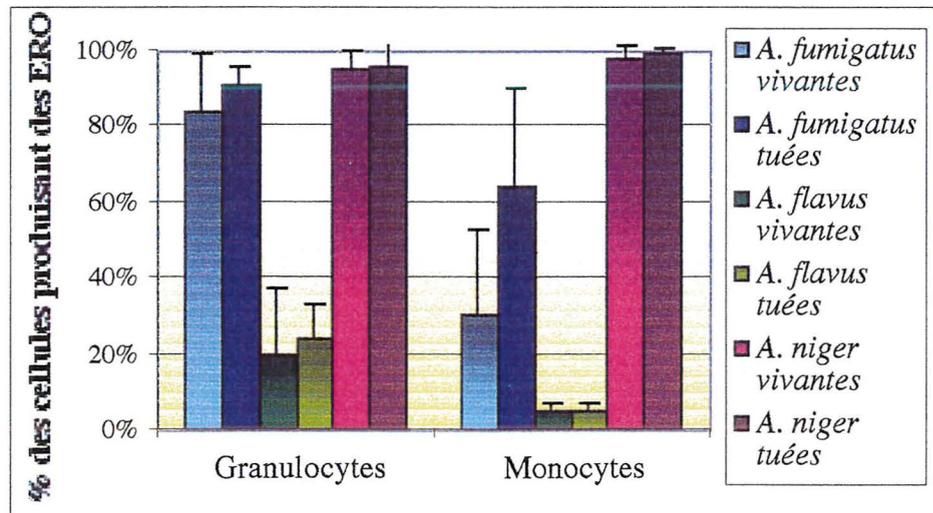
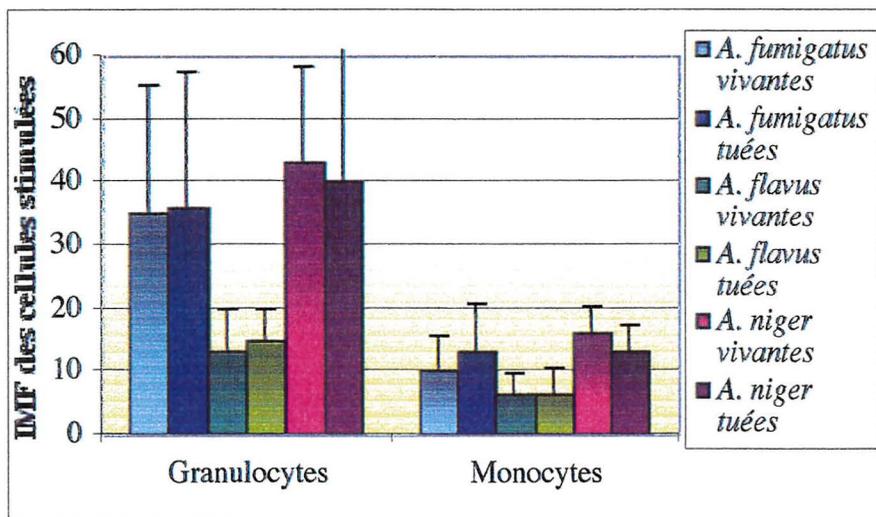


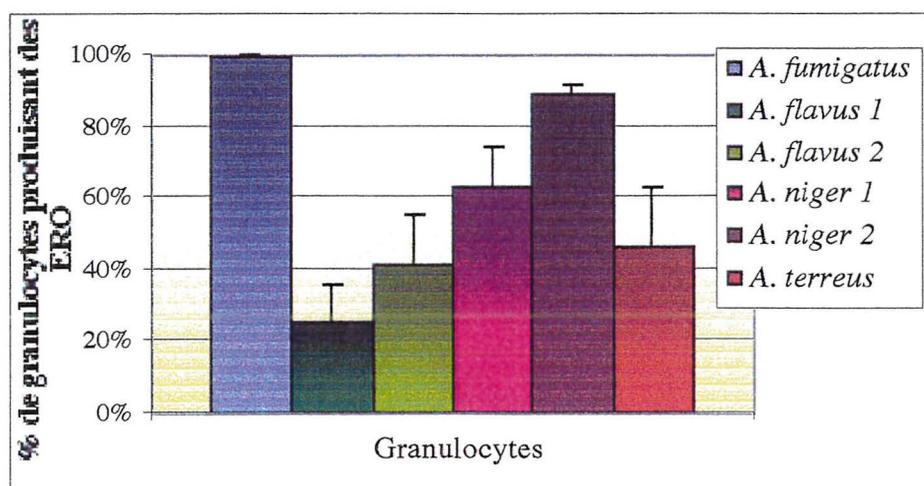
Figure 23 : Intensité moyenne de fluorescence (en u.a.) des granulocytes et monocytes produisant des ERO après stimulation par des conidies vivantes ou tuées ($10^8/ml$) de différentes espèces d'*Aspergillus*. (n=9).



Afin de vérifier qu'il n'y avait pas de variation en fonction des souches utilisées, nous avons testé la réponse oxydative de leucocytes en présence de différentes souches de *A. flavus* et *A. niger* et une souche de *A. terreus* (figure 24).

Quelle que soit la souche de *A. flavus*, la réponse oxydative des leucocytes est plus faible par rapport à *A. fumigatus* et *A. niger*. *A. terreus* entraîne une stimulation comparable à *A. flavus*.

Figure 24 : Pourcentage de granulocytes produisant des espèces réactives de l'oxygène après stimulation avec des conidies tuées ($10^8/ml$) de différentes espèces d'*Aspergillus* (*A. fumigatus*, *A. niger*, *A. flavus*, *A. terreus*)(n=3).



1.5. Etude de la réponse oxydative chez différents patients

Dans l'objectif du développement d'un examen biologique prédictif chez des sujets à risques aspergillaires, des essais ont été réalisés sur 4 patients différents :

Tableau 11 : Caractéristiques des différents patients

Patient sexe/age	Pathologie	Thérapeutique immunosuppressive	NFS	HCMV	
				Antigénémie	Sérologie
1	Leucopénie par choc septique	Corticoïdes		-	-
2 (H/32)	Stade SIDA de l'infection à VIH avec charge virale importante. Infection à HCMV par réactivation.		EB : 11,2 G/l Hb : 104 g/l Pq : 444 G/l	+	+
3 (F/62)	Pneumopathie Pleuro-pneumopathie à HCMV, Plasmocytome	Chloraminophène (2-2-2 à J10) Médrol (32 mg/j)	EB : 605 G/l Hb : 85 g/l Pq : 73 G/l	+	+
4 (H/75)	Infection pulmonaire à <i>Staphylococcus aureus</i> . Infection à HCMV par réactivation		EB : 10,3 G/l dont 95% de PNN Hb : 88 g/l Pq : 72 G/l	+	-

NFS : Numération formule sanguine ; EB : éléments blancs (polynucléaires, monocytes, lymphocytes) ; Hb : hémoglobine ; Pq : Plaquettes (G : 10⁹ éléments/litre)

Pour tous les patients, il y a diminution de la réponse oxydative à *A. fumigatus* aussi bien en pourcentage de cellules stimulées qu'en intensité de stimulation, ceci est surtout observé pour les granulocytes (Tableau 12 et 13).

Un essai a été réalisé sur un sujet agranulocytaire, mais le faible nombre de cellules circulantes rend l'approche très difficile et le « burst oxydatif » n'a pu être mesuré par notre technique.

Tableau 12 : Réponse oxydative à différents stimuli (PMA, *E.coli* opsonisés tués ($10^8/ml$), conidies tuées de *A. fumigatus* ($10^8/ml$)) des granulocytes de patients présentant différentes pathologies.

% de granulocytes produisant des ERO	Patient 1	Patient 2	Patient 3	Patient 4	Norme
PMA	99%	100%	100%	99%	100
<i>E. coli</i>	64%	41%	92%	100%	90-100
<i>A. fumigatus</i>	23%	39%	41%	40%	60-100

Tableau 13 : Réponse oxydative à différents stimuli (PMA, *E.coli* opsonisés tués ($10^8/ml$), conidies tuées de *A. fumigatus* ($10^8/ml$)) des monocytes de patients présentant différentes pathologies

% de monocytes produisant des ERO	Patient 1	Patient 2	Patient 3	Patient 4	Norme
PMA	95%	89%	99%	98%	99-100
<i>E. coli</i>	64%	43%	96%	100%	63-100
<i>A. fumigatus</i>	14%	33%	67%	8%	21-100

2. Etude de l'adhérence et de l'expression des récepteurs au complément CR3 et CR4.

Dans l'objectif de développer une technique d'étude du rôle de l'infection à HCMV sur l'adhérence et l'expression des récepteurs au complément par des cellules de patients, nous avons utilisé un modèle de lignée cellulaire, afin dans un premier temps de déterminer si le HCMV modifie les paramètres étudiés.

2.1. Infection des cellules THP-1 différenciées

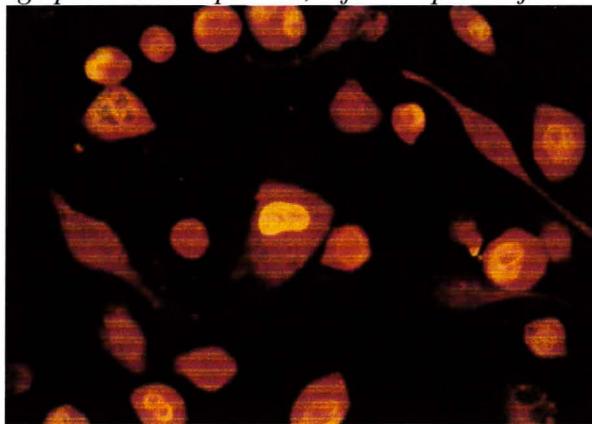
Le taux d'infection des macrophages est déterminé par comptage sur 1000 cellules au microscope à fluorescence trois jours après infection. La viabilité cellulaire évaluée avec le bleu de Trypan est comprise entre 94 et 96% dans ces expériences.

L'infection des macrophages par le HCMV est déterminée par la mise en évidence de protéines virale dans les cellules infectées par immunofluorescence indirecte.. Trois jours après infection, le pourcentage de macrophages positifs est de 55% avec E13 et de 50% avec pp65 (figure 25)

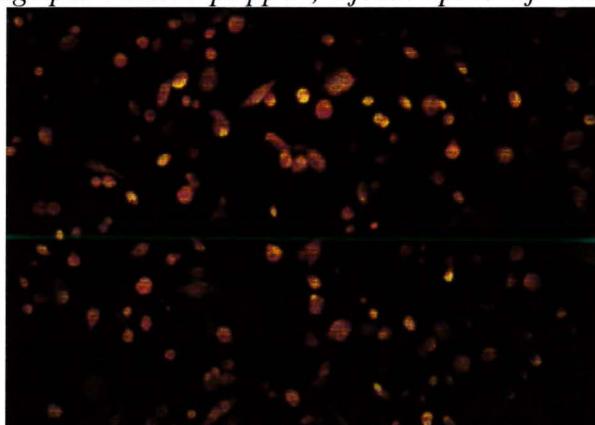
Après avoir vérifié que les cellules étaient bien infectées, nous avons analysé l'influence de l'infection à HCMV sur l'adhérence de conidies et sur l'expression des intégrines.

Figure 25 : Photographie de cellules THP-1 différenciées infectées par du HCMV marquées par immunofluorescence.

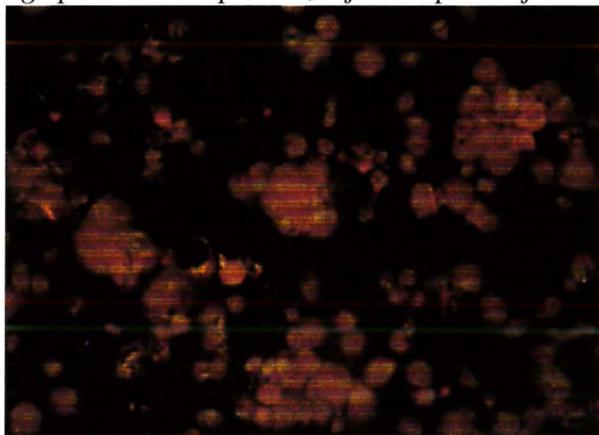
*Cellules THP-1 différenciées infectées par le HCMV.
Marquage par l'anticorps E13, 3 jours après infection. X400*



*Cellules THP-1 différenciées infectées par le HCMV.
Marquage par l'anticorps pp65, 3 jours après infection. X250*



*Cellules THP-1 différenciées infectées par le HCMV.
Marquage par l'anticorps E13, 3 jours après infection. X250*



2.2. Adhérence des conidies

L'étude de l'adhérence des conidies aspergillaires à la surface des THP-1 différenciées infectées ou non a été réalisée en triplicat. Les macrophages exposés au HCMV fixent moins les conidies vivantes que les macrophages non infectés (46% vs 58%).

Figure 26 : Variation de l'adhérence des conidies aspergillaires vivantes à la surface des macrophages infectés (HCMV) ou non (RPMI).
Profil de variation au cours de trois expériences

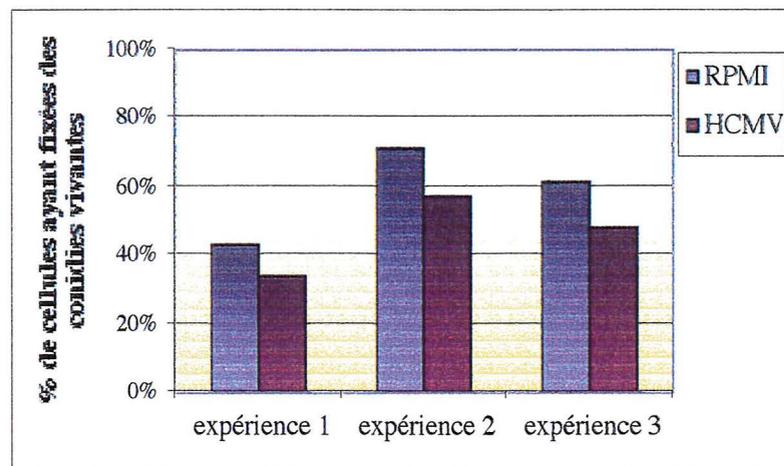
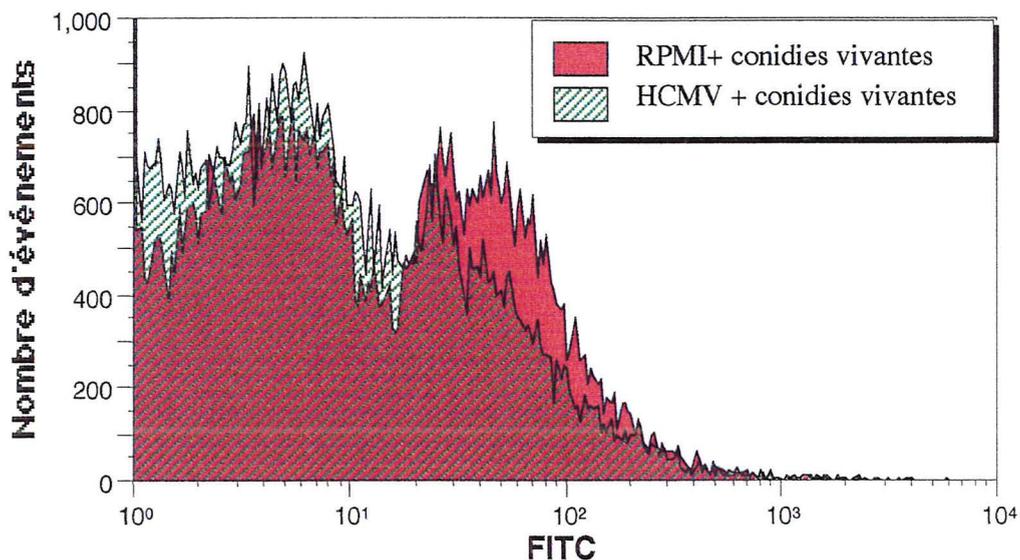


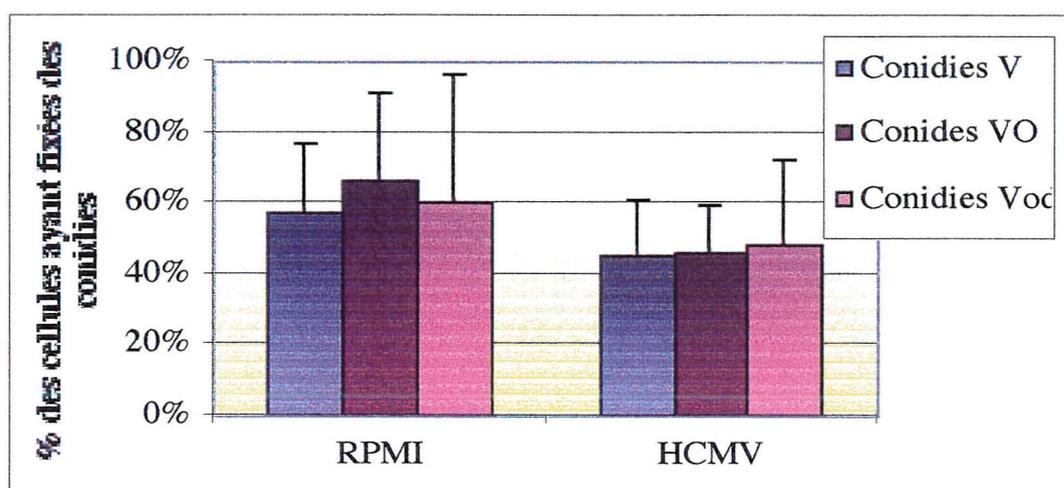
Figure 27 : Histogramme du nombre de cellules THP-1 infectées (HCMV) ou non (RPMI) ayant fixées des conidies marquées au FITC en fonction de l'intensité de fluorescence.



L'adhérence réalisée avec des conidies vivantes préalablement opsonisées dans du sérum humain décomplémenté ou non (Conidies VO et Conidies Vod) est plus forte que pour les conidies non opsonisées (Conidies V).

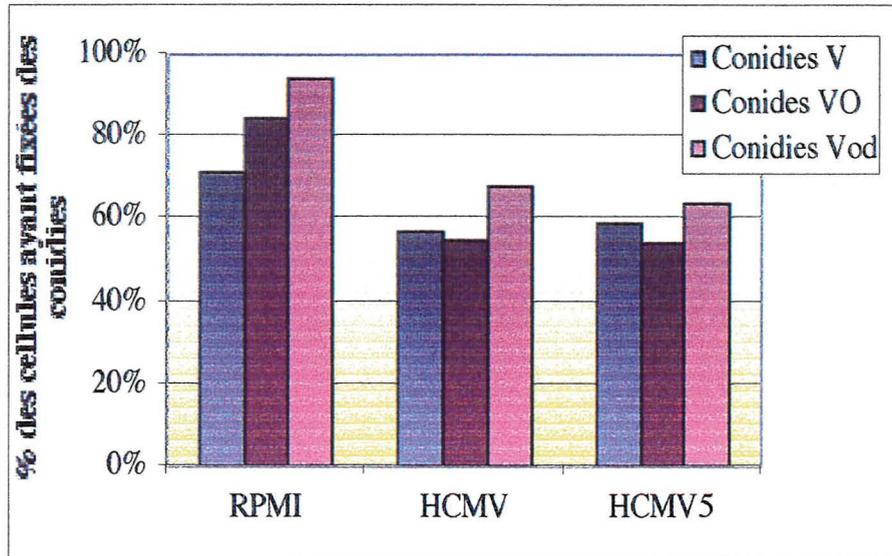
D'autre part, dans le cas de conidies opsonisées l'adhérence semble supérieure avec du sérum complémenté (RPMI : 57%, 67%, 60%). Ces variations ne sont pas observées lorsque les cellules sont infectées (HCMV : 45%, 43%, 46%).

Figure 28 : Variation de l'adhérence des conidies aspergillaires à la surface des macrophages infectés (HCMV) ou non (RPMI) en fonction de leur opsonisation (V : vivantes, VO : vivantes opsonisées, Vod : vivantes opsonisées avec sérum décomplémenté) (n=2).



Nous avons étudié l'adhérence des conidies aspergillaires à la surface des macrophages non infectés (RPMI), exposés à 10^6 pfu/ml et à 5×10^6 pfu/ml de la suspension virale. Pour les concentrations virales testées, aucune variation de l'adhérence des conidies quelles que soient leur état n'est observée (RPMI : 71%, 84%, 94% ; HCMV : 57%, 55%, 68% ; HCMV5 : 59%, 54%, 64%).

Figure 29 : Variation de l'adhérence des conidies aspergillaires à la surface des macrophages infectés par différentes concentrations de virus (RPMI : THP-1 non infectées, HCMV : THP-1 infectées par 10^6 pfu/ml de HCMV, HCMV5 : THP-1 infectées par 5×10^6 pfu/ml HCMV) (V : vivantes, VO : vivantes opsonisées, VOd : vivantes opsonisées avec sérum décomplémenté) (n=1).



2.3. Expression des intégrines

Le récepteur CR1 n'est pas exprimé par la lignée THP-1 avant et après différenciation en macrophage.

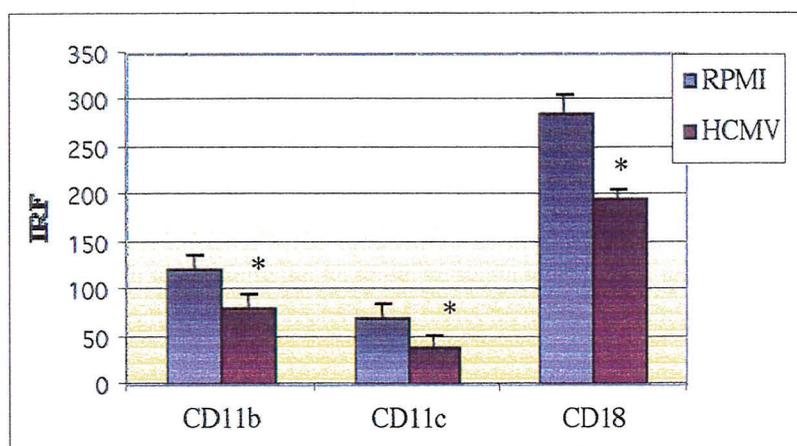
La moyenne des quatre expériences, étudiant l'expression des sous-unités α et β des récepteurs au complément CR3 et CR4, montre une différence dans l'expression des chaînes CD11b, CD11c entre les macrophages non infectés et infectés (CD11b : 60% vs 70% ; CD11c : 43% vs 60%) sauf pour le CD18 (90% vs 88%).

Des variations plus marquées sont observées en intensité moyenne de fluorescence, les macrophages infectés exprimant significativement moins de sous-unités, en particulier le CD18 (CD11b : 131 u.a. vs 174 u.a.; CD11c : 88 u.a. vs 117 u.a., CD18 : 223 u.a. vs 318 u.a.).

Afin de rendre les résultats plus expressifs, l'index relatif d'expression de fluorescence (IRF) est utilisé. Pour le témoin négatif, un seuil est de 3% de cellules fluorescentes est consenti.

IRF = Intensité moyenne de fluorescence x % de cellules fluorescentes

Figure 30 : Index relatif de fluorescence des sous-unités α (CD11b, CD11c) et β (CD18) des récepteurs au complément CR3 et CR4 à la surface de macrophages infectés par HCMV(n=4)



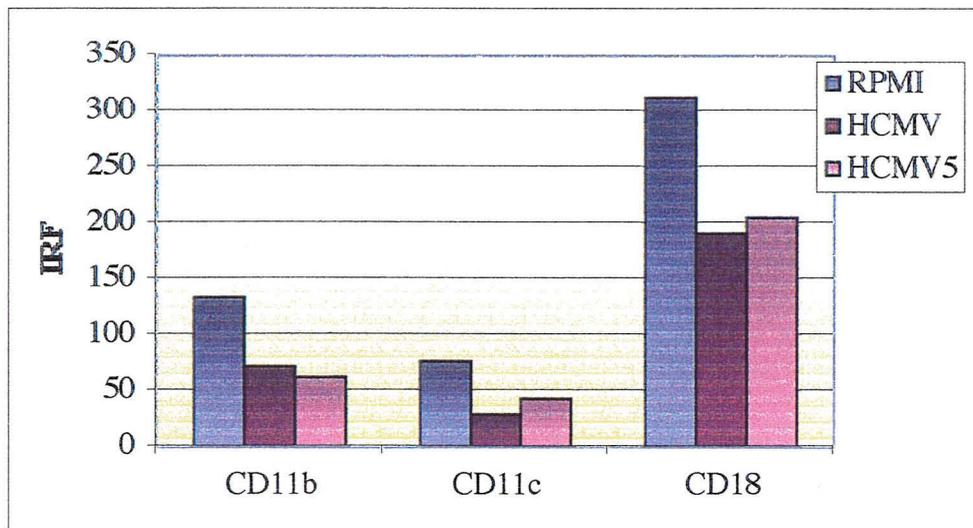
*différence significative ($p < 0,05$) par rapport à la valeur du témoin RPMI.

En présence de HCMV, l'index relatif de fluorescence pour les différentes sous-unités est diminué (CD11b : 79 u.a. vs 122 u.a.; CD11c : 38 u.a. vs 70 u.a. ; CD18 : 196 u.a. vs 286 u.a.).

Afin de déterminer l'impact du titre viral sur l'expression des récepteurs CR3 et CR4, nous avons infecté les macrophages par 10^6 pfu/ml et 5×10^6 pfu/ml de virus (HCMV, HCMV5). Une diminution identique d'expression est observée. En index relatif de fluorescence, on obtient respectivement pour les cellules non infectées (RPMI), infectées par 10^6 pfu/ml (HCMV) et 5×10^6 pfu/ml (HCMV5) : CD11b : 133u.a., 70 u.a., 63 u.a. ;CD11c : 76 u.a., 29 u.a., 43 u.a. ; CD18 : 313 u.a., 190 u.a., 206 u.a.

Lors d'une expérience précédente, nous avons infecté les THP-1 différenciées avec 5×10^4 pfu/ml de virus, nous n'avons pas observé de variation dans l'expression des récepteurs par rapport au témoin RPMI de cellules non infectées.

Figure 31 : Index relatif de fluorescence des chaînes CD11b, CD11c, CD18 par les macrophages infectés par différentes concentrations de virus (RPMI : THP-1 non infectées, HCMV : THP-1 infectées par 10^6 pfu/ml de HCMV ; HCMV5 : THP-1 infectées par $5 \cdot 10^6$ pfu/ml de HCMV)



Discussion

Dans l'organisme, les macrophages alvéolaires et les leucocytes humains coopèrent pour l'élimination d'*A. fumigatus* par différents moyens, dont la phagocytose et le « burst oxydatif » en particulier. En effet, les espèces réactives de l'oxygène (ERO : H_2O_2 , O_2^- , O_2^{\cdot}) jouent un rôle important dans la neutralisation et la destruction des conidies et des hyphes par les phagocytes (Levitz *et al.*, 1986). C'est en échappant à ces fonctions phagocytaires que le champignon peut persister et proliférer dans l'organisme.

1. Etude du burst oxydatif des leucocytes

1.1. Mise au point de la méthode par cytométrie

Il a été démontré par diverses techniques, excepté la cytométrie en flux, qu'*A. fumigatus* induisait une production d'ERO dans les phagocytes (Shanan *et al.*, 2000). Seule une étude récente a employé la cytométrie en flux pour analyser la réponse oxydative des phagocytes à un autre champignon filamenteux *Exophiala dermatitidis* (Schnitzler *et al.*, 1999). Ces auteurs ont montré que la mélanine fongique prévenait la mort du champignon dans le phagolysosome sans modifier le burst oxydatif des polynucléaires neutrophiles (PNN).

Il existe un certain nombre de méthodes permettant de mesurer la libération d'ERO par la cellule : (a) réduction du cytochrome c ; (b) chimiluminescence (O_2^- ou un produit de dismutation combiné avec du luminol ou de la luciférine entraîne une libération de lumière) ; (c) réduction du nitrobleu tétrazolium (NBT) (en présence de superoxyde ou d'un donneur d'électron le NBT soluble dans l'eau devient du formazan insoluble) ; (d) consommation d'oxygène en utilisant une électrode à oxygène.

Dans le cas de la cytométrie en flux, il est possible de mesurer la quantité d'ERO produites. D'autres avantages sont apportés par cette technique, dont le principal est l'analyse qualitative et quantitative d'un nombre important de cellules isolées et non plus de l'ensemble d'une population ($\approx 10^3$ - 10^6 cellules). L'éventuelle hétérogénéité de réponse au sein d'une population cellulaire peut alors être mise en évidence. D'autre part, elle offre la possibilité de travailler directement sur sang total sans purification préalable des neutrophiles et des monocytes, excluant toutes modifications de l'état des cellules et de la réponse oxydative. De plus, l'absence de purification réduit le temps de procédure, rendant l'utilisation de ce test envisageable en routine. Un des autres avantages de la cytométrie est de pouvoir travailler sur un faible nombre de cellules. Ce test peut donc être réalisé sur des volumes réduits de sang, et par conséquent au cours des neutropénies. En travaillant sur sang total, la présence de sérum permet une opsonisation des microorganismes qui facilitent leur reconnaissance par les phagocytes (Sturtevant *et al.*, 1992).

Plusieurs substrats peuvent être utilisés pour détecter les ERO en cytométrie, en particulier le diacétate de 2',7'-dihydrodichlorofluorescéine (DCFH-DA), le dihydroéthidium (DHE) et la DHR-123. Cependant, le DHE semble moins sensible que la DHR-123, et la fluorescence moins stable de la DCFH-DA a tendance à diffuser (Vowells *et al.*, 1995). L'utilisation de DCFH-DA permet la détection de la formation d' H_2O_2 , alors que celle de la DHR-123 permet très certainement la détection d'un plus grand nombre de ERO (Rothe *et al.*, 1991). Nous avons donc utilisé pour notre technique cytométrique de la DHR-123, et nos résultats se sont révélés reproductibles (CV < 10 %).

De plus, afin d'optimiser la méthode, il est apparu au cours de tests préliminaires que la réponse oxydative des leucocytes dépendait de nombreux facteurs : temps de stimulation, nombre et état des conidies (vivantes, tuées, prégermées). Par exemple, en

augmentant le nombre de conidies au-delà d'une valeur seuil, la production d'ERO cesse car les cellules sont altérées (Levitz *et al.*, 1985).

Finalement, il est observé une réponse oxydative à *A. fumigatus* plus faible que pour les autres stimuli (PMA et *E. coli*) et ce sont les résultats que nous discutons.

1.2. Variabilité individuelle

Afin d'étudier la capacité de réponse des polynucléaires neutrophiles (PNN) de sujets à risque d'aspergillose invasive, nous avons établi un intervalle de réponse oxydative des leucocytes de sujets sains à des conidies tuées d'*A. fumigatus*. Une hétérogénéité est apparue dans la réponse oxydative individuelle. Ce phénomène est absent pour les autres stimuli (PMA et *E. coli*). Cette variation de réponse individuelle à une même souche d'*A. fumigatus* laisse supposer l'influence possible d'une immunité anti-aspergillaire spécifique préexistante. Il serait donc intéressant de corrélérer la réponse oxydative à *A. fumigatus* avec la teneur en anti-corps anti-*Aspergillus*.

1.3. Réponse oxydative selon l'état des conidies

A. fumigatus n'étant pas une particule inerte, nous avons souhaité analyser la capacité de réponse oxydative des polynucléaires neutrophiles et des monocytes de sujets sains vis-à-vis des différents états d'*A. fumigatus* (conidies vivantes, tuées, prégermées). A chaque stade de son développement, le champignon va exprimer différentes molécules susceptibles d'influencer la réponse immunitaire innée.

Les monocytes et les polynucléaires neutrophiles agissent préférentiellement sur les conidies prégermées et les hyphes.

L'hyphe (filament mycélien) constitue la forme pathogène du champignon, mais son utilisation pour les études *in vitro* entraîne une destruction des cellules rendant

l'interprétation des phénomènes impossible, la forme prégermée (stade précédant l'hyphe) est donc plus intéressante.

Lors de la stimulation par des conidies tuées, les premiers résultats montrent une augmentation, pour le stade prégermé, du pourcentage de cellules produisant des ERO en particulier des monocytes, ainsi qu'une augmentation de l'intensité moyenne de fluorescence (IMF)(Pastor et al, 2001). Dans ce même contexte, la forme tuée des conidies présente une capacité de stimulation de la réponse oxydative plus forte que la forme vivante, les conidies aspergillaires étant capable de produire et de libérer des substances inhibant la réponse oxydative des polynucléaires neutrophiles (Robertson *et al.*, 1987 ; Murayama *et al.*, 1996, Pastor *et al.*, 2001).

Lors de l'utilisation de conidies vivantes, une diminution non significative de la réponse oxydative des polynucléaires est observée lorsque les conidies sont opsonisées. L'hypothèse suivante est avancée : les conidies opsonisées vivantes, adhérant mieux aux cellules (Sturtevant *et al.*, 1992), neutralisent plus efficacement la réponse oxydative car les substances inhibitrices solubles sont plus facilement orientées sur leur cible cellulaire. Cette différence non significative est probablement due à l'utilisation de sang total ; celui-ci contenant du sérum autologue, les conidies vivantes sont en partie opsonisées.

1.4. Réponse selon la souche et le génotype

Dans le cadre de la stimulation des leucocytes d'un individu sain par différentes souches d'*A. fumigatus* (définies par l'origine, le patient, le traitement, les prélèvements...) ou de la stimulation des leucocytes des différents individus sains par une même souche d'*A. fumigatus*, une grande hétérogénéité de réponse est observée. La réponse oxydative des leucocytes semble dépendre du génotype, de la souche, et de l'individu.

Le fait d'observer des résultats similaires pour deux souches issues d'un même patient et de génotype identique pour un même individu conduisait à l'hypothèse de l'existence d'une réponse oxydative caractéristique d'un génotype. Cependant, il a été montré pour une autre souche du même génotype, mais issue d'un patient différent, que la production de ERO différait. Le caractère génotypique ne permet donc pas de définir, à lui seul, le profil de réponse oxydative d'un individu à une souche.

Le génotype consistant à détecter la présence de gènes et non leur expression, l'étude de caractères phénotypiques semble plus intéressante pour définir ce profil. Parmi les méthodes de typage utilisées par l'équipe de l'EBGA, la technique de MLEE permet aussi l'étude de l'expression d'isoenzyme. Elle nous renseigne donc aussi sur un caractère phénotypique. Les souches EBGA peuvent être alors défini par un biotype. Lors de la stimulation des leucocytes d'un individu sain par différentes souches EBGA de même biotype, une variation de la réponse oxydative est observée entre les souches. Il n'est pas apparu de profil de réponse caractéristique de biotype par l'association de trois méthodes différentes. Le caractère phénotypique de la MLEE ne semble pas intervenir dans la modulation de la réponse oxydative des leucocytes à *A. fumigatus*, des souches de même type MLEE entraînant des réponses oxydatives différentes.

La présence de souches mutantes albinos (conidies dépourvues de pigments) a permis de mettre en évidence une augmentation de la réponse oxydative des leucocytes chez les sujets sains. D'après Jahn (Jahn *et al.*, 2000), ce phénomène est lié à la présence de pigment à la surface des conidies capables d'emprisonner les ERO produits par les cellules. L'augmentation de la réponse oxydative n'est alors pas liée à une stimulation de la production d'ERO mais à une diminution de leur captation par le pigment. Le pigment permettrait donc aux conidies de résister aux effets délétères des ERO, et ainsi de persister et de proliférer dans l'organisme.

Dans le contexte de notre étude, nous mesurons la quantité d'ERO produite et non libérée par les cellules contrairement à l'étude précédente. On peut envisager l'hypothèse



que les conidies phagocytées captent les radicaux dès leur production, avant l'ajout et l'oxydation de la DHR-123.

Le Dr Tsai et son équipe ont développé et utilisé une souche mutante albinos alb-1 possédant une plus grande capacité à fixer le facteur C3 du complément intervenant dans l'opsonisation des microorganismes (Tsai *et al.*, 1998). Nos résultats montrent pour cette souche mutée sur alb-1 une réponse oxydative plus importante dans les monocytes et les granulocytes des individus sains. D'après la littérature, ce phénomène s'explique par une perte de la captation d'ERO par les pigments puisque cette souche est albinos, mais aussi par une fixation plus importante du C3. En effet, dans notre protocole nous travaillons en sang total, c'est-à-dire en présence de sérum et de facteurs du complément qui permettent une opsonisation des conidies par le C3. Les conidies ainsi opsonisées sont mieux reconnues par les phagocytes qui sont alors activés.

1.5. Réponse oxydative selon l'espèce d'*Aspergillus*

L'étude de quatre espèces d'*Aspergillus* (*A. flavus*, *A. terreus*, *A. fumigatus* et *A. niger*) de pathogénicité différente sur des sujets sains montre une hétérogénéité de la réponse oxydative pour un même individu. *A. flavus* et *A. terreus* semblent entraîner une production de ERO moins importante et dans moins de cellules qu'*A. fumigatus* et qu'*A. niger*. Ce dernier induit une forte réponse oxydative dans les granulocytes et les monocytes comparable à celle obtenue avec *A. fumigatus*.

Nous avons aussi stimulé les leucocytes des individus avec deux souches différentes d'*A. flavus* et deux souches d'*A. niger*. Il est apparu une variation de la réponse oxydative des individus en fonction de la souche au sein d'une même espèce d'*Aspergillus*. Cependant les souches d'*A. flavus* induisaient toujours une réponse oxydative significativement plus faible que les souches d'*A. niger*. Il semble que chaque espèce induise un "burst oxydatif" caractéristique, mais difficile à corrélérer avec la

pathogénicité. Les différences d'expression d'antigènes, de molécules intervenant dans la pathogénicité, et de pigments sont probablement à l'origine de ces variations.

1.6. Réponse oxydative des différents patients

Chez les patients, on observe une diminution de la réponse oxydative quelle que soit la pathologie ou le traitement sous jacent. En effet, l'existence d'un traitement aux corticoïdes chez les patients pourrait être à l'origine de la diminution de la réponse oxydative. Pour comprendre les mécanismes responsables d'une telle baisse, il faut mieux cibler les caractéristiques des différents sujets en fonction : de la pathologie sous jacente, de la nature de la neutropénie, de son origine et des traitements. Cependant, il est intéressant d'observer que certains patients présentent une baisse de réponse à *A. fumigatus* alors que leur réponse à PMA et *E. coli* est normale. Même si nous n'avons pas encore validé ce test chez les patients à risque d'AI, il apparaît que l'hétérogénéité de réponse d'un sujet en fonction du stimulus nous conduise à utiliser des tests fonctionnels d'étude de la phagocytose et du burst oxydatif, plus spécifiques en fonction du contexte clinique.

2. L'influence de l'infection à HCMV sur la phagocytose des conidies aspergillaires par des macrophages.

Afin de comprendre le rôle subversif du HCMV sur l'élimination des conidies aspergillaires *in vivo*, nous avons étudié *in vitro* l'influence de l'infection virale sur l'adhérence des conidies et sur l'expression de récepteurs au complément CR3 et CR4 sur une lignée cellulaire.

2.1. Adhérence

Les conidies aspergillaires vivantes adh rent moins aux macrophages exposés à une suspension de HCMV. Ce virus, considéré comme un facteur de risque pour les infections fongiques invasives (George *et al.*, 1997), en particulier pour l'aspergillose invasive, favoriserait ces maladies en induisant une diminution de la capacité des macrophages   reconn tre et à fixer les conidies inhalées.

En comparant les taux de fixation de conidies opsonisées ou non, à des macrophages infectés ou non, on remarque un taux de fixation plus important lorsque les conidies sont opsonisées pour les cellules non infectées. En présence de HCMV, ce taux reste plus faible mais est identique. Ces résultats montrent que l'infection des macrophages par le HCMV influence l'adhérence des conidies, par fixation directe des molécules de la paroi des conidies à des récepteurs membranaires de la cellule et par des moyens de reconnaissance des opsonines présentes sur les conidies.

2.2. Expression des intégrines CR1, CR3 et CR4

Les cellules THP-1 différenciées, comme les macrophages, expriment à leur surface les récepteurs membranaires CR3 (CD11b/CD18) et CR4 (CD11c/CD18).

Nos résultats montrent que l'infection des macrophages par le HCMV ne modifie pas significativement l'expression des récepteurs CR3 et CR4. L'index relatif de fluorescence (IRF) reflète le nombre moyen d'anticorps fixés à la surface des macrophages et donc la quantité de récepteurs exprimée par cellule. Elle nous a permis d'évaluer l'intensité d'expression des glycoprotéines CD11b, CD11c ou CD18 à la surface des macrophages. Les macrophages infectés par du HCMV expriment significativement moins les chaînes CD11b, CD11c et CD18 des intégrines CR3 et CR4 ($P < 0,05$).

Nos résultats sont en accord avec plusieurs études qui rapportent que l'infection par le HCMV peut induire une baisse de l'expression de plusieurs β 1 intégrines à la surface de fibroblastes (Warren *et al.*,1994) ou de cellules endothéliales (Shagasempour *et al.*, 1997). Aucune étude n'a montré une baisse de l'expression des récepteurs au complément après infection par HCMV.

On peut émettre l'hypothèse que le HCMV inhibe l'adhérence des conidies, notamment par la diminution de l'expression des récepteurs au complément, empêchant ainsi leur destruction par les macrophages. Cette diminution de l'expression des β 2 intégrines et de l'adhérence favorise la croissance des conidies aspergillaires au sein du tissu contaminé, pouvant aboutir à un envahissement et à une destruction tissulaire. A l'inverse, d'autres travaux ont montré que le HCMV induit une augmentation de l'expression de nombreuses intégrines (ICAM-1, ELAM...), et des récepteurs aux immunoglobulines (Mc Keating *et al.*, 1990) : ceci entraîne une augmentation de la pénétration des microorganismes dans les cellules favorisant leur dissémination dans l'organisme. Dans les deux cas, le HCMV favoriserait le développement d'infections concomitantes.

De part les résultats obtenus, cette étude représente une nouvelle approche de la cytométrie en microbiologie et surtout en mycologie. Même soumis à des variations individuelles, une étude de la réponse oxydative des leucocytes stimulés par *Aspergillus fumigatus* sous différentes conditions a pu être réalisée. Les résultats obtenus sur les patients sont quant à eux encourageants. Les modulations d'adhérence des conidies aux macrophages (THP-1) sous influence d'une infection virale (HCMV) sont aussi clairement démontrées.

Conclusion

Thèse soutenue par : Alexandrine PASTOR

Titre :

**Etude par cytométrie en flux de la phagocytose de conidies
aspergillaires par des leucocytes humains.
Influence de l'infection à Cytomégalovirus.**

Cette étude représente une nouvelle approche de la cytométrie en mycologie. A notre connaissance, c'est la première utilisation de la cytométrie pour quantifier le burst oxydatif en présence d'*Aspergillus fumigatus* et sur sang total. C'est une méthode rapide, simple et reproductible pour quantifier le « burst oxydatif » des leucocytes sur sang total.

Même si nos résultats étaient soumis à de fortes variations interindividuelles, le développement de ce test nous a permis de mettre en évidence une modification de la réponse oxydative des leucocytes en fonction de l'état des conidies (vivantes, tuées, prégermées), de la souche, de l'espèce et de l'individu. A chaque stade de son développement, le champignon met en place un arsenal de molécules lui permettant de résister aux mécanismes de défense de l'hôte. Cet arsenal peut varier d'un stade à l'autre, d'une souche à l'autre et selon les espèces. De plus, les premiers résultats obtenus sur les patients sont encourageants. Grâce à ce test, il sera donc possible d'étudier les modifications de la réponse oxydative de sujets à risque aspergillaire et de l'utiliser comme examen biologique prédictif. Cependant, afin d'évaluer la place de cette technique de cytométrie dans la stratégie de prévention de l'AI, une étude clinique réalisée sur un large échantillon des patients à "risque aspergillaire" et leur suivie sur plusieurs mois est nécessaire.

Dans un deuxième temps, nous avons mis en évidence l'influence de l'infection par le cytomegalovirus (HCMV) sur l'adhérence des conidies aspergillaires et sur l'expression des récepteurs au complément CR3 et CR4 de lignée monocytaire

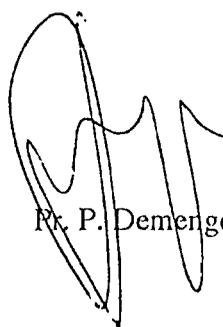
l'expression des récepteurs au complément CR3 et CR4 d'une lignée de cellules monocytaires différenciées en macrophages. *In vitro*, le HCMV joue un rôle dans la diminution des défenses anti-aspergillaire. La méthode ainsi maîtrisée et démontrée *in vitro* sera transposée sur des cellules humaines de sujets sains ou de patients, afin de comprendre si l'influence du HCMV sur les phagocytes se retrouve *in vivo*.

La prévention occupe une place importante dans la lutte contre l'aspergillose invasive car il n'existe pas de chimioprophylaxie efficace. Ce test original, simple et rapide de quantification de deux étapes essentielles de la phagocytose des conidies aspergillaires : l'adhérence et le « burst oxydatif » permettra de définir un indice pour « quantifier et qualifier » la capacité de réponse d'un patient donné. Cet indice permettra d'obtenir une notion prédictive individuelle de la réponse à une stimulation aspergillaire et du risque de développer une infection aspergillaire.

VU ET PERMIS D'IMPRIMER

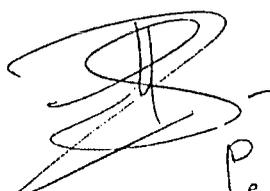
Grenoble, le 22 Novembre 2001

LE DOYEN


Pr. P. Demerge



LE PRESIDENT DE THESE


Pr. R. Grillot

Pe 22 Nov 2001

Bibliographie

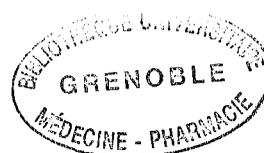
1. Aldebert D., Pinel C., Brion J.P., Ambroise-Thomas P., Grillot R. Le rôle de l'immunité locale dans l'aspergillose pulmonaire invasive. *Presse Med.* 2001 ; **30** : 1258-1264.
2. Anofel Parasitologie-Mycologie. Association française des enseignants de Parasitologie. 6^{ème} édition. Eds format utile ; 1998, 357-366.
3. Babior B.M. Oxidant from phagocytes : agents of defence and destruction. *Blood.* 1984 ; **64** : 959-966.
4. Bart-Delabesse E., Sarfati J., Debeaupuis J.P., Van Leeuwen W., Van Belkum A., Bretagne S., Latgé J.P. Comparison of restriction fragment length polymorphism microsatellite length polymorphic DNA analyses for fingerprinting *Aspergillus fumigatus* isolates. *J. Clin. Microbiol.* 2001 ; **39** : 2683-2686.
5. Baybutt H.N., Holsboer F. Inhibition of macrophage differentiation and function by cortisol. *Endocrinology.* 1990 ; **127** : 476-480.
6. Bertout S., Renaud F., Barton R., Symoens F., Burnod J., Piens M.A., Lebeau B., Viviani M.A., Chapuis F., Bastide J.M., Grillot R., Mallie M. Genetic polymorphism of *Aspergillus fumigatus* in clinical samples from patients with invasive aspergillosis : investigation using multiple typing methods. *J. Clin. Microbiol.* 2001 ; **39** : 1731-1737.
7. Bodaghi B., Jones T.R., Zipeto D., Vita C., Sun L., Laurent L., Arenzana-Seisdedos F., Virelizier J.L., Michelson S. Chemokines sequestration by viral chemoreceptors as novel viral escape strategy : withdrawal of chemokines from the environment of cytomegalovirus-infected cells. *J. Exp. Med.* 1998 ; **188** : 855-866.
8. Bouchara J.P., Tronchin G. Adhésion et pathogénicité dans les infections aspergillaires. *Med. Mal. Infect.* 1999 ; **29** : 705-711.
9. Chavanet P. Amphotéricine B déoxycholate (Fungizone®) : vieux médicament, nouvelles versions. *Rev. Med. Interne.* 1997 ; **18** : 153-165.
10. Colimon R., Minjolle S., Seigneurin J.M., Morand P. Virologie moléculaire médicale. Cachan : Eds. Médicales Internationales. 1997 : 169-215.
11. Conférence de Consensus : « Prévention du risque aspergillaire chez les patients immunodéprimés (hématologie, transplantation) ». Institut Pasteur, Paris, 21 mars 2000. *HygièneS.*
12. Cuenca-Estrella M., Rodriguez-Tudela J.L., Mellado E., Martinez-Suarez J.V., Monzon A. Comparison of the in vitro activity of voriconazole (UK-109, 406), itraconazole and amphotericin B against clinical isolates of *Aspergillus fumigatus*. *J. Antimicrob. Chemother.* 1998 ; **42** : 531-533.
13. De Pauw B.E. Prospects of voriconazole in the treatment of life-threatening *Aspergillus* infections. Presented at 4th Congress of the European Confederation of Medical Mycology. 11-13 May 1998 ; Glasgow, UK.
14. Delorme J., Robert A. Monographie des *Aspergillus*. In *Mycologie médicale*. Décarie éditeur. 1997 ; 145-148.
15. Denning D.W. Invasive aspergillosis. *Clin. Inf. Dis.* 1997 ; **26** : 781-805.

16. Denning D.W., Elliott J., Keaney M. Temperature-dependent expression of elastase in *Aspergillus* species. *J. Med. Vet. Mycol.* 1993 ; **31** : 455-458.
17. Feger C., Kerviller E., Zagdanski A.M., Attal P, Cyna-Gorse F., Frija J., Laval Jeantet M. Aspects radiologiques des aspergilloses invasives. *Path Biol.* 1994 ; **42** : 670-674
18. George M.J., Snyderman D.R., Werner B.G., Griffith J., Falagas M.E., Dougherty N.N., Rubin R.H. The independent role of Cytomegalovirus as a risk for invasive fungal disease in orthopic liver transplant recipients. *Am. J. Med.* 1997 ; **103** : 106-113.
19. Gorenssek M.J., Stewart R.W., Keys T.F., Mc Henry M.C., Babiak T., Goormastic M. Symptomatic cytomegalovirus infection as a significant risk factor for major infections after cardiac transplantation. *J. Infect. Dis.* 1988 ; **158** : 884-887.
20. Grillot R. Les mycoses humaines : démarche diagnostique. Collection Option Bio. Eds Elsevier, Paris 1996.
21. Grillot R., Mondon P., Brenier M.P., Ambroise-Thomas P. *Aspergillus fumigatus* : du saprophytisme à la virulence. Biodiversité phénotypique et génotypique. *Ann. Pharm. Fr.* 1996 ; **54** : 68-72.
22. Grillot R., Noel T. Antifongiques et antifongigramme. *Option Bio.* 1999 ; **224** : 1-16.
23. Grillot R., Parat S., Perdrix A., Croizé J. Contamination of air systems : 1987-88 assessment and prospects of the Grenoble intervention group. *Aerobiologia.* 1990 ; **45** : B8-B12.
24. Guillemain R., Lavarde V., Chevalier P., Guinvarch A., Glotz D. Aspergillose et transplantation rénale, cardiaque et pulmonaire. *Path. Biol.* 1994 ; **42** : 661-669.
25. Hiemenz J.W., Walsh T.J. Lipid formulations of amphotericine B : recent progress and futurs directions. *Clin. Infect. Dis.* 1996 ; **22** : 133-144.
26. Hoang A. Caspofungin acetate : an antifungal agent. *Am. J. Health. Syst. Pharm.* 2001 ; **58** : 1206-1214.
27. Husni R.N., Gordon S.M., Longworth D.L., Arroliga A., Stillwell P.C., Avery R.K., Maurer J.R., Metha A., Kirby T. Cytomegalovirus infection is a risk factor for invasive aspergillosis in lung transplant recipients. *Clin. Inf. Dis.* 1998 ; **26** : 753-755.
28. Ibanez C.E., Schrier R., Ghazal P., Wiley C., Nelson J.A. Human cytomegalovirus productively infects primary differentiated macrophages. *J. Virol.* 1991 ; **65** : 6581-6588.
29. Innis M.A., Gelfand D.H. Optimization of PCRs. In : PCR protocols. A guide to methods and applications. Eds Innis *et al.* Academic press, Inc 1992 ; 3-12.
30. Janh B., Boukhallouk F., Lotz J., Langfelders K., Wanner G., Brukhage A.A. Interaction of human phagocytes with pigmentless *Aspergillus* conidia. *Infect. Immun.* 2000 ; **68** : 3736-3739.
31. Kappe R., Levitz S.M., Cassone A., Washburn R.G. Mechanism of host defence against fungal infection. *J. Med. Vet. Mycol.* 1992 ; **30** : 167-177.

32. Koenig H. Genre *Aspergillus*. In : Guide de mycologie médicale. Ellipse, 1995 ; 170-183.
33. Kwon-Chung K.J., Bennet J.E. Subcutaneous and deep mycoses. In : Medical mycology, a practical approach. Lea & Febiger. Philadelphia. 1992 ; 223-247.
34. Lamy B., Moutaouakil M., Latgé J.P., Davies J. Secretion of a potential virulence factor, a fungal ribonucleotoxin during human aspergillosis infections. *Mol. Microbiol.* 1991 ; **5** : 1811-1815.
35. Latgé J.P. *Aspergillus fumigatus* and aspergillosis. *Clin. Microbiol. Rev.* 1999 ; **12** : 310-350.
36. Latgé J.P., Paris S., Sarfati J., Debeaupuis J.P., Monod M. Exoantigens of *Aspergillus fumigatus* : serodiagnosis and virulence. In : The genus *Aspergillus*. Eds Keith A & Powell et al. Plenum Press, New York, 1994 ; 321-339.
37. Lathey J., Spector S. Unrestricted replication of human cytomegalovirus in hydrocortisone-treated macrophages. *J. Virol.* 1991 ; **64** : 6371-6375.
38. Lebeau B., Piens M.A., Kures L., Morin O., Pospisil F., Chevrier S. Profil actuel de l'aspergillose invasive en France. *J. Clin. Med.* 1996 ; **6** : 97-102.
39. Levitz S.M., Diamond R.D. Mechanisms of resistance of *Aspergillus fumigatus* conidia to killing by neutrophil *in vitro*. *J. Infect. Dis.* 1985 ; **152** : 33-42.
40. Löffler J., Hebart H., Sepe S., Schumacher U., Klingebiel T., Einsele H. Detection of a wide range of medically important fungi by polymerase chain reaction. *J. Med. Microbiol.* 1994 ; **40** : 358-364.
41. Mc Keating J.A., Griffiths P.D., Weiss R.A. HIV susceptibility conferred to human fibroblasts by cytomegalovirus-induced Fc receptor. *Nature.* 1990 ; **343** : 659-661.
42. Mondon P., Brenier M.P., Symoens F., Rodriguez E., Coursange E., Chaib F., Lebeau B., Piens M.A., Tortorano A.M., Mallie M., Chapuis F., Carlotti A., Villard J., Viviani M.A., Nolard N., Bastide J.M., Ambroise-Thomas P., Grillot R. Molecular typing of *Aspergillus fumigatus* strains by sequence-specific DNA primer (SSDP) analysis. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 1997 ; **17** : 95-102.
43. Monod M., Paris S., Sanglard D., Jaton-Ogay K., Bille J., Latgé J.P. Isolation and characterization of a secreted metalloprotease of *Aspergillus fumigatus*. *Infect. Immun.* 1993-a ; **61** : 4099-4104.
44. Monod M., Togni G., Rahalison L., Frenk E. Isolation and characterization of extracellular alkaline protease of *Aspergillus fumigatus*. *J. med. Microbiol.* 1991 ; **35** : 23-28.
45. Morel F., Doussiere J., Vignais V. The superoxide-generating oxidase of phagocytic cells. *Eur. J. Biochem.* 1991 ; **201** : 523-546.
46. Murayama T., Amitani R., Ikegami Y., Nawada R., Lee W.J., Kuze F. Suppressive effects of *Aspergillus fumigatus* culture filtrates on human alveolar macrophages and polymorphonuclear leucocytes. *Eur. Respir. J.* 1996 ; **9** : 293-300.
47. Pastor A., Aldebert D., Boutonnat J., Ambroise-Thomas P., Grillot R. Oxidative response of human leukocytes after stimulation with *Aspergillus fumigatus*:

- influence of fungal activation, stage and viability. *Mycoses*. 2001 ; **44** : suppl 1,3. (abstract).
48. Rau W.S. *Aspergillus* infections of the lung : radiological signs. *Mycoses*. 1997 ; **40** : 25-32.
 49. Reichard U., Monod M., Rüchel R. Molecular cloning and sequencing of the gene encoding an extracellular aspartic proteinase from *Aspergillus fumigatus*. *FEMS Microbiol. Lett.* 1995 ; **130** : 69-74.
 50. Rex J.H., Bennet J.E., Gallin J.I., Malech H.L., Melnick D.A. Normal and deficient neutrophils can cooperate to damage *Aspergillus fumigatus* hyphae. *J. Infect. Dis.* 1989 ; **162** : 523-528..
 51. Richardson M.D., Patel M. Stimulation of neutrophil phagocytosis of *Aspergillus fumigatus* conidia by interleukin-8 and n-formylmethionyl-leucylphenylalanine. *J. Med. Vet. Mycol.* 1995 ; **33** : 99-104.
 52. Robertson M.D., Seaton A., Milne L.J.R., Reaburn J.A. Suppression of host defences by *Aspergillus fumigatus*. *Thorax*. 1987 ; **42** : 19-25.
 53. Ross G.D., Reed W., Dalzell J.G., Becker S.E., Hogg N. Macrophage cytoskeleton association with CR3 and CR4 regulates receptor mobility and phagocytosis of iC3B-opsionized erythrocytes. *J. Leukoc. Biol.* 1992; **51** : 109-117.
 54. Rothe G. Emmendorfer A., Oser A., Roesler J., Valet G. Flow cytometry measurement of the respiratory burst activity of phagocytes using dihydrorhodamine 123. *J. Immun. Methods*. 1991 ; **138** : 133-135.
 55. Schnitzler N., Peltroche-Llacsahuanga H., Bestier N., Zundorf J., Lutticken R., Haase G. Effect of melanin and carotenoids of *Exophiala (Wangiella) dermatitidis* on phagocytosis, oxidative burst, and killing by human neutrophils. *Infect. Immun.* 1999 ; **67** : 94-101.
 56. Schooley R.T., Hirsch M.S., Colvin R.B., Cosimi B., Tolkoff-Rubin N.E., McCluskey R.T., Burton R.C., Russel P.S., Herrin J.T., Delmonici F.L., Giorgi J.V., Henle W., Rubin R.H. Association of herpes infections with T-lymphocyte-subset alterations, glomerulopathy, and opportunistic infections after renal transplantation. *N. Engl. J. Med.* 1983 ; **308** : 307-313.
 57. Schwartz S., Thiel E. Clinical presentation of invasive aspergillosis. *Mycoses*. 1997 ; **40** : 21-24.
 58. Serevens J.L., Donnelly J.P., Meis J.F.G.M., De Vries Robbe P.F., De Pauw B.E., Verweij P.E. Two strategies for managing invasive aspergillosis : a decision analysis. *Clin. Infect. Dis.* 1997 ; **25** : 1148-1154.
 59. Shagasempour S., Woodroffe S.B., Sullivan-Tailyour G., Garnett H.M. Alteration in the expression of endothelial cell integrin receptors alpha 5 beta 1 and alpha 2 beta 1 and alpha 6 beta 1 after in vitro infection with clinical isolate of human cytomegalovirus. *Arch. Virol.* 1997 ; **142** : 125-138.
 60. Shanani T.A., Sorenson W.G., Simpson J., Kefalides N.A., Lewis D.M. Tyrosine kinase activation in response to fungal spores is primarily dependant on

- endogenous reactive oxygen production in macrophages. *J. Biol. Chem.* 2000 ; **275** : 10175-10181.
61. Slight J., Nicholson J., Mitchell C., Pouilly N. Inhibition of the alveolar macrophage oxidative burst by a diffusible component from the surface of the spores of *Aspergillus fumigatus*. *Thorax*. 1996 ; **51** :389-396.
 62. Sturtevant J., Latgé J.P. Participation of complement in the phagocytosis of conidia of *Aspergillus fumigatus* by human polymorphonuclear cells. *J. Infect. Dis.* 1992 ; **166** : 580-586.
 63. Symoens F., Bertout S., Piens M.A., Burnod J., Renaud F., Nolard N., Chapuis F., Grillot R., and the EBGGA Network. A longitudinal study of lung transplant recipients infected with *Aspergillus*: genetic polymorphism of *A. fumigatus*. *J. Heart. Lung. Transplant.* 2001 ; **20** : 970-978.
 64. Symoens F., Viviani M.A., Nolard N. Typing by immunoblot of *Aspergillus fumigatus* from nosocomial infections. *Mycoses*. 1993 ; **61** : 1650-1656.
 65. Taramelli D., Malabarba M.G., Sala G., Basilico N., Cocuzza G. Production of cytokines by alveolar and peritoneal macrophages stimulated by *Aspergillus fumigatus* conidia. *J. Med. Vet. Mycol.* 1996 ; **34** : 49-56.
 66. Tronchin G., Bouchara J.P., Larcher G., Lissitzky J.C., Chabasse D. Interaction between *Aspergillus fumigatus* and basement membrane laminin: Binding and substrate degradation. *Biol. Cell.* 1993 ; **77** : 201-208.
 67. Tsai H.F., Wheeler M.H., Chang Y.C., Kwon-Chung K.J. The developmentally regulated *alb1* gene of *Aspergillus fumigatus*: its role in modulation of conidial morphology and virulence. *J. Bacteriol.* 1998 ; **180** : 3031-3088.
 68. Verweij P.E., Denning D.W. Diagnostic and therapeutic strategies for invasive aspergillosis. *Sem. Resp. Crit. Care. Med.* 1997 ; **18** : 203-215.
 69. Vowells S.J., Sekhosaria S., Malech H.L., Shalit M., Fleisher T.A. Flow cytometric analysis of the granulocyte respiratory burst: a comparison study of fluorescent probes. *J. Immunol. Methods.* 1995 ; **178** : 89-97.
 70. Wagner J.A., Ross H., Hunt., Gamberg P., Valentine H., Merigan T.C., Stinson E.B. Prophylactic ganciclovir treatment reduces fungal as well as cytomegalovirus infections after heart transplantation. *Transplantation*, 1995 ; **60** :1473-1477.
 71. Waldorf A.R., Levitz S.M., Diamond R.D. *In vivo* bronchoalveolar macrophage defense against *Rhizopus oryzae* and *Aspergillus fumigatus*. *J. Infect. Dis.* 1984 ; **150** : 752-760.
 72. Warren A.P., Owens C.N. Borysiewicz L.K., Patel K. Down-regulation of integrin $\alpha 1/\beta 1$ expression and association with cell rounding in human cytomegalovirus-infected fibroblasts. *J. Gen. Virol.* 1994 ; **75** : 3319-3325.
 73. Yeldandi V., Laghi F., Mc Cabe M.A., Larson R., O'Keefe P., Moontoya A., Garrity E.R. Aspergillosis and lung transplantation. *J. Heart. Lung. Transplant.* 1995 ; **14** : 883-890.
 74. Yeni P. Perspectives médicamenteuses dans le traitement de l'aspergillose invasive. *Path. Biol.* 1994 ; **42** : 700-705.



Annexes

Préparation des milieux

1. Milieu *Aspergillus minimun*

- **Solution d'éléments traces (pour 1 litre) :**

Na ₂ B ₄ O ₇ (10 H ₂ O)	40 mg
CuSO ₄ (5 H ₂ O)	400 mg
FeSO ₄ (7 H ₂ O)	1 g
MnSO ₄ (1 H ₂ O)	600 mg
Na ₂ MoO ₄ (2 H ₂ O)	800 mg
ZnSO ₄ (7 H ₂ O)	8 g
CoCl ₂ (5 H ₂ O)	160 mg

- **Solution saline (x 50) (pour 1 litre) :**

KCl	26 g
MgSO ₄ (7 H ₂ O)	26 g
KH ₂ PO ₄	76 g
Solution d'éléments traces :	50 ml

- **Milieu minimum *Aspergillus* (pour 1 litre)**

Solution saline (x 50)	20 ml
Glucose	10 g
NaNO ₃ (1M)	10 ml

Ajuster le pH à 6,5 avec NaOH 10N.

Ajouter 18 g/l d'agar et stériliser.

Couler dans tube ou boîte, conserver à 4°C.

2. Préparation pour 1 litre de milieu RPMI:

- RPMI-1640 medium (Sigma)
- Dissoudre dans 900ml d'eau milli-Q
- Ajouter 2 g de Bicarbonate de sodium
- Ajouter 3,6 g de tampon Hépès (Gibcobl)
- Ajuster le pH à 7,2.
- Ajouter 100U/ml de pénicilline et 100µg/ml de streptomycine (Mélange Pénicilline-Streptomycine, Biomérieux)
- Filtrer (0,22 µm)
- Ajouter 10ml de Glutamine à 200mM (2mM finale).

3. Préparation du tampon carbonate

A préparer la veille

- **Solution A** : peser 11,06 g de carbonate de sodium (Na_2CO_3) et ajouter 100 ml d'eau bidistillée
- **Solution B** : peser 0,84 g de bicarbonate de sodium (NaHCO_3) et ajouter 100 ml d'eau bidistillée.

Verser petit à petit la solution A dans la solution B pour obtenir $\text{pH} = 9$.

Autoclaver et conserver à 4°C.

4. Préparation du milieu Czapeck modifié

Extrait de levure :	1 g
Nitrate de K :	3 g
Phosphate dipotassique	1 g
Chlorure de K	0,5 g
Sulfate de K	0,5 g
Sulfate de Mg	0,5 g
Sulfate ferreux	0,01 g
Saccharose	30 g
Eau qsp	1000 ml

$\text{pH} = 7,2$

Autoclaver 20 minutes à 120°C.

Tableau 14
Critères définissant le terrain et les facteurs de risques d'infections fongiques invasives probables ou possible. Adaptation aux aspergilloses

- Neutropénie inférieure à 500/ μ l
- Fièvre persistante plus de 96 heures malgré un traitement antibactérien à large spectre
- Température corporelle >38°C et l'une des conditions suivantes :
 - Neutropénie prolongée (>10jours) dans les 60 jours précédents
 - Traitement par agent immunosuppresseur récent (dans les 30 jours) ou en cours
 - Antécédents d'aspergillose invasive
 - Coexistence d'un SIDA
 - Signes de maladie du greffon contre l'hôte
 - Traitement corticoïde pendant plus de trois semaines.

D'après la Conférence de Consensus : « Prévention du risque aspergillaire chez les patients immunodéprimés (Hématologie, Transplantation) ». Institut Pasteur, Paris, 21 mars 2000. *HygièneS.*

Tableau 15
Epidémiologie de l'aspergillose invasive

	Incidence (%)
Transplantation pulmonaire et cardio-pulmonaire	19-26
Granulomatose septique chronique	25-40
Leucémie aiguë	5-24
Greffe de moelle allogénique	4-9
Greffe de moelle autologue sans facteur de croissance	0,5-6
SIDA	0-12
Transplantation hépatique	1,5-10
Transplantation rénale et cardiaque	0,5-10
Lupus érythémateux disséminé	1
Greffe de moelle autologue avec facteur de croissance	<1

D'après la Conférence de Consensus : « Prévention du risque aspergillaire chez les patients immunodéprimés (hématologie, Transplantation) ». Institut Pasteur, Paris, 21 mars 2000. *HygièneS.*

Tableau 16**Taux d'incidence et de mortalité des aspergilloses invasives en transplantation.**

Type de transplantation	Incidence de l'aspergillose invasive (%)	Mortalité (%)	Mortalité imputable à l'aspergillose invasive (%)
Moelle osseuse	6,4	92	10
Poumon	8,4	55*	9,3
Foie	1,7	87	16,9
Cœur	6,2	78	15,4
Rein	0,7	75	

*74 % dans l'aspergillose invasive, 29% dans l'aspergillose trachéobronchique nécrosante.

D'après D. Aldebert *et al.*, *Presse Med*, 2001 ; 30 :1258-1264.**Tableau 17****Facteurs de risque de l'aspergillose invasive liés à l'hôte
(Déficits immunitaires congénitaux exceptés)****En onco-hématologie**

- Neutropénie
- Taux des polynucléaires neutrophiles inférieur ou égal à 500/mm³ pendant 15 jours ou plus ;
- Taux de polynucléaires neutrophiles inférieur ou égal à 100/mm³ quelle que soit la durée.
- Corticothérapie : posologie de prednisone ou methyl-prednisolone supérieure à 1mg/kg/j pendant 1 à 3 semaines.
- Colonisation aspergillaire des voies aériennes supérieures ou inférieures
- Allogreffe de cellules souches hématopoïétiques
- Antécédents d'aspergillose invasive
- Facteurs tels que :
 - Porte d'entrée cutanée ;
 - Lésions muqueuses chimio-induites ;
 - Diabète secondaire

En transplantation d'organe solide

- Type d'organe transplanté
- Transplantation pulmonaire :
 - Infection à cytomégalovirus
 - Colonisation pulmonaire précoce
- Transplantation hépatique :
 - Hépatites fulminantes ou sub-fulminantes ;
 - Suite opératoire compliquées.
- Traitement immunosuppresseur : rôle prédominant de la corticothérapie.

D'après D. Aldebert *et al.*, *Presse Med*, 2001 ; 30 :1258-1264.

Tableau 18 : Données cliniques concernant les souches isolées de patients "EBGA". (Symoens et al., 2001)

Patients				Facteurs de prédisposition		
N°Patient Sexe/age	Pathologie aspergillaire	Devenir	Secteur hospitalier	Pathologie sous- jacente	Thérapie immunosuppressive	Traitement antifongique systémique
1 F/62	API prouvée	Décès (11/12/95)	USI	STP droite (11/7/95), emphysème	Met 60mg/d (11/7/95) Aza 150 mg/d (07/11/95 au 24/11/95) Cycl 200 mg/d (07/11/95 au décès)	AmB 50 mg/d (07/11/95 au décès) AmB Liposome 250mg/d (15/11/95 au décès).
4 M/48	Non-ABI	Décès (22/01/95)	UT	STP (12/10/94) sévère emphysème pulmonaire	Met 32 mg/d (de la greffe au décès) Aza 50 mg/d (de la greffe au décès) Cycl 30 mg/d (de la greffe au décès)	AmB 30 mg/j (10/12/94 au 17/12/94) AmB 60mg/j (18/12/94 au décès).
7 F/26	CB	Survie	UT	STP (11/9/93), PPH	Met 14 mg/d (de la greffe à maintenant) Aza 100 mg/d (de la greffe à maintenant) Cycl 400 mg/d (de la greffe à maintenant)	Itra 400 mg/j (24/04/96 au 27/08/96)
8 F/35	CB	Décès (08/08/96)	UT	STP (12/31/92) HPP ; STP (7/12/94), bronchiolite oblitérante	Met 16 mg/d (de la 1 ^{ère} greffe au décès) Aza 150 mg/d (de la 1 ^{ère} greffe au décès) Cycl 300 mg/d (de la 1 ^{ère} greffe au décès) Tacrolimus 4 mg/d (de la 1 ^{ère} greffe au décès)	AmB liposome 300 mg/j (13/06/98 au décès) Itra 400 mg/j (31/01/95 au 10/03/95, 18/08/95 au 10/11/95, 15/03/96 au 10/06/96, 13/06/96 au décès)

API : Aspergillose pulmonaire invasive, ABI : Aspergillose bronchique invasive, CB : colonisation bronchique ; STP : simple transplantation pulmonaire, HPP : Hypertension pulmonaire primaire ; Met : methylprednisolone, Aza : azathioprine, AmB : amphotericine B, Cycl : cyclosporine, Itra : itraconazole ; USI : unité de soins intensif, UT : unité de transplantation.



Serment des Apothicaire

Je jure, en présence des maîtres de la faculté, des conseillers de l'ordre des pharmaciens et de mes condisciples :

D'honorer ceux qui m'ont instruit dans les préceptes de mon art et de leur témoigner ma reconnaissance en restant fidèle à leur enseignement.

D'exercer, dans l'intérêt de la santé publique, ma profession avec conscience et de respecter non seulement la législation en vigueur, mais aussi les règles de l'honneur, de la probité et du désintéressement.

De ne jamais oublier ma responsabilité et mes devoirs envers le malade et sa dignité humaine ; en aucun cas je ne consentirai à utiliser mes connaissances et mon état pour corrompre les mœurs et favoriser des actes criminels.

Que les hommes m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses. Que je sois couvert d'opprobre et méprisé de mes confrères si j'y manque.



Résumé

Aspergillus fumigatus est un champignon filamenteux, responsable d'une infection gravissime chez les immunodéprimés : l'aspergillose invasive. Parmi les différentes lignes de défenses utilisées par l'organisme pour éliminer le champignon, l'immunité cellulaire non spécifique occupe une place importante. Les polynucléaires neutrophiles et les monocytes vont agir sur les conidies ayant échappés aux macrophages et sur les filaments mycéliens. Un des mécanismes utilisé par ces phagocytes pour neutraliser le champignon repose sur la production de dérivés oxygénés, c'est le « burst oxydatif ».

Notre objectif était d'étudier, sur un modèle *in vitro* et à partir d'échantillon de sang total, certaines étapes essentielles de la phagocytose des conidies d'*A. fumigatus* : l'adhérence et le « burst oxydatif ».

La première partie de ce travail consistait à développer une technique utilisant la cytométrie en flux pour quantifier le « burst oxydatif » des leucocytes humains après stimulation par des conidies d'*A. fumigatus*. Les variations de la réponse oxydative des phagocytes d'individus sains ont été étudiées en présence de conidies aspergillaires appartenant à des espèces, ou à des génotypes différents et à des stades variés afin d'envisager si ce test peut aider au diagnostic des patients à risque d'aspergillose invasive.

Dans une deuxième partie, nous avons déterminé l'influence de l'infection à cytomégalovirus sur l'adhérence de conidies et sur l'expression des récepteurs CR3 et CR4 susceptibles d'intervenir dans ce phénomène d'adhérence. L'infection virale d'une lignée de cellules monocytaires différenciées en macrophages entraîne une diminution de l'adhérence des conidies et de l'expression des récepteurs au complément.

De part les résultats obtenus, cette étude représente une nouvelle approche de la cytométrie en microbiologie et surtout en mycologie.

Mots clés : *Aspergillus fumigatus*, « burst oxydatif », cytométrie en flux, cytomégalovirus, adhérence, récepteurs au complément.