

Mise au point de la PCR-aspergillus en vue du diagnostic biologique de l'aspergillose invasive

Dominique Beaudet

▶ **To cite this version:**

Dominique Beaudet. Mise au point de la PCR-aspergillus en vue du diagnostic biologique de l'aspergillose invasive. Sciences pharmaceutiques. 1999. dumas-01534107

HAL Id: dumas-01534107

https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-01534107

Submitted on 7 Jun 2017

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.

UFR de Pharmacie
UNIVERSITÉ Grenoble Alpes
BIBLIOTHÈQUES UNIVERSITAIRES Grenoble Alpes
UNIVERSITÉ Grenoble Alpes
Grenoble INP

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 SID de Grenoble :
bump-theses@univ-grenoble-alpes.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

B.U.M. GRENOBLE
D 115 039794 0

1er exemplaire

UNIVERSITE JOSEPH FOURIER
FACULTE DE PHARMACIE DE GRENOBLE

Année : 1999

N° D'ordre : 7050

MISE AU POINT DE LA PCR-*ASPERGILLUS* EN VUE DU DIAGNOSTIC BIOLOGIQUE DE L'ASPERGILLOSE INVASIVE

Thèse
présentée à l'Université Joseph Fourier-Grenoble I en vue de l'obtention du Diplôme d'Etat de **Docteur en Pharmacie**
par
Dominique BEAUDET
[Données à caractère personnel]

Thèse soutenue publiquement le 20 Décembre 1999 à 15 heures
devant le jury composé de :

Madame Le Professeur R. GRILLOT	UFR de Pharmacie Grenoble Président du jury
Madame Le Docteur B. LEBEAU	Praticien hospitalier CHU de GRENOBLE
Madame Le Docteur MP. BRENIER-PINCHART	Assistant hospitalo-universitaire CHU de GRENOBLE
Madame M. LAGET	Maître de Conférence UFR de Pharmacie Marseille

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 Galènique*
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*
LECLERC	*Gérard*	*Chimie Organique*
MARIOTTE	*Anne-Marie*	*Pharmacognosie*
RIBUOT	*Christophe*	*Physiologie-Pharmacologie*
ROUSSEL	*Anne-Marie*	*Biochimie*
SEIGLE-MURANDI	*Françoise*	*Botanique et Cryptogamie*
STEIMAN	*Régine*	*Biologie Cellulaire*
WOUESSIDJEWE	*Denis*	*Pharmacie Galénique*

BIBLIOTHÈQUE UNIVERSITAIRE
GRENOBLE
MÉDECINE - PHARMACIE

UNIVERSITE JOSEPH FOURIER
FACULTE DE PHARMACIE DE GRENOBLE

Année : 1999 N° D'ordre :

MISE AU POINT DE LA PCR-*ASPERGILLUS* EN VUE DU DIAGNOSTIC BIOLOGIQUE DE L'ASPERGILLOSE INVASIVE

Thèse
présentée à l'Université Joseph Fourier-Grenoble I en vue de l'obtention du
Diplôme d'Etat de **Docteur en Pharmacie**
par
Dominique BEAUDET
[Données à caractère personnel]

Thèse soutenue publiquement le 20 Décembre 1999 à 15 heures
devant le jury composé de :

Madame Le Professeur R. GRILLOT	UFR de Pharmacie Grenoble Président du jury
Madame Le Docteur B. LEBEAU	Praticien hospitalier CHU de GRENOBLE
Madame Le Docteur MP. BRENIER-PINCHART	Assistant hospitalo-universitaire CHU de GRENOBLE
Madame M. LAGET	Maître de Conférence UFR de Pharmacie Marseille

Monsieur le Professeur P. AMBROISE-THOMAS

Je vous remercie pour m'avoir accueillie au sein de votre laboratoire. Veuillez trouver dans ce travail, le témoignage de ma reconnaissance pour tout ce que j'ai pu apprendre dans votre service.

Madame le Professeur R. GRILLOT

C'est un grand honneur que vous me faites en acceptant la présidence de ce jury. Vous m'avez permis de réaliser ce travail ; je vous remercie de m'avoir fait confiance. Veuillez trouver ici l'expression de mon profond respect.

Madame le Docteur B. LEBEAU

Vous avez spontanément accepté de juger mon travail. Veuillez trouver ici l'expression de mes sincères remerciements pour les connaissances que vous m'avez fait partager.

Madame le Docteur MP. BRENIER-PINCHART

Veuillez recevoir le témoignage de ma profonde sympathie pour m'avoir encadrée au cours de mes expériences et pour vos précieux conseils.

Madame M. LAGET

Je te remercie du témoignage d'intérêt que tu as porté à mon travail en acceptant de faire partie du jury.

Je tiens tout particulièrement à remercier Madame Josette BURNOD et Madame Josiane SIMON pour l'aide qu'elles m'ont apportée au cours de mes expériences et les connaissances qu'elles ont su me faire partager.

Je remercie également Sébastien Goubet et Dorra Derrouich-Guergour pour leurs conseils techniques et leur gentillesse ainsi que l'ensemble du personnel du laboratoire de Parasitologie-Mycologie de l'hôpital et de la faculté pour leur aide et leur sympathie.

TABLE DES MATIERES

ABREVIATIONS 9

LISTE DES ANNEXES 10

INTRODUCTION 11

CHAPITRE I : *ASPERGILLUS* ET ASPERGILLOSE INVASIVE 14

1-Le genre *Aspergillus* 15
1-1- Historique 15
1-2- Classification 15
1-3- Description 15
1-4- Mode de contamination et maladies respiratoires aspergillaires 17
1-5- Facteurs favorisants la survenue des aspergilloses 18
1-5-1- L'environnement : moisissure ubiquitaire 18
1-5-2- Du saprophytisme à la pathogénicité 18
1-6- Les défenses anti-*Aspergillus* de l'hôte 18
2- L'aspergillose invasive 19
2-1- Les différentes manifestations pathologiques de l'AI 16
2-1-1- L'aspergillose pulmonaire invasive 19
2-1-2- Autres formes d'AI 20
2-2- Les patients à risque 21
2-2-1- Neutropénie profonde 21
2-2-2- Allogreffe de moelle osseuse 22
2-2-3- Transplantation d'organes et corticothérapie 22
2-3- Présentation clinique 22
2-4- Traitement 23
2-4-1- Amphotéricine B 23
2-4-2- Itraconazole 25
2-4-3- Voriconazole 26

CHAPITRE II : DIAGNOSTIC ACTUEL DE L'ASPERGILLOSE INVASIVE

1- L'imagerie médicale 28
1-1- Radiographie pulmonaire 28
1-2- Scanner thoracique (ou tomodensitométrie) 29
1-3- Imagerie par résonance magnétique 29
2- Diagnostic mycologique 30
3- Diagnostic indirect 31
3-1- Recherche des anticorps anti-aspergillaires 31
3-2- Recherche des antigènes circulants (sérum, LBA, urine) 32
3-2-1- Recherche d'un antigène circulant (GM) par agglutination au latex 32
3-2-2- Recherche d'un antigène circulant (GM) par ELISA 33
3-2-3- Recherche du (1→3)β-D- glucane 34
3-3- Recherche des métabolites 34

CHAPITRE III : VERS LE DIAGNOSTIC MOLECULAIRE DE L'ASPERGILLOSE INVASIVE ? 35

1- Données de la littérature : les différentes techniques décrites 36
2- Résultats des différentes études cliniques 39
2-1- Les patients 39
2-2- Les prélèvements 40
3- Place de la PCR-*Aspergillus* dans la stratégie diagnostique de l'AI 43

CHAPITRE IV : MISE AU POINT DE LA PCR-*ASPERGILLUS* 46

MATERIELS ET METHODES 47
1- Les souches fongiques 48
1-1- Souche référencée d'*A. fumigatus* 48
1-2- Autres souches de référence 48
1-3- Souches isolées de prélèvements de malades 49
1-4- Mise en culture 50
2- Extraction de l'ADN fongique 50
2-1- Lyse du mycélium 50
2-2- Extraction de l'ADN 50
3- Méthode d'amplification génique en chaîne (PCR) 50
3-1- Principe 50
3-2- Conditions d'amplification 52
3-2-1- Préparation du milieu réactionnel 52
3-2-2- Le cycle thermique 52
4- Méthodes de révélation 53
4-1- Révélation sur gel d'agarose 53
4-2- Révélation par Southern Blot 53
4-3- Révélation par ELISA 55

RESULTATS 57
1- Mise au point des conditions d'amplification 57
1-1- les amorces 57
1-2- l'UNG 58
1-3- Les nucléotides 58
1-4- Le magnésium 58
1-5-Le cycle thermique 58
1-5-1- Optimisation du nombre de cycles 58
1-5-2- Optimisation du temps de dénaturation et d'hybridation 59
1-5-3- Optimisation de la température d'hybridation 59
1-6- La Taq polymérase 59
2- Etude de sensibilité 60
2-1- Souche référencée d'*A.fumigatus* 60
2-2- Souches isolées de prélèvements de malades 60
3- Etude de spécificité 61
3-1- Souches référencées d'autres espèces d'*Aspergillus* 61
3-2- Souches d'autres champignons filamenteux 61
4-Reproductibilité 62

DISCUSSION 63
1- Les difficultés de la PCR-*Aspergillus* 63
2- La technique 65
3- Les perspectives 69

CONCLUSION 71

ANNEXES 74

BIBLIOGRAPHIE 88

ABREVIATIONS

A. fumigatus : *Aspergillus fumigatus*

ADN : acide désoxyribonucléique

AmB : Amphotéricine B

ARN : acide ribonucléique

ARNr : acide ribonucléique ribosomal

AI : aspergillose invasive

API : aspergillose pulmonaire invasive

BA : broncho-aspiration

EBGA : European Research Group on Biotype and Genotype of *Aspergillus*

ELISA : enzyme-linked immunosorbent assay

EORTC : European Organization for Research and Treatment of Cancer

GM : galactomannane

LBA : lavage broncho-alvéolaire

pb : paire de base

PCR : polymerase chain reaction

PM : poids moléculaire

UNG : uracilglycosylase

LISTE DES ANNEXES

Figure n°1 : « tête aspergillaire » d'*A.fumigatus*

Figure n°2 : Lavage broncho-alvéolaire : filaments mycéliens d'*A.fumigatus*

Annexe n°1 : Critères diagnostiques de l'AI retenus par l'EORTC (European Organization for Research and Treatment of Cancer)

Schéma n°1 : Séquence correspondant à la région V7 à V9 codant pour la sous unité 18S de l'ARNr

Schéma n°2 : Protocole d'extraction de l'ADN fongique

Schéma n°3 : PCR-*Aspergillus*, principe et conditions d'amplification

Schéma n°4 : Principe de la technique de Southern Blot

Schéma n°5 : Principe de la PCR-ELISA

Schéma n°6 : Représentation graphique des résultats de la PCR-ELISA

Figure n°3 : Optimisation de la concentration en amorces

Figure n°4 : Optimisation de la concentration en nucléotides

Figure n°5 : Optimisation de la concentration en $MgCl_2$

Figure n° 6 : Optimisation du nombre de cycle thermique

Figure n°7 : Optimisation de la durée de dénaturation et d'hybridation

Figure n°8 : Optimisation de la température d'hybridation

Figure n°9 : Etude de la sensibilité de la PCR-*Aspergillus* sur une souche référencée d'*A.fumigatus*, révélation sur gel d'agarose

Figure n°10 : Etude de la sensibilité de la PCR-*Aspergillus* sur une souche référencée d'*A.fumigatus*, révélation par Southern Blot

Figure n°11 : Etude de la sensibilité de la PCR-*Aspergillus* sur 5 souches de patients

Figure n°12 : Etude de la spécificité de la PCR sur 5 souches référencées du genre *Aspergillus*

Figure n°13 : Etude de la spécificité de la PCR sur d'autres champignons filamenteux

INTRODUCTION

Aspergillus fumigatus, Fresenius 1863, est un champignon filamenteux ubiquitaire dans l'environnement, capable de provoquer chez les immunodéprimés (neutropénie, corticothérapie au long cours et à forte dose, transplantation de moelle osseuse et d'organes...), une infection gravissime : l'aspergillose invasive (AI). Ce micromycète qui pénètre par les voies respiratoires, envahit le parenchyme pulmonaire dans 70 à 80% des cas conduisant à l'aspergillose pulmonaire invasive (API) (26). Puis, il est susceptible de se propager par voie hématogène dans tout l'organisme et de provoquer une atteinte cérébrale, cardiaque ou cutanée. L'API se manifeste cliniquement par une pneumopathie fébrile persistante malgré une antibiothérapie à large spectre (47).

La fréquence de l'AI est élevée et varie de 5 à 25% pour les patients traités pour une hémopathie maligne. Le taux de mortalité peut atteindre 80% (16). Le risque aspergillaire est particulièrement élevé dans les agranulocytoses prolongées, en particulier au cours des leucémies aiguës, des chimiothérapies anticancéreuses, des transplantations d'organe, principalement les greffes de moelle osseuse et chez les patients sous corticothérapie au long cours (19). L'issue favorable d'une aspergillose invasive dépend de deux types de facteurs : la restauration des fonctions de défense immunitaire et l'instauration d'une thérapeutique antifongique précoce. Cette attitude doit pouvoir s'appuyer sur un diagnostic formel et rapide (26).

Affirmer une aspergillose invasive consiste à apporter la preuve mycologique et/ou histologique de l'envahissement tissulaire par le micromycète. Le diagnostic de certitude est rarement porté car il nécessite des prélèvements invasifs (biopsies), souvent contre-indiqués chez ces patients. Chez les patients à risque, placés sous hotte à flux, l'AI est considérée comme probable si *Aspergillus* spp est isolé dans le lavage broncho-alvéolaire (LBA). Mais la sensibilité est faible et le champignon se développe en 3 à 5 jours. Aussi, dans le but d'améliorer le diagnostic chez ces patients immunodéprimés pour lesquels la recherche des anticorps est décevante, plusieurs techniques de recherche des antigènes circulants ont été développées. Le test Pastorex *Aspergillus®* (Sanofi Diagnostics Pasteur, Marnes la Coquette, France) manque de sensibilité (environ 50%) mais présente une bonne spécificité (21, 65, 73). La détection du galactomannane par un test Platelia *Aspergillus®* (Sanofi Diagnostics Pasteur, Marnes la Coquette, France) a permis d'augmenter la sensibilité (82,5 à 100%) mais il présente un taux élevé de faux positifs (5 à 10%) (59, 65, 73).

Le scanner thoracique est un outil majeur de diagnostic mais permet de détecter uniquement des lésions déjà formées (11). En pratique, le diagnostic est difficile et s'appuie sur un faisceau d'arguments cliniques, radiologiques et biologiques (19).

Des études récentes ont montré que le développement de nouvelles techniques de biologie moléculaire telle que la «Polymerase Chain Reaction » pourrait trouver sa place dans le diagnostic de l'aspergillose invasive. Cette maladie dont le diagnostic et le traitement précoce conditionnent en partie le pronostic semble constituer une bonne application diagnostique de la PCR.

En effet, la PCR est déjà utilisée en routine pour le diagnostic d'autres maladies infectieuses dues à des organismes eucaryotes comme la toxoplasmose (18). La PCR offre la possibilité de détecter de très faible quantité d'ADN et a le potentiel pour permettre un diagnostic précoce. Depuis 1993, plusieurs auteurs ont développé des méthodes de PCR pour détecter la présence d'ADN d'*Aspergillus* spp (8, 9, 22, 33, 51, 52, 55, 60, 63, 67, 76). Ces techniques PCR ont été étudiées sur plusieurs types de prélèvements : le lavage broncho-alvéolaire (8, 9, 52, 63, 67), les urines (55), le sérum (8, 13, 76) et le sang total (22, 69). Le sérum paraît être le prélèvement le plus adapté pour la PCR-*Aspergillus* (meilleur compromis entre la sensibilité et la faisabilité). La PCR sur sérum semble intéressante, particulièrement en association avec d'autres techniques dont la détection de l'antigène aspergillaire (galactomannane) (8). La PCR-*Aspergillus* apporterait une arme diagnostic nouvelle en complément des méthodes habituelles (8, 9, 10, 22, 33, 51, 60, 76).

Après l'analyse critique de la littérature, nous avons voulu adapter et optimiser sur une souche référencée *d'A.fumigatus* (CBS 144-89), la PCR-*Aspergillus* décrite par Melchers *et al* (52). Les amorces correspondent à une région conservée du gène codant pour la sous unité 18S de l'ARNr. Cette technique, très sensible, permet la détection de l'ADN des principales espèces pathogènes du genre *Aspergillus* et pourrait améliorer le diagnostic de l'AI.

CHAPITRE I : *ASPERGILLUS* ET ASPERGILLOSE INVASIVE

1- Le genre *Aspergillus*

1-1- Historique

La description du genre *Aspergillus* a été faite en 1729 par Pier Antonio MICHELI, Directeur du jardin des plantes à Florence, qui choisit cette appellation d'après l'évidente ressemblance existant entre l'organe conidiogène du champignon (la tête aspergillaire) et le goupillon, instrument liturgique (27). La prise de conscience que ces moisissures étaient capables de provoquer chez l'homme une infection fulminante ne date que de la seconde moitié du vingtième siècle.

Il y a à ce jour, approximativement 150 espèces décrites dont seize reconnues comme pathogènes chez l'homme (16). *Aspergillus fumigatus* est responsable de la majorité de ces infections (90% des cas), viennent ensuite *A.flavus* (5 à 10%) et *A.niger* (2 à 3%) puis *A.nidulans, A.terreus*... (72).

1-2- Classification

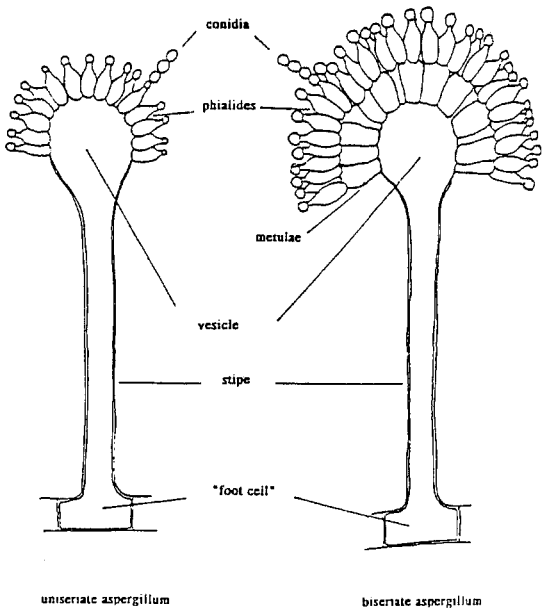
Les *Aspergillus* sont des champignons filamenteux microscopiques dont la classification repose en pratique sur leur mode de reproduction (sexué ou asexué). La plus part, se reproduisent de façon asexuée. Ils font donc partie des Deutéromycètes (champignons imparfaits), de la classe des Hyphomycètes, de la famille des Moniliaceae et du genre *Aspergillus* (42).

Le genre *Aspergillus* compte 8 espèces de reproduction sexuée comme *A.nidulans* (*Emericella nidulans*), qui font partie des Ascomycètes appartenant à l'ordre des Eurotiales et à la famille des Trichocomaceae (42).

1-3- Description

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, ramifiés. A partir d'une cellule particulière, appelée «cellule-pied», se dresse en angle droit un filament non cloisonné, appelé conidiophore.

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 appelée metula, la moisissure est alors dite bisériée (*A.flavus*) (15). 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 chaînette facilement détachables. L'ensemble : vésicule du conidiophore, phialides et la colonne de conidies constitue la tête aspergillaire, structure qui caractérise le genre *Aspergillus* (45).



In : *Aspergillus*, biology and industrial application. Benett JW & Klich MA. Eds Butterworth-Heineman, 1992 (78).

Les colonies d'*A. fumigatus* sont planes, poudreuses (texture liée à l'abondance des spores) et se colorent en vert avec la production de 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 jaune, vert ou brun (41). A l'examen microscopique, on note que la tête aspergillaire est compacte. Le conidiophore, long et lisse, est terminé par une vésicule hémisphérique aplatie au sommet. Seuls la moitié supérieure ou les ¾ de la vésicule sont recouverts de phialides unisériées et de chaînettes de conidies, rugueuses parallèles à l'axe du conidiophore (15) (figure n°1).

1-4- Mode de contamination et maladies respiratoires aspergillaires

A.fumigatus est un micromycète saprophyte dont les conidies hydrophobes sont facilement dispersées dans l'air. La porte d'entrée du champignon chez l'homme se fait par inhalation des conidies ; la voie de contamination la plus fréquente est la voie aérienne. 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) (2).

L'inhalation de spores par des malades atteints de différentes anomalies immunitaires, conduit à des infections variées. Cependant, quatre formes principales sont classiquement individualisées (27) :

1) **L'aspergillome ou «truffe aspergillaire»** 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 (2).

2) **L'aspergillose broncho-pulmonaire allergique (ABPA)** est une broncho-pneumopathie d'origine immunoallergique, déclenchée par l'exposition répétée à l'inhalation des spores aspergillaires chez des sujets asthmatiques ou mucoviscidosiques (25). Cela correspond à des manifestations d'hypersensibilité du tractus broncho-pulmonaire vis à vis de l'antigène aspergillaire.

3) **L'aspergillose chronique nécrosante (aspergillose semi-invasive)** 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 (16).

4) **L'aspergillose pulmonaire invasive (API)** 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 provoquer, dans 20 à 30% des cas, une atteinte cérébrale, cardiaque, osseuse ou cutanée (41).

1-5- Facteurs favorisants la survenue des aspergilloses

1-5-1- L'environnement : moisissure ubiquitaire

Ce sont des moisissures extrêmement répandues dans l'environnement. *A.fumigatus* vit au dépend des matières organiques de toute nature, des végétaux en décomposition (les composts, les pots de fleur) mais il est également présent dans les sols et dans l'habitât de l'homme (poussières de maison, vêtements, climatiseurs et humidificateurs d'air). A l'extérieur, on le trouve en abondance dans les milieux humides, notamment dans les silos (grains moisis), les balles de foin et les fientes de pigeons (41).

1-5-2- Du saprophytisme à la pathogénicité

Bien qu'*A.fumigatus* ne soit pas un pathogène «strict », il a développé au cours de son évolution un certain nombre de mécanismes capables de contrecarrer les défenses de l'hôte. Un certain nombre de facteurs semblent favoriser son développement dans les tissus pulmonaires (27).

Tout d'abord, la thermotolérance du champignon favorise son implantation dans l'organisme. *A.fumigatus* se développe en 24 à 48 heures à 37°C mais tolère des températures de 45°C. Ce micromycète capable de survivre dans des milieux extrêmes peut résister à des milieux fortement salés (osmophilie) ou faiblement oxygénés (micro-aérophilie). Il sécrète un arsenal de substances qui permettent aux spores d'adhérer au tissu pulmonaire puis de l'envahir (toxines, protéases) (45).

De plus, la présence des conidies dans l'air (10^{-1} à 10^{6} conidies /m^3), leur petite taille (2 à 3 µm) qui leur permet de pénétrer profondément dans les voies respiratoires et de gagner les territoires alvéolaires ainsi que l'aptitude des spores à filamenter (constituant un obstacle à la phagocytose), sont aussi des facteurs nécessaires au développement de cette espèce chez l'homme (44).

1-6- Les défenses anti-*Aspergillus* de l'hôte

L'*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 cellulaire et tissulaire sont successivement mises en jeu afin d'éliminer ou de neutraliser les micro-organismes inhalés par l'homme.

La première ligne de défense est 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. De ce fait, seulement une petite partie des spores inhalées gagne les territoires broncho-alvéolaires (44).

La deuxième ligne de défense, essentielle dans l'élimination des conidies, est constituée des macrophages alvéolaires et des polynucléaires neutrophiles (PNN). Les macrophages sont capables de phagocyter les spores inhalées alors que les PNN sont responsables de l'élimination des conidies germées qui ont échappé à la phagocytose. La capacité des spores à filamenter est un élément important, puisqu'elle constitue un obstacle à la phagocytose (44).

2- L'aspergillose invasive

A.fumigatus est responsable chez des patients 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 (API). 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 organes ou plus non contigus. Les principaux organes atteints sont alors, le cerveau (10-20%), le tube digestif, le foie, les reins et le cœur (16).

2-1- Les différentes manifestations pathologiques de l'aspergillose invasive

2-1-1- 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 envahissant 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 (54).

La lésion est triangulaire et souvent en cible formant une nécrose ischémique entourée d'un liseré hémorragique (54). Ces champignons sécrètent des toxines nécrosantes qui facilitent leurs disséminations. 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 des organes de voisinage (plèvre, péricarde...) (16).

2-1-2- Autres formes d'aspergillose invasive

Aspergillose invasive sinusienne : les atteintes sinusiennes représentent environ 15% des cas d'AI, associées ou non à une atteinte pulmonaire (57). Elles peuvent être asymptomatiques ou responsables d'une symptomatologie souvent unilatérale (obstruction nasale avec rhinorrhée, douleurs rétro-orbitaires et sinusiennes, œdème et/ou hématome facial parfois exophtalmie) (61).

Aspergillose cérébrale : le cerveau est atteint dans 10 à 20% des cas d'AI, soit par dissémination hématogène, soit par extension d'un foyer sinusien. Son pronostic est particulièrement sombre avec un taux de mortalité de 95-100% (23). Elle se caractérise par le développement d'abcès du cerveau et/ou du cervelet, unique ou multiple, exceptionnellement sous forme d'abcès médullaires ou de méningite (72).

L'aspergillose cardiaque 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 (16).

Aspergillus présente un important tropisme vasculaire, la dissémination hématogène 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 (23). L'atteinte rénale est également possible, survenant dans les formes disséminées et se traduisant par des microabcés et des infarctus (23). L'atteinte osseuse est rare. Elle concerne surtout les vertèbres, le sternum et les os longs. Elle se traduit par une ostéolyse mouchetée (23). Les localisations cutanées secondaires sont peu fréquentes mais très évocatrices par leur aspect en pustules évoluant vers la nécrose (57).

2-2- Les patients à risque

A.fumigatus est un champignon opportuniste. Bien que l'inhalation de spores soit quotidienne, les infections aspergillaires sont rares. Les AI sont des infections nosocomiales dans 75% des cas, survenant chez des patients à risque, essentiellement lors d'altération de la réponse phagocytaire (47).

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 (19).

Les patients sous corticothérapie au long cours à forte dose et ceux atteints de granulomatose septique chronique familiale sont aussi des populations à risque, non pas à cause d'une déficience quantitative des macrophages et des polynucléaires mais en raison d'une altération de leur fonction (16). On peut noter également des surinfections aspergillaires des plaies chez les grands brûlés (1 à 7 %) (16). L'aspergillose invasive au cours du SIDA reste rare (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) (49).

2-2-1- 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) (72). La fréquence de l'AI est alors de 5 à 25% (16). Le risque aspergillaire est de 1% par jour entre le 6ème et le 22ème jour de neutropénie (34) ; il augmente de 4% par jour après 3 semaines de neutropénie ; après 5 semaines, il est de 70% (57).

A l'heure actuelle, l'utilisation de facteur de croissance hématopoïétique 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 du nombre des aspergilloses (77).

2-2-2- Allogreffe de moelle osseuse

L'allogreffe de moelle osseuse entraîne une période d'aplasie profonde pendant laquelle le malade est protégé sous un flux laminaire. 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, font 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 (57). Les AI surviennent 2 à 3 mois après la transplantation, ainsi, la période de risque se prolonge après la récupération hématologique (57). La fréquence est de 4 à 9% (16).

2-2-3- Transplantation d'organes et corticothérapie au long cours à forte dose

L'augmentation du nombre de transplantations d'organes ces dernières décennies conjointement à la prescription d'immunosuppresseurs puissants, dont les corticoïdes, a entraîné une incidence croissante des cas d'AI. La fréquence est de 0,5% chez le transplanté rénal, 4,5% chez le transplanté cardiaque et 18% chez le transplanté cardio-pulmonaire et pulmonaire (29). En effet, les greffés pulmonaires présentent un risque accru du fait de l'altération des mécanismes de défenses locaux (29).

2-3- 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 (47).

Les signes cliniques, lorsqu'ils sont présents, n'ont rien de spécifiques. La toux est sèche, parfois accompagnée d'une expectoration hémoptoïque évocatrice. Le patient peut se plaindre de douleurs thoraciques, irradiant vers l'épaule, ce qui évoque une douleur pleurale. L'examen pulmonaire peut retrouver des râles crépitants et bronchiques (57).

2-4- 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% (16). 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 (77). Le traitement antifongique a pour but de limiter l'extension de l'infection en attendant la restauration des défenses immunitaires indispensables à la guérison (77). Il repose sur deux antifongiques principaux : l'amphotéricine B et l'itraconazole.

2-4-1- Amphotéricine B

L'amphotéricine B déoxycholate (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 avec l'ergostérol de la membrane des cellules fongiques, entraînant des troubles de la perméabilité qui conduit à la mort des cellules (28). 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).

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) (77).

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'amphotéricine B (AmB) ont permis d'envisager son association à 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 intolérance immédiate et la plus faible toxicité rénale permettent l'utilisation de doses plus élevées que lors de l'emploi de Fungizone® (12).

- la forme complexe phospholipidique de l'AmB (Abelcet®) doit être administrée 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 (12). 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 à 1 mg/kg/j (12).

- la forme dispersion colloïdale de l'AmB (Amphocil™) nécessite une autorisation temporaire d'utilisation (ATU). Elle doit être administrée en perfusion intraveineuse à la dose recommandée de 4mg/kg/j (32). Cette formulation lipidique en disque a une toxicité immédiate similaire à celle de la Fungizone® mais la toxicité rénale est moins importante (12).

Globalement, seule l'Ambisome® semble bien tolérée. Les deux autres formes présentent les même 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 (77). Ces nouvelles formulations seront réservées aux adultes et enfants ayant développés une insuffisance rénale sous AmB ou en cas d'altération préexistante et persistante de la fonction rénale ou encore en cas d'échec de fortes posologies de Fungizone® (12).

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 (32).

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 (12). Depuis le développement des formes lipidiques, cette utilisation, hors AMM, n'est plus utilisée.

2-4-2- 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 P_{450} des champignons. L'inhibition du cytochrome P_{450} bloque le système enzymatique (C14α-déméthylase) qui permet la transformation du lanostérol en ergostérol, constituant lipidique essentiel de la membrane fongique (28).

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 (20).

L'absorption intestinale variant d'un sujet à l'autre, certains échecs thérapeutiques peuvent être rapportés à des concentrations sériques insuffisantes ; il conviendra de faire des dosages sériques d'itraconazole après 10 à 15 jours de traitement (77).

Chez les patients sous traitement immunosuppresseurs (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 (29).

Une nouvelle forme galénique, Sporanox® solution buvable, destinée au traitement des candidoses oro-pharyngée, 5 à 10 fois mieux résorbées que la forme actuelle a été développée en emprisonnant l'itraconazole dans des cyclodextrines (77). 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 absorption digestive aléatoire ou des troubles de la conscience (77).

2-4-3- Voriconazole (UK-109, 496)

Le voriconazole est un dérivé triazolé de 3ème génération à activité fongicide contre *Aspergillus* spp, à la fois actif par voie orale et parentérale et très bien toléré (14). Cet antifongique à large spectre est aujourd'hui en attente d'AMM et a une autorisation temporaire d'utilisation (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* (14). Sur le modèle animal, le voriconazole est également plus actif que l'itraconazole et l'AmB contre *A.fumigatus* (17). Les résultats préliminaires des études cliniques, montre que ce nouvel antifongique est efficace dans le traitement des infections disséminées à *Aspergillus* spp (14). D'après une étude menée sur des patients atteints d'aspergillose invasive, la dose initiale est de 12 mg/kg/j en IV, puis 3 mg/kg/j pendant 6 à 27 jours. Enfin, un relais per os de 200 mg/kg/j pendant 4 à 24 semaines doit être envisagé (17).

Aucun des nouveaux antifongiques actuellement disponibles en clinique ne semble capable de stériliser les lésions invasives, constituées de filaments (77). Ceci souligne l'intérêt d'un diagnostic précoce. C'est en effet à la phase toute initiale de l'infection que l'on peut espérer obtenir le meilleur résultat thérapeutique (77). 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 (62).

Pour le CHU de Grenoble, le budget des antifongiques est passé en 2 ans de 1.9 MF à 4 MF, une «meilleure sélection » des patients permettrait de réduire le coût des antifongiques à l'hôpital (62) ; mais le diagnostic précoce de certitude est difficile à obtenir.

CHAPITRE II :
LES METHODES ACTUELLES DE DIAGNOSTIC DE L'ASPERGILLOSE INVASIVE

L'aspergillose invasive est la mycose dont le diagnostic de certitude est le plus difficile à établir. Affirmer une AI consiste à apporter la preuve mycologique et/ou histologique de l'envahissement tissulaire. Ceci fait appel à des prélèvements biopsiques qui permettent d'isoler le champignon dans 53 à 94% des cas. Mais ces moyens très invasifs sont souvent contre-indiqués chez ces patients profondément immunodéprimés (25). En pratique, l'AI est définie comme probable ou possible, selon les critères récemment reconnus par l'EORTC (European Organization For Research and Treatment of Cancer, association under Belgian law) (56) (annexe n°1a, 1b). Le diagnostic s'appuie sur un faisceau d'arguments cliniques, radiologiques et biologiques (19).

1- L'imagerie médicale

1-1- Radiographie pulmonaire

La radiographie standard doit être pratiquée chez tous les patients à risque, dès l'apparition d'une fièvre ou d'un signe d'appel respiratoire. Les aspects radiologiques de l'aspergillose pulmonaire invasive dépendent du stade évolutif de l'infection et de la profondeur de l'immunodépression sous-jacente (23).

Dans 10 à 25 % des cas, la radiographie pulmonaire est normale à l'installation des symptômes (23). Ceci souligne l'importance de la répétition des clichés, même si leur qualité technique est souvent insuffisante. En effet, les clichés sont réalisés au lit des malades fragiles et intransportables compte tenu de leur aplasie.

Dans les autres cas, on peut observer soit des opacités diffuses de mauvais pronostic, soit des formes plus localisées (images d'infiltrats) lorsque l'examen est réalisé précocement (23). Il faut surveiller, par la répétition des clichés, l'évolution inconstante mais évocatrice au moment de la sortie d'aplasie, des infiltrats vers la nécrose, avec formation d'un séquestre donnant un aspect de nodule surmonté d'un **croissant gazeux** (23). Ce signe radiologique standard très évocateur d'API apparaît tardivement lors de la guérison de la granulopénie, soit deux à trois semaines après l'opacité initiale, au moment où le diagnostic a déjà été fait dans 50% des cas (23).

1-2- Scanner thoracique (ou tomodensitométrie)

Le scanner peut mettre en évidence précocement deux signes scanographiques évocateurs d'aspergillose :

- **Le signe du halo** est décrit comme un flou périlésionnel en verre dépoli, situé à la périphérie d'une lésion. Il représente une zone hémorragique périphérique entourant l'infarctus rond central. Il s'agit d'un signe très précoce dans l'évolution de la lésion aspergillaire survenant le plus souvent avant la phase de réparation neutropénique. Ce signe hautement évocateur d'API chez un patient neutropénique n'est pas spécifique ; il peut être retrouvé dans d'autres infections pulmonaires (11).
- **Le signe du croissant gazeux**, signe le plus tardif dans l'évolution de l'API, apparaît après la réparation de la neutropénie. Il correspond à la détersion de la lésion aspergillaire par les polynucléaires. Ce signe n'est pas pathognomonique d'aspergillose mais il est très évocateur d'infection à champignons filamenteux à tropisme vasculaire (11).

Le scanner thoracique doit rechercher systématiquement le signe du halo dès qu'un infiltrat radiologique est observé chez un individu fébrile en aplasie. Ce signe spécifique permet un diagnostic précoce de l'API mais il ne met en évidence que des lésions déjà constituées (11). De plus, le scanner précise l'étendue des lésions (nombre, localisation, extension aux organes voisins et à distance) et guide les gestes fibroscopiques permettant la réalisation du lavage broncho-alvéolaire dans la zone la plus infecté, augmentant la fiabilité du prélèvement (23).

1-3- Imagerie par résonance magnétique (IRM)

L'imagerie par résonance magnétique permet une exploration multiplanaire (les 3 plans anatomiques habituels et tous les obliques possibles) conduisant à une étude morphologique des lésions par la détection de la nature hémorragique des nodules ou de l'infiltrat et la mise en évidence de la nécrose avec visualisation des lésions. L'IRM apporte une aide au diagnostic précoce de l'AI en démontrant le caractère en cible des opacités nodulaires. Le centre en hyposignal T1 représente la nécrose et les éléments fongiques. L'hypersignal périphérique représente l'hémorragie subaiguë ou l'infarctus hémorragique (23)

2- Diagnostic mycologique

Affirmer une aspergillose invasive consiste à apporter la preuve mycologique et/ou histologique de l'envahissement tissulaire par le micromycète (26). L'examen histologique s'effectue sur biopsie tissulaire. La mise en évidence de la forme filamenteuse du champignon dans un prélèvement profond constitue un diagnostic de certitude de la maladie. En pratique, la biopsie n'est pas réalisée compte tenu du caractère invasif de la technique et de l'état débilité des patients ; le risque hémorragique lié à l'état thrombopénique est souvent trop important (26).

Tous les prélèvements adressés au laboratoire dans un contexte de suspicion d'aspergillose font l'objet d'une analyse mycologique comportant un examen microscopique direct et la mise en culture (26).

Les examens directs se font au moyen de lames en verre sur lesquelles sont déposés directement les produits pathologiques à examiner, soit par étalement (expectoration, pus), soit par apposition de la tranche de section (biopsie), soit par étalement du culot de centrifugation (LBA).

L'examen direct des prélèvements fibroscopiques (broncho-aspiration et lavage broncho-alvéolaire), échantillons les plus couramment réalisés dans ce contexte, peut montrer :

- des spores, peu caractéristiques étant donné le caractère saprophyte d'*Aspergillus* ;
- des filaments mycéliens, sous forme d'éléments septés, non pigmentés, à parois parallèles, de 2 à 3,5 µm de diamètre. Ils présentent des ramifications dichotomiques à 45° (25) (figure n°2).

La mise en culture du champignon sur gélose Sabouraud-Chloramphénicol sans actidione® est le seul moyen de prouver qu'il s'agit bien d'une aspergillose et non d'une infection due à un autre « contaminant », de préciser l'espèce en cause et de vérifier sa sensibilité aux antifongiques (26). L'incubation des cultures entre 30 et 37°C permet habituellement l'obtention des isolats en 48 heures ou en 4 à 5 jours ; mais il est prudent de prolonger la culture jusqu'à 7 jours, surtout si le patient est déjà sous thérapeutique antifongique.

Après culture, l'observation des caractéristiques macroscopiques des colonies isolées et de la structure microscopique des organes de fructification permet l'identification de l'espèce en cause (25). Mais seulement 1/3 des AI prouvées d'après les données autopsiques sont diagnostiquées mycologiquement *ante-mortem* (26). Quant aux hémocultures, elles sont négatives dans l'immense majorité des cas.

L'isolement d'*Aspergillus* dans des prélèvements non invasifs (nez, expectoration, trachée) doit toujours être interprétée avec prudence car leur présence peut être uniquement liée à l'inhalation de spores présentes dans l'air ambiant. En revanche, lorsqu'il s'agit de patients sous flux laminaire, la présence du champignon dans les expectorations, présente une excellente valeur prédictive de maladie invasive. Celle-ci est encore améliorée lorsqu'il s'agit d'un prélèvement obtenu sous bronchoscopie (lavage broncho-alvéolaire) (25).

3- Diagnostic indirect

3-1- Recherche des anticorps anti-aspergillaire

La technique sérologique d'électrosynérèse permet de rechercher les anticorps sériques anti-aspergillaires. On effectue un criblage des sérums contenant des anticorps face aux antigènes d'*A.fumigatus*, *A.nidulans*, *A.flavus* et *A.terreus*. La rencontre Ag/Ac est matérialisée par un arc dit de précipitation. On associe à cette méthode une recherche des anticorps sériques par une technique immunoenzymatique : la méthode ELISA. La réaction Ag/Ac se fait au fond d'une cupule sensibilisée, au laboratoire, par de l'antigène d'*A.fumigatus*. Si une des deux techniques se révèle positive, le résultat sera confirmé par immunoélectrophorèse (IE) présentant une spécificité élevée (25).

Cependant, en raison de leur déficit immunitaire, la plupart des patients atteints d'AI ne produisent pas d'anticorps vis à vis du champignon. La recherche des anticorps n'a donc que peu d'intérêt pour le diagnostic précoce de l'API. Mais, il est essentiel de faire une sérologie régulièrement afin de dépister une éventuelle séroconversion précoce à la sortie d'aplasie ou une ascension des titres sérologiques dans près de 40% des cas d'AI (25).

3-2- Recherche des antigènes circulants (sérum, urine, LBA)

Chez les patients immunodéprimés, où la détection d'anticorps n'est pas adaptée, il s'agit de rechercher et de doser dans les liquides biologiques (sérum, urine, LBA) des antigènes circulants dont l'augmentation de concentration évoquera une infection évolutive (46). Cette technique peut palier aux insuffisances de la sérologie notamment chez les sujets en aplasie. La concentration d'antigènes circulants est bien corrélée à l'évolution de la maladie : augmentation de la concentration en cas d'aggravation de la maladie ou diminution en cas d'efficacité du traitement (64).

3-2-1- Recherche d'un antigène circulant (le galactomannane) par une méthode d'agglutination au latex

Le test « Pastorex *Aspergillus*® » (Sanofi Diagnostics Pasteur, Marnes la Coquette, France), qualitatif et semiquantitatif, permet par une technique d'agglutination au latex, la détection d'un polysaccharide pariétal d'*Aspergillus* : le galactomannane (GM), qui peut être présent dans le sérum de malades atteints de forme invasive d'aspergillose. Ce test utilise des particules de latex sensibilisées par un anticorps monoclonal IgM de rat EB-A2 qui reconnaît la chaîne latérale du galactomannane : le (1→5)β-galactofuranose. La réaction se traduit par une agglutination visible à l'œil nu. La limite de détection est de 15 ng/ml de sérum (25).

Ce test d'agglutination a une spécificité de 86 à 100% et une sensibilité très variable selon les auteurs, de 27 à 95% (21, 65, 73). La faible quantité de GM circulant, proche de la limite de détection, explique la mauvaise sensibilité du test en pratique.

Lorsqu'il est utilisé en dépistage systématique chez des patients à risque, il détecte des concentrations d'antigène qui correspondent à un stade avancé de la maladie. La positivité obtenu trop tardivement n'a donc pas de réelle utilité dans la décision thérapeutique (25). Cette méthode reste un excellent test de confirmation d'aspergillose mais ne peut en aucun cas être utilisé comme un test systématique de dépistage précoce de la maladie (75).

Très spécifique, cette méthode semble intéressante mais manque de sensibilité. Un autre test utilisant le même anticorps a été développé : la méthode « sandwich ELISA », commercialisé sous le nom de « Platelia *Aspergillus*® » (Sanofi Diagnostics Pasteur, Marnes la Coquette, France).

3-2-2- Recherche d'un antigène circulant (le galactomannane) par ELISA

Le test « Platelia *Aspergillus*® » (Sanofi diagnostics Pasteur, Marnes la Coquette, France) utilise une technique immunoenzymatique de type sandwich, permettant la recherche du GM dans les sérums humains. Ce test a un seuil de détection de 1 ng de GM/ ml de sérum (59).

Dans plusieurs études réalisées sur des échantillons de sérum, ce test a montré une grande sensibilité (82.5 à 100%) et une spécificité de 81 à 100% (59, 65, 73). En dépit de la très grande sensibilité de ce test, un résultat négatif ne doit pas exclure un diagnostic d'AI en raison de la très faible concentration en antigènes aspergillaires lors du tout premier stade de la maladie. Un suivi régulier (hebdomadaire puis tous les 2 jours) des patients à risque permet d'augmenter la sensibilité et la précocité du test. Dans la majorité des cas, le GM est détectable dans le sérum avant qu'apparaissent les premiers signes cliniques d'AI (59) et avant que les infiltrats soient visibles à la radiographie (73). Le test Platelia® permet donc une détection du GM à un stade précoce de la maladie.

La spécificité du test est moins satisfaisante. Le nombre de faux positifs est de l'ordre de 5% à 10%, ce qui impose de répéter les essais au moins deux fois ; on ne retrouve en général pas deux résultats faussement positifs consécutivement (59). Certains auteurs pensent qu'il y a dans le sérum, des molécules qui ressemblent à l'épitope reconnu par l'anticorps monoclonal anti-GM (64). D'autres montrent que chez les patients greffés de moelle osseuse, la chimiothérapie peut endommager la muqueuse intestinale laissant alors passer dans la circulation sanguine le GM initialement présent à la surface des fruits, des légumes ou des antibiotiques (amoxicilline, pipéracilline...) ce qui conduit à un test faussement positif (3).

La recherche d'antigènes circulants apparaît aujourd'hui comme une méthode capable d'améliorer la précocité du diagnostic de l'AI. Deux prélèvements positifs consécutifs indiqueront la présence de GM dans le sérum (8). Cependant, tout résultat positif devra être confronté aux données cliniques du patient (8).

3-2-3- Recherche du (1→3)-β-D glucane

Un test développé par une équipe japonaise, non commercialisé en France : le G-test® (Fungitec-G Test®, Seikagatu Corporation, Tokyo) permet de détecter dans le sérum un constituant de la paroi des cellules fongiques (*Candida* sp, *Cryptococcus* sp, *Aspergillus* sp...) : le (1→3)-β-D glucane. Ce test a une limite de détection de 50 pg/ml de sérum (30).

Sa sensibilité est de 81 à 90 % et sa spécificité de 88 à 100% pour le diagnostic des mycoses systémiques (36, 72). Très sensible, ce test se positive avant le test Platelia® pour la recherche du galactomannane et permettrait le diagnostic précoce d'infection fongique systémique dont l'API (30, 36).

3-3- Recherche des métabolites

Les métabolites solubles non antigéniques comme le D-mannitol se détectent et se mesurent par des réactions biochimiques faisant appel à la technique de chromatographie liquide haute performance (CLHP). Cependant, à l'heure actuelle, la mise en évidence du D-mannitol dans les échantillons cliniques reste du domaine expérimental (72).

Malgré le développement de ces nouvelles techniques, le diagnostic de l'AI reste difficile. La stratégie diagnostique actuelle pourrait bénéficier de l'apport des techniques de biologie moléculaire telles que la « Polymerase Chain Reaction ». En effet, du fait de sa grande sensibilité, la PCR a déjà trouvé sa place dans le diagnostic biologique de plusieurs maladies parasitaires et fongiques comme la toxoplasmose et la pneumocystose (18, 60). Des études récentes ont montré que la PCR pourrait améliorer la précocité du diagnostic de l'aspergillose invasive (8, 9, 10, 22, 33, 51, 60, 76).

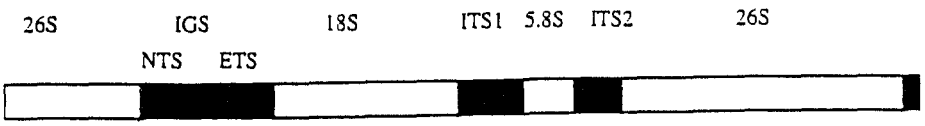
CHAPITRE III : VERS UN DIAGNOSTIC MOLECULAIRE DE L'ASPERGILLOSE INVASIVE ? (données de la littérature)

A l'heure actuelle différentes techniques de PCR ont été développées pour détecter l'ADN d'*Aspergillus* spp au cours de l'AI afin d'améliorer le diagnostic (8, 9, 10, 22, 33, 51, 60, 76). En matière de PCR-*Aspergillus*, il n'existe pas encore de consensus ni sur la nature du prélèvement le mieux adapté ni pour le choix de la séquence à amplifier. L'analyse critique de la littérature nous a permis de faire la synthèse des différentes techniques de PCR développées jusqu'à présent pour détecter l'ADN d'*Aspergillus* au cours de l'AI et de discuter les performances des méthodes utilisées lors d'études cliniques.

1- Données de la littérature : les différentes techniques décrites

Parmi les techniques décrites pour distinguer le genre *Aspergillus* ou l'espèce (principalement *A. fumigatus*), on distingue deux types de démarches :
- la première consiste à utiliser des amorces spécifiques d'*Aspergillus* spp ou d'*A.fumigatus*, la spécificité étant confirmée par hybridation (9, 10, 52, 55, 67, 73, 76) ;
- la seconde consiste à détecter l'ADN fongique par des amorces « tous champignons » permettant d'amplifier l'ADN de nombreux champignons pathogènes ; puis une hybridation par sondes spécifiques permet l'identification de genre (*Candida* sp, *Aspergillus* sp...) et d'espèces (22, 51).

A.fumigatus est un organisme eucaryote haploïde possédant huit chromosomes dont le génome de 3.10^7 pb est encore mal connu (66). La séquence d'ADN codant pour l'ARNr est très utilisée comme cible pour l'hybridation et comme source d'amorces. En effet, il correspond à la répétition d'environ 100 copies d'une séquence répétée en tandem (tête à queue) dans lequel il y a des séquences hautement conservées au niveau des régions codantes et des séquences hautement variables dans les régions « spacers » (4).



Représentation de l'ADNr (« ribosomal ARN gene complex ») des champignons filamenteux ; illustration de l'ordre des gènes. IGS : région espace intergénique, NTS : espace non transcrit, ETS : espace externe transcrit, ITS1 et ITS2 : espace interne transcrit. In : The genus *Aspergillus*. Eds Keith A & Powell Ka. Plenum Press, New York. 1994 (4).

Le tableau ci-après résume les principaux paramètres techniques des différentes PCR.

Séquence des amorces	Cible de la PCR	spécificité	Détection des produits d'amplification	Méthode de confirmation
1993 Spreadbury *et al* (63) Af1 : CCTTGGCTAGATTTGTTGGC Af2 : CCAACTCCCCTCAGCCAATC	26S/ espace intergénique de la région de l'ADNc d'*A. fumigatus*	*A. fumigatus*	Electrophorèse sur gel d'agarose	Southern Blot pour confirmer la spécificité des produits PCR (bandes non spécifiques d'ADN de *Penicillium* spp et de plusieurs *Aspergillus* spp).
1993 Tang *et al.* (67) Alp 11 : AGCACCGACTACATCTAC Alp 12 : GAGATGGTGTTGGTGGC	Gène codant pour une protéase alcaline d'*A. fumigatus* et *A. flavus.*	*A.fumigatus* (747 pb) *A.flavus* (690 pb)	Electrophorèse sur gel d'agarose	Southern Blot pour confirmer la spécificité (bandes non spécifiques)
1993 Reddy *et al.* (55) -TGG ACA TGT ATA AAC CAG - GTC AAA CTT ATA GTC GTC	Amorces basée sur une séquence partielle de protéine Asp f1 d'*A. fumigatus* et d'autres protéines homologues.	*A.fumigatus* *A.restrictus*	Electrophorèse sur gel d'agarose	Southern Blot pour confirmer la spécificité des produits d'amplification
1994 Melchers *et al.* (52) Asp 1 : CGGCCCTTAAATAGCCCGGC Asp 2 : ACCCCCCTGAGCCAGTCCG	Gène de l'ARNr 18S d'*Aspergillus* spp.	Plusieurs espèces d'*Aspergillus* spp.	Hot-Start PCR (PCR à haute température). Electrophorèse sur gel d'agarose	Southern Blot et enzyme de restriction pour distinguer *Aspergillus* spp de *Paecilomyces variotii.*
1995 Bretagne *et al.* (9) -GAA AGG TCA GGT GTT CGA GTC AC -CTT TGG TTG CGG GTT TAG GGA TT	ADN mitochondrial	*A.fumigatus* *A.flavus* *A.terreus* *A.niger*	PCR compétitive avec contrôle interne et UNG. Electrophorèse sur gel d'acrylamide.	Southern Blot pour confirmer la spécificité des produits d'amplification
1996 Yamakami *et al.* (76) outerAsp5 :GATAACGAACGAGACCTC GG outerAsp8 :GCCAACCTCCCCTGAGCC AG innerAsp1 :CGGCCCTTAAATAGCCCG GTC innerAsp7 :CCTGAGCCAGTCCGAAGG CC	Gène de l'ARNr 18S d'*A.fumigatus*	Plusieurs espèces d'*Aspergillus* spp.	PCR « nichée » Electrophorèse sur gel d'agarose.	Southern Blot pour confirmer la spécificité des produits d'amplification de la PCR « nichée »
1997 Einsele *et al.* (22) ATTGGAGGGCAAGTCTGGTG CCGATCCCTAGTCGGCATAG	Séquence consensus au niveau du gène de l'ARNr 18S d'une variété de champignons pathogènes	champignons pathogènes	Electrophorèse sur gel d'agarose	Southern Blot (sondes spécifiques d'espèces).
1998 Bretagne *et al.* (8) - TGG TAG AGC TGT CGC TTT ACA CGC - TTG GTT GCC TTA GGG ATT	ADN mitochondrial d'*A.fumigatus* et *A.flavus*	*A.fumigatus* *A.flavus*	PCR-ELISA (enzyme linked immunosorbent assay)	Electrophorèse sur gel d'urée-acrylamide.

Séquences des amorces	Cible de la PCR	Spécificité	Détection des produits d'amplification	Méthode de confirmation
1998 Van Burik *et al* (69) 5'-GATACCGTCGTAGTCTTA-3' 5'-ATTCCTCTCGTTGAAGAGC-3'	Séquence consensus au niveau du gène de l'ARNr 18S d'une variété de champignons pathogènes	champignons pathogènes	Electrophorèse sur gel d'agarose	Southern Blot (sondes spécifiques d'espèces).
1998 Brandt *et al* (6) Z19-276 : 5'-TTGATCGTGCCCTGGCTTCCC Z19-660 : 5'-CAACATTGAAATCCAAGAGGC	Séquence au niveau du gène de l'ARNr 18S d'*A.fumigatus* spp.	7 espèces d'*A.fumigatus*	L'amorce s'hybride sur le fragment amplifié de 864 pb spécifique d'*Aspergillus.* L'amorce fluorescente est clivée en 5' par l'endonucléase (Taq polymérase). Un détecteur mesure l'intensité de fluorescence.	
1999 Turenne *et al* (68) ITS 4 : 5'-tcc tcc gtc tat tga tga c-3' ITS 86 : 5'-gtg aat cat cga atc ttt gaa c-3'	Région ITS2 située entre la sous unité 5.8S et 18S de l'ARNr	56 champignons pathogènes	Méthode d'électrophorèse capillaire pour séparer les produits amplifiés fluorescents (longueur de ITS2 spécifique de genre et d'espèce).	

La sensibilité et la limite de détection des différentes techniques de PCR sont déterminées en amplifiant une série de dilutions d'ADN. Ces techniques permettent de détecter sur gel d'agarose de 1 pg à 50 pg d'*Aspergillus* sp (52, 55, 63, 67). L'hybridation par Southern Blot augmente la sensibilité d'un facteur 10.

La spécificité est testée en amplifiant l'ADN génomique de plusieurs micro-organismes puis confirmée par Southern Blot. La spécificité de toutes ces méthodes correspond à la spécificité attendue. Cependant, avec certaines espèces, après amplification, des bandes de tailles incorrectes sont parfois présentes sur le gel d'agarose ; mais le Southern Blot confirme la négativité (63, 67).

Ces deux approches sont différentes et posent des problèmes spécifiques. La PCR « tous champignons » est particulièrement sensible aux contaminations. Une étude récente menée par Löeffler *et al* (48) montre que la détection de plusieurs espèces de champignons par des amorces «tous champignons» correspondant à une région hautement conservée du gène codant pour l'ARNr 18S, se heurte à des problèmes de contaminations et nécessite des précautions particulières.

Hormis les contaminations du mélange réactionnel par les spores aéroportées d'*Aspergillus* ou par les amplifiats, les auteurs ont répertorié des contaminations de la zymolyase (enzyme d'extraction) par *Saccharomyces cerevisiae*, des contaminations de la lyticase (enzyme d'extraction) par *T.harzianum* et la contamination du tampon par *Acremonium* spp. L'utilisation de ce type d'amorces demande l'emploi de réactifs d'une grande pureté.

Les recherches actuelles, en terme de PCR-*Aspergillus*, sont orientées vers la PCR quantitative, afin de quantifier la charge fongique. Henke *et al* (31) ont mis au point une technique de PCR utilisant un « Light-Cycler™ » associé à un système de détection par fluorescence. Les amorces spécifiques sont marquées par différents composés fluorescents. Des dilutions de concentrations connues de la séquence cible permettent d'établir une gamme d'étalonnage. La concentration de l'ADN de l'échantillon clinique est déterminée en comparant la fluorescence de l'échantillon avec la gamme d'étalonnage. L'étude clinique portant sur 10 patients (98 échantillons) retrouve 100% de sensibilité pour les échantillons de patients atteints d'AI prouvées et 50% pour les échantillons de patients atteints d'AI possibles (31).

2- Résultats des différentes études cliniques

2-1- Les patients

L'intérêt des différentes PCR-*Aspergillus* sur des prélèvements biologiques a été évalué sur plusieurs types de patients :

- patients immunodéprimés avec ou sans API documentée et patients immunocompétents (8, 9, 22, 52, 63, 67, 73, 76) ;
- patients à faible risque d'AI mais avec des facteurs de risque de colonisation (74) ;
- patients VIH+ (9) ;
- patients présentant une aspergillose pulmonaire semi-invasive.

Les résultats obtenus par ces études cliniques sont difficiles à comparer. En effet, l'évaluation d'une nouvelle méthode de diagnostic repose sur la comparaison avec une technique de référence.

Or, le diagnostic de certitude de l'AI est rarement obtenu. Pour prouver l'aspergillose invasive, il est nécessaire d'obtenir des prélèvements invasifs, souvent contre-indiqués en raison de l'état clinique du patient. Dans la plupart des études cliniques, les auteurs évaluent leur PCR sur des échantillons de patients ayant une AI possible ou probable mais non certaine. On note alors la difficulté d'évaluer une nouvelle technique sans pouvoir la comparer à une technique de référence. De plus, les patients étudiés sont regroupés et classés selon des critères qui ne sont pas toujours identiques d'un centre à l'autre.

2-2- Les prélèvements

Ces techniques moléculaires ont été adaptées sur plusieurs types de prélèvements : le liquide de lavage broncho-alvéolaire (LBA) pour la majorité des études (9, 10, 52, 63, 67, 73, 74), les urines (55), le liquide céphalo-rachidien (LCR) (71, 37), le sérum (8, 76) et le sang (10, 22, 69). A l'heure actuelle, il n'existe pas de consensus en ce qui concerne la nature du prélèvement biologique le mieux adapté.

Dans les études cliniques, la PCR est le plus souvent réalisée sur le **liquide de lavage broncho-alvéolaire** (LBA). La sensibilité de ces essais est élevée et les résultats sont obtenus deux jours avant ceux de la culture. En revanche, la spécificité est faible en raison du nombre élevé de faux positifs (10 à 25%) (8). Plusieurs explications sont possibles :

- l'*Aspergillus* est un contaminant largement répandu dans l'environnement. Les spores aéroportées peuvent contaminer les échantillons ou le milieu réactionnel (63, 67) ;
- la contamination par des produits d'une précédente amplification peut être responsable de ces faux positifs ; cependant, Bretagne *et al* (9), qui utilisent une enzyme, l'UNG qui dégrade ces produits issus d'amplifications précédentes, ont également des faux positifs ;
- le manque de spécificité des amorces est improbable car les études de spécificité ont donné des résultats satisfaisants (9, 52, 63, 67) ;
- les faux positifs pourraient être expliqués par la présence dans le tractus respiratoire de spores d'*Aspergillus* sp. Une PCR positive ne pourra être prise en compte que chez les patients à risque d'aspergillose (9).

Les différents résultats issus de ces études ne semblent pas encourager au développement de la recherche de l'ADN d'*Aspergillus* dans les prélèvements bronchoscopiques. Le risque de faux positifs pourrait rendre difficile l'interprétation des résultats (52, 63, 67). La PCR ne peut pas distinguer une véritable infection, d'une colonisation du tractus respiratoire ou d'une contamination des échantillons de LBA par des conidies. Comme Bretagne *et al* le soulignent, la PCR devrait être mise au point sur des échantillons biologiques moins susceptibles d'être contaminés par des spores aéroportées, comme les urines, le sang ou les biopsies pulmonaires (9).

La PCR pratiquée sur des **biopsies pulmonaires** peut permettre d'établir le diagnostic quand la culture est négative du fait, par exemple, d'un traitement antifongique. Mais ce type de prélèvement n'est que rarement réalisé en pratique.

Le seul travail décrit sur des échantillons d'**urine** ne conduit pas à une étude clinique permettant d'apprécier l'intérêt de la PCR sur ce type de prélèvement (55).

Récemment, Verweij *et al* (71) ont étudié un autre type de prélèvement : le **liquide céphalo-rachidien** (LCR) chez un patient atteint d'une méningite fongique à *A.meningitis*. La PCR a donné un résultat positif 4 jours avant la culture mais seulement 4 échantillons sur 26 ont été positifs. Il semble qu'une faible quantité de cellules fongiques soit présente dans le LCR et la clairance de l'ADN dans le LCR n'est pas connue. L'essai peut être négatif car l'ADN fongique n'est pas présent dans le LCR au moment du prélèvement (71).

Une autre étude menée par Kami *et al* (37) apporte un tout autre point de vue sur ce type de prélèvement. Leur étude clinique basée sur 5 échantillons de LCR isolés de 5 patients atteints d'aspergillose du système nerveux central (abcès cérébraux) retrouve une sensibilité de 100%. Cependant, ce prélèvement difficile (ponction lombaire, cathéter intraventiculaire) n'a que peu d'intérêt dans l'utilisation de la PCR en routine car la méningite aspergillaire est rare. Mais bien que rare, ce prélèvement peut avoir un intérêt, de façon ponctuelle, pour le diagnostic des aspergilloses invasives cérébrales.

Deux autres types d'échantillons non invasifs ont été testés : **le sang** (22, 69) et **le sérum** (5, 8, 13, 76). La PCR utilisée pour détecter l'ADN dans le sérum est spécifique d'*Aspergillus* (8, 76) alors que celle mise au point par Einsele *et al* (22) sur sang total permet l'amplification de l'ADN de plusieurs champignons pathogènes.

La détection de l'ADN aspergillaire dans ces échantillons moins susceptibles à l'aérocontamination semble plus prometteuse. En effet, ce type de prélèvement peut être renouvelé plusieurs fois ce qui paraît utile pour le suivi des patients agranulocytaires et le suivi du traitement antifongique (22). En effet, la disparition de l'ADN fongique dans le sang du patient peut être corrélée avec le succès de la thérapie (22).

Dans leurs études, Bretagne *et al* (8) et Einsele *et al* (22) montrent que toutes les hémocultures de patients atteints d'AI sont négatives, tandis que les PCR sur sérum sont positives dans 12 cas /22 et les PCR sur le sang dans 13 cas /13. Plusieurs explications sont possibles. Bretagne *et al* pensent que les hyphes mortes sont libérées dans le sang, ce qui expliquerait que la culture soit négative et alors que la PCR est positive (8). La différence de sensibilité entre le sang et le sérum peut être expliquée par une intéraction possible entre le champignon et les cellules du sang. Einsele *et al* (22) ont trouvé 100% de sensibilité pour la détection des infections fongiques quand deux échantillons de sang sont testés. Aux vues de ces résultats la PCR-*Aspergillus* sur sang total semble la plus prometteuse en terme de sensibilité.

Cependant, l'utilisation du **sang** comme prélèvement de choix pour la PCR se heurte à plusieurs difficultés :

- Tout d'abord, le sang est un produit labile que l'on ne peut pas conserver. L'échantillon doit être traité immédiatement après avoir fait le prélèvement.
- De plus, le traitement de l'échantillon est particulièrement délicat sur le plan technique, l'extraction est longue et le nombre d'étape à cette phase peut être à l'origine de contaminations (22). Plusieurs coffrets ont été commercialisés pour simplifier les protocoles d'extraction de l'ADN. Le QIAmp Tissue Kit (Qiagen, Hilden, Germany) permet d'obtenir en 4 heures l'ADN fongique, d'une pureté comparable à celui obtenu avec une méthode conventionnelle, qui prend en moyenne 8 heures (50). L'utilisation du coffret augmente considérablement (23 fois) le coût de l'extraction. Mais, raccourcir cette étape est essentiel pour l'utilisation de la PCR sur sang total.

Compte tenu des difficultés décrites, la PCR sur **sérum** semble plus facile à appliquer au diagnostic biologique. En effet, la possibilité de congeler les sérums en vue d'une analyse ultérieure ainsi que la simplification du traitement des échantillons rendent ce type de prélèvement intéressant.

Dans une étude récente, après expérimentation animale, Bougnoux *et al* (5) ont montré que le sérum était le prélèvement de choix pour le diagnostic par PCR des candidoses systémiques. Le lapin massivement infecté, par voie intraveineuse, à l'aide d'une suspension de spores de *Candida albicans*, présente une fongémie certaine et constitue un bon modèle pour comparer, en terme de sensibilité, ces deux types de prélèvements (sang total et sérum).

L'équipe de Bretagne *et al* a comparé la sensibilité de la PCR sur trois types d'échantillons : **le sérum, le plasma** et **les leucocytes** (13). Le plasma n'a pas donné des résultats intéressants. Le sérum semble être le prélèvement de choix pour le diagnostic de l'AI. En effet, offrant une sensibilité égale, le sérum présente l'avantage, par rapport au culot de leucocytes, de permettre une extraction facile de l'ADN et de pouvoir être congelé.

3- Place de la PCR-*Aspergillus* dans la stratégie diagnostique de l'AI

Deux équipes ont montré que la PCR-*Aspergillus* sur sérum pourrait améliorer le diagnostic de l'AI (8, 76). Afin de déterminer la place de la PCR dans la stratégie diagnostic, plusieurs études ont été menées de manière à comparer en terme de sensibilité, la PCR à la détection d'antigènes aspergillaires circulants.

La PCR-*Aspergillus* paraît intéressante, particulièrement lorsqu'elle est couplée à la recherche d'antigènes aspergillaires circulants : le galactomannane (8, 76). Ces deux examens présentent l'avantage de pouvoir être réalisés sur le même échantillon.

Les études préliminaires conduites sur des échantillons de LBA (73) ou de sérum (8, 30, 39) montre que l'association de ces techniques semble constituer un apport significatif pour le diagnostic biologique de l'AI.

Verweij *et al* (73) ont retrouvé, lors d'une étude clinique basée sur l'examen d'échantillons de LBA isolés de 35 patients non neutropéniques, respectivement 5 PCR positives et 2 détections de GM positives. Le taux élevé de faux positif révèle que le LBA n'est pas le prélèvement de choix pour ces deux techniques (73).

D'autres auteurs (76) ont publié une comparaison entre le test d'agglutination au latex (Pastorex *Aspergillus*®, Sanofi Diagnostics Pasteur, Marnes la Coquette, France) et la PCR « nichée » réalisée sur sérum. L'étude portait sur 20 patients ayant une AI prouvée. On retrouve 14 PCR+ et 12 détections de GM positives ; dont 10 positifs avec les deux techniques. Cette étude montre que le sérum pourrait être utilisé pour la détection de l'ADN d'*Aspergillus*.

A leur tour, Bretagne *et al* (8) comparent la sensibilité de la PCR compétitive à la détection du GM dans le sérum par un test ayant une sensibilité dix fois supérieure à celle du test d'agglutination au latex : la méthode « sandwich » ELISA (Platelia *Aspergillus*®, Sanofi Diagnostics Pasteur, Marnes la Coquette, France). Dans cette étude, le test du GM est légèrement plus sensible que la PCR. Sur 22 patients ayant une AI confirmée, probable ou suspectée, l'étude montre 15 détections de GM positives et 12 PCR+, dont 9 positifs avec les deux techniques. Cependant, ni le taux de GM et d'ADN « relâchés » dans le sang, ni leur clairance ne sont connus. On sait seulement que la demi-vie de l'ADN d'*Aspergillus* spp dans le sang est courte, probablement inférieur à 5 minutes (8). Si la clairance de l'ADN est supérieure à celle du GM et si la quantité de GM relâchée par le champignon est supérieure à la quantité d'ADN, cela peut expliquer la meilleure sensibilité de la détection de l'antigène circulant. Ainsi, une PCR ne sera positive que si la charge fongique est supérieure au seuil de détection au moment du prélèvement (8).

La détection du GM par ELISA est une technique sensible, facile à réaliser en routine pour le suivi hebdomadaire des patients à risque. Cependant, cette technique manque de spécificité. L'association à la PCR permettrait de confirmer ou d'infirmer la présence d'ADN d'*Aspergillus* spp dans le prélèvement et de ce fait améliorer la spécificité de l'ELISA.

La détection du GM sera définitivement positive si elle est confirmée par PCR (73). Ainsi, lorsqu'ils sont positifs, ces deux tests non invasifs et de réalisation rapide (24 h pour la PCR et 4 h pour l'ELISA) peuvent constituer une alternative aux investigations agressives comme la biopsie et de ce fait constituer un apport dans l'établissement d'un diagnostic de certitude (8).

Après analyse critique de la littérature, nous avons pu noter que le choix du prélèvement était déterminant. Il n'existe cependant pas de consensus à l'heure actuelle. Seule la PCR réalisée sur des prélèvements sanguins semble associer une spécificité et une sensibilité suffisante. La PCR-*Aspergillus* sur sérum paraît intéressante, particulièrement lorsqu'elle est couplée avec la recherche d'antigènes aspergillaires (8, 76) ; ce couplage présente l'avantage de pouvoir être réalisé sur le même échantillon.

La commercialisation de kit d'extraction d'ADN (QIAmp Tissue Kit, Quiagen, Hilden, Germany) et de détection des produits amplifiés par ELISA (PCR ELISA Dig-labelling et Dig-detection Kit , Boerhinger Mannheim, Mannheim, Germany), facilitera l'adaptation de la PCR-*Aspergillus* aux laboratoires d'analyses médicales. La simplification des méthodes et leur standardisation seront nécessaires au développement de la PCR-*Aspergillus* comme nouvel outil diagnostic de l'AI.

CHAPITRE IV :

MISE AU POINT DE LA PCR-*ASPERGILLUS*

MATERIELS ET METHODES

La méthode de Melchers *et al* (52) qui permet la détection du genre *Aspergillus* a été retenu pour l'adaptation et l'optimisation de la PCR-*Aspergillus* dans le laboratoire. En effet, il est nécessaire de pouvoir amplifier et révéler le matériel nucléaire de plusieurs espèces, l'infection n'étant pas toujours due à *A.fumigatus*. Les amorces utilisées permettent l'amplification d'une séquence spécifique du genre *Aspergillus* commune aux principales espèces pathogènes d'*Aspergillus*, qui correspond à la région de V7 à V9 du gène codant pour la sous unité 18S de l'ARN ribosomal (schéma n°1).

Asp 1 : 5'-CGG-CCC-TTA-AAT-AGC-CCG-GTC-3'

Asp 2 : 5'-ACC-CCC-CTG-AGC-CGA-TCC-G-3'

La sensibilité de la méthode est élevée. Elle permet la détection de 1 pg d'ADN par électrophorèse sur gel d'agarose et de 100 fg par Southern Blot (hybridation par une sonde marquée au ^{32}P).

La spécificité est bonne, mais des réactions croisées sont observées avec *Penicillium marneffei, Penicillium chrysogenum* et *Paecilomyces variotii.* L'analyse par Southern Blot distingue le genre *Aspergillus* du *Penicillium marneffei. Paecilomyces variotii* est différencié par l'action d'une endonucléase *StyI* qui coupe le fragment amplifié du genre *Aspergillus* en deux fragments au niveau du site de restriction de l'enzyme.

Melchers *et al* (52) utilisent la technique de «Hot-Start PCR» qui favorise la diminution des appariements non spécifiques, et une hybridation par une sonde marquée au ^{32}P lors de l'analyse par Southern Blot. Fletcher *et al* (24) ont simplifié cette méthode en utilisant une PCR classique et une sonde froide pour le Southern Blot. C'est donc une PCR classique qui a été adaptée au laboratoire.

1- Les souches fongiques

1-1-Souche référencée d'*Aspergillus fumigatus*

Une souche CBS (Centraalbureau voor Schimmelcultures) d'*A.fumigatus* a été utilisée pour la mise au point de la PCR-*Aspergillus*. La souche CBS 144-89 (ALP+) correspond à un isolat de malade atteint d'aspergillose invasive : cette souche a servi de référence à l'étude pour l'expression de la protéase alcaline, facteur potentiel de virulence.

1-2-Autres souches de références

Les amorces utilisées pour l'amplification permettent la détection de l'ADN du genre *Aspergillus*. D'autres espèces d'*Aspergillus* également rencontrées en pathologie humaine (moins fréquentes) ont été choisies afin d'étudier la spécificité de la technique. Il s'agit des souches de :

- *Aspergillus flavus* n°IHEM 5902
- *Aspergillus nidulans* n°IHEM 4190
- *Aspergillus niger* n° IHEM 2951
- *Aspergillus terreus* n°IHEM 2499

Ces souches référencées d'*Aspergillus* ont été obtenues par l'IHEM (Institute of Hygiene and Epidemiology Mycology, Bruxelles, Belgique).

Des homologies de séquence sont retrouvées au niveau de la région conservée de la sous unité 18S de l'ARNr entre *Aspergillus* spp, *Penicillium marneffei*, *Penicillium chrysogenum* et *Paecylomyces variotii*. Afin de vérifier la spécificité des amorces choisies la technique a été étudiée sur :

- *Paecilomyces variotti* n°IHEM 3998
- *Penicillium* sp

L'étude de la spécificité a également été réalisée sur un autre champignon filamenteux : *Fusarium* sp.

1-3- Souches isolées de prélèvements de malades

Les souches de patients ont été choisies parmi les souches d'une étude d'un réseau européen : l'EBGA network : European research group on biotype and genotype of *Aspergillus*. Des isolats obtenus à partir de prélèvements biologiques (lavages broncho-alvéolaires, crachats) provenant de malades ayant développé une aspergillose invasive prouvée ou hautement probable, ont été collectés par les différents centres EBGA (Lyon, Grenoble, Milan) puis centralisées à l'IHEM.
Les souches d'*A.fumigatus* ont été obtenues par le Centre Hospitalier Universitaire de Lyon à partir de prélèvements broncho- alvéolaires et de crachats chez des patients ayant une aspergillose invasive prouvée ou probable.

Souches n°IHEM	Provenance du prélèvement	Service et hôpital	Maladie associée
n°IHEM 9520	LBA	Réanimation Lyon	Corticothérapie au long cours, patient non neutropénique
n°IHEM 9450	crachat	Hématologie Lyon	Lymphome, cancer du sein, leucose, patient neutropénique
n°IHEM 9509	LBA	Réanimation Lyon	Lymphome, patient neutropénique
n°IHEM 9380	LBA	Réanimation Lyon	Lymphome, patient neutropénique
n°IHEM 9900	LBA	Réanimation Lyon	leucose

Tableau n°2 : origine géographique et provenance des souches référencées par l'IHEM (Institute of Hygiene and Epidemiology Mycology, Bruxelles, Belgique).

1-4-Mise en culture

Les souches lyophilisées ont été reconstituées et cultivées stérilement (sous hotte à flux laminaire) pour éviter tout risque de contamination croisée avec les spores de l'environnement. Le lyophilisat est reconstitué par 0,2 ml d'eau stérile à l'aide d'une pipette Pasteur. Puis la suspension de spores d'*A.fumigatus* est ensemencée sur boite de Pétri (gélose Sabouraud-Chloramphénicol-Gentamicine, Bio-Mérieux). Les boites sont incubées 24 h à 42°C.

Une colonie étoilée et parfaitement isolée est alors récupérée à l'oëse et mise en suspension dans 500µl d'un milieu de culture «Sabouraud liquide» et placée 72 h à 42°C sous agitation. *A.fumigatus*, champignon thermotolérant, se développe à 42°C ce qui limite le risque de contamination. Les autres souches d'*Aspergillus* et de chaque champignon filamenteux seront mises en culture à 24°C.

2- Extraction de l'ADN fongique

2-1- Lyse du mycélium

Après centrifugation, le culot est lavé par 400 µl de TE (Tris-HCl 10mM, pH7,5 ; EDTA 1mM), puis extrait par 300 µl de tampon d'extraction (Tris-HCL 200mM, pH8,5 ; NaCl 500mM ; EDTA 25mM ; SDS 1%) et enfin placée à –20°C.

La lyse du mycélium est favorisée par le broyage de la colonie congelée à l'aide d'un piston de polypropylène et sous l'action de la protéinase K (Sigma) à 10 µg/µl pendant 1h à 55°C sous agitation (38).

2-2-Extraction de l'ADN

Une première extraction par le phénol permet d'enlever des protéines. Les traces de phénol sont éliminées par un lavage au chloroforme-alcool isoamylique. L'ADN est précipité dans l'isopropanol froid. Les ARN sont dégradés par 15 µl de RNase 10 µg/µl à 37°C pendant 1h30, 2 fois consécutives.

L'ADN, extrait par le phénol-chloroforme, est précipité dans 0.1V d'acétate de sodium 3M pH5,2 et 2,5V d'éthanol absolu pendant 30 mn à –80°C puis dans l'éthanol à 70%. Le précipité est séché au «speed vac», repris dans 30µl de TE et congelé à -20°C (schéma n°2).

La concentration d'ADN est mesurée au spectrophotomètre à 260 nm. En effet, les bases puriques et pyrimidiques absorbent à 260 nm. Les protéines absorbent non seulement à 280 nm mais aussi à 260 nm. L'extrait doit avoir un rapport DO260/DO280 compris entre 1,8 et 2. On obtient la concentration en µg/µl (38).

3- Méthode d'amplification génique en chaîne (PCR)

La « Polymerase Chain Reaction » ou PCR est une technique de synthèse d'acides nucléiques *in vitro* par laquelle un segment d'ADN particulier, connu ou partiellement connu, peut être spécifiquement amplifié.

3-1- Principe

Ce procédé consiste à utiliser deux amorces oligonucléotidiques de synthèse, complémentaires d'une séquence de 20 à 25 nucléotides, situées de part et d'autre de la séquence à amplifier, en 3' de chaque brin. Après séparation des deux brins d'ADN complémentaires, les amorces hybrident les deux brins opposés de la séquence cible. L'ADN polymérase synthétise une copie de l'ADN situé entre les deux amorces ; ainsi chaque amorce est allongée dans le sens 5'→3' d'une séquence exactement complémentaire au brin « recopié ». Les brins néosynthétisés étant eux-mêmes complémentaires des amorces, servent à leur tour de modèle pour l'ADN polymérase. Il en résulte un doublement de la séquence cible à chaque cycle. Le cycle « dénaturation, appariement, synthèse » est répété en moyenne 30 fois. Il s'ensuit une accumulation exponentielle des séquences cibles amplifiées d'environ 2^n, où *n* est le nombre de cycles d'amplification réalisés (38) (schéma n°3).

3-2- Conditions d'amplification

3-2-1- Préparation du milieu réactionnel

La réaction d'amplification est effectuée dans 30 µl d'un mélange, préparé sous une hotte contenant :

Tampon d'amplification : 67 mM Tris-HCl pH 8.8, 16 mM $(NH_4)_2SO_4$, 0.01% Tween 20

$MgCl_2$: 3 mM

dATP, dCTP, dGTP : 200 µM

dUTP : 400 µM

Asp 1, Asp 2: 0,8 µM (chacune)

UNG : 0,3 U

Taq Polymérase thermostable : 0,75 U

Eau stérile qsp 30µl

Le milieu réactionnel est recouvert d'une goutte d'huile minérale pour éviter l'évaporation. L'ADN, dilué en série, est ajouté au dernier moment sous l'huile minérale. Un témoin négatif contenant tous les composants nécessaires à la PCR, excepté l'ADN, est préparé en parallèle.

3-2-1- Le cycle thermique

La réaction est effectuée dans un appareil automatique : le «Perkin Elmer Cetus thermal cycler ®» (CETUS CORPORATION). Les produits PCR issus d'une amplification précédente sont dégradés par l'UNG pendant 10 mn à 45°C. Puis l'ADN est dénaturé pendant 7 mn à 94°C. Le cycle thermique va alors commencer et se répéter 40 fois selon la chronologie suivante :

- dénaturation de l'ADN : 30 s à 94°C
- appariement des amorces : 30 s à 62°C
- élongation par l'ADN polymérase : 1 mn à 72°C

L'extension finale est réalisée à 72°C pendant 5 mn.

4- Méthodes de révélation

L'identification des fragments amplifiés par PCR se fait par électrophorèse sur gel d'agarose marqué au bromure d'éthidium. Cette révélation simple permet une observation rapide des fragments.

La spécificité de l'amplification est confirmée par Southern Blot (hybridation à l'aide d'une sonde de capture froide) (52). Une nouvelle méthode de détection, la PCR-ELISA de réalisation plus simple, permet de confirmer la spécificité et d'améliorer la sensibilité.

4-1- Révélation sur gel d'agarose

La visualisation de la portion d'ADN amplifiée est obtenue après électrophorèse sur gel d'agarose. Pour une taille de fragment inférieure à 1 Kb, un gel à 1,5 % d'agarose est préparé. Du bromure d'éthidium, agent intercalent de l'ADN et fluorescent au UV, est incorporé au gel à raison d'une goutte pour 100 ml de TAE (Tris-acétate-EDTA). Vingt µl de produit amplifié et 2 µl de bleu de bromophénol, pour visualiser le dépôt, sont déposés dans chaque puits. Vingt µl d'un témoin de poids moléculaire, le 1 Kb ladder (US Patent) sont déposés en parallèle. Après migration, le gel est observé sous UV puis photographié (38).

4-2- Révélation par Southern Blot

La technique du Southern Blot (SOUTHERN, 1975) consiste en un transfert sur membrane de nylon, d'ADN séparés par électrophorèse donnant ainsi une réplique parfaite du profil électrophorétique. L'hybridation avec une sonde marquée, spécifique du fragment attendu, permet la mise en évidence d'un fragment non détecté par la révélation sur gel d'agarose (1) (schéma n°4).

La sonde de capture marquée à la digoxigénine correspond à une séquence d'oligonucléotides comprise entre la région V7 et V9 de la sous unité 18S de l'ARNr (schéma n°1) (52). La sonde Asp-p est constituée de 21 bases dont la séquence est :

5'-ATG-GAA-GTG-CGC-GGC-AAT-AAC-3'

➔Traitement du gel et transfert

- Après migration, le gel est agité doucement dans une solution de HCl 0,25 M pendant 10 mn afin de casser les grands fragments d'ADN (étape de dépurination) puis 30 mn dans une solution dénaturante (NaOH 0,5 M ; NaCl 5M) qui casse l'ADN en fragments courts et en simple brin, étape indispensable pour l'hybridation ultérieure. Le gel est ensuite plongé pendant 30 mn dans une solution neutralisante (Tris-HCl 1M, pH8 ; NaCL 1,5 M) sous agitation modérée.
- Le gel est recouvert d'une feuille de nylon (Hybond-N ; Amersham) et de deux feuilles de papier Whathman 3MM, toutes trois coupées à ses dimensions et imbibées de tampon 2 x SSC. Une pile de papier très hydrophile est ajoutée pour absorber le liquide contenu dans le gel d'agarose et créer un courant liquidien ascendant qui entraîne l'ADN. Les fragments d'ADN sont transférés par capillarité et piégés dans la membrane. Le transfert dure de 16 à 24 h.
- A la fin du transfert, la membrane est placée sous les rayons UV à 254 nm afin que les liaisons deviennent covalentes.

➔Préhybridation et hybridation

- La préhybridation dure environ 2 h à 42°C et permet de saturer tous les sites potentiels de fixation de la membrane à l'aide d'ADN hétérologue. L'ADN transféré n'a saturé qu'une partie des sites. Si la sonde était apportée directement, elle se fixerait immédiatement sur ces sites plutôt que de s'hybrider avec les séquences complémentaires de l'ADN.
- L'hybridation est effectuée à 42°C pendant environ 15 heures à l'aide du tampon d'hybridation contenant la sonde Asp-p marquée à la digoxigénine à raison de 1 µl de sonde par ml de tampon.
- La préhybridation et l'hybridation sont réalisées dans le même tampon contenant :

Tampon SSC (sodium citrate 75 mM pH 7 / NaCl 750 mM)	5 x SSC
Blocking stock solution (Blocking stock reagent 10%)	10%
N lauroyl sarkosine	10%
SDS	10%

➔Lavage de la membrane

La membrane est lavée deux fois 5 mn dans 2 x SSC + SDS 0,1 % et deux fois 15 mn dans 0,1 x SSC + SDS 0,1%, puis 5 mn dans un mélange tampon acide malique (0,1 mol/l) / NaCl (0,15 mol/l) à pH 7,5 et enfin 30 mn avec la « Blocking stock solution » diluée au 1/10 dans le tampon acide malique.

➔Détection par chimiluminescence

La détection des fragments amplifiés se fait à l'aide d'un coffret de détection (Boerhinger Mannheim). La membrane est placée pendant 30 mn dans une solution d'antidigoxigénine diluée au 1/10000 où les anticorps antidigoxigénine vont se fixer sur la sonde marquée à la digoxigénine. Elle est lavée 4 fois 10 mn avec le tampon acide malique afin d'éliminer le conjugué puis 5 mn dans un tampon Tris-HCl 1M pH 9,5-NaCl 0,1 mol/l. Le substrat CCPD® dilué au 1/100 est déposé en surface et laissé pendant 5 mn à l'abri de la lumière. La membrane enveloppée de papier film, est placée à l'étuve pendant 10 mn à 37°C puis mise en cassette à température ambiante pendant 30 mn à 2 heures.

Les hybrides sont enfin repérés par autoradiographie (film Curix RP1-AGFA GEVAERT). La portion d'ADN s'hybridant avec la sonde est visualisée sous forme d'une ou plusieurs bandes.

4-3- Révélation par PCR-ELISA

La détection des produits amplifiés par PCR se fait à l'aide d'un coffret de détection PCR-ELISA Dig-detection (Boerhinger Mannheim). La sonde de capture marquée à la biotine (Asp-p) correspond à la même séquence d'oligonucléotides utilisée pour le Southern Blot. Elle va se lier à l'ADN amplifié contenant du dUTP marqué à la digoxigénine. L'ADN va alors se lier au fond du puits par l'intermédiaire de la biotine qui a une forte affinité pour la streptavidine (fixée au fond du puits). Les anticorps anti-digoxigénine liés à une peroxydase vont se fixer sur la digoxigénine ; l'enzyme va pouvoir transformer le substrat incolore en substrat coloré. La réaction colorimétrique est lue au spectrophotomètre à 405 nm (schéma n°5).

La réaction consiste à dénaturer 10 µl de produits d'amplification renfermant du dUTP marqué à la digoxigénine (PCR Dig-labelling Mix ^{plus}, Boerhinger Mannheim) par 40 µl de solution de dénaturation pendant 10 mn à température ambiante. Puis, 200 µl de solution d'hybridation contenant la sonde marquée à la biotine à 7,5 pmol/ml sont ajoutés. 200 µl de ce mélange sont déposés dans chaque cupule de la microplaque et incubés 1 h 30 à 37 °C sur un agitateur rotatif. Ensuite, les barrettes sont lavées 5 fois avec 300 µl de la solution de lavage.

Puis, 200 µl du conjugué anti-digoxigénine liés à une peroxydase sont ajoutés et incubés 30 mn à 37°C sur un agitateur rotatif. Après 5 lavages, 300 µl de substrat (solution ABTS®) sont ajoutés et placés 30 mn à 37°C sous agitation douce.

En parallèle, on déposera dans une cupule 200 µl d'ABTS® et dans une autre, un témoin positif contenant 10 µl de contrôle de produit PCR auquel on ajoutera une sonde de capture spécifique à 0.75 pmol/µl.

La lecture des barrettes se fait au lecteur de microplaques automatique à 405 nm. L'absorbance du substrat est soustraite à chaque valeur d'échantillon. On mesure un index : I= DO de l'échantillon / DO du témoin négatif. Le résultat est positif si l'index est supérieur à 3 et limite si l'index est compris entre 2 et 3.

RESULTATS

L'adaptation d'une technique de PCR nécessite la réévaluation et l'optimisation des conditions par rapport à ce qui est décrit dans la publication de Melchers *et al* (52). De plus, ces derniers n'utilisaient pas d'UNG, ce qui risque de modifier certains paramètres lors de l'adaptation de cette technique.

1- Mise au point des conditions d'amplification

Les résultats d'une amplification PCR dépendent du milieu réactionnel et de la concentration de chacun des composants. Une gamme de dilution d'ADN d'une souche de référence d'*A. fumigatus*, a permis de déterminer les conditions optimales de la PCR-*Aspergillus* adaptée de la technique de Melchers *et al* (52).

1-1-Les amorces

La PCR de Melchers *et al* (52) utilise des amorces correspondant à une séquence conservée au niveau de la région V7 (Asp 1) et V9 (Asp 2) du gène codant pour la sous unité 18S de l'ARNr. Elles ont été synthétisées par Eurogentec® d'après la séquence oligonucléotidique décrite (schéma n°1) :

Asp 1 est un oligonucléotide de 21 bases, de Tm = 68°C et de séquence :

5'-CGG-CCC-TTA-AAT-AGC-CCG-GTC-3'

Asp 2 est un oligonucléotide de 19 bases, de Tm = 66 °C et de séquence :

5'-ACC-CCC-CTG-AGC-CGA-TCC-G-3'

Ces amorces permettent d'amplifier un fragment d'ADN de 363 pb. Afin de déterminer leur concentration optimale, plusieurs concentrations ont été testées : 1,2 µm, 0,8 µM, 0,6 µM et 0,4 µM (figure n°3). La PCR-*Aspergillus* montre un résultat optimal pour une concentration de 0,8 µM.

1-2- L'UNG

La PCR étant une technique très sensible, un des principaux problèmes est le risque de contamination du milieu par l'ADN amplifié au cours des manipulations précédentes. Afin d'éviter ces contaminations, une enzyme : l'uracylglycosylase (AmpErase® UNG, Perkin Elmer) est ajoutée au milieu réactionnel. Le principe est simple : le dNTP est remplacé par le dUTP ; il en résulte un marquage très spécifique de la cible amplifiée par rapport à la cible non amplifiée. Une incubation de 10 mn à 45°C va permettre à l'enzyme de dégrader l'ADN provenant d'une amplification antérieure. L'enzyme est ensuite détruite par l'étape de dénaturation de l'ADN à 94°C (38). L'UNG a été utilisée à une concentration de 1U/100µl.

1-3- Les nucléotides

L'utilisation de l'UNG implique l'incorporation de dUTP dans le milieu. On utilise un mélange de nucléotides GeneAmp® (Perkin-Elmer) contenant du dATP, dUTP, dCTP, dGTP. Plusieurs concentrations ont été testées : 200µM, 160µM, 120µM, 100µM et 80µM (figure n°4). La concentration optimale est 200µM.

1-4- Le magnésium

Le magnésium est nécessaire à la fois pour stabiliser les nucléotides et pour la réaction. Les concentrations optimales sont en général comprises entre 0,5 et 2,5 mM. Cependant lors de l'utilisation de l'UNG, il est nécessaire d'augmenter les concentrations. Plusieurs concentrations ont été étudiées : 4mM, 3,5mM, 3mM, 2,5mM et 2mM (figure n°5). La concentration optimale est 3mM.

1-5- Le cycle thermique

1-5-1- Optimisation du nombre de cycles

Les trois étapes (dénaturation, hybridation, élongation) constituent un cycle au cours duquel la quantité d'ADN est doublée. Ils sont renouvelés entre 20 à 50 fois. Il est inutile de trop augmenter leur nombre car l'amplification cesse d'être exponentielle après 20 cycles et atteint rapidement un plateau.

Deux amplifications ont été comparées, l'une avec 35 cycles et l'autre avec 40 cycles, sur une gamme de dilution d'ADN de la souche ALP+ (figure n°6). L'amplification du fragment d'ADN est optimale avec 40 cycles ; les bandes obtenues sur le gel sont plus intenses.

1-5-2- Optimisation du temps de dénaturation et d'hybridation

Une durée d'hybridation trop longue favorise l'amplification de fragments non spécifiques. Deux durées d'hybridation ont été testés :

- un cycle dit « court »

30 s à 94°C (dénaturation)
30 s à 62°C (hybridation)
1 mn à 72°C (élongation)

- un cycle dit « long »

1 mn à 94°C
1 mn à 62°C
1 mn à 72°C

L'expérience montre une diminution des fragments non spécifiques lorsque le temps d'hybridation est de 30 secondes (figure n° 7).

1-5-3- Optimisation de la température d'hybridation

Quatre températures inférieures à la Tm de l'amorce possédant la plus faible Tm ont été testées (figure n° 8). La température optimale d'appariement des amorces est de 62°C.

1-6-La Taq Polymérase

La PCR utilise une DNA polymérase résistante aux températures élevées, la Taq polymérase (EurobioTaq®, Eurobio) extraite d'une bactérie vivant dans les sources chaudes (80-90°C) : *Thermus aquaticus*. La concentration d'enzyme est de 2,5 U pour 100 µl de mélange réactionnel.

2- Etude de sensibilité de la PCR-*Aspergillus*

2-1- Souche référencée d'*A. fumigatus*

L'étude de la sensibilité a été réalisée sur une gamme de dilution d'ADN d'une souche référencée d'*A.fumigatus* (figure n°9 et n°10). Les trois modes de révélation décrits précédemment ont été utilisés de manière à déterminer la limite de sensibilité :
- lors de la révélation sur **gel d'agarose**, on obtient une bande décelable pour une concentration de 7,5 pg. Fletcher *et al* (24) rapportent une limite de détection sur gel de 15 pg tandis que Melchers *et al* (52) annoncent un seuil de détection sur gel de 1 pg ;
- la révélation par Southern Blot permet d'abaisser ce seuil jusqu'à 1 pg. Fletcher *et al* (24) indiquent une limite de détection par **Southern Blot** de 1,5 pg tandis que Melchers *et al* (52) atteignent 100 fg ;
- la révélation par **la méthode ELISA** permet une détection positive jusqu'à 4,6 pg puis un résultat limite jusqu'à 2 pg. Fletcher *et al* (24) descendent par ELISA jusqu'à 1 pg. Cette équipe a réussi à montrer une proportionnalité entre les DO lue au lecteur de plaque et la concentration d'ADN fongique (dilution d'ADN en série) sur une échelle logarithmique entre 1 pg et 100 pg d'ADN ; ce qui permet de tracer une droite d'étalonnage. Les moyennes des DO de nos trois essais ont été reportées sur une échelle logarithmique mais elles ne nous ont pas permis de tracer une droite mais seulement de montrer une tendance (schéma n°6).

2-2- Souches isolées de prélèvements de patients

Afin d'étudier la sensibilité de la technique sur des souches non référencées, la PCR-*Aspergillus* a été réalisée sur de l'ADN de souches isolées de prélèvements de malades atteints d'AI possible ou probable. Cinq souches de malades ont été testées sur six concentrations d'ADN différentes (10 ng à 0.066 ng). La révélation sur gel montre que l'ADN des souches isolées de malades a bien été amplifié ; on obtient une bande de 363 pb pour toutes les concentrations d'ADN testées (figure n°11).

3- Etude de la spécificité de la PCR-*Aspergillus*

3-1- Souches référencées d'autres espèces d'*Aspergillus*

Nous avons voulu vérifier que les amorces choisies permettaient l'amplification des principales espèces du genre *Aspergillus*. La PCR a été réalisée sur l'ADN de souches référencées d'autres espèces d'*Aspergillus : A. nidulans*, *A.terreus*, *A. flavus* et *A. niger*, sur cinq concentrations différentes. La révélation sur gel montre que le bande de 363 pb est présente pour toutes les espèces étudiées (figure n°12).

3-2-Souches d'autres champignons filamenteux

Melchers et al ont observé des réactions croisées avec *Paecilomyces variotii*, *Penicillium marneffei*. Nous avons voulu vérifier l'amplification de l'ADN de ces souches. La PCR a été réalisée sur l'ADN d'une souche de *Penicillium* sp et *Paecilomyces variotii*. Afin d'étudier la spécificité de la méthode, la PCR a été testée sur l'ADN d'un autre champignon filamenteux : *Fusarium* spp. Ces trois champignons ont été étudiés sur sept concentrations différentes (figure n°13).

- La révélation sur gel montre que l'ADN du *Fusarium* spp n'a pas été amplifié ce qui vérifie l'absence de réactions croisées avec ce champignon. Cependant, des bandes de tailles incorrectes peuvent être observées sur le gel d'agarose.
- L'amplification n'a pas eu lieu avec *Penicillium* sp, mais il ne s'agit pas du *Penicillium marneffei*.
- L'ADN du *Paecilomyces variotii* a bien été amplifié ; on obtient une bande de 363 pb.

La PCR ne suffit pas à distinguer *Aspergillus* spp de *Paecilomyces variotii*. Il serait nécessaire de réaliser un Southern Blot afin de voir si l'hybridation par la sonde Asp-p a lieu sur le fragment amplifié de *Paecilomyces*. Selon Melchers *et al* (52), l'analyse par Southern Blot ne permet pas de distinguer l'*Aspergillus spp* du *Paecilomyces ;* il faut utiliser la RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) avec comme enzyme de restriction : l'endonucléase StyI.

4-Etude de la reproductibilité

Les études de reproductibilité ont été réalisées sur l'ADN de la souche de référence d'*A.fumigatus*. Le fragment spécifique de 363 pb est retrouvé sur gel d'agarose jusqu'à des concentrations de 7,5 pg d'ADN. Cependant, malgré des conditions expérimentales identiques, des fragments de tailles différentes au fragment attendu, peuvent être amplifiés pour des concentrations d'ADN élevées (jusqu'à 66 pg environ) (figure n°9). Avec la révélation par le Southern Blot, certains de ces fragments peuvent être hybridés avec la sonde spécifique (figure n°10).

DISCUSSION

Malgré le développement de nouvelles méthodes de diagnostic telles que le scanner et la détection de l'antigène aspergillaire par ELISA, le diagnostic de certitude de l'AI reste difficile. Aussi, cette infection fongique dont le diagnostic et le traitement précoces conditionnent en partie le pronostic, semble constituer une bonne application diagnostique de la PCR. En effet, cette technique de biologie moléculaire a déjà trouvé sa place dans le diagnostic d'autres maladies comme la toxoplasmose en Parasitologie.

1-Les difficultés de la PCR-*Aspergillus*

Les premières publications datent de 1993 ; date à laquelle Spreadbury *et al* ont mis au point une PCR permettant la détection de l'ADN d'*A.fumigatus* (63). Par la suite plusieurs techniques ont été décrites suivant deux démarches. La première consiste à utiliser des amorces spécifiques d'*Aspergillus* spp ou d'*A.fumigatus,* la spécificité étant confirmée par hybridation (9, 10, 52, 55, 67, 73, 76) ; la seconde consiste à détecter l'ADN fongique par des amorces « tous champignons » permettant d'amplifier l'ADN de nombreux champignons pathogènes ; puis une hybridation par sondes spécifiques permet l'identification de genre (*Candida* sp, *Aspergillus* sp...) et d'espèces (22, 51). Cependant, à l'heure actuelle, il n'existe toujours pas de consensus en ce qui concerne le choix des amorces.

La mise au point de la PCR-*Aspergillus* se heurte à de nombreux problèmes.

1) *A.fumigatus* est un **organisme eucaryote haploïde** possédant 8 chromosomes et dont le génome de 3.10^7 pb est encore mal connu (66). La séquence d'ADN codant pour l'ARNr (« ribosomal RNA gene complex ») comprend des régions fréquemment amplifiées. Or, cet ADNr correspond à la répétition d'environ 100 copies d'une séquence répétée en tandem (tête à queue) où sont présentes des régions hautement conservées parmi les organismes eucaryotes et spécialement parmi les membres du royaume fongique (4). Il s'ensuit le problème d'amplification de fragments conduisant à des bandes de tailles incorrectes ; ce qui rend l'interprétation des résultats difficile.

2) De plus, *A.fumigatus* est un **contaminant** largement répandu dans l'environnement ; les spores aéroportées de ce micromycète peuvent théoriquement contaminer le milieu réactionnel. Mais cette théorie est controversée par Spreadbury *et al* (63) qui ont réalisé des PCR sur des suspensions de spores. Cette équipe a montré que les produits amplifiés étaient détectables dans les échantillons contenant 10^5 à 10^6 conidies (63). Or, il est improbable que de telles quantités de spores soientt présentes accidentellement dans le milieu. Cependant, l'utilisation de la PCR pour le diagnostic biologique de l'AI impose un résultat sûr, aussi cette possibilité de contamination ne doit pas être exclue.

Lors de l'utilisation de la PCR pour le diagnostic biologique, la principale et la plus efficace des mesures à prendre pour lutter contre les contaminations par des spores aéroportées, consiste à réaliser les mélanges dans une pièce différente de celle où sera extrait l'ADN. D'autre part, une contamination par des produits PCR d'une précédente amplification peut être à l'origine de faux positifs ; mais l'utilisation d'UNG permet d'éviter les contaminations par des produits d'une amplification précédente (9).

Pour éviter les contaminations, il conviendra donc de réaliser les trois étapes de la PCR (extraction de l'ADN, réalisation du mélange réactionnel et révélation) dans trois pièces séparées. L'atmosphère de ces pièces devra être contrôlée. La pièce d'extraction doit être en dépression pour que les spores ne puissent pas sortir et contaminer l'environnement et la pièce de réalisation du « mix » doit être en surpression pour que rien ne pénètre.

Le personnel doit porter des blouses réservées à la fabrication des mélanges réactionnels, des gants stériles et un masque afin d'éviter toute contamination lors de la réalisation du mélange réactionnel. Bien que le risque de contamination par de l'ADN non amplifié soit faible (63), quelques précautions particulières peuvent être prises à titre préventif :

- réalisation du mélange réactionnel sous hotte ;
- utilisation de cônes de prélèvement munis de filtre protecteur ;
- irradiation des amorces, de l'eau, du $MgCl_2$, du tampon, des dNTP (sauf les dNTP marqués à la digoxigénine) avec des rayons UV ;
- aliquoter tous les composants et les réactifs en petits volumes dès leur réception.

3) L'évaluation clinique de la PCR-*Aspergillus* est difficile. En effet, la nature du prélèvement biologique le mieux adapté, n'est pas encore définie. A partir des prélèvements fibroscopiques, il existe de nombreux faux positifs, probablement dus à la présence dans le tractus respiratoire de spores aspergillaires. La PCR réalisée sur sérum ou sur sang total semble plus intéressante. Cependant, personne ne sait où se trouve le champignon dans le sang ni comment il est véhiculé (spores, mycélium, ADN libre). En effet, les hémocultures sont, dans l'immense majorité des cas, négatives ; alors que les PCR réalisées sur sang total, sérum et culot de leucocytes sont positives (8, 13, 22).

Tous ces problèmes et ces paramètres mal maîtrisés rendent l'adaptation et la mise au point de la PCR-*Aspergillus* difficile. Ainsi, après bientôt 7 ans de recherche aucune PCR pour la détection de l'ADN d'*Aspergillus* spp n'est encore réalisée en routine au diagnostic biologique de l'AI.

2- La technique

Après analyse critique de la littérature, nous avons choisi d'adapter au sein du laboratoire de Parasitologie-Mycologie du CHU de Grenoble, la technique décrite par Melchers *et al* (52). Cette technique de PCR permet d'amplifier une séquence commune aux principales espèces pathogènes d'*Aspergillus*.

Le choix de cette technique correspond à un compromis entre les deux types d'approches décrits dans la littérature. En mycologie, l'éventail des champignons pathogènes est très large, aussi il semblerait utile d'avoir une méthode de diagnostic commune à la majorité des champignons pathogènes afin de faire un criblage des échantillons biologiques. Mais l'utilisation des amorces «tous champignons» se heurte à d'importants problèmes de contamination et de résultats faussement positifs (48). Cependant, pour le diagnostic de l'AI, il est nécessaire de pouvoir amplifier et révéler le matériel génétique de plusieurs espèces du genre *Aspergillus*, l'infection n'étant pas toujours due à *A.fumigatus* (52). La PCR-*Aspergillus* décrite par Melchers *et al* (52) ne permet pas d'amplifier l'ADN de tous les champignons pathogènes mais seulement l'ADN des principales espèces du genre *Aspergillus* ; ce qui constitue un bon compromis entre ces techniques.

La mise au point et l'optimisation de la PCR-*Aspergillus* a été faite sur une souche référencée d'*A.fumigatus* (CBS 144-89). L'étude de la sensibilité de la méthode nous a permis d'obtenir des résultats comparables à ceux rapportés par Fletcher *et al* (24). La sensibilité de la PCR pour la détection de l'ADN d'*Aspergillus* est élevée puisque l'on détecte jusqu'à 7,5 pg par électrophorèse sur gel d'agarose et jusqu'à 1 pg par Southern Blot. Le seuil de détection de la méthode ELISA est proche de celui du Southern Blot (jusqu'à 2 pg) et la technique est plus rapide (3h contre 2 à 3 jours). Melchers *et al* atteignent une limite de sensibilité supérieure à la notre, soit 1 pg sur gel d'agarose et 100 fg lors de l'analyse par Southern Blot mais cette équipe utilise la Hot-Start PCR (52).

La révélation sur gel d'agarose permet une visualisation rapide du fragment d'ADN amplifié mais manque de sensibilité. De plus, plusieurs bandes non spécifiques de tailles incorrectes apparaissent sur le gel lors de certaines amplifications pour des concentrations d'ADN élevées (jusqu'à 66 pg environ). Plusieurs de ces bandes sont hybridées lors du Southern Blot. Fletcher *et al* ont observé 2 bandes sur le gel d'agarose et sur le Southern Blot. Ils pensent qu'il s'agit vraisemblablement d'un polymorphisme : il y a plusieurs copies de la séquence cible répétées dans l'ADN (24).

Il serait intéressant de réévaluer l'intérêt de la Hot-Start PCR décrite par Melchers *et al* (52) puis abandonnée par Fletcher *et al* (24). Cette technique présente, entre autre, deux avantages :

- la 1ère étape de dénaturation peut être longue et à température élevée, ce qui permet une dénaturation plus efficace sans altération de la polymérase (38) ;
- l'hybridation des amorces et l'initiation de l'élongation s'effectuent à la température la plus élevée possible, ce qui permet d'augmenter la spécificité et de diminuer les amorçages non spécifiques (38).

La Taq polymérase est déposée sur la couche supérieure du mélange réactionnel au-dessus de l'huile de vaseline. La différence de densité et la faible viscosité de l'huile de vaseline à 94°C (température de dénaturation de l'ADN) permettent la traversée très rapide de l'enzyme au travers de la couche d'huile isolante (38).

La Hot-Start-Taq®DNA polymérase, forme modifiée de la Qiagen®Taq DNA polymerase est commercialisée (Qiagen®, Courtaboeuf, France). Cette enzyme présente l'intérêt de ne pas avoir d'activité polymérase à température ambiante, elle est activée par une incubation de 15 mn à 95 °C. Cela prévient l'amplification des appariements non spécifiques des amorces et des dimères d'amorces formés à basse température.

Cependant, malgré la Hot-Start PCR, Verweij *et al* (74) ont montré que dans certains cas, des produits d'amplification non spécifiques sont visibles sur le gel d'agarose mais ils ne donnent pas lieu à une hybridation avec la sonde spécifique d'*Aspergillus* lors de l'analyse par Southern Blot.

L'étude de spécificité, sur gel d'agarose, nous a permis de vérifier que :

- les amorces choisies permettent l'amplification d'ADN des principales espèces du genre *Aspergillus* comme l'ont décrit Melchers *et al* (52) ;
- il existe des réactions croisées entre l'ADN du genre *Aspergillus* et l'ADN de *Paecilomyces variotii*, comme l'ont montré Melchers *et al* (52). En effet, ils ont décrit des homologies de séquence au niveau de la région conservée de la sous unité 18S de l'ARNr entre *Aspergillus* spp, *Penicillium marneffei*, *Penicillium chrysogenum* et *Paecilomyces variotii* (52). Nous avons voulu vérifier l'amplification de l'ADN de ces souches. La PCR a été réalisée sur l'ADN d'une souche de *Penicillium* sp et *Paecilomyces variotii*. Afin d'étudier la spécificité de la méthode, la PCR a été testée sur l'ADN d'un autre champignon filamenteux : *Fusarium* spp.

L'amplification n'a pas eu lieu avec *Penicillium* sp, mais il ne s'agit pas d'un *Penicillium marneffei*. L'ADN du *Paecilomyces variotii* a bien été amplifié ; on obtient une bande de 363 pb. La PCR ne suffit pas à distinguer *Aspergillus* spp de *Paecilomyces variotii*. L'équipe de Melchers *et al* a montré que l'analyse par Southern Blot permettait de distinguer le genre *Aspergillus* du *Penicillium marneffei*. *Paecilomyces variotii* est différencié par l'action d'une endonucléase *StyI* qui coupe le fragment amplifié du genre *Aspergillus* en deux fragments au niveau du site de restriction de l'enzyme (52).

La révélation sur gel montre que l'ADN du *Fusarium* spp n'a pas été amplifié ce qui vérifie l'absence de réactions croisées avec ce champignon. Cependant, des bandes de tailles incorrectes peuvent être observées sur le gel d'agarose.

L'aspergillose invasive se développant chez des patients immunodéprimés, d'autres infections sous-jacentes peuvent être présentes. Or, le diagnostic de l'AI doit être spécifique du genre *Aspergillus*. Afin de vérifier l'absence d'hybridation croisée avec d'autres micro-organismes eucaryotes et procaryotes, il sera nécessaire d'étendre les essais vers d'autres champignons non filamenteux comme *Candida albicans*, vers des protozoaires comme *Toxoplasma gondii* puis vers des bactéries type *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Streptococcus pneumoniae* et les Mycobactéries (52).

L'analyse par Southern Blot est une méthode sensible et sert de référence pour vérifier la spécificité de la PCR. Cependant elle est longue, coûteuse en réactifs et en main d'œuvre, et surtout non automatisable. Aujourd'hui, une nouvelle méthode de détection des produits amplifiés, la PCR-ELISA paraît prometteuse. Fletcher *et al* (24) décrivent une sensibilité et une spécificité proche de celles obtenues avec le Southern Blot et sa réalisation plus simple permet un résultat rapide (2 à 3 heures). On peut, dès aujourd'hui, dire que la présence sur le marché d'un kit de détection des produits amplifiés (Boerhinger Mannheim) est indispensable à l'adaptation en routine de la PCR au laboratoire.

Il sera pour cela indispensable d'harmoniser le calcul de la limite de détection et de la zone grise. Selon la notice du coffret, on mesure un index : I= DO de l'échantillon / DO du témoin négatif. Le résultat est positif si l'index est supérieur à 3 et limite si l'index est compris entre 2 et 3. Fletcher *et al* (24) définissent la zone grise comme la zone située entre la valeur moyenne des DO des témoins négatifs plus deux dérivations standards et cette même moyenne plus trois dérivations standards. Jones *et al* (35) considèrent la zone grise entre la moyenne des DO des échantillons négatifs plus deux dérivations standards et cette même moyenne plus quatre dérivations standards.

Comme le décrivent Löeffler *et al* (49), la PCR-ELISA pourrait être une méthode de détection semi-quantitative qui permettrait d'apprécier la charge fongique. Pour cela, il serait nécessaire d'établir une courbe de correspondance entre la densité optique et une dilution de spores dans du sang de patients sains.

Fletcher *et al* (24) ont réussi à montrer une proportionnalité entre les DO lue au lecteur de plaque et la concentration d'ADN fongique (dilution d'ADN en série) sur une échelle logarithmique entre 1 pg et 100 pg d'ADN, ce qui permet de tracer une droite d'étalonnage. Les moyennes des DO de nos trois essais ont été reportées sur une échelle logarithmique. Elles ne nous ont pas permis de tracer une droite mais seulement de montrer une tendance (schéma n°6).

Les PCR ont été réalisées sans témoin interne. Ce témoin interne permet de vérifier que tous les éléments du mélange réactionnel sont présents pour permettre une bonne amplification de l'ADN introduit dans le milieu. Cela évite les résultats faussement négatifs du fait d'un mauvais mélange réactionnel. Bretagne *et al* (9) ont développé la PCR-compétitive qui utilise un contrôle interne. Les amorces (les mêmes que celles qui amplifient le gène d'*Aspergillus*) permettent d'amplifier le témoin interne. On considère alors une PCR négative seulement si le gène d'*Aspergillus* n'est pas amplifié et si le témoin interne est amplifié (9).

3- Les perspectives

Une étude clinique permettra d'évaluer l'intérêt de la PCR-*Aspergillus* dans le diagnostic biologique de l'AI et sa place par rapport à l'ensemble de la stratégie de diagnostic habituellement utilisée (scanner thoracique, examen mycologique, antigénémie aspergillaire).

Différents types de prélèvements ont été étudiés. La PCR sur sérum semble plus prometteuse en terme de sensibilité, de spécificité et de faisabilité que les autres techniques décrites (8, 13).

Dans un premier temps, il sera nécessaire d'adapter la PCR-*Aspergillus* sur sérum de patient sain dans lequel auront été ajoutées des spores d'*A.fumigatus*. Le protocole d'extraction de l'ADN fongique du sérum est décrit dans la littérature (5, 22, 76). Des suspensions de spores, à des concentrations décroissantes, permettront d'étalonner la technique d'extraction. Il sera également utile d'évaluer l'intérêt des coffrets d'extraction d'ADN commercialisés (13, 50).

L'étude clinique qui permettra d'évaluer l'intérêt de la PCR dans le diagnostic biologique de l'AI a plusieurs objectifs :

1) Evaluation de la sensibilité de la technique pour le diagnostic biologique de l'AI et de son intérêt dans le suivi thérapeutique.

Tous les patients présentant une AI définie selon les critères diagnostiques récemment retenus par l'EORTC (annexe n°1a, 1b) ou une suspicion d'AI seront inclus dans l'étude clinique. De plus, la surveillance hebdomadaire de ces patients permettrait une évaluation de l'intérêt de la PCR dans le suivi thérapeutique des patients.

2) Evaluation de précocité de la PCR-*Aspergillus* par rapport à l'ensemble de la stratégie de diagnostic habituellement utilisée (scanner thoracique, examen mycologique de prélèvements fibroscopiques, antigénémie aspergillaire et sérologie) grâce au suivi par PCR des patients neutropéniques susceptibles de développer une AI.

3) Confirmation de la spécificité de la PCR-*Aspergillus* par inclusion de patients neutropéniques qui ne présenteront pas au cours de ce suivi d'AI et des volontaires sains. Les patients neutropéniques suivis présenteront vraisemblablement d'autres infections bactériennes, virales ou fongiques au cours de l'étude, ce qui permettra également d'évaluer la spécificité de cette technique au cours d'autres infections.

Le développement de la PCR-*Aspergillus* permettrait d'améliorer le diagnostic de cette infection qui grève lourdement le pronostic des patients. La PCR sur sérum semble prometteuse en association avec d'autres techniques dont la détection d'antigènes aspergillaires.

CONCLUSION

THESE SOUTENUE PAR : Dominique BEAUDET

TITRE : MISE AU POINT DE LA PCR-*ASPERGILLUS* EN VUE DU DIAGNOSTIC BIOLOGIQUE DE L'ASPERGILLOSE INVASIVE.

CONCLUSION

Aspergillus fumigatus est un champignon filamenteux ubiquitaire dans l'environnement, capable de provoquer chez les patients immunodéprimés (neutropénie, corticothérapie au long cours à forte dose, greffés d'organe) une infection gravissime : l'aspergillose invasive (AI) majoritairement pulmonaire (70 à 80% des cas). Cette infection nosocomiale peut atteindre 5 à 25% des patients traités pour une hémopathie maligne. L'AI est fréquemment mortelle (létalité > 80%). Le pronostic dépend de deux types de facteurs : la restauration des défenses immunitaires et la prescription d'une thérapeutique antifongique précoce et à forte dose. Le médecin doit pouvoir s'appuyer sur un diagnostic à la fois rapide et formel. Or, le diagnostic de certitude est rarement porté car il nécessite des examens invasifs (biopsies) souvent contre-indiqués chez ces patients. En pratique, l'AI est considérée comme probable ou possible d'après un ensemble d'arguments cliniques, radiologiques et biologiques.

La stratégie diagnostique actuelle pourrait bénéficier de l'apport des techniques de biologie moléculaire telles que la «Polymerase Chain Reaction ». En effet, la PCR a déjà trouvé sa place dans le diagnostic d'autres maladies infectieuses, dues à des organismes eucaryotes comme la toxoplasmose. Des études récentes ont montré que la PCR pourrait améliorer le diagnostic de l'AI. En matière de PCR-*Aspergillus*, il n'existe pas encore de consensus ni sur la nature du prélèvement biologique ni sur le choix de la séquence à amplifier. Après analyse critique de la littérature, nous avons choisi d'adapter une technique de PCR décrite par Melchers *et al* (*J. Clin. Microbiol.* 1994), pour la détection de l'ADN des principales espèces du genre *Aspergillus*.

Les amorces choisies correspondent à une région conservée de la sous-unité 18S de l'ARNr. Les conditions d'amplification ont été optimisées sur une souche référencée d'*A.fumigatus* (CBS 144-89). La sensibilité élevée de la méthode permet de détecter 7,5 pg d'ADN sur le gel d'agarose et 1 pg lors de l'analyse par Southern Blot.

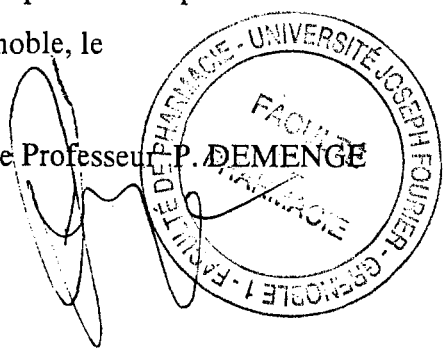
L'utilisation d'une méthode de détection PCR-ELISA commercialisée (Boerhinger Mannheim) permet une détection à la fois sensible et rapide des produits amplifiés, nécessaire à l'adaptation en routine au laboratoire. L'ADN de souches isolées de prélèvements de patients atteints d'AI a été amplifié, mettant en évidence le fragment spécifique de 363 paires de bases. Les PCR réalisées sur l'ADN de souches référencées d'autres espèces d'*Aspergillus (A.terreus, A.nidulans, A.flavus, A. niger*) et sur des souches d'autres champignons filamenteux (*Penicillium* sp, *Paecilomyces variotii, Fusarium* sp) ont confirmé la spécificité décrite. L'étude de spécificité sera étendue à d'autres microorganismes rencontrés en pathologie humaine pouvant être présents dans les prélèvements (levures, bactéries).

Afin d'évaluer la place de la PCR dans la stratégie diagnostique de l'AI, une étude clinique réalisée sur des échantillons biologiques de patients atteints d'une aspergillose invasive prouvée ou probable, sera nécessaire. La PCR-*Aspergillus* effectuée sur le sérum semble intéressante, particulièrement en association avec d'autres techniques, dont la détection d'antigène aspergillaire (galactomannane).

La détection par PCR de l'ADN d'*Aspergillus* sp dans les prélèvements biologiques, notamment le sérum, pourrait constituer un apport significatif dans la stratégie diagnostique de l'AI, pour répondre à la demande de plus en plus pressante des cliniciens.

Vu et permis d'imprimer

Grenoble, le



M. le Professeur P. DEMENGE

Mme. le Professeur R.GRILLOT

le 24.11.99

DOYEN DE L'UFR DE PHARMACIE

PRESIDENT DE THESE

ANNEXES

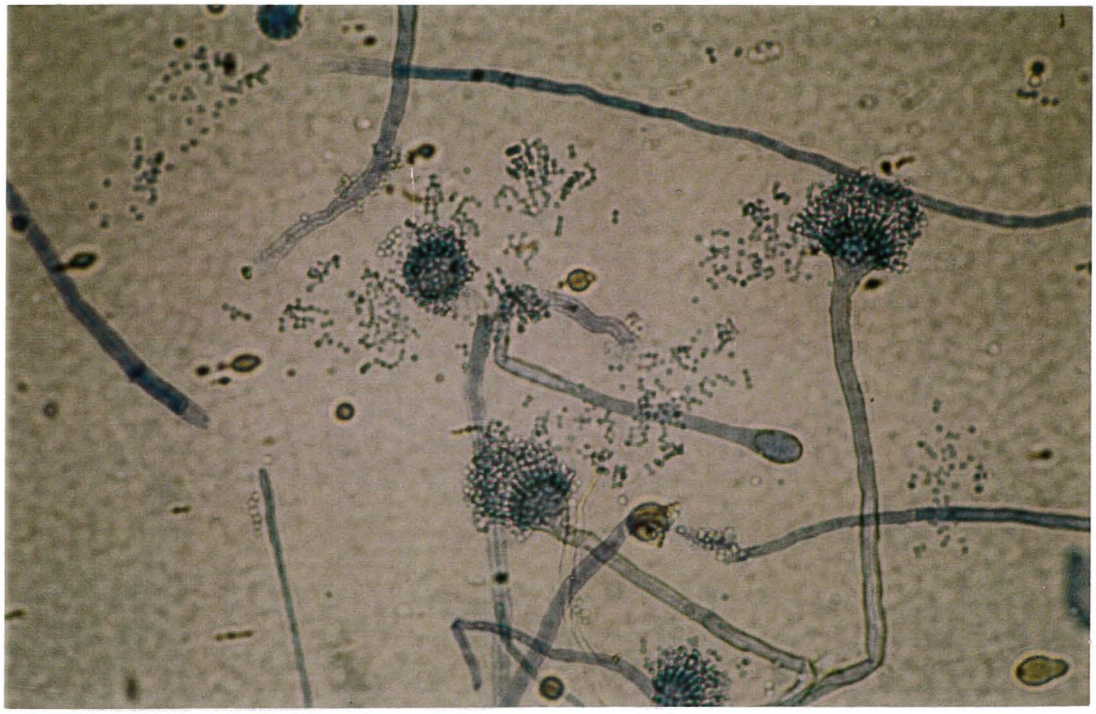


Figure n°1- « Têtes aspergillaires » d'*A.fumigatus* :
aspect microscopique en culture (G x 300)
(Laboratoire Parasitologie-Mycologie, CHU Grenoble)

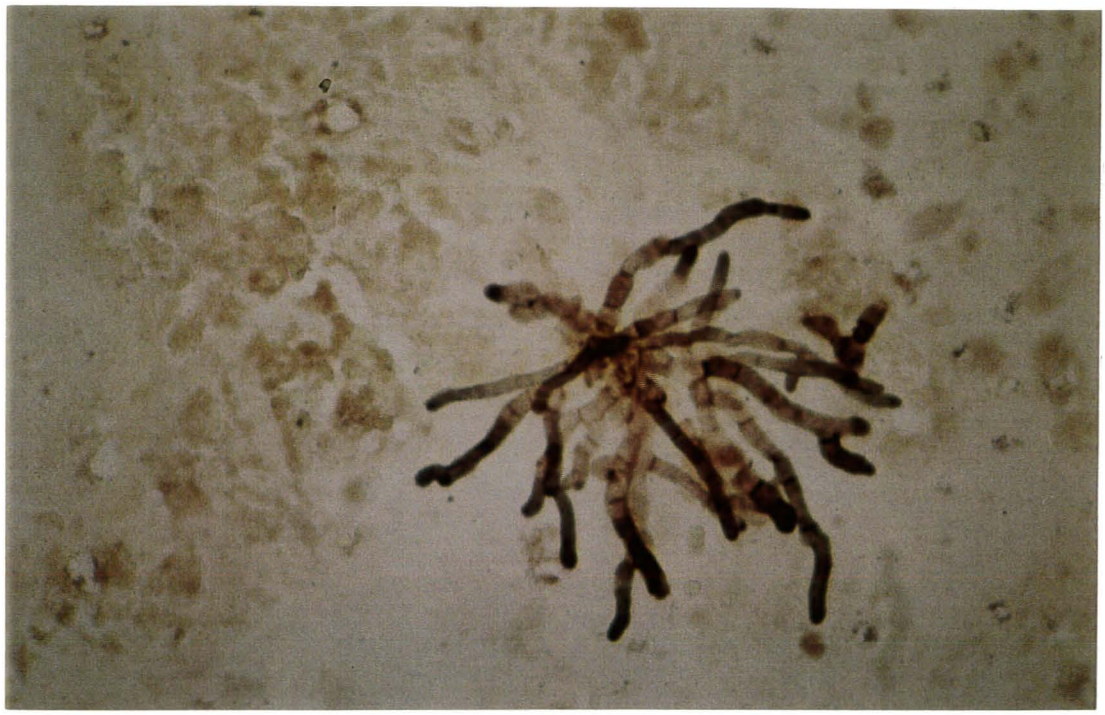


Figure n°2- Lavage broncho-alvéolaire : filaments mycéliens
(G x 480 : coloration de Musto)
(Laboratoire Parasitologie-Mycologie, CHU Grenoble)

Aspergillose invasive prouvée

Examen histologique ou cytologique montrant des filaments mycéliens à partir d'une ponction à l'aiguille ou biopsie avec des dommages tissulaires **OU** Culture positive obtenue par une technique stérile d'un site normalement stérile et présence de signes d'infections avec signes cliniques et radiologiques au niveau de ce site.

Aspergillose invasive probable

Un critère lié à l'hôte **ET** Un critère microbiologique **ET** Un critère clinique majeur ou 2 critères mineurs

Aspergillose invasive possible

Un critère lié à l'hôte **ET** Un critère microbiologique **OU** Un critère clinique majeur ou 2 critères mineurs

Annexe n°1a : Critères diagnostiques de l'AI retenus par l'EORTC (European Organization for Research and Treatment of Cancer) (56)

Facteurs liés à l'hôte :

- Neutropénie : < 500/mm^3
- Fièvre persistante (>96h) et résistante à une antibiothérapie IV à large spectre
- Température >38°c ou < à 36°C et un des critères suivants :
    - neutropénie de plus de 10 jours dans les 60 jours précédents
    - utilisation récente d' immunosuppresseurs (dans les 30 jours précédents)
    - antécédents d'AI
- Utilisation prolongée de corticoides (>3 semaines)

Critères microbiologiques

- Culture positive d'un crachat, d'un LBA à *Aspergillus fumigatus*
- Culture positive ou examen direct microscopique positif d'un prélèvement de sinus à *Aspergillus fumigatus*
- Cytologie/examen direct positif d'un crachat, d'un LBA
- Détection d'antigène aspergillaire positif dans le LBA, le LCR ou le sang
- signes de GVHD

Critères cliniques

Majeurs	Mineurs
Infections pulmonaires	
Sur le scanner, présence du signe du halo, d'un croissant gazeux ou d'une cavité autour d'un infiltrat nodulaire	1. Présence d'une toux, d'une douleur thoracique, d'hémoptysie, d'une dyspnée 2. Signes physiques de condensation pulmonaire 3. Infiltrats pulmonaires non spécifiques
Infection sinusienne	
Présence de signes radiologiques d'infection sinusienne invasive (avec atteinte osseuse)	1. Symptômes au niveau des voies aériennes supérieures 2. Ulcération nasale, epistaxis 3. Oedème périorbitaire 4. Douleur en regard du sinus maxillaire Lésion nécrotique ou perforation du palais

Annexe n°1b : Critères diagnostiques de l'AI retenus par l'EORTC (European Organization for Research and Treatment of Cancer) (56)

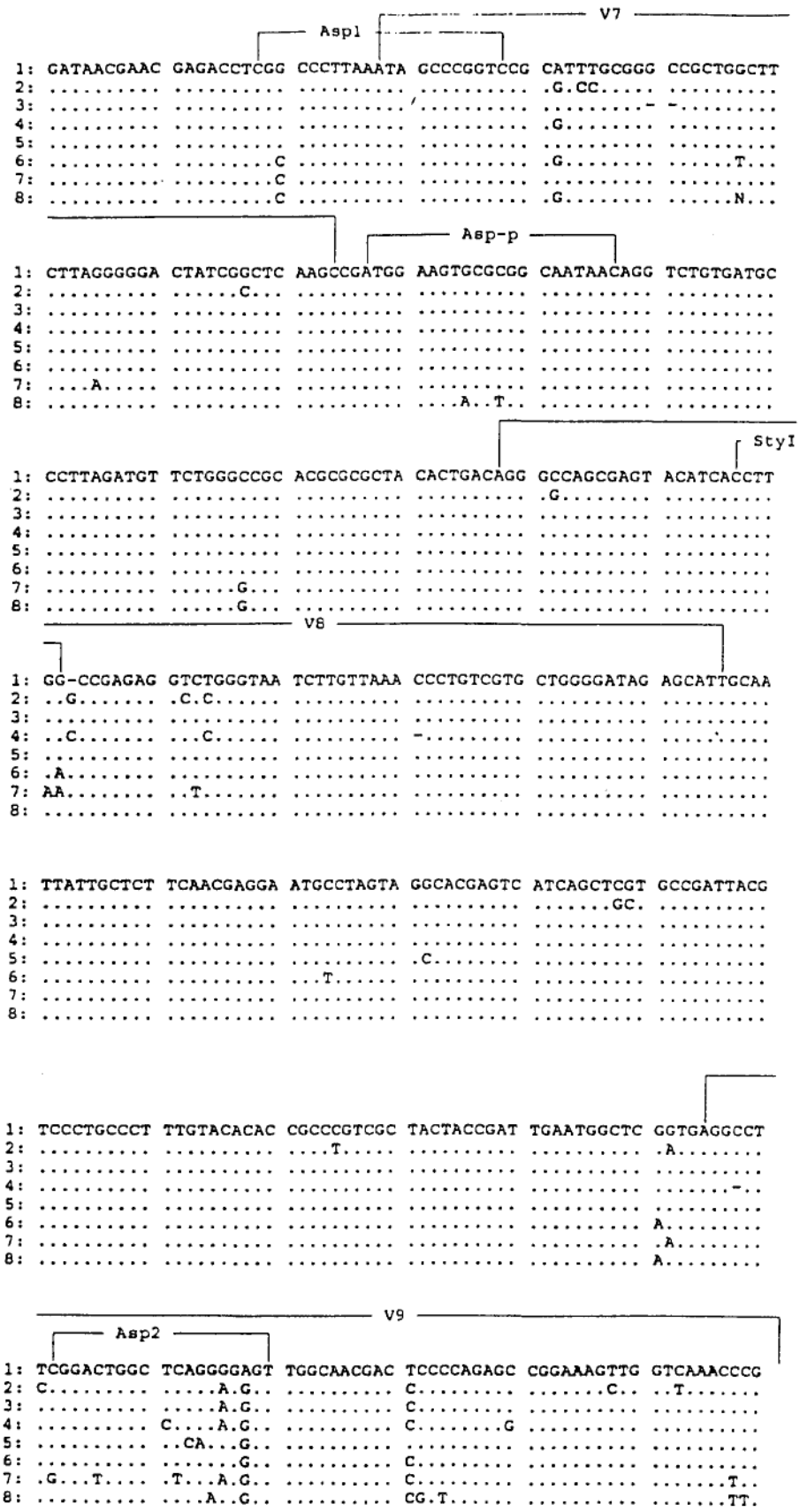


Schéma n°1- Séquence correspondant à la région V7 à V9 du gène codant pour la sous unité 18S de l'ARNr. Asp 1, Asp 2 correspondent aux amorces choisies pour la PCR-*Aspergillus*. Asp-p correspond à la sonde d'hybridation pour le Southern Blot et la PCR-ELISA. *StyI* correspond au site de restriction de l'endonucléase 1 : *A. fumigatus*, 2 : *A. niger*, 4 : *A. flavus*, 5 : *A. terreus*, 6 : *Paecilomyces variotii*, 7 : *Penicillium chrysogenum*, 8 : *Penicillium marneffei*, d'après Melchers *et al* (52).

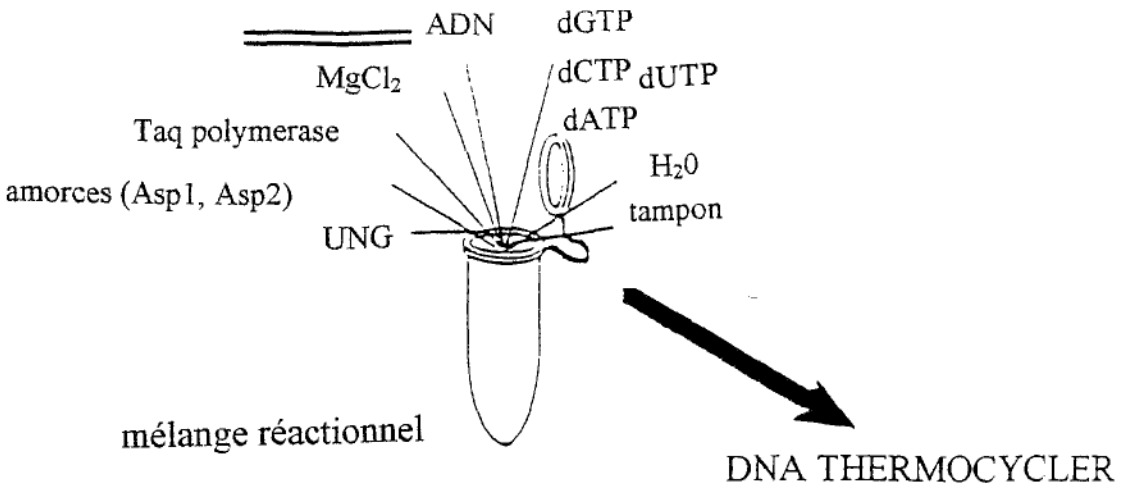
- culture en milieu liquide pendant 3 jours à 42°C
- centrifuger 5 min à 12000 trs/min
- éliminer le milieu
- laver avec 400 µl de TE
- centrifuger 5 min à 12000 trs/min
- éliminer le TE
- ajouter 300 µl de tampon d'extraction
- congélation à -20°c

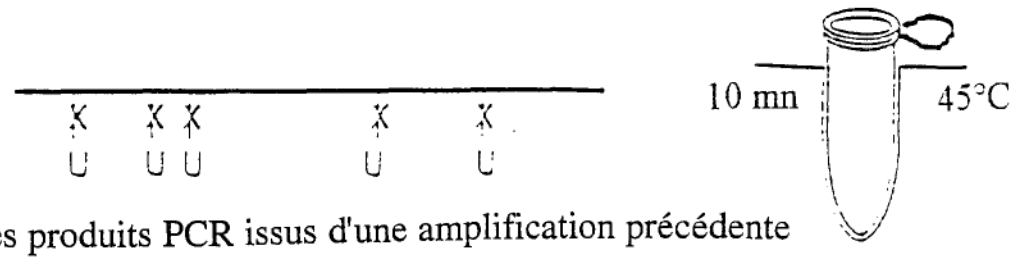
- broyage avec le piston, dans la glace
- ajouter 3 µl de protéinase K à 10 $\mu g.\mu l^{-1}$
- incuber 1h à 55°C (sous agitation 7)
- centrifuger quelques secondes
- ajouter 300 µl de phénol (phase jaune inférieure)
- centrifuger 5 min à 12000 trs/min à 4°C
- récuperer le surnageant (blanc dessus)
- ajouter 300 µl de phénol-chloroforme(phase jaune inférieure)
- centrifuger 5 mn à 12000 trs /mn
- récuperer le surnageant
- ajouter 300 µl de chloroforme - alcool isoamylique
- centrifuger 5 min à 12000 trs/min à 4°C
- récuperer le surnageant
- ajouter 300 µl d'isopropanol froid(-20°C)
- mettre à -20°C une nuit ou 1/2 h à -80°C

- centrifuger 20 min à 12000trs/min à 4°C
- éliminer le surnageant
- ajouter 500 µl d'éthanol à 70 % (+4°C)
- centrifuger 5 min à 12000 trs/min à 4°C
- éliminer l'ethanol
- passer les tubes au speed vac 5 min
- reprendre le culot par 300 µl de TE
- congeler à -20°C ou 1 nuit à +4°

- ajouter 15 µl de RNAse à 10 $\mu g.\mu l^{-1}$
- incuber 1 H30 à 37°C
- rajouter 15 µl de RNAse à 10 $\mu g.\mu l^{-1}$
- remettre à incuber 1 H30 à 37°C (soit 3 H à 37°C au total)
- ajouter 300 µl de phénol-chloroforme
- centrifuger 5 min à 12000 trs/min + 4°C
- récuperer le surnageant (blanc dessus)
- ajouter 0,1V d'acétate de Na 3M pH 5,2 (+4°C) et 2,5 V d'éthanol absolu (-20°C)
- mettre à -20°C une nuit ou 1/2 h à -80°C
- centrifuger 20 min à 12000trs/min à 4°C
- éliminer le surnageant
- ajouter 500 µl d'éthanol à 70 % (+4°C)
- centrifuger 5 min à 12000 trs/min à 4°C
- éliminer l'éthanol
- passer les tubes au speed vac 5 min
- reprendre le culot par 50 µl de TE
- congeler à -20°C

Schéma n°2- Protocole d'extraction de l'ADN fongique





dégradation des produits PCR issus d'une amplification précédente

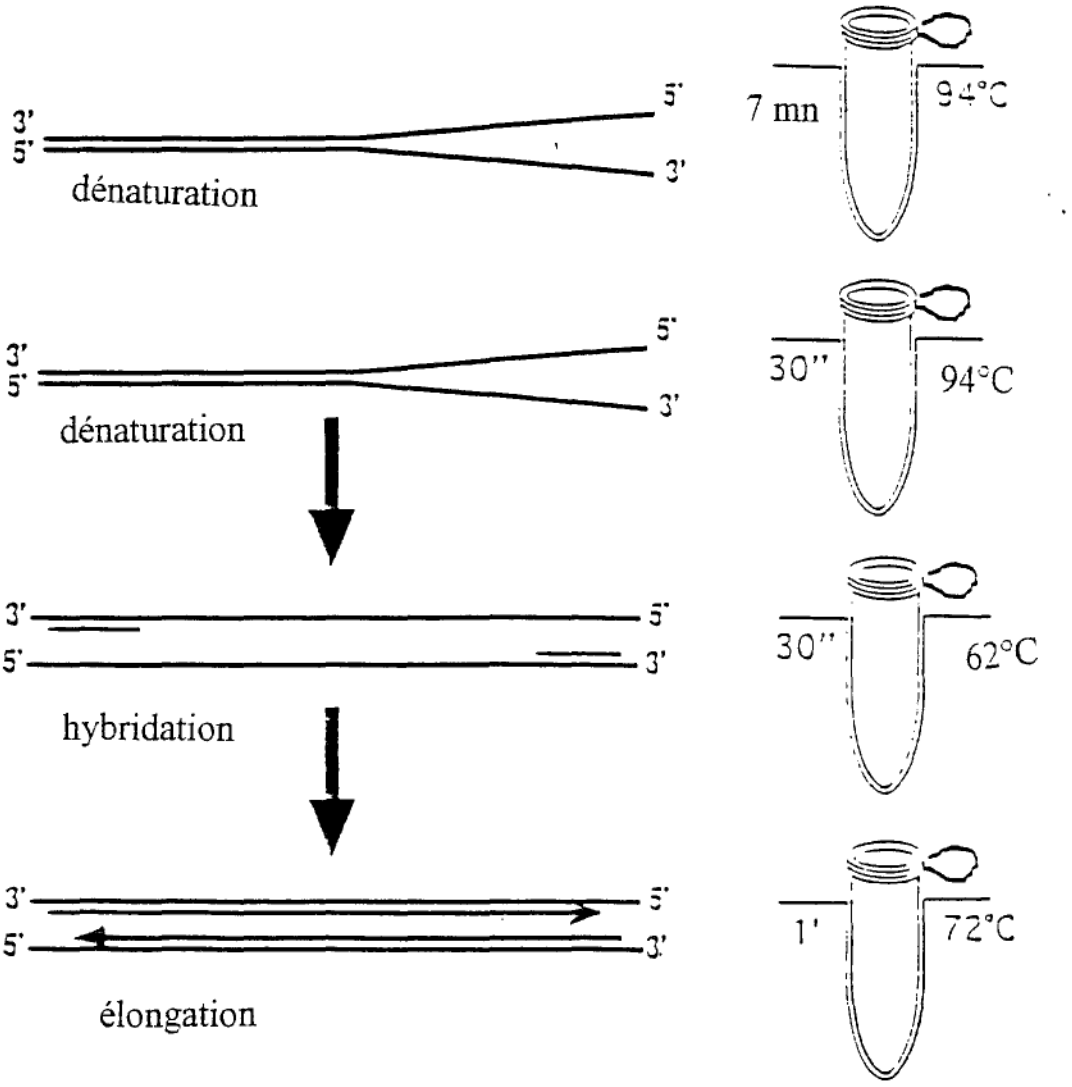


Schéma n°3- PCR-*Aspergillus* : principe et conditions d'amplification

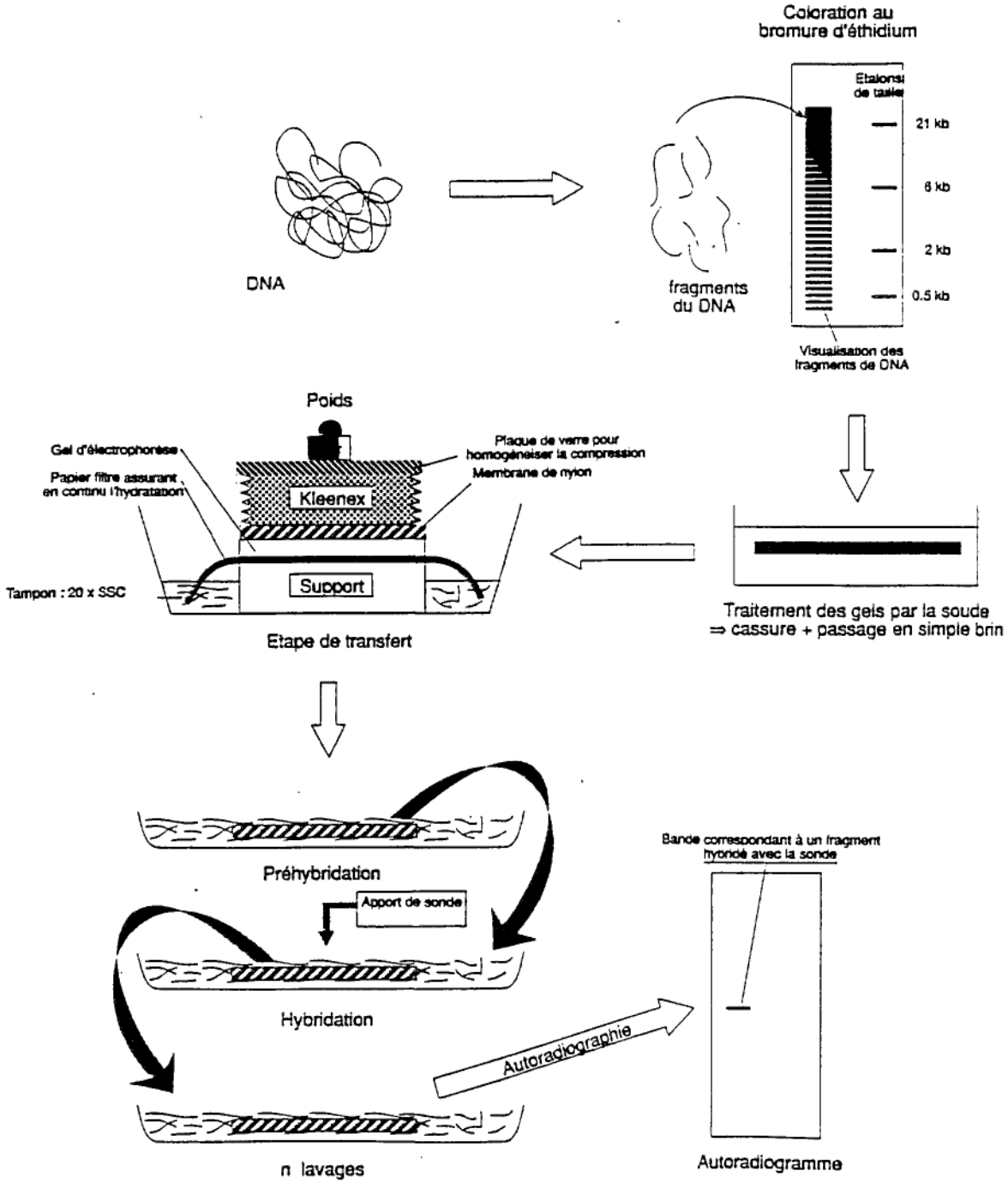


Schéma n°4- Principe de la technique de Southern Blot (38)

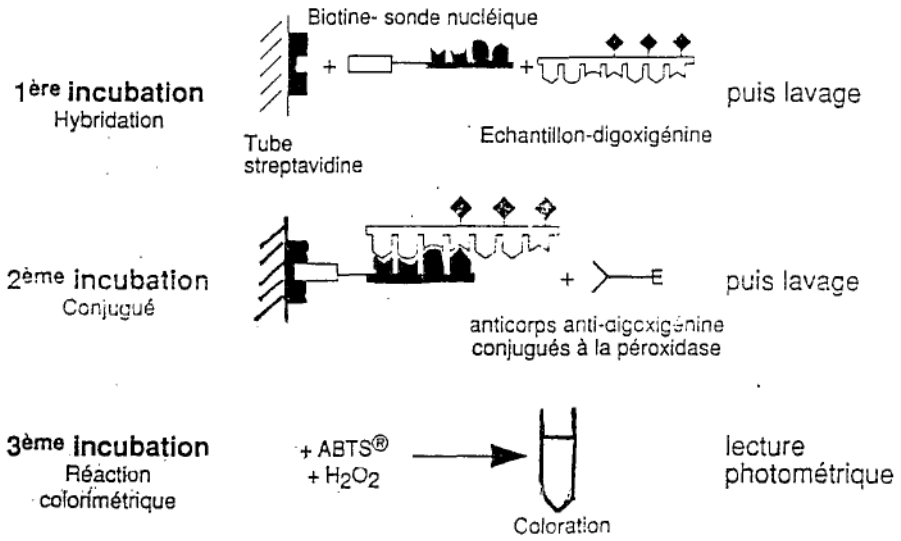


Schéma n°5- Principe de la PCR-ELISA (Coffret de détection PCR-ELISA dig-detection, Boerhinger Mannheim)

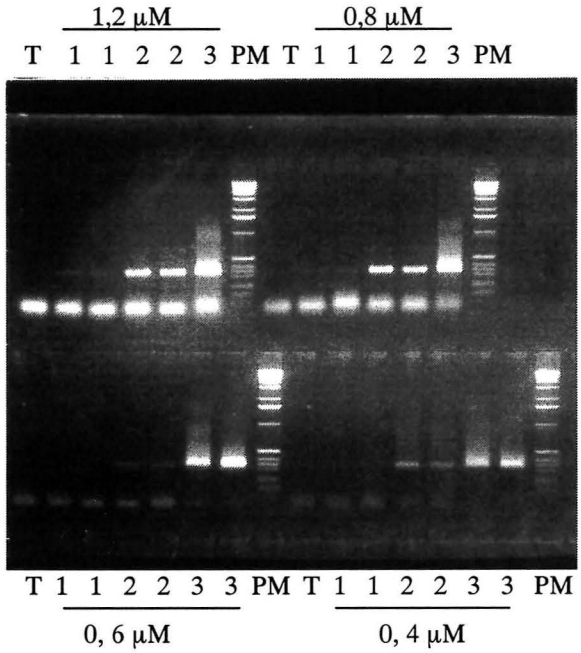


Figure n°3 : Electrophorèse sur gel d'agarose (1.5%) : optimisation de la concentration en amorces sur une gamme de dilution d 'ADN d'*A.fumigatus* (1: 0.05 ng, 2: 5 ng, 3: 500 ng) ; T : témoin, PM : poids moléculaire.

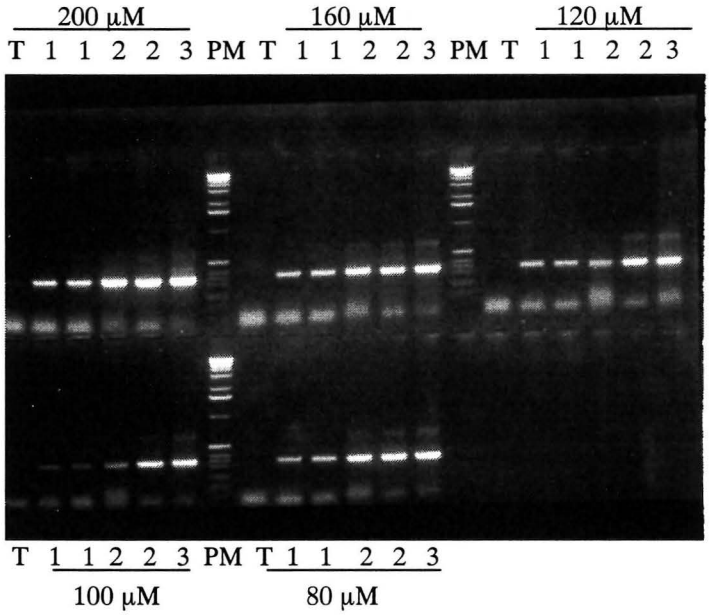
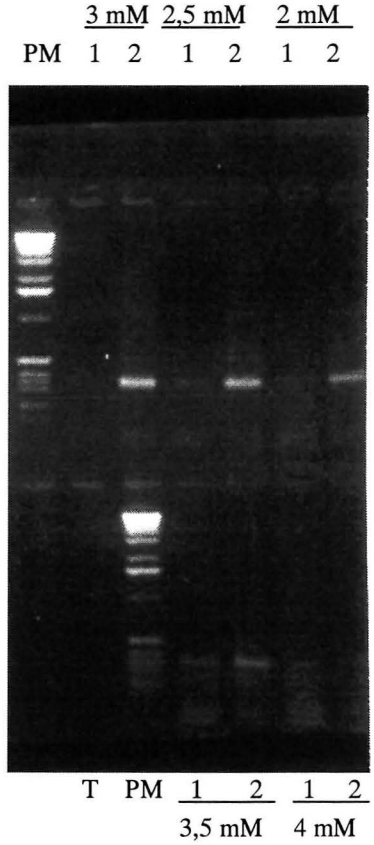


Figure n°4: optimisation de la concentration en nucléotides sur une gamme de dilution d 'ADN d'*A.fumigatus* (1: 0.005 ng, 2: 5 ng, 3: 500 ng).

Figure n°5 : optimisation de la concentration de $MgCl_2$ (1: 1 ng, 2: 300 ng).



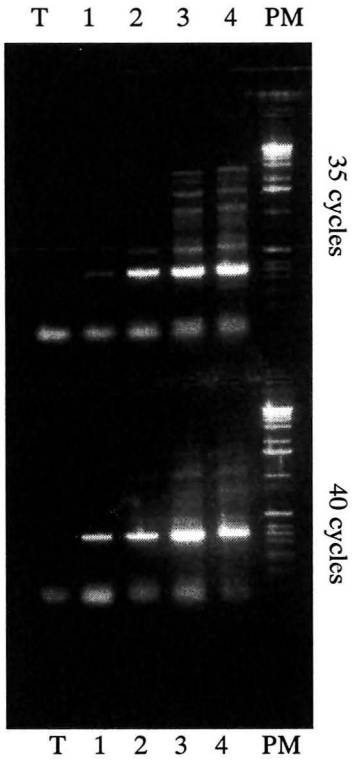


Figure n° 6 : optimisation du nombre de cycles thermiques (1: 0.5 ng, 2: 50 ng, 3: 500 ng, 4: 1000 ng).

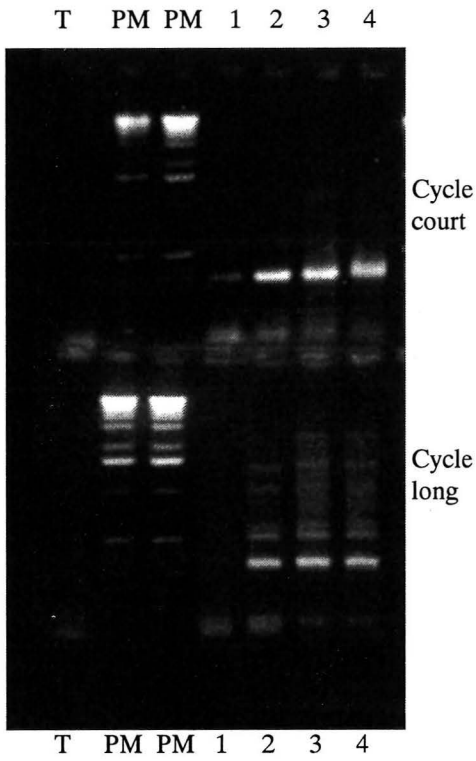


Figure n° 7: optimisation de la durée de dénaturation et d 'hybridation (1: 0.5 ng, 2: 50 ng, 3: 500 ng, 4: 1000 ng).

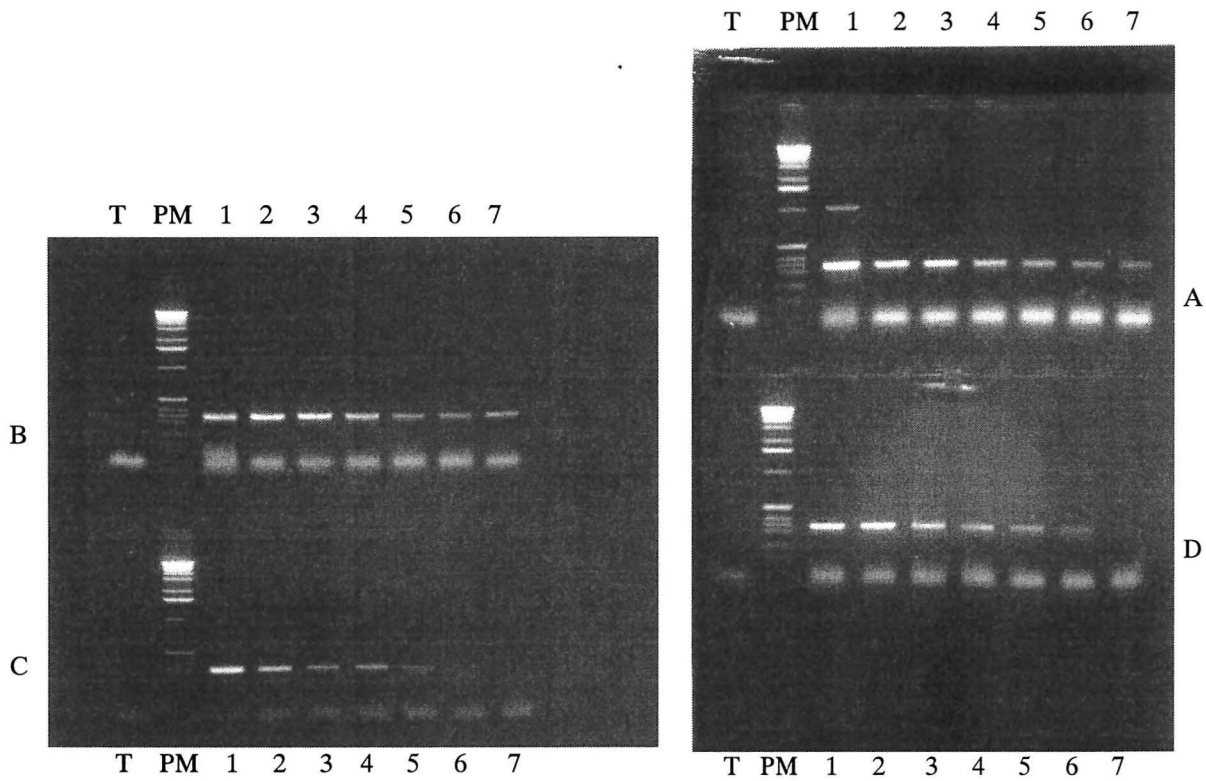


Figure n° 8: optimisation de la température d 'hybridation ; A : 61°C, B : 62°C, C : 63°C, D : 64°C (1: 10 ng, 2: 1 ng, 3: 500 pg, 4: 250 pg, 5: 125 pg, 6: 66 pg, 7: 32 pg).

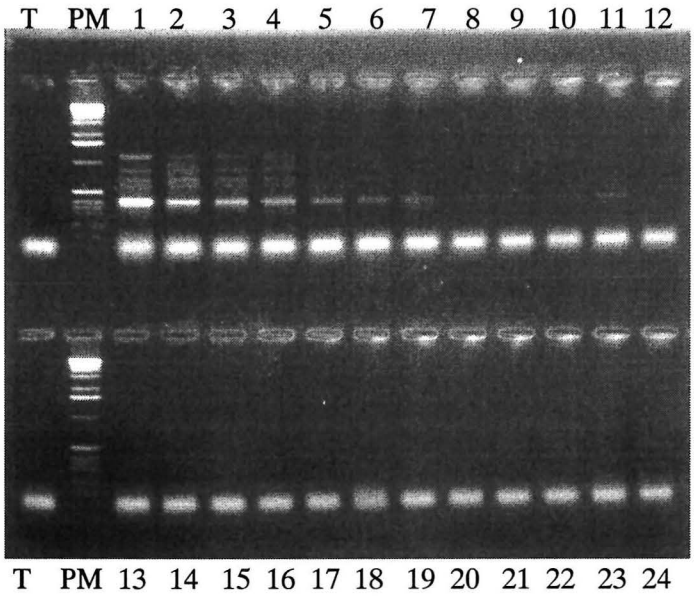


Figure n°9: Etude de la sensibilité de la PCR-*Aspergillus* sur une souche référencée d'*A.fumigatus,* révélation sur gel d'agarose (1: 10 ng, 2: 1 ng, 3: 500 pg, 4: 250 pg, 5: 125 pg, 6: 66 pg, 7: 32 pg, 8: 15 pg, 9: 11 pg, 10 : 9 pg, 11: 7.5 pg, 12: 5.6 pg, 13: 4.6 pg, 14: 3.5 pg, 15: 2.8 pg, 16: 2 pg, 17: 1 pg, 18: 500 fg, 19: 400 fg, 20: 300 fg, 21: 200 fg, 22: 100 fg, 23: 75 fg, 24: 50 fg, T : témoin, PM : poids moléculaire).

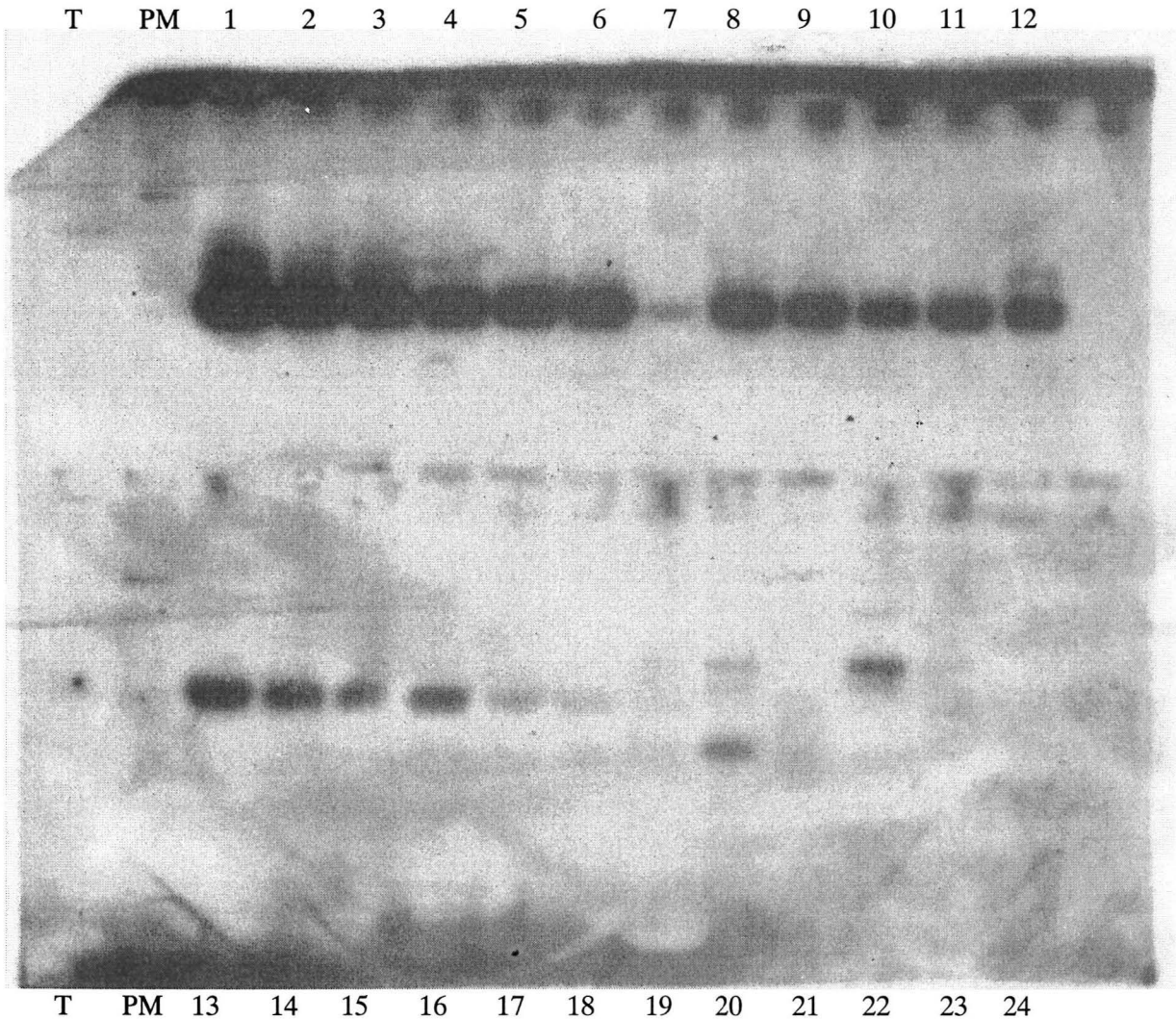
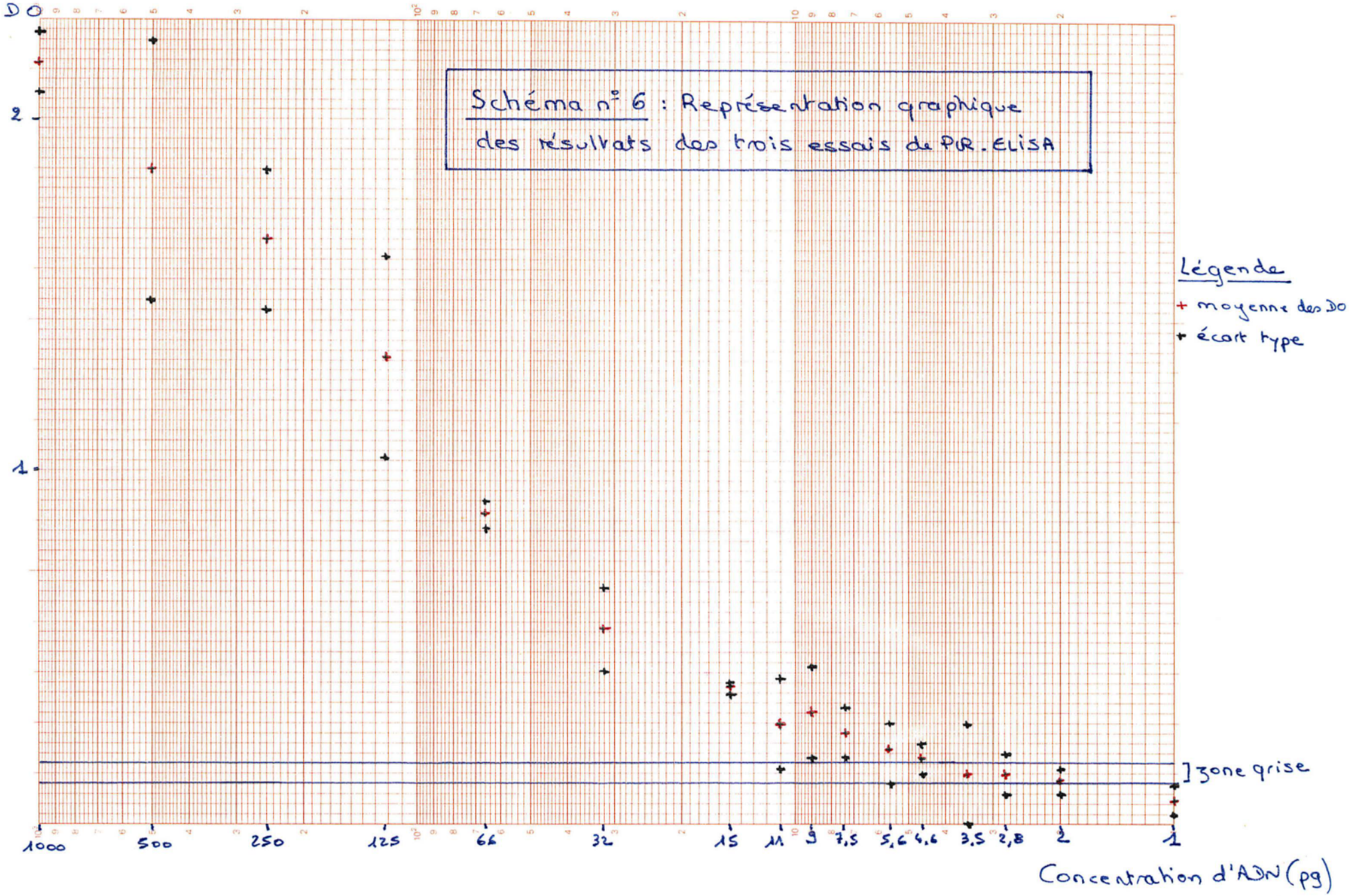


Figure n°10 : Etude de la sensibilité de la PCR-*Aspergillus* ; révélation par Southern Blot.


DO
2
1
Schéma n° 6 : Représentation graphique
des résultats des trois essais de PCR. ELISA
Légende
+ moyenne des DO
+ écart type
] Zone grise
1000
500
250
125
66
32
15
11
9
7,5
5,6
4,6
3,5
2,8
2
1
Concentration d'ADN (pg)

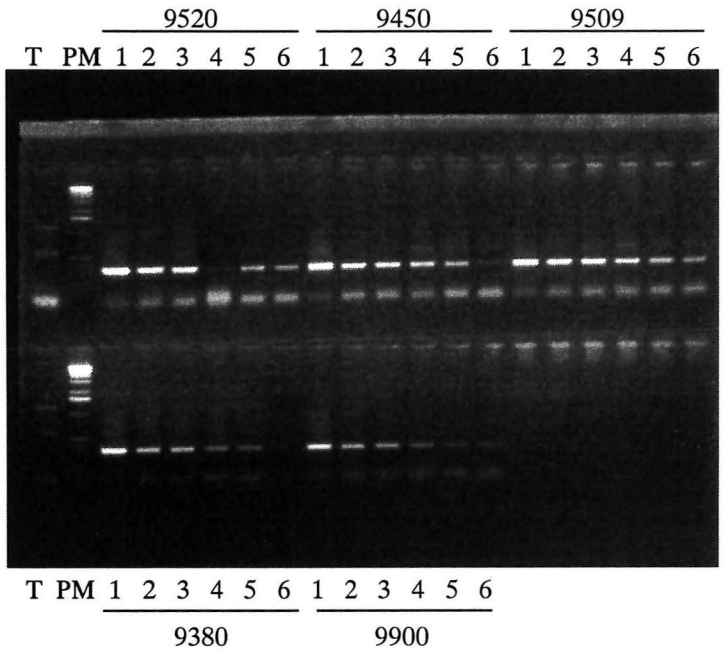


Figure n° 11 : Etude de la sensibilité de la PCR-*Aspergillus* sur 5 souches isolées de prélèvements de patients atteints d'AI possible ou probable (1 : 10 ng, 2 : 1 ng, 3: 500 pg, 4 : 250 pg, 5 : 125 pg, 6 : 66 pg).

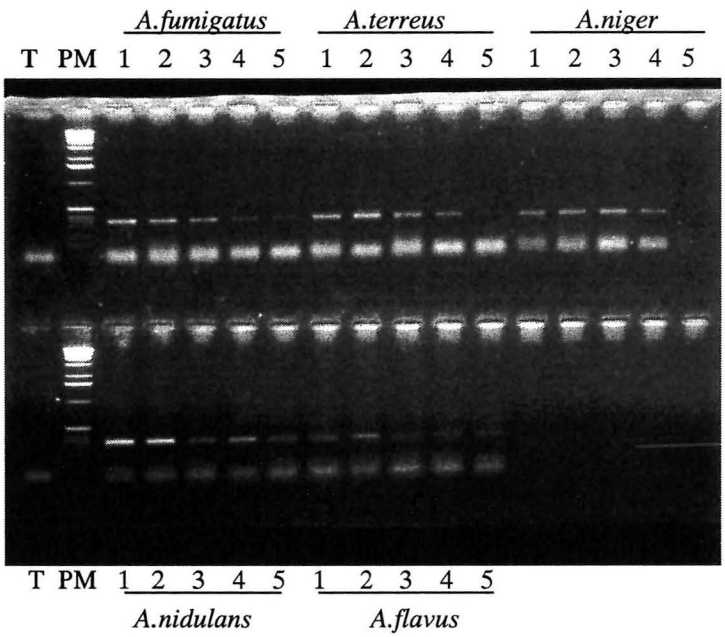


Figure n°12 : Etude de la spécificité de la PCR sur 5 souches référencées d'espèces du genre *Aspergillus* (1 : 10 ng, 2 : 1 ng, 3 : 500 pg, 4 : 250 pg, 5 : 125 pg).

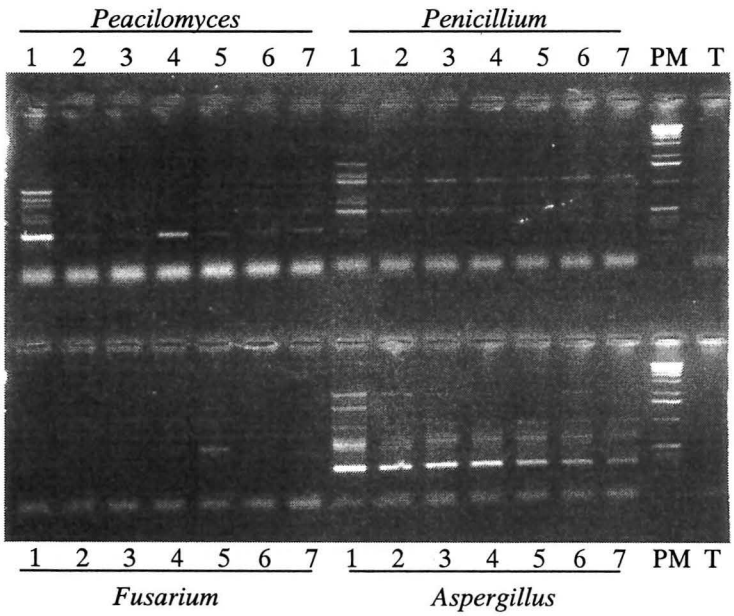


Figure n°13 : Etude de la spécificité de la PCR sur *A.fumigatus* et d'autres champignons filamenteux (1 : 10 ng, 2 : 1 ng, 3 : 500 pg, 4: 250 pg, 5: 125 pg, 6: 66 pg, 7: 32 pg).

BIBLIOGRAPHIE

1) Agut H, Huraux JM. La place de l'amplification génique (PCR) en microbiologie. *Bull. Soc. Fr. Microbiol.*1990 ; *5* : 7-9.

2) Anofel Parasitologie-Mycologie. Association française des enseignants de Parasitologie. 6ème édition. Eds format utile ; 1998, p357-66.

3) Ansorg R, Van den Boom R, Rath PM. Detection of *Aspergillus* galactomannan antigen in foods and antibiotics. *Mycoses*. 1997 ; *40* : 353-7.

4) Bainbridge BW. Modern approaches to the taxonomy of *Aspergillus*. In : The genus *Aspergillus*. Eds Keith A & Powell KA *et al.* Plenum Press, New York. 1994 ; 291-301.

5) Bougnoux ME, Dupont C, Mateo J, Saulnier P, Faivre V, Payen D *et al.* Serum is more suitable than whole blood for diagnosis of systemic candidiasis by nested PCR. *J. Clin. Microbiol.* 1999 ; *37* : 925-30.

6) Brandt ME, Padhye AA, Mayer LW, Holloway BP. Utility of random amplified polymorphic DNA PCR and Taqman automated detection in molecular identification of *Aspergillus fumigatus. J. Clin. Microbiol.* 1998 ; *36* : 2057-62.

7) Brenier-Pinchart MP, Pelloux H, Lebeau B, Pinel C, Ambroise-Thomas P, Grillot R. Towards a molecular diagnosis of invasive aspergillosis ? *J. Mycol. Med.* 1999 ; *9* : 16-23.

8) Bretagne S, Costa JM, Bart-Delabesse E, Dhédin N, Rieux C, Cordonnier C. Comparaison of serum galactomannan antigen detection and competitive polymerase chain reaction for diagnosing invasive aspergillosis. *Clin. Inf. Dis.* 1998 ; *26* : 1407-12.

9) Bretagne S, Costa JM, Marmorat-Khuong A, Poron F, Cordonnier C, Vidaud M *et al.* Detection of *Aspergillus* species DNA in bronchoalveolar lavage by competitive PCR. *J. Clin. Microbiol.* 1995 ; *33* : 1164-8.

10) Buchheidt D, Skladny H, Baust C, Hehlmann R. Early detection of *Aspergillus* species by PCR in blood and bronchoalveolar lavage samples of immunocompromised patients. *Trends in invasive fungal infections* 4, 5-8, 1997. Abstract p. 65, Barcelona, Spain.

11) Caillot D, Casasnovas O, Bernard A, Covaillier JF, Durand C, Cuisinier B *et al.* Improved management of invasive pulmonary aspergillosis in neutropenic patients using early thoracic computed tomographic scan and surgery. *J. Clin. Oncol.* 1997 ; *15* : 139-47.

12) Chavanet P. Amphotéricine B déoxycholate (Fungizone®) : vieux médicament, nouvelles versions. *Rev. Med. Interne.* 1997 ; *18* :153-65.

13) Costa JM, Vidaud D, Bart-Delabesse E, Vidaud M, Bretagne S. Real time PCR (Taqman) for the diagnostic of invasive aspergillosis. *Trends in invasive fungal infections 5*, p 3.04, 14-16 octobre 1999, Malte.

14) Cuena-Estrella M, Rodriguez-Tudela JL, Mellado E, Martinez-Suarez JV, Monzon A. Comparaison 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* : 531-3.

15) Delorme J, Robert A. Monographie des *Aspergillus*. In : Mycologie médicale. Décarie éditeur. 1997 ; 145-8.

16) Denning DW. Invasive aspergillosis. *Clin. Inf. Dis.* 1997 ; *26* : 781-805.

17) De Pauw BE. Prospects of voriconazole in the treatment of life-thretening *Aspergillus* infections. Presented at 4th Congress of the European Confederation of Medical Mycology. 11-13 May 1998 ; Glasgow, UK.

18) Derouin F. Apport des méthodes de biologie moléculaire au laboratoire de parasitologie- mycologie en 1997. *La lettre de l'infectiologue* 1998 ; *2* : 66-71.

19) Derouin F. Diagnostic, traitement et prévention de l'aspergillose invasive. *Path. Biol.* 1994 ; *42* : 629-31.

20) Dupont B. Traitement curatif de l'aspergillose invasive. *Path. Biol.* 1994 ; *42* : 688-93.

21) Dupont B, Improvisi L, Provosy F, Meulemans L, Stynen D. Détection de galactomannane dans les aspergilloses invasives humaines et animales avec un test au latex. *Bull. Soc. Fr. Mycol. Med.* 1990 ; *19* : 35-41.

22) Einsele H, Hebart H, Roller G, Loffler J, Rothenhofer I, Muller CA *et al.* Detection and identification of fungal pathogens in blood by using molecular probes. *J. Clin. Microbiol.* 1997 ; *35* : 1353-60.

23) Feger C, Kerviller E, Zagdanski AM, Attal P, Cyna-Gorse F, Frija J *et al.* Aspects radiologiques des aspergilloses invasives. *Path. Biol.* 1994 ; *42* : 670-4.

24) Fletcher HA, Barton RC, Verweij PE, Evans EGV. Detection of *Aspergillus fumigatus* PCR products by a microtitre plate based DNA hybridation. *J. Clin. Pathol.* 1998 ; *51* : 617-20.

25) Grillot R. Les mycoses humaines : démarche diagnostique. Collection Option Bio. Eds Elsevier, Paris 1996.

26) Grillot R, Lebeau B, Ambroise-Thomas P. L'aspergillose invasive : conduite du diagnostic mycologique. *Path. Biol.* 1995 ; *42* : 675-82.

27) Grillot R, Mondon P, Brenier MP, Ambroise-Thomas P. *Aspergillus fumigatus* : du saprophytisme à la virulence. Biodiversité phénotypique et génotypique. *Ann. Pharm. Fr.* 1996 ; 54 : 68-72.

28) Grillot R, Noel T. Antifongiques et antifongigramme. *Option Bio.* 1999 ; *224* : 1-16.

29) Guillemain R, Lavarde V, Chevalier P, Guinvarch A, Glotz D. Aspergillose et transplantation rénale, cardiaque et pulmonaire. *Path. Biol.* 1994 ; *42* : 661-9.

30) Hashimoto A, Yamakami Y, Kamberi P, Yamagata E, Karashima R, Nagaoka H *et al.* Comparaison of PCR, (1→3)β-D-glucan and galactomannan assays in sera of rats with experimental invasive aspergillosis. *J. Clin. Lab. Anal.* 1998 ; *12* : 257-62.

31) Henke N, Löffler J, Hebart H, Einsele H. Rapid quantification of *Aspergillus* DNA using the Light cycler™ system. *Trends in invasive fungal infections 5*, p 3.08, 14-16 octobre 1999, Malte.

32) Hiemenz JW, Walsh TJ. Lipid formulations of amphotericine B : recent progress and futures directions. *Clin. Infect. Dis.* 1996 ; *22* : 133-44.

33) Hopfer RL, Walden P, Setterquist S, Highsmith WE. Detection and differentiation of fungi in clinical specimens using polymerase chain reaction amplification and restriction enzyme analysis. *J. Med. Vet. Mycol.* 1994 ; *32* : 3351-66.

34) Innis MA, Gelfand DH. Optimization of PCRs. In : PCR protocols. A guide to methods and applications. Eds Innis *et al.* Academic press, Inc 1992 ; 3-12.

35) Jones ME, Fox AJ, Barnes AJ, Oppenheim BA, Balagopal P, Morgenstern GR *et al.* PCR ELISA for the early diagnostic of invasive pulmonary *Aspergillus* infection in neutropenic patients. *J. Clin. Microbiol.* 1998 ; *51* : 652-6.

36) Kami M, Kanda Y, Ogawa S, Mori S, Tanaka Y, Honda H *et al.* Frequent false-positive results of *Aspergillus* latex agglutination test : transient *Aspergillus* antigenemia during neutropenia. *Cancer.* 1999 ; *86* : 274-81.

37) Kami M, Ogawa S, Kanda Y, Tanaka Y, MacHida U, Matsumura T *et al.* Early diagnosis of central nervous system aspergillosis using polymerase chain reaction, latex agglutination test, and enzyme-linked immunosorbent assay. *Br. J. Heamatol.* 1999 ; *106* : 536-7.

38) Kaplan JC, Delpech M. Biologie moléculaire et médecine. Médecine-Sciences Flammarion. 2ème édition, 1993 ; chapitre 19, 20, 21, 23, 25, 28.

39) Kawamura S, Maesaki S, Noda T, Hirakata Y, Tomono K, Tashiro T *et al.* Comparaison between PCR and detection of antigen in sera for diagnosis of pulmonary aspergillosis. *J. Clin. Microbiol.* 1999 ; *37* : 218-20.

40) Kawamura S, Maesaki S, Omagari K, Hashiguchi K, Tomono K, Tashiro T *et al.* Invasive pulmonary aspergillosis diagnosed early by polymerase chain reaction assay. *Intern. Med.* 1999 ; *38* : 744-6.

41) Koenig H. Genre *Aspergillus.* In : Guide de mycologie médicale. Ellipse, 1995 ; 170-83.

42) Kwon-Chung KJ, Bennett JE. Subcutaneous and deep mycoses. In : Medical mycology, a practical approach. Lea & Febiger. Philadelphia. 1992 ; 223-47.

43) Latgé JP. *Aspergillus fumigatus* and aspergillosis. *Clin. Microbiol. Rev.* 1999 ; *12* : 310-50.

44) Latgé JP, Paris S, Sarfati J, Debeaupuis JP, Diaquin M, Girardin H. Outils, progrés et questions dans l'étude moléculaire de l'*Aspergillus fumigatus* et de l'aspergillose invasive. *Path. Biol.* 1994 ; *42* : 632-9.

45) Latgé JP, Paris S, Sarfati J, Debeaupuis JP, Monod M. Exoantigens of *Aspergillus fumigatus* : serodiagnosis and virulence. In : The genus *Aspergillus*. Eds Keith A & Powell *et al.* Plenum Press, New York, 1994 ; 321-39.

46) Latgé JP, Sarfati J, Debeaupuis JP. *Aspergillus* : des problèmes de détection ? *Soc. Fr. Mycol. Med.* 1995 ; 8-10.

47) Lebeau B, Piens MA, Kures L, Morin O, Pospisil F, Chevrier S *et al.* Profil actuel de l'aspergillose invasive en France. *J. Clin. Med.* 1996 ; *6* : 97-102.

48) Löffler J, Hebart H, Bialek R, Hagmeyer L, Schmidt D, Serey FP *et al.* Contaminations occuring in fungal PCR assays. *J. Clin. Microbiol.* 1999 ; *37* : 1200-2.

49) Löffler J, Hebart H, Sepe S, Schumacher U, Klingebiel T, Einsele H. Detection of PCR-amplified fungal DNA by using a PCR-ELISA system. *Medical Mycol.* 1998 ; *36* : 275-9.

50) Löffler J, Hebart H, Schumacher U, Reitze H, Einsele H. Comparaison of different methods for extraction of DNA of fungal pathogens from cultures and blood. *J. Clin. Microbiol.* 1997 ; *37* : 3311-2.

51) Makimura K, Murayama SY, Yamaguchi H. Detection of a wide range of medically important fungi by polymerase chain reaction. *J. Med. Microbiol.* 1994 ; *40* : 358-64.

52) Melchers WJG, Verweij PE, Van den Hurk P, Van Belkum P, De Pauw BE, Hoogkamp-Korstanje JAA *et al.* General primer-mediated PCR for detection of *Aspergillus* species. *J. Clin. Microbiol.* 1994 ; *32* : 1710-7.

53) Parkin F, Cerrina J, Le Roy Ladurie F, Libert JM, Dartevelle P. Infections après transplantation d'organe : quelle place de la biologie moléculaire ? *La lettre de l'infectiologue.* 1998 ; *2* : 85-8.

54) Rau WS. *Aspergillus* infections of the lung : radiological signs. *Mycoses.* 1997 ; *40* : 25-32.

55) Reddy LV, Kumar A, Kurup VP. Specific amplification of *Aspergillus fumigatus* DNA by polymerase chain reaction. *Mol. Cell. Probes.* 1993 ; *7* : 121-6.

56) Report of activities, 14 Octobre 1998, European Organization for Research and Treatment of Cancer international association under Belgian law.

57) Ribaud P, Esperou-Bourdeau H, Devergie A, Gluckman E. Aspergillose invasive et allogreffe de moelle. *Path. Biol.* 1994 ; *42* : 652-5.

58) Ridcharson MD, Warrok DW. Aspergillosis. In : Fungal infection diagnostic and management. Blackwell scientific publications. 1993 ; 133-47.

59) Rohrlich P, Sarfati J, Mariani P, Duval M, Carol A, Saint Martin C *et al.* Perspective sandwich enzyme-linked immunosorbent assay for serum galactomannan : early predictive value and clinical use in invasive aspergillosis. *Pedriatr. Infect. Dis. J.* 1996 ; *15* : 232-7.

60) Sandhu GS, Kline BC, Stoskan L, Robert GD. Molecular probes for diagnosis of fungal infections. *J. Clin. Microbiol.* 1995 ; *33* : 2913-9.

61) Schwartz S, Thiel E. Clinical presentation of invasive aspergillosis. *Mycoses.* 1997 ; *40* : 21-4.

62) Serevens JL, Donnelly JP, Meis JFGM, De Vries Robbe PF, De Pauw BE, Verweij PE. Two strategies for managing invasive aspergillosis : a decision analysis. *Clin. Infect. Dis.* 1997 ; *25* : 1148-54.

63) Spreadbury C, Holden D, Aufauvre-Brown A, Bainbridge B, Cohen J. Detection of *Aspergillus fumigatus* by polymerase chain reaction. *J. Clin. Microbiol.* 1993 ; *31* : 615-21.

64) Stynen D, Goris A, Sarfati J, Latgé JP. A new sensitive sandwich enzyme-linked immunosorbent assay to detect galactofuran in patients with invasive aspergillosis. *J. Clin. Microbiol.* 1995 ; *33* : 497-500.

65) Sulahian A, Tabouret M, Ribaud P, Sarfati J, Gluckman E, Latgé JP *et al.* Comparaison of an enzyme immunoassay and latex agglutination test for detection of galactomannan in the diagnosis of invasive aspergillosis. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect Dis.* 1996 ; *15* : 139-45.

66) Swart K, Debets AJM, Holub EF, Bos LJ, Hoekstra RF. Physical karyotiping : genetic and taxonomic applications in aspergilli. In : The genus *Aspergillus*. Eds Keith A & Powell. Plenum Press, New York ; 1994 ; 233-9

67) Tang MC, Holden DW, Aufauvre-Brown A, Cohen J. The detection of *Aspergillus* spp. by the polymerase chain reaction and its evaluation in bronchoalveolar lavage fluid. *Am. J. Respir. Dis.* 1993 ; *148* : 1313-7.

68) Turenne CY, Sanche SE, Hoban DJ, Karlowsky JA, Kabani AM. Rapid identification of fungi by using the ITS2 genetic region and an automated fluorescent capillary electrophoresis system. *J. Clin. Microbiol.* 1999 ; *37* : 1846-51.

69) Van Burik JA, Myerson D, Schreckhise RW, Bowden RA. Panfungal assay for detection of fungal infection in human blood specimens. J. *Clin. Microbiol.* 1998 ; *36* : 1169-75.

70) Vaneechoutte M, Van Eldere J. The possibilities and limitations of nucleic acid amplification technology in diagnostic microbiology. *J. Med. Microbiol.* 1997 ; *46* : 188-94.

71) Verweij PE, Brinkman K, Kremer HPH, Kullberg BJ, Meis JFGM. *Aspergillus meningitidis* : diagnosis by non-culture-based microbiological methods and management. *J. Clin. Microbiol.* 1999 ; *37* : 1186-9.

72) Verweij PE, Denning DW. Diagnostic and therapeutic strategies for invasive aspergillosis. *Sem. Resp. Crit. Care. Med.* 1997 ; *18* : 203-15.

73) Verweij PE, Latgé JP, Rijs AJMM, Melchers WJG, De Paw BE, Hoogkamp-Korstanje JAA *et al.* Comparaison of antigen detection and PCR assay using bronchoalveolar lavage fluid for diagnosing invasive pulmonary aspergillosis in patients receiving treatment for hematological malignancies. *J. Clin. Microbiol.*1995 ;*33*:3150-3.

74) Verweij PE, Meis JFGM, Van den Hurk P, Van Belkum P, De Pauw BE, Hoogkamp-Korstanje JAA, Melchers WJG. Polymerase chain reaction as a diagnostic tool for invasive aspergillosis : evaluation in bronchoalveolar lavage fluid from low risk patients. *Serodiag. Immunother. Infect. Dis.* 1994 ; *6* : 203-8.

75) Verweij PE, Stynen D, Antonius JM, Rijs M, De Paw BE, Jacomina A *et al.* Sandwich enzyme-linked immunosorbent assay compared with pastorex latex agglutination test for diagnosing invasive aspergillosis in immunocompromised patients. *J. Clin. Microbiol.* 1995 ; *33* : 1912-4.

76) Yamakami Y, Hashimoto A, Tokimatsu I, Nasu M. PCR detection of DNA specific for *Aspergillus* species in serum of patients with invasive aspergillosis. *J. Clin. Microbiol.* 1996 ; 34 : 2464-8.

77) Yeni P. Perspectives médicamenteuses dans le traitement de l'aspergillose invasive. *Path. Biol.* 1994 : *42* : 700-5.

78) Young RA. Current taxonomic schemes of the genus *Aspergillus* and its teleomorphs. In : *Aspergillus,* biology and industrial applications. Benett JW & Klich MA. Eds Butterworth-Heineman, 1992 ; 355-90.



Serment des Apothicaires

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 moeurs 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.

RESUME

Aspergillus fumigatus est un champignon filamenteux, responsable d'une infection gravissime chez les immunodéprimés (neutropénie, corticothérapie, transplantation...) : l'aspergillose invasive (AI). Le pronostic dépend de deux facteurs : la restauration des défenses immunitaires et la prescription d'une thérapeutique antifongique précoce et à forte dose. Le médecin doit pouvoir s'appuyer sur un diagnostic rapide et formel. Le diagnostic de certitude est rarement porté car il nécessite des prélèvements invasifs souvent contre-indiqués chez ces patients. En pratique, l'AI est possible ou probable, d'après un ensemble d'arguments cliniques, radiologiques et biologiques. Cette infection au diagnostic difficile constitue, en théorie, une bonne application de la PCR (Polymerase Chain Reaction). Après analyse critique de la littérature, nous avons choisi d'adapter et d'optimiser sur une souche référencée d'*A.fumigatus* (CBS 144-89), une technique de PCR décrite par Melchers *et al* (*J. Clin. Microbiol.* 1994) pour la détection de l'ADN du genre *Aspergillus.* La sensibilité élevée de la méthode permet de détecter 7,5 pg d'ADN sur le gel d'agarose et 1 pg par Southern Blot. L'utilisation d'une méthode de détection PCR-ELISA commercialisée (Boerhinger Mannheim) permet une détection à la fois sensible et rapide des produits amplifiés, nécessaire à l'adaptation en routine au laboratoire. L'ADN de souches isolées de prélèvements de patients atteints d'AI a été amplifié. Les PCR réalisées sur l'ADN de souches référencées d'autres espèces d'*Aspergillus (A.terreus, A.nidulans, A.flavus, A.niger*) et sur des souches d'autres champignons filamenteux (*Penicillium* sp, *Paecilomyces variotii*, *Fusarium* sp) ont confirmé la spécificité décrite. L'étude de spécificité sera étendue à d'autres micro-organismes. Une étude bioclinique réalisée sur des échantillons biologiques de patients atteints d'AI, sera par la suite indispensable pour évaluer la place de la PCR dans la stratégie diagnostique de l'aspergillose invasive.

MOTS CLEFS

Aspergillus spp, *Aspergillus fumigatus*, aspergillose invasive, immunodéprimés, diagnostic moléculaire, Polymerase Chain Reaction (PCR)