

UNIVERSITE DE LIMOGES

FACULTE DE PHARMACIE

ANNEE 2011

THESE N°

<p>ASPERGILLOSE HUMAINE.</p> <p>EPIDEMIOLOGIE, DIAGNOSTIC BIOLOGIQUE, CONTRÔLE.</p>

THESE

POUR LE DIPLÔME D'ETAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE

Présentée et soutenue publiquement le : 21 Janvier 2011

Par : QUATRESOUS Nicolas né le 20/12/1984 à Limoges

EXAMINATEURS DE LA THESE

Président : Professeur G. DREYFUSS, Laboratoire Parasitologie-Mycologie

Juge : Docteur D. AJZENBERG, Maître de conférences-Praticien hospitalier

Juge : Docteur F. COMBY, Maître de conférences

Juge : Monsieur Y. KHIYATI, Docteur en Pharmacie

UNIVERSITE DE LIMOGES : FACULTE DE PHARMACIE

DOYEN DE LA FACULTE : Monsieur le Professeur Jean-Luc **DUROUX**
1^{er} VICE-DOYEN : Madame Catherine **FAGNERE**, Maître de Conférences
2^{ème} VICE-DOYEN : Monsieur Serge **BATTU**, Maître de Conférences

PROFESSEURS :

BENEYTOUT Jean-Louis	BIOCHIMIE ET BIOLOGIE MOLECULAIRE
BOTINEAU Michel	BOTANIQUE ET CRYPTOLOGIE
BROSSARD Claude	PHARMACOTECHNIE
BUXERAUD Jacques	CHIMIE ORGANIQUE ET THERAPEUTIQUE
CARDOT Philippe	CHIMIE ANALYTIQUE ET BROMATOLOGIE
CHULIA Albert	PHARMACOGNOSIE
CHULIA Dominique	PHARMACOTECHNIE
DELAGE Christiane	CHIMIE GENERALE ET MINERALE
DESMOULIERE Alexis	PHYSIOLOGIE
DREYFUSS Gilles	MICROBIOLOGIE-PARASITOLOGIE-IMMUNOLOGIE
DUROUX Jean-Luc	BIOPHYSIQUE, BIOMATHEMATIQUES ET INFORMATIQUE
LOUDART Nicole	PHARMACOLOGIE

PROFESSEURS DES UNIVERSITES-PRATICIENS HOSPITALIERS DES DISCIPLINES PHARMACEUTIQUES :

LACHATRE Gérard	TOXICOLOGIE
MOESCH Christian	HYGIENE HYDROLOGIE ENVIRONNEMENT
ROGEZ Sylvie	MICROBIOLOGIE-PARASITOLOGIE-IMMUNOLOGIE

MAITRES DE CONFERENCES :

BASLY Jean-Philippe	CHIMIE ANALYTIQUE ET BROMATOLOGIE
BATTU Serge	CHIMIE ANALYTIQUE ET BROMATOLOGIE
BEAUBRUN-GIRY Karine	PHARMACOTECHNIE
BILLET Fabrice	PHYSIOLOGIE

CALLISTE Claude	BIOPHYSIQUE, BIOMATHEMATIQUES ET INFORMATIQUE
CLEDAT Dominique	CHIMIE ANALYTIQUE ET BROMATOLOGIE
COMBY Francis	CHIMIE ORGANIQUE ET THERAPEUTIQUE
COURTIOUX Bertrand	PHARMACOLOGIE, PARASITOLOGIE
DELEBASSEE Sylvie	MICROBIOLOGIE-PARASITOLOGIE-IMMUNOLOGIE
DEMIOT Claire-Elise	PHARMACOLOGIE
FAGNERE Catherine	CHIMIE ORGANIQUE ET THERAPEUTIQUE
FROISSARD Didier	BOTANIQUE ET CRYPTOLOGIE
JAMBUT Anne-Catherine	CHIMIE ORGANIQUE ET THERAPEUTIQUE
LABROUSSE Pascal	BOTANIQUE ET CRYPTOLOGIE
LEGER David	BIOCHIMIE ET BIOLOGIE MOLECULAIRE
LIAGRE Bertrand	BIOCHIMIE ET BIOLOGIE MOLECULAIRE
LOTFI Hayat	TOXICOLOGIE
MARION-THORE Sandrine	CHIMIE ORGANIQUE ET THERAPEUTIQUE
MARRE-FOURNIER Françoise	BIOCHIMIE ET BIOLOGIE MOLECULAIRE
MILLOT Marion	PHARMACOGNOSIE
MOREAU Jeanne	MICROBIOLOGIE-PARASITOLOGIE-IMMUNOLOGIE
POUGET Christelle	CHIMIE ORGANIQUE ET THERAPEUTIQUE
ROUSSEAU Annick	BIOPHYSIQUE, BIOMATHEMATIQUES ET INFORMATIQUE
SIMON Alain	CHIMIE GENERALE ET MINERALE
TROUILLAS Patrick	BIOPHYSIQUE, BIOMATHEMATIQUES ET INFORMATIQUE
VIANA Marylène	PHARMACOTECHNIE
VIGNOLES Philippe	BIOPHYSIQUE, BIOMATHEMATIQUES ET INFORMATIQUE

MAITRES DE CONFERENCES DES UNIVERSITES-PRATICIENS HOSPITALIERS DES DISCIPLINES PHARMACEUTIQUES :

DREYFUSS Marie-Françoise	CHIMIE ANALYTIQUE ET BROMATOLOGIE
---------------------------------	-----------------------------------

PROFESSEUR CERTIFIE :

MARBOUTY Jean-Michel	ANGLAIS
-----------------------------	---------

SOMMAIRE

INTRODUCTION	2
CHAPITRE I : LE GENRE <i>ASPERGILLUS</i>	3
CHAPITRE II : ENJEU ET PROBLEMATIQUE DES INFECTIONS FONGIQUES A <i>ASPERGILLUS</i>	36
CHAPITRE III : LES MANIFESTATIONS CLINIQUES DE L'ATTEINTE ASPERGILLAIRE	53
CHAPITRE IV : LE DIAGNOSTIC BIOLOGIQUE	71
CHAPITRE V : TRAITEMENT DES MALADIES ASPERGILLAIRES	88
CONCLUSION	125
BIBLIOGRAPHIE	126
TABLE DES MATIERES	129

INTRODUCTION

Les champignons du genre *Aspergillus* sont saprophytes et cosmopolites. Les spores aspergillaires, ou conidies, sont ubiquitaires et retrouvées constamment en suspension dans l'atmosphère. Chaque individu est donc exposé quotidiennement à une grande quantité de spores aspergillaires. En cas de réceptivité particulière de l'hôte, certaines espèces telles que *Aspergillus fumigatus* peuvent être à l'origine d'un ensemble de maladies allant de mycoses localisées, comme l'aspergillome, à des infections invasives d'évolution souvent mortelles, en passant par des formes cliniques particulières d'origine immuno-allergique. Ces dix dernières années ont vu une nette augmentation de l'incidence des aspergilloses invasives, comme l'illustrent les récents cas diagnostiqués à Marseille cette année même, du fait du nombre croissant de sujets à risque et de l'utilisation accrue d'agents immunosuppresseurs agressifs. Ces infections sont de diagnostic difficile et entraînent une lourde mortalité.

Dans ce mémoire, nous aborderons successivement, dans le chapitre 1 : le genre *Aspergillus*, dans le chapitre 2 : les enjeux et la problématique des infections fongiques à *Aspergillus*, puis dans le chapitre 3 : les manifestations cliniques de l'atteinte aspergillaire, dans le chapitre 4 : le diagnostic biologique, dans le chapitre 5 : le traitement des maladies aspergillaires, et finalement nous terminerons ce mémoire par une conclusion.

Chapitre 1

Le genre *Aspergillus*

Dans ce chapitre, nous nous intéresserons aux généralités du genre *Aspergillus*, avec notamment : les caractères généraux, l'épidémiologie, la répartition et la dissémination dans l'environnement, les caractères morphologiques, la croissance et le cycle fongique, les caractères culturels, le mode de contamination, le pouvoir pathogène, le pouvoir toxigène, le diagnostic d'espèces, et enfin nous détaillerons les principales espèces d'*Aspergillus* impliquées dans les aspergilloses. Le contenu de ce chapitre provient principalement des travaux de Euzéby 1992, Chabasse *et al.* 2002, Desoubeaux et Chandener 2010a.

1. Caractères généraux

Les champignons du genre *Aspergillus* ont été décrits pour la première fois en 1729. Ce sont des champignons saprophytes, c'est-à-dire qui tirent leur nourriture de substances organiques en décomposition. Ce sont des moisissures à filaments hyalins, cloisonnés, et ils sont haploïdes. Ils font partie du groupe phylogénétique des Ascomycètes, à l'ordre des Eurotiales et à la famille des *Trichocomacées* ou *Aspergillacées*. Le genre *Aspergillus* comprend aujourd'hui quelque 185 espèces, dont une vingtaine sont retrouvées en pathologie humaine (Badillet *et al.* 1987a). Les *Aspergillus* sont présents partout dans le monde, et en région tempérée plus particulièrement à la fin de l'été, en automne et en hiver. Ces champignons ont un métabolisme aérobie. De plus ils participent au recyclage du carbone et de l'azote de

l'environnement. Ils sont thermophiles (certaines espèces peuvent survivre à des températures proches de 70°C) et ne requièrent pas de nutriments spécifiques.

2. Epidémiologie

Les *Aspergillus* sont des champignons cosmopolites. Ils sont très répandus dans le milieu extérieur. Ces champignons sont ubiquistes, on les trouve aussi bien en milieu rural (foin, paille, céréales ou fruits moisissés, silos à grains, matières organiques en décomposition...) qu'en milieu urbain, où on les rencontre aussi bien à l'intérieur qu'à l'extérieur des habitations (poussières derrière les meubles, cadres, faux plafonds, conduits d'aération, plantes en pots...). Les différentes enquêtes aéromycologiques révèlent que les spores aspergillaires sont au quatrième rang des spores fongiques de l'air les plus fréquemment rencontrées (Chabasse *et al.* 2002).

3. Répartition et dissémination dans l'environnement

Dans la nature, les *Aspergillus* représentent entre 1 et 7% des champignons environnementaux. A cause de leur petite taille et de leur hydrophobicité, les conidies d'*Aspergillus* sont facilement mises en suspension dans l'air ; on les retrouve alors aussi bien dans la poussière que dans les systèmes de climatisation. En effet les concentrations de spores atteignent 1 à 100/m³ d'air à l'intérieur comme à l'extérieur. Les concentrations peuvent monter jusqu'à 109/m³ dans certains environnements comme les centres de compostage (Desoubieux et Chandenier 2010a). Les spores aspergillaires sont également très fréquentes dans les chantiers ou zones de travaux diverses. On les retrouve aussi sur les plantes (feuilles, fleurs, fruits), la paille, le fourrage humide, les pots de fleurs, mais également à la surface des murs dans les locaux humides (murs recouverts de moisissures), sur les matériaux de démolition abandonnés à la pluie. L'inhalation de conidies pour chaque personne est alors constante et quotidienne. On estime qu'un individu inhale de 2000 à 5000 génotypes différents par mois, du fait de l'importante biodiversité des spores aspergillaires (Desoubieux et Chandenier 2010a). Concernant la survie des *Aspergillus* dans le milieu extérieur, elle est quasiment illimitée, car ces champignons sont essentiellement saprophytes. Leur résistance aux agents extérieurs est

également importante. En effet, parmi les agents physiques, seules la dessiccation et la chaleur à 100°C peuvent tuer les spores. De plus, le froid ne les affecte pas.

4. Caractères morphologiques

Les *Aspergillus* sont caractérisés par un thalle végétatif formé de filaments mycéliens hyalins. Ces filaments sont de diamètre fin et régulier, ils sont septés et ramifiés. L'identification du genre *Aspergillus* repose sur la mise en évidence des têtes aspergillaires à l'examen microscopique. En effet, sur les filaments végétatifs prennent naissance des filaments dressés non cloisonnés appelés conidiophores. Ces conidiophores se terminent par une vésicule de forme variable sur laquelle sont disposées les cellules conidiogènes ou phialides. La conidiogénèse s'effectue sur le mode blastique phialidique, par bourgeonnement à l'apex des phialides d'une série de spores ou conidies qui restent collées les unes aux autres en chaînes non ramifiées, basipètes, la plus jeune étant à la base de la chaîne. Les spores unicellulaires sont de forme variable, globuleuses, subglobuleuses ou elliptiques. Elles peuvent être lisses ou recouvertes d'aspérités plus ou moins marquées, et sont de pigmentations diverses. Les phialides sont soit directement insérées sur la vésicule (têtes unisériées), soit portées par des petits articles insérés sur la vésicule : les métules (têtes bisériées). L'ensemble : vésicule (avec ou sans métules) / phialides / conidies, constitue la tête aspergillaire caractéristique du genre *Aspergillus* (figure 1).

5. Croissance et cycle fongique

Dans l'environnement les *Aspergillus* sont sous la forme de champignons filamenteux septés et ramifiés : cette forme végétative est appelé mycélium. En condition de sevrage ou d'autres stress, des structures spécialisées se développent à partir du mycélium : les conidiophores. Il s'agit d'organes de fructification au bout desquels les têtes aspergillaires ou vésicules terminales sont retrouvées. Les conidies, spores asexuées unicellulaires et uninucléées, sont produites au niveau des organes de fructification par les phialides. Les phialides sont des cellules conidiogènes fertiles, en forme de bouteille et qui prennent naissance sur la vésicule terminale. Ce sont les conidies, 2 à 3 µm de diamètre et très volatiles, qui sont responsables de la dissémination du champignon dans l'environnement. La germination des spores se

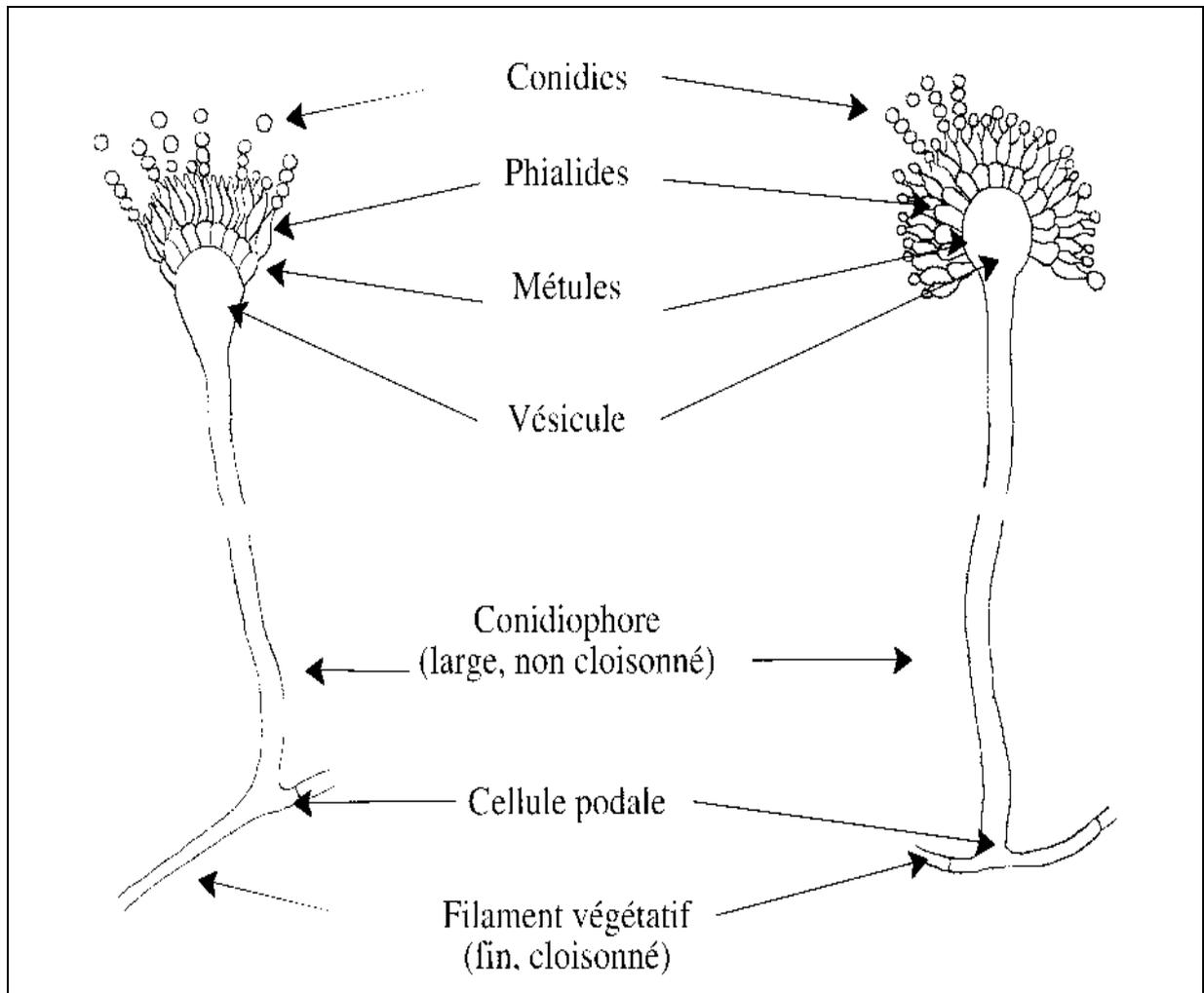


Figure 1
Appareil reproducteur des *Aspergillus*
(Chabasse *et al.* 2002)

déroule en deux étapes. Dans des conditions adéquates, les conidies gonflent. Cette phase de croissance iso-diamétrale dure 3 à 4h à 37°C (Desoubeaux et Chandener 2010a). Après cette phase de gonflement, la croissance devient polarisée. En effet, on observe l'apparition d'un tube germinatif qui va s'allonger progressivement et produire un filament ramifié qui formera la colonie typique de tous les champignons filamenteux (figure 2).

6. **Caractères culturels**

Les *Aspergillus* présentent une croissance rapide sur milieu de Sabouraud additionné d'antibiotiques. Ils sont cependant en majorité inhibés par l'actidione. Après 24 à 48h de culture, on peut observer des colonies plates, formées de courts filaments aériens blancs. C'est suite à la maturation des structures conidiogènes (48 à 96h) que les colonies présentent leur teinte caractéristique : brune, verte, jaune, ou même noire selon les espèces. La couleur de la culture permet une orientation rapide du diagnostic d'espèce. Les *Aspergillus* se développent bien sur les milieux classiques de mycologie comme celui de Sabouraud. Mais si nécessaire, leur fructification peut être stimulée par repiquage de la colonie sur une gélose au malt, ou sur milieu de Czapek qui constituent leurs milieux de référence. Enfin, les *Aspergillus* poussent à 22-25°C et à 37°C pour les espèces qui sont thermophiles.

7. **Mode de contamination**

Dans ce paragraphe, l'essentiel des informations provient des travaux des différents auteurs cités en introduction de ce chapitre mais également des travaux de : Dupont 1981, et ceux rapportés de www.sante.univ-nantes.fr (07/2010).

Les spores d'*Aspergillus* étant en suspension dans l'air, leur inhalation est obligatoire et quotidienne. La voie principale de pénétration dans l'organisme est respiratoire, c'est donc l'appareil broncho-pulmonaire qui est le plus fréquemment concerné par la maladie aspergillaire. Dans certaines circonstances, comme lors de la manipulation de grains ou de foin moisissés, l'inhalation des spores peut être massive. Dans ce cas, le champignon est retrouvé dans l'expectoration pendant plusieurs jours après la contamination, que le sujet soit malade ou non. La voie aérienne est aussi responsable des localisations sinusiennes.

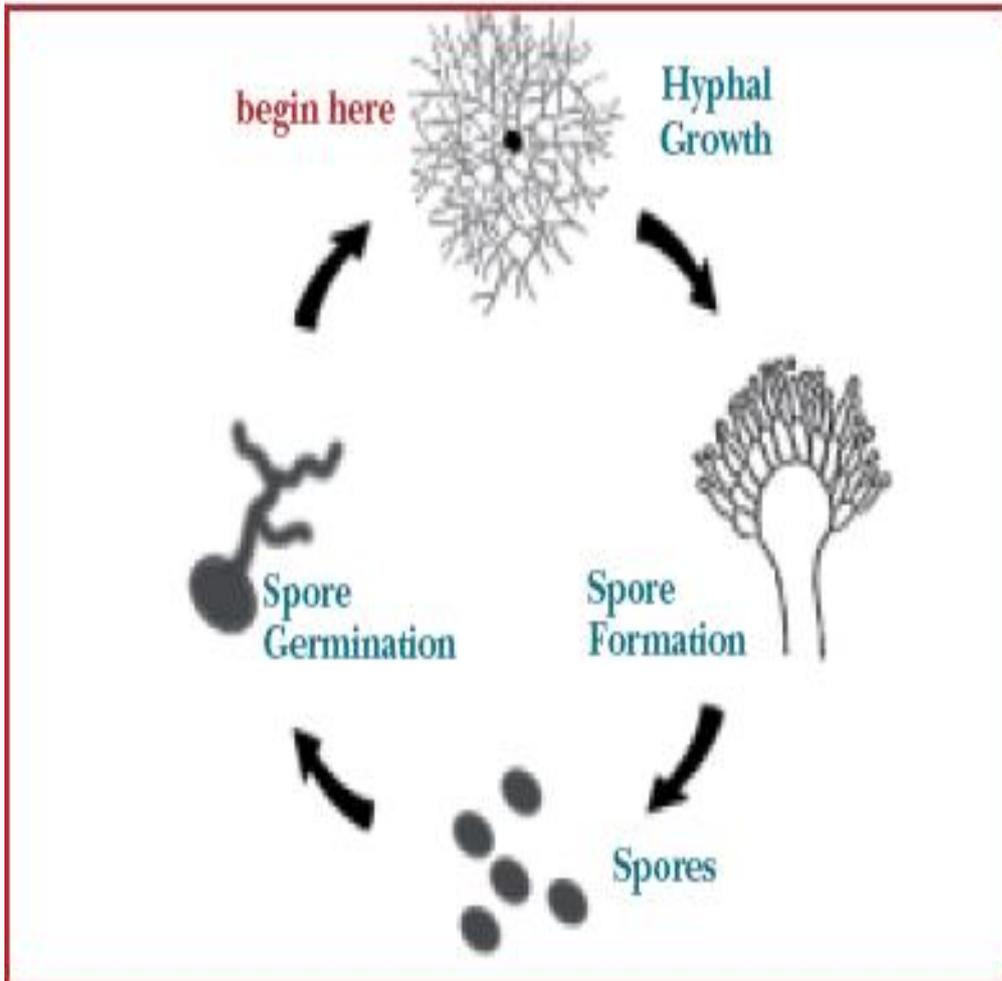


Figure 2

Cycle de croissance des champignons du genre *Aspergillus*

(Desoubeaux et Chandener 2010a)

Plus rarement, une contamination directe est possible par déposition de spores sur des plaies ou brûlures, ou un site opératoire, et peut aboutir à des infections locales à risque de dissémination en fonction du contexte clinique. On peut alors observer des infections cutanées comme les otomycoses du conduit auditif, ou des surinfections chez les brûlés, voire des atteintes oculaires chez les personnes portant des verres de contact. De façon exceptionnelle, le champignon peut contaminer des solutés injectables (soluté de perfusion, liquide de dialyse).

Le caractère obligatoire de l'inhalation des spores, et leur rejet hors de l'appareil respiratoire rendent compte de la relative fréquence de la positivité des recherches d'*Aspergillus* dans l'expectoration. Pour cette raison, une telle découverte ne permet pas pour autant à elle seule, de porter le diagnostic d'aspergillose broncho-pulmonaire. Inversement, dans certaines infections pulmonaires aspergillaires, comme l'aspergillome ou la pneumopathie aspergillaire invasive, la présence du champignon dans l'expectoration est très inconstante. Les résultats d'une telle recherche doivent donc obligatoirement être confrontés avec les éléments du contexte clinique et immunologique pour pouvoir faire la différence entre un simple saprophytisme et une présence suspecte ou anormale.

8. Pouvoir pathogène

Dans ce paragraphe, l'essentiel des informations provient des travaux effectués par les différents auteurs cités en introduction de ce chapitre, mais également des travaux de Dupont 1981.

Les moisissures sont des organismes peu virulents mais très opportunistes. Le développement des *Aspergillus* chez leur hôte nécessite l'existence de conditions favorables. En effet certains facteurs environnementaux (comme l'abondance des spores aspergillaires dans l'air inhalé), ou certains facteurs liés au champignon (comme la taille des spores, la thermo-tolérance, les facteurs de virulence) contribuent à la fréquence de la pathologie aspergillaire. Cependant certaines conditions propres à l'hôte comme l'existence d'une caverne tuberculeuse, d'un cancer bronchique, d'un emphysème, d'une broncho-pneumopathie chronique obstructive, d'une dilatation des bronches, d'une mucoviscidose, ..., représentent des facteurs favorisants. De plus, les personnes avec une altération du système

immunitaire, comme celles sous corticothérapie prolongée, ou sous chimiothérapie, mais également les personnes atteintes du SIDA ou d'une hémopathie maligne, ou celles ayant une neutropénie, sont plus exposées à une infection par *Aspergillus*.

Les *Aspergillus* sont ainsi à l'origine de diverses mycoses : des kératites, des otomycoses, des onyxis, des atteintes cutanées, ou encore des mycoses profondes qui résultent d'une inoculation traumatique des spores. Cependant les *Aspergillus* sont la plupart du temps des pathogènes respiratoires. L'infestation s'effectue par inhalation des conidies véhiculées par le vent. Ils sont à l'origine de sinusites ou de surinfections bronchiques au cours des broncho-pneumopathies chroniques obstructives et de la mucoviscidose. Mais l'atteinte aspergillaire chez le sujet non immunodéprimé est dominée par l'aspergillome, qui est lié au développement du champignon dans une bronche ou dans le parenchyme pulmonaire, sous forme d'une boule fongique appelée truffe aspergillaire. Le développement de l'*Aspergillus* s'effectue généralement dans une cavité préexistante (bulle d'emphysème, caverne tuberculeuse...) et se traduit par des troubles respiratoires accompagnés d'hémoptysies et, sur le plan radiologique, d'une image classique en grelot.

Les formes les plus graves sont toutefois observées chez les patients fortement immunodéprimés, surtout chez les patients sous chimiothérapie aplasante en préparation à la greffe de moelle osseuse. L'infection a alors un caractère invasif et présente une évolution très rapide et souvent fatale.

Les principales manifestations du pouvoir pathogène sont les suivantes :

- Processus de sensibilisation responsable de manifestations allergiques, comme l'asthme aspergillaire.
- Colonisation d'une cavité préformée avec un développement fongique uniquement local, comme l'aspergillome pulmonaire dans une cavité tuberculeuse résiduelle.
- L'infection proprement dite, c'est-à-dire le développement et la diffusion du mycélium dans la profondeur d'un organe, comme la pneumopathie aspergillaire du leucémique.

Parmi les principaux éléments qui définissent le pouvoir pathogène de ces champignons, on trouve la petite taille des spores (2 à 3 μm de diamètre pour *Aspergillus fumigatus*), ce qui leur permet d'atteindre les alvéoles pulmonaires.

De plus, on trouve la capacité ou non des champignons à se développer chez leur hôte à 37°C voire au-delà, en induisant une prolifération angio-invasive. C'est ce qu'on appelle la thermo-tolérance.

Les mécanismes d'adhérence aux cellules épithéliales semblent également avoir un rôle important, par l'intermédiaire de différentes structures conidiennes qui se fixent sur le fibrinogène, la fibronectine, l'albumine, la laminine, le complément ou encore sur les immunoglobulines. Ainsi, certaines lectines dérivées du fucose et de l'acide sialique ont été identifiées sur la surface pariétale du champignon. De plus, l'hydrophobicité des conidies, grâce aux hydrophobines, permet leur dispersion et permet également la fixation aux poches hydrophobes de l'albumine et de certaines protéines de matrice comme le collagène.

La production de toxines participe aussi au pouvoir pathogène. Divers métabolites produits lors de la multiplication fongique et dénommés « toxines » jouent un rôle pathogène. Ainsi les hémoptysies, qui font toute la gravité de l'aspergillome, sont la conséquence d'ulcérations vasculaires par des toxines nécrosantes. La gliotoxine, par exemple, inhibe la phagocytose ainsi que la transcription de médiateurs de l'inflammation, tout en induisant l'apoptose des macrophages et en bloquant l'activation lymphocytaire. La RNase et l'hémolysine entraînent respectivement une mort des cellules hôtes et la lyse des hématies.

Il faut également souligner l'importance du tropisme vasculaire des *Aspergillus* qui participe au pouvoir pathogène. Ce tropisme vasculaire est responsable des foyers d'infarctissement et de nécrose facilitant l'extension et la formation d'abcès.

Différentes observations permettent de suggérer un rôle des pigments dans la pathogénicité, notamment la dihydroxynaphtalène-mélanine. Les souches « sauvages » blanches d'*A. fumigatus*, par exemple, sont connues pour être moins pathogènes que les souches vertes. Les conidies pâles se fixent d'avantage au complément, elles sont plus rapidement phagocytées, et leur paroi cellulaire semble être plus perméable, comme le montre une sensibilité accrue aux drogues. Enfin, la

synthèse de pigments semble également jouer un rôle protecteur vis-à-vis des rayons ultra-violet et participer au maintien de l'intégrité génomique.

De plus, on constate que de nombreuses enzymes participent à la colonisation de la matrice pulmonaire et à la dégradation de facteurs humoraux, telles que des sérines ou des aspartates protéases ; ou également une dipeptidyl-peptidase de type chymotrypsine qui altère le collagène et l'élastine pulmonaire, ou des anti-oxydants comme la superoxyde dismutase (SOD) ou la catalase.

La pathologie aspergillaire se situe, en terme de fréquence, au premier rang des mycoses systémiques autochtones. Parmi 127 cas documentés diagnostiqués au Service de Mycologie de l'Institut Pasteur (Drouet 1973), 83 sont des aspergillomes, 41 des aspergilloses de type invasif ou disséminées et 3 des manifestations allergiques (figure 3).

La répartition selon l'âge, de 174 cas d'aspergilloses (Dupont 1981), montre que l'adulte est plus souvent atteint, mais le sujet jeune peut aussi être concerné en raison de déficits immunitaires congénitaux ou d'affections malignes (figure 4). Cependant la régression et la meilleure guérison de la tuberculose (grande pourvoyeuse d'aspergillome) devraient correspondre à une diminution de cette forme clinique. En revanche, les formes viscérales invasives ou disséminées sont une préoccupation croissante chez les sujets aux défenses immunitaires altérées.

Outre l'homme, plusieurs espèces animales sont sensibles à l'infection aspergillaire notamment les oiseaux et le bétail, où le champignon est responsable d'avortement au cours de la gestation et de pneumopathies chez les nouveau-nés. Au laboratoire, le lapin ou la souris sont très sensibles à l'infection expérimentale.

9. Pouvoir toxigène

Plusieurs types de substances toxiques ont été mis en évidence chez les *Aspergillus*.

Tout d'abord des endotoxines, par exemple :

- La fumigatoxine, de poids moléculaire élevé est une endotoxine isolée des filaments mycéliens des souches très pathogènes d'*A. fumigatus*. Cette toxine paraît agir en inhibant les récepteurs du GABA de la contraction musculaire. De plus elle est très antigénique.

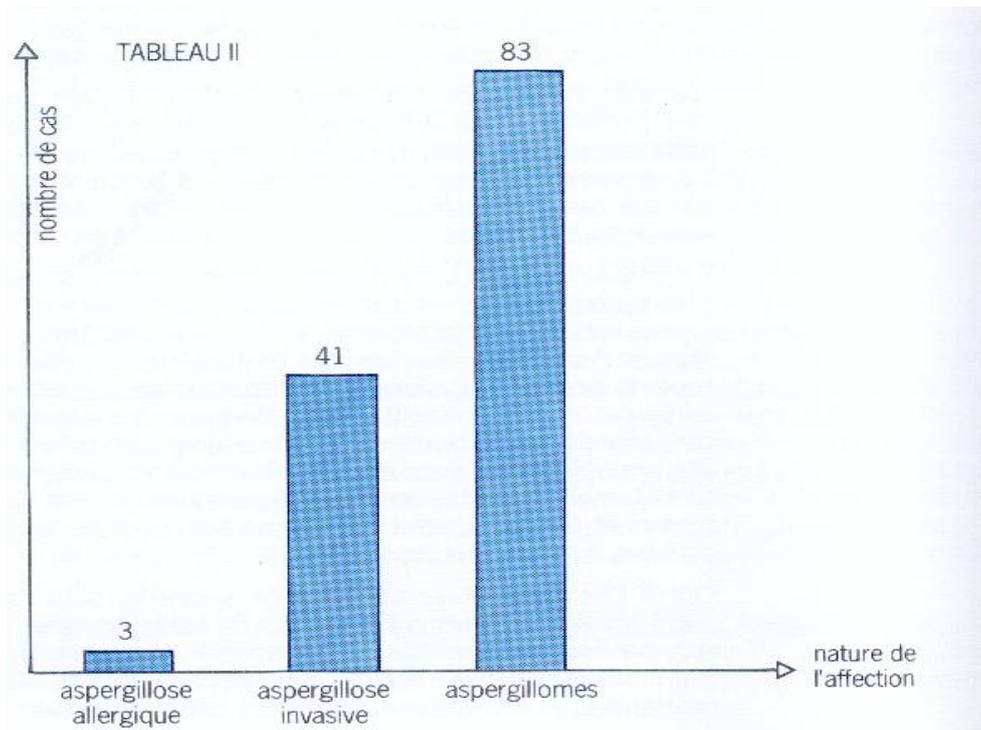


Figure 3

Répartition de 127 cas d'atteintes aspergillaires en fonction de la nature de l'affection
(Drouet 1973)

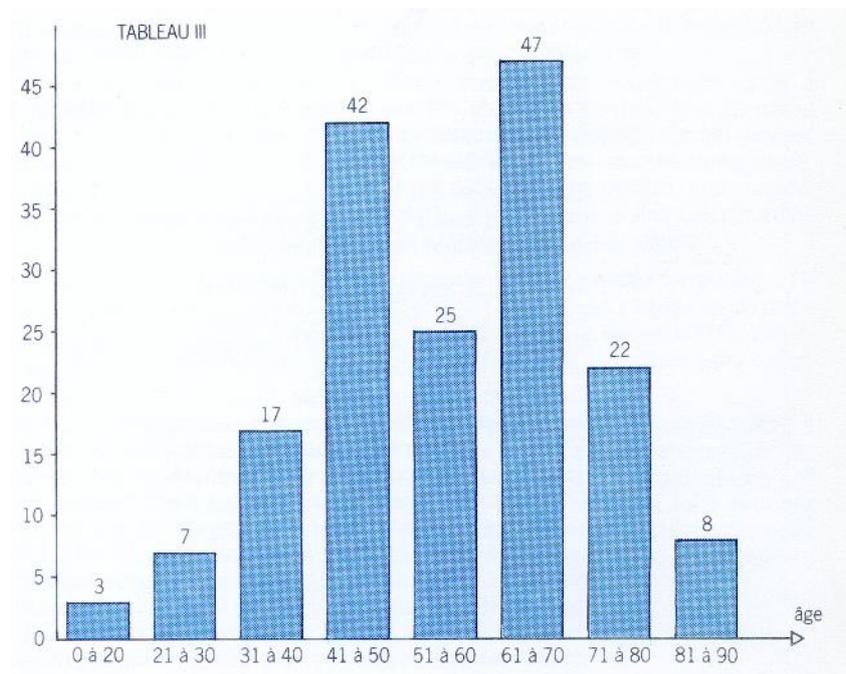


Figure 4

Répartition de 174 aspergilloses en fonction des tranches d'âges
(Dupont 1981)

- Une autre endotoxine, l'acide phtioïque, isolée aussi d'*A. fumigatus* est identique à l'acide phtioïque du bacille tuberculeux. C'est un acide gras à longue chaîne dont la toxicité aiguë est faible. Elle provoque une inflammation de la rate et la formation de granulomes, notamment dans les poumons.

L'ensemble des endotoxines des *Aspergillus* parasites détermine aussi des accidents nécrotiques locaux, et des phénomènes hémolytiques.

Les *Aspergillus* élaborent également des toxines diffusibles, produits de leur métabolisme, et des enzymes protéolytiques, notamment :

- Une glyco-protéine résistant à la protéase.
- La gliotoxine qui inhibe la phagocytose et la formation des lymphocytes T cytotoxiques.
- Il en est de même d'une hémolysine.
- Une protéinase élastinolytique (élastase) qui lyse l'élastine (protéine du tissu conjonctif et de la paroi artérielle).
- Une exoprotéase fibrinogénolytique qui dégrade les tissus et permet la dispersion du parasite.
- Enfin, même s'il ne s'agit pas d'une toxine, on observe l'élaboration au cours du métabolisme des *Aspergillus*, d'acide oxalique. Il en résulte le dépôt de cristaux d'oxalate de calcium en diverses lésions d'aspergillose et des phénomènes de nécrose dus à l'acide oxalique lui-même. Cette oxalose semble être propre à l'infection par *Aspergillus niger*.

Tous ces effets liés à l'élaboration de toxines aspergillaires expliquent l'existence de divers syndromes, notamment de syndromes nerveux sans colonisation de l'encéphale par les parasites, de la formation *in situ* de cavernes consécutives à la nécrose tissulaire, des syndromes d'immunodépression d'autant plus graves que les parasites se sont déjà installés sur un terrain immunodéprimé. En règle générale les toxines aspergillaires sont thermolabiles et détruites en 15 minutes à 60°C.

Il existe également des toxines solubles responsables des accidents de mycotoxicoses. Ces intoxications doivent être distinguées des autres pathologies aspergillaires. Elles sont provoquées par l'ingestion d'*Aspergillus* toxiques souillant les aliments, notamment par l'aflatoxine. On a observé que cette aflatoxine, libérée au cours du parasitisme d'*Aspergillus flavus*, exerce un effet immuno-dépresseur en inhibant la phagocytose des spores et des débris mycéliens. Bien que ces mycotoxicoses soient parfois l'œuvre d'*Aspergillus* également impliqués dans les aspergilloses, nous ne les évoquons pas.

On a observé, qu'en règle générale, les substances de poids moléculaire élevé interviennent dans la pathogénicité des *Aspergillus* parasites, alors que les substances de faible poids moléculaire sont surtout impliquées dans les mycotoxicoses (Euzeby 1992).

10. Diagnostic d'espèces

Le diagnostic d'espèce est porté sur un ensemble de critères macroscopiques et microscopiques (figure 5).

Les critères macroscopiques sont la vitesse de pousse et l'aspect des colonies à maturité (surface, relief, couleur au recto et au verso).

Les critères microscopiques sont la taille du conidiophore (avec présence ou non d'une pigmentation ou d'échinulations), la taille et la forme de la vésicule, la présence ou non de métules, la taille/surface et pigmentation des conidies, l'existence ou non d'une reproduction sexuée (présence ou non de cléistothèces et de cellules en noisette ou « Hülle cells »).

N.B : En effet, pour certaines espèces, apparaissent parfois en culture des formations sexuées (stade téléomorphe). Ce sont des cléistothèces contenant des asques arrondis renfermant chacun 8 ascospores. Les « Hülle cells », ou cellules en noisette, sont des formations arrondies, réfringentes, à paroi épaisse, qui accompagnent souvent les formes sexuées, mais qu'on peut également observer isolément, indépendamment de la reproduction sexuée. De plus, un des critères principaux repose sur l'aspect général de la tête aspergillaire, notamment sur l'implantation des phialides sur la vésicule : tête en colonne (phialides disposées seulement sur la partie

	<i>A. fumigatus</i>	<i>A. flavus</i>	<i>A. niger</i>	<i>A. nidulans</i>	<i>A. terreus</i>	<i>A. versicolor</i>	<i>A. repens</i>
Aspect macroscopique	Recto: blanc puis vert, vert-gris puis vert foncé à gris-noirâtre	Recto: duveteux à poudreux, blanc puis jaune à jaune-vert	Recto: blanc-jaune, puis granuleux et noirâtre	Recto: duveteux à poudreux, vert foncé à jaunâtre	Recto: duveteux à poudreux, beige à cannelle	Recto: ocre puis de couleur variée (jaune, ocre, vert, ...)	Recto: velouté à poudreux, vert, cannelle ou brun-orange
	Verso: incolore, jaune, vert ou brun-rouge	Verso: incolore, rosé à brun rouge foncé	Verso: incolore à jaune pâle	Verso: rougeâtre, pourpre	Verso: jaune à brun-orange	Verso: incolore ou jaune à brun-rougeâtre	Verso: incolore
Tete aspergillaire	Unisériée, en colonne	Uni ou bisériée, radiée	Bisériée, radiée	Bisériée, en colonne courte	Bisériée, en colonne longue	Bisériée, radiée	Unisériée, radiée ou en colonnes lâches
Conidiophore	Court (300µm), lisse, incolore	Long (jusqu'à 2,5 mm), souvent verruqueux	Long (1,5-3 mm), large (15-20 µm)	Court (75-100 µm), sinueux	100-250 µm	Long (500-700 µm)	Long (500 à 1000 µm)
	Evasement progressif (aspect en massue)	Incolore, à parois épaisses	Lisse, incolore à brun	Brun, lisse	Lisse, incolore	Lisse, jaunâtre	Lisse, incolore
Vésicule	Hémisphérique (20-30 µm), phialides au sommet	Sphérique (25-45 µm)	Sphérique (30-100 µm)	Hémisphérique (8-10 µm)	Hémisphérique (10-15 µm)	Ovale (12-16 µm)	Ronde (6-8 X 3-5 µm de diamètre)
Conidies	Rondes (2,5-3 µm), vertes, échinulées ou lisses	Grosses (3,5-4,5 µm), globuleuses, vert-pâle, échinulées	Grosses et globuleuses (3,5-5 µm), brunes, échinulées	Globuleuses (3-3,5 µm), vertes, échinulées	Petites (1,5-2,5 µm), lisses, rondes ou elliptiques	Globuleuses (2-3,5 µm), échinulées	Globuleuses ou ovales (5-6 µm), échinulées
Forme Sexuée				Cléistothèces, asques, ascospores, cellules en noisettes			Cléistothèces, asques, ascospores

Figure 5

Récapitulatif des critères discriminants macroscopiques et microscopiques des principales espèces aspergillaires

D'après Bouchet *et al.* 1989

supérieure de la vésicule) ; ou tête ronde, radiée (phialides insérées sur tout le pourtour de la vésicule).

11. Les principales espèces d'*Aspergillus* impliquées dans les aspergilloses

Dans ce paragraphe, l'essentiel des informations est tiré des travaux de Badillet *et al.* 1987b, Botton *et al.* 1990, Chabasse *et al.* 2002.

11.1 *Aspergillus fumigatus* (Fresenius 1863)

C'est l'agent le plus fréquemment rencontré dans les aspergilloses humaines et animales. Sur le plan morphologique, il se distingue des autres espèces d'*Aspergillus* par la couleur de ses colonies à maturité, par l'évasement progressif du conidiophore à son sommet, et par ses têtes unisériées en colonnes. De plus, contrairement aux autres espèces, il est capable de se développer à 45°C.

Répartition, fréquence, habitat

Cette espèce est retrouvée partout dans le monde, mais plus particulièrement dans les régions tropicales et subtropicales. De plus, sa bonne tolérance aux températures élevées peut expliquer l'abondance de cette moisissure dans les composts et autres matériaux de nature organique dans lesquels interviennent des phénomènes de décomposition avec élévation de température (silos à grains, foins en balle, arachides, bagasses). Cette espèce est retrouvée communément dans le sol et l'atmosphère, où elle occupe la deuxième place après les espèces de la série des *Aspergillus glaucus*, avec une fréquence accrue pendant les mois d'hiver.

Caractères culturaux/ Aspect macroscopique

La croissance est rapide, les colonies atteignent 4 à 5 cm en une semaine sur milieu de Czapek. On observe alors un mycélium extensif hyalin, plus ou moins immergé dans la gélose. Après maturation des structures conidiogènes, la surface de la colonie (soit le recto) se colore en vert bleuté, puis vert foncé, et plus tardivement en gris-vert foncé (cette coloration est

caractéristique de l'espèce) et prend une texture superficielle rase à poudreuse, voire cotonneuse, avec de courtes mèches mycéliennes blanches. Certaines souches peuvent présenter une texture feutrée ou même floconneuse moins caractéristique. Le revers de la colonie (soit le verso) est incolore, jaune, vert ou brun-rouge suivant les souches. Cette espèce est clairement thermophile. Elle a une croissance très rapide à 37°C (24 à 48h). Cependant l'optimum thermique est à 40-42°C, mais il se développe très bien à 45°C et pousse jusqu'à 57°C. Par contre, cette espèce ne pousse pas en présence d'actidione.

Morphologie microscopique

La multiplication de cette espèce est végétative. Il n'y a pas de reproduction sexuée connue, ni présence de « Hülle cells ». On observe alors des têtes conidiennes typiques, en forme de colonnes plus ou moins allongées, unisériées. Les conidiophores érigés sont produits directement par des hyphes végétatives basales et par des hyphes aériennes. Ils présentent une paroi lisse, colorée en vert-brun, surtout au niveau de la partie terminale. Ils mesurent 300 µm de long et 5 à 6 µm de large. Les conidiophores s'élargissent progressivement pour donner la vésicule (20 à 30 µm), qui est aussi pigmentée (la coloration s'accroît également de la base au sommet). La vésicule n'est donc pas nettement individualisée par rapport au conidiophore. Elle porte directement, à sa partie supérieure plus ou moins hémisphérique, de nombreuses phialides disposées de façon parallèle à l'axe du conidiophore. Ces phialides sont donc dressées et très groupées. Les conidies ou phialospores, sont verdâtres, échinulées, globuleuses ou subglobuleuses et finement verruqueuses. Leur taille réduite (2 à 3 µm) les range parmi les plus petites du genre *Aspergillus* (figure 6).

11.2 *Aspergillus flavus* (Link 1809)

Il est un agent responsable d'aspergillose pulmonaire ou généralisée chez l'immunodéprimé. D'un point de vue morphologique, il se distingue des

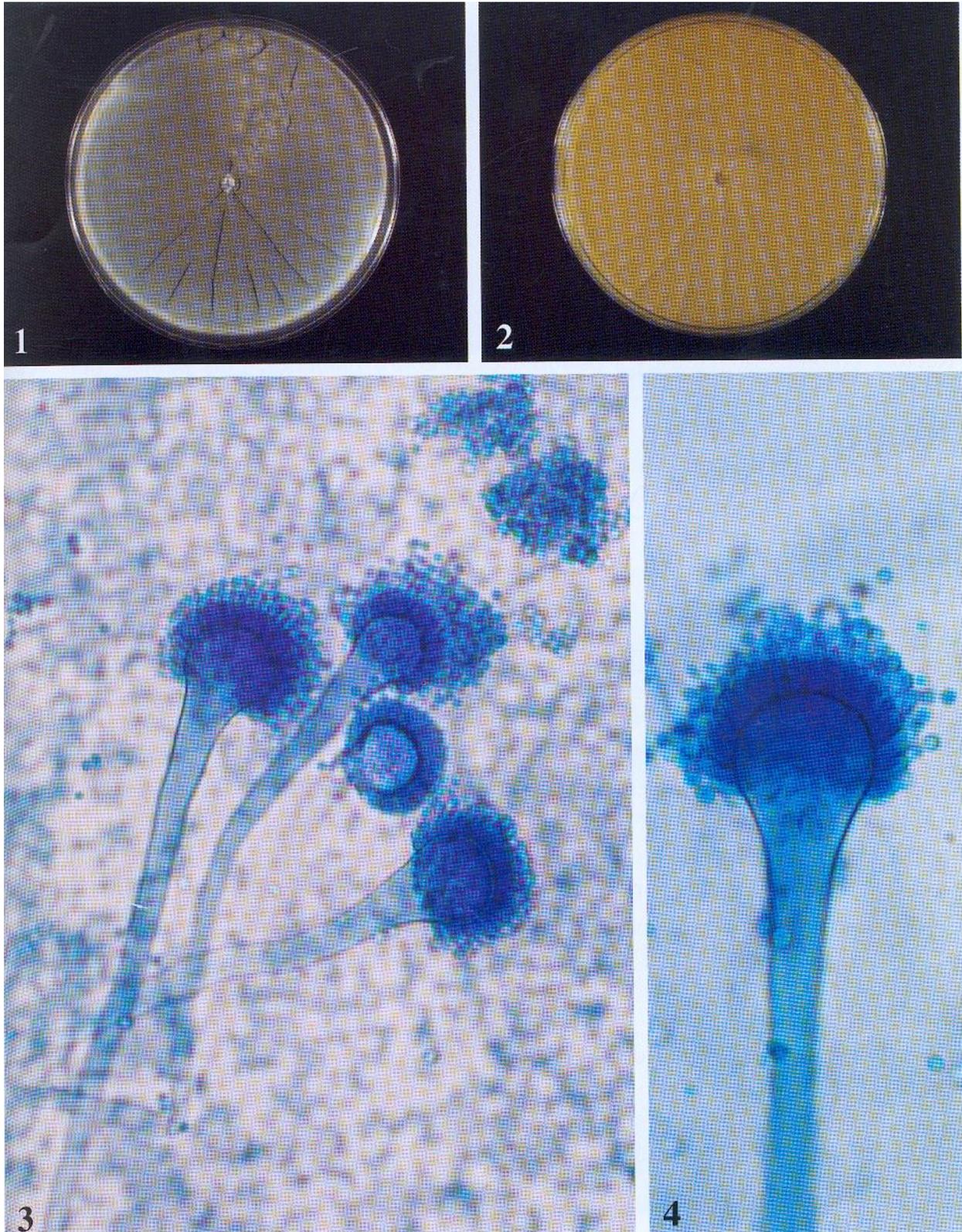


Figure 6 : *Aspergillus fumigatus*

Culture sur gélose de Sabouraud à 8 jours : (1) (2)

Têtes aspergillaires : objectif 20 (3), objectif 30 (4)

(Chabasse *et al.* 2002)

autres espèces d'*Aspergillus* par la couleur vert-jaune de ses colonies et par ses conidiophores à paroi verruqueuse.

Répartition, fréquence, habitat

Ce champignon est présent dans toutes les régions du globe, mais on le trouve plus fréquemment dans les zones tropicales et subtropicales. En France, il figure cependant parmi les espèces les plus rencontrées. On le trouve dans différents types de sols, et plus particulièrement dans les sols cultivés. Dans les zones tropicales, il se développe dans le fruit de l'*Arachis hypogea* (Arachide), c'est pourquoi une attention toute particulière doit être accordée à la contamination des produits alimentaires qui en dérivent, car de nombreuses souches peuvent produire des aflatoxines. Ce champignon se développe également souvent sur les graines de céréales (maïs, avoine...).

Caractères culturaux/ Aspect macroscopique

Ce champignon est facilement isolé sur milieu de Sabouraud. Sur milieu de Czapek, les colonies sont typiquement vert-jaune (d'abord blanche, puis jaune, et enfin vert-jaune). Leur aspect est généralement granuleux dans les zones centrales et plus poudreux en périphérie. Le verso est de couleur variable puisque, selon les isolats, il est presque incolore, rosé, ou brun-rouge. Cette espèce a une croissance rapide (2 à 3 jours). Il se développe entre 10 et 42°C (voire 48°C exceptionnellement) avec un optimum thermique à 37°C. Son développement est inhibé par l'actidione.

Morphologie microscopique

La multiplication de cette espèce est végétative. Il n'y a pas de reproduction sexuée connue, ni présence de « Hülle cells ». On observe alors des structures conidiogènes (ou conidiophores) qui se développent rapidement à partir du mycélium végétatif incolore. Ces structures sont caractérisées par un filament dressé appelé stipe. Ce stipe (700 à 1000 µm de longueur) possède une paroi épaisse, hyaline et verruqueuse surtout vers la zone supérieure qui se termine par une vésicule sphérique de 10 à 60 µm de

diamètre. Les cellules conidiogènes (ou phialides) sont, soit insérées directement sur la vésicule, soit portées par des métules. Dans une même colonie, on peut observer les deux types, parfois sur la même vésicule. Les conidies sont produites en longues chaînes qui forment une structure irrégulièrement radiée. Elles sont typiquement de couleur vert-jaune, globuleuses à subglobuleuses, échinulées, et mesurent 3,5 à 4,5 µm de diamètre. La tête aspergillaire est donc unisériée ou bisériée, mesure 300 à 400 µm de long, est radiée puis se scinde en plusieurs colonnes sporales mal individualisées (figure 7).

11.3 *Aspergillus niger* (Van Tieghem 1867)

Ce champignon peut provoquer chez le sujet non immunodéprimé des aspergillomes, mais aussi des otites ou des sinusites. On le rencontre plus rarement chez l'immunodéprimé, où il est responsable d'infections cutanées, pulmonaires ou généralisées. Au niveau morphologique, il se caractérise par des têtes aspergillaires radiées, bisériées, noires à maturité.

Répartition, fréquence, habitat

Cette espèce est extrêmement commune dans le monde entier. Ce champignon est omnivore et peut contaminer les substrats les plus divers. Toutefois, dans nos régions tempérées, on observe un pic atmosphérique en été, qui peut s'expliquer par son affinité pour les plantes herbacées.

Caractères culturaux/ Aspect macroscopique

Ce champignon croît facilement sur milieu de Czapek, une colonie peut atteindre 3 à 4 cm en 10 jours, avec le mycélium extensif hyalin en grande partie immergé dans la gélose. Les colonies apparaissent d'abord blanches, puis jaunes, et enfin granuleuses noires. En effet, ce champignon produit également du mycélium aérien blanc et de très nombreuses structures sporifères érigées, pulvérulentes, brun-noir, qui sont généralement disposées en cercles concentriques. Le verso est incolore à jaune. Un exsudat jaune pâle peut être produit en toutes petites gouttelettes. Cette

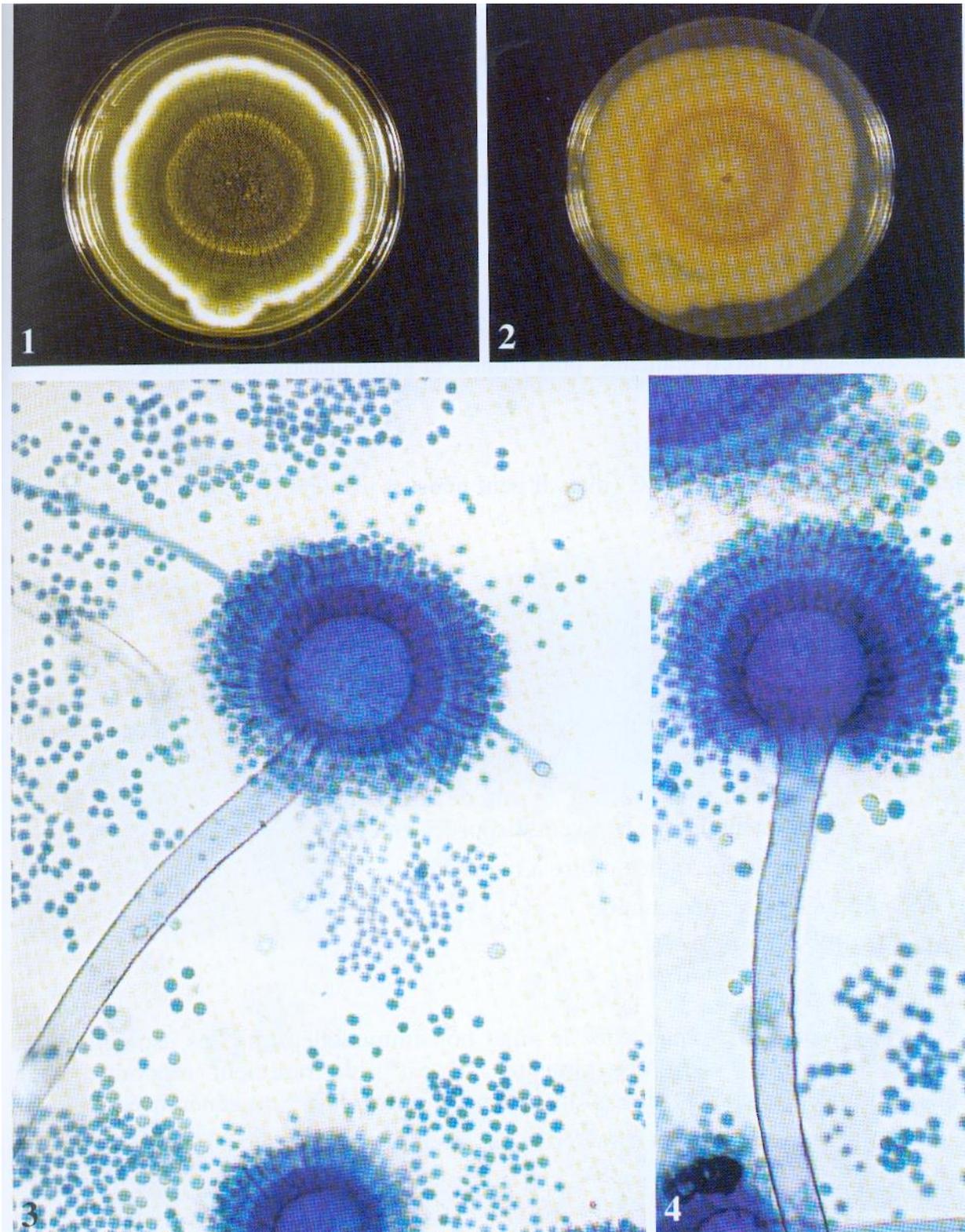


Figure 7 : *Aspergillus flavus*

Culture sur gélose de Sabouraud à 8 jours (1) (2)

Têtes aspergillaires : objectif 40 (3) (4)

(Chabasse *et al.* 2002)

espèce a une croissance rapide, avec un optimum thermique compris entre 25 et 30°C, mais il peut pousser jusqu'à 42°C. Son développement est aussi inhibé par l'actidione.

Morphologie microscopique

La multiplication de cette espèce est végétative. Il n'y a pas de reproduction sexuée connue, ni présence de « Hülle cells ». On observe alors des têtes conidiennes larges, brun-rouge très sombre à noir, tout d'abord sphériques et secondairement radiées. Elles sont portées par de longs conidiophores (1,5 à 3 mm de long) qui présentent une paroi épaisse, lisse et incolore. La vésicule est globuleuse, brune, et de grande taille (40 à 70 µm de diamètre). Les phialides, très serrées, sont insérées sur la vésicule par l'intermédiaire de métules disposées sur tout le pourtour de la vésicule. Métules et phialides sont légèrement teintées de brun. Les conidies sont produites en très longues chaînes qui, au fil du temps, ont tendance à se regrouper en plusieurs colonnes compactes. Elles sont typiquement globuleuses, brunes, échinulées à très verruqueuses, et mesurent 3,5 à 5 µm de diamètre. La pigmentation n'est pas répartie de façon uniforme sur toute la surface de la conidie, mais correspond à des granulations ornementales regroupées en crêtes irrégulièrement distribuées. La tête aspergillaire est donc bisériée radiée, et noire à maturité (figure 8).

11.4 Aspergillus nidulans (Eidam/Winters 1884)

Ce champignon peut provoquer des sinusites ou même des infections pulmonaires chez le sujet immunodéprimé. Il se distingue des autres *Aspergillus* par différents facteurs. Tout d'abord par l'existence d'une reproduction sexuée, et par la présence de « Hülle cells ». Puis également par ses colonies vert foncé à revers rougeâtre, ses conidiophores courts et bruns, et ses têtes en colonne bisériées.

Répartition, fréquence, habitat

L'*Aspergillus nidulans* est isolé du sol, de l'air et de divers substrats végétaux.

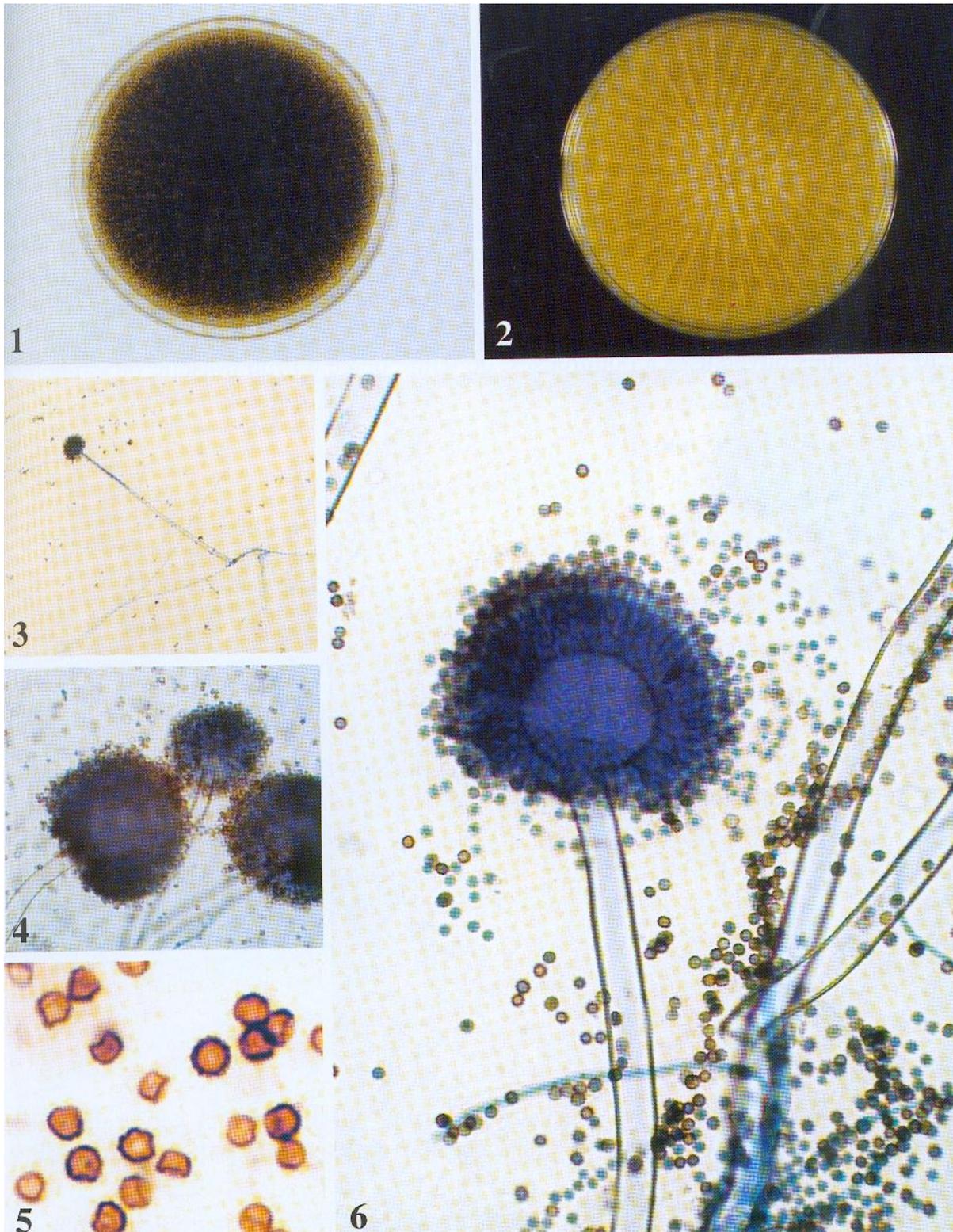


Figure 8 : *Aspergillus niger*

Culture sur gélose de Sabouraud à 8 jours : (1) (2)

Têtes aspergillaires : objectif 4 (3), 20 (4), 40 (6), 100 (5)

(Chabasse *et al.* 2002)

Caractères cultureux/ Aspect macroscopique

La croissance est rapide, notamment sur milieu de Czapek où une colonie peut atteindre 5 à 6 cm de diamètre en deux semaines. La colonie apparaît duveteuse voire poudreuse ; elle a une couleur habituellement vert foncé ou vert cresson, avec une marge blanchâtre qui correspond à la zone d'extension. Après 3 ou 4 semaines de culture, des granulations de couleur crème voire jaunâtre apparaissent, en nombre variable, au sein du tapis vert. Ces formations correspondent à la reproduction sexuée, contrairement aux zones vertes qui concernent la reproduction asexuée. Le verso de la colonie est coloré en rouge-pourpre. L'optimum thermique pour la croissance est compris entre 25 et 30°C, mais le champignon pousse également à 37°C. Sa croissance est également inhibée par l'actidione.

Morphologie microscopique

➤ Forme asexuée

Les têtes conidiennes forment des colonnes évasées vers l'extérieur. Elles sont portées par des conidiophores courts (75 à 100 µm de long), bruns, lisses, sinueux. La vésicule est sphérique, brune et petite. Elle possède des métules insérées uniquement sur l'hémisphère supérieur, qui portent les phialides. Les conidies sont rondes (3 à 5 µm de diamètre), vertes, échinulées et souvent disposées en chaînes. La tête aspergillaire est donc bisériée en colonne, courte et compacte.

➤ Forme sexuée

Cette moisissure est homothallic et donne le plus souvent la forme sexuée *Emericella nidulans* dans les mêmes cultures que la forme asexuée. On observe des cléistothèces globuleux (100 à 300 µm de diamètre), brun-orangé à maturité, à paroi bien délimitée. Ils renferment de nombreux ascus octosporés. Les ascospores rouge-vif, sont ornementées de deux crêtes équatoriales. On observe également chez ce champignon la présence de « Hülle cells », ou cellules dites en

noisette. Ces cellules arrondies de 10 à 20 µm de diamètre, ont une paroi épaisse et réfringente. Elles sont disposées autour des cléistothèces ou de façon éparse sur le mycélium végétatif. La fonction de ces cellules est encore à ce jour inconnue (figure 9).

11.5 *Aspergillus terreus* (Thom 1918)

Il peut être à l'origine d'aspergilloses pulmonaires et cérébrales chez le sujet immunodéprimé. Il est souvent isolé des expectorations chez les patients atteints de mucoviscidose. Au niveau morphologique, il se distingue des autres espèces d'*Aspergillus* par la couleur brun-cannelle de ses colonies, par ses têtes aspergillaires en colonnes et par l'existence de conidies solitaires à base tronquée qui sont produites directement sur le mycélium.

Répartition, fréquence, habitat

Ce champignon est essentiellement tellurique, très fréquent dans les terres arables des régions chaudes. Il est moins commun dans les sols forestiers, et exceptionnel dans les sols acides. Il est rare dans les régions froides et tempérées. On le retrouve également sur les débris végétaux, la paille, le coton, ou sur les grains stockés dans de mauvaises conditions.

Caractères culturaux/ Aspect macroscopique

Il pousse très rapidement sur tous les milieux usuels. Sur le milieu de Czapek, les colonies peuvent atteindre 4 à 5 cm de diamètre en une dizaine de jours. Le mycélium est ras et incolore. Après sporulation les colonies deviennent duveteuses à poudreuses, et sont de teinte beige à brun-noisette caractéristique. Le verso des colonies est incolore ou jaune à brun-orange. Certaines souches produisent un exsudat abondant de couleur ambrée. L'optimum thermique est compris entre 25 et 30°C, mais le champignon pousse aussi à 37°C. Contrairement aux autres espèces décrites précédemment, la croissance est possible en présence d'actidione.

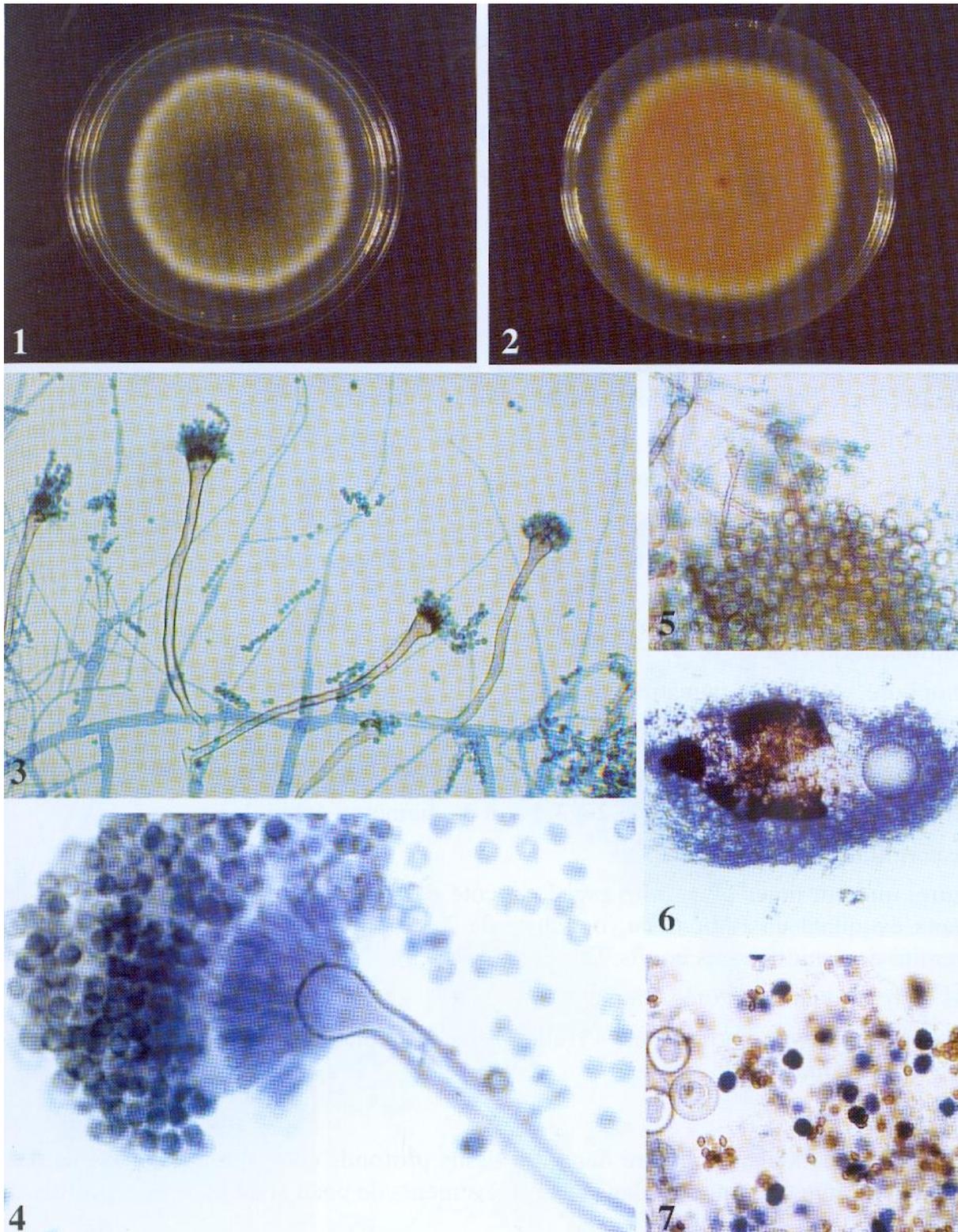


Figure 9 : *Aspergillus nidulans*

Culture sur gélose de Sabouraud : (1) (2)

Têtes aspergillaires : objectif 4 (6), 10 (5), 20 (3), 100 (4) (5) (7)

(Chabasse *et al.* 2002)

Morphologie microscopique

La multiplication de cette espèce est végétative. Il n'y a pas de reproduction sexuée connue, ni présence de « Hülle cells ». Les têtes conidiennes forment des colonnes compactes et de diamètre uniforme, qui peuvent atteindre jusqu'à 500 µm de long. Les conidiophores sont incolores, parfois jaune-pâle. Leur paroi est lisse et se termine par une vésicule asymétrique. La vésicule est en forme de cône du « côté conidiophore » et en forme de dôme « côté extérieur ». Toute la surface arrondie (donc supérieure) de la vésicule porte des métules en rangées serrées, qui portent à leur tour des phialides fines et très régulières. Les conidies sont de petite taille (1,5 à 2 µm), lisses, globuleuses à légèrement elliptiques. On observe aussi des aleuries solitaires rondes ou ovales, de 6 à 7 µm de diamètre, à base tronquée, qui se forment directement sur le mycélium latéralement et en profondeur (figure 10).

11.6 Aspergillus versicolor (Vuillemin/ Tiraboschi 1929)

On le retrouve exceptionnellement dans les tissus profonds chez le sujet immunodéprimé. Cependant, on l'isole souvent à partir de prélèvements de peau et de phanères. Il est donc parfois responsable d'onychomycoses. Il est aussi mentionné pour être un carcinogène hépatique et rénal. Au niveau morphologique, il se distingue des autres *Aspergillus* par la polychromie de ses colonies et par la présence de pinceaux associés aux têtes aspergillaires.

Répartition, fréquence, habitat

C'est une espèce cosmopolite. Elle est cependant plus fréquente dans les zones tempérées et froides. On la retrouve dans l'atmosphère, mais aussi dans de nombreux types de sols, sur des débris végétaux, ou différentes graines. Certaines souches produisent des toxines comme la stérigmatocystine ou l'acide cyclopiaxonique.

Caractères cultureux/ Aspect macroscopique

Ce champignon a une croissance plutôt lente. Sur milieu de Czapek, la colonie atteint 1 à 2 cm en une dizaine de jours. Toutefois la croissance est

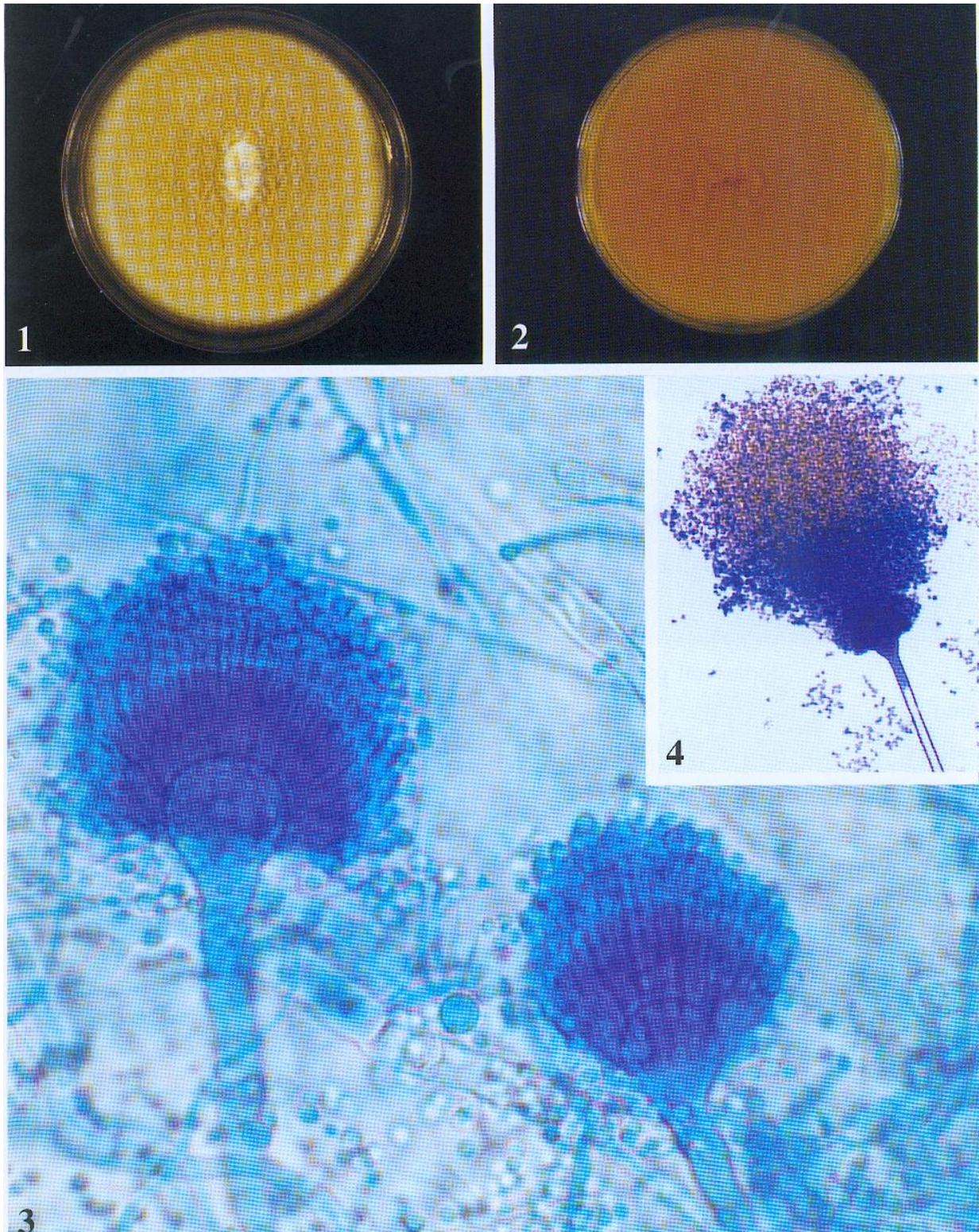


Figure 10 : *Aspergillus terreus*

Culture sur gélose de Sabouraud à 8 jours (1) (2)

Têtes aspergillaires : objectif 10 (4), objectif 40 (3)

(Chabasse *et al.* 2002)

plus rapide sur milieu au malt. Le mycélium a une surface veloutée avec quelques zones à aspect poudreux. La couleur de la colonie varie selon les souches, les zones et l'âge du champignon. Ces colonies peu extensives sont d'abord blanches puis de couleurs variées : rosée, jaunâtre, ocre ou verte, parfois sur la même colonie. Le verso de la colonie varie aussi : il peut être incolore, jaune ou rouge. L'optimum thermique pour la croissance est de 25 à 30°C ; cependant ce champignon peut pousser de 4 à 40°C. La croissance du champignon est inhibée par l'actidione. Toutefois, certaines souches y sont résistantes.

Morphologie microscopique

La multiplication du champignon est végétative. Il n'y a pas de reproduction sexuée connue. Toutefois, on peut observer de temps en temps des « Hülle cells » semblables aux cellules en noisette d'*Emericella nidulans*. Les conidiophores sont caractérisés par des filaments dressés (stipes). Ils ont une paroi lisse et sont incolores à jaunes. Ils mesurent entre 500 et 700 µm de long et se terminent par une vésicule de forme ovale. Cette vésicule (12 à 16 µm de diamètre) porte sur toute sa surface des métules, qui portent elles-mêmes les phialides. Ces phialides produisent de longues chaînes de conidies globuleuses, échinulées, de 2 à 3 µm de diamètre. Les têtes aspergillaires sont donc bisériées, radiées. En outre, on a observé à côté des têtes aspergillaires, la présence de pinceaux évoquant un *Penicillium*, c'est-à-dire des bouquets de 2 à 3 phialides disposées en verticilles à l'extrémité de conidiophores courts, fins et cloisonnés (figure 11).

11.7 *Aspergillus repens*, groupe *glaucus* (Link 1809)

Ce champignon est plus rarement pathogène ; cependant il peut être responsable d'atteintes pulmonaires ou généralisées chez le sujet immunodéprimé. Au niveau morphologique, les espèces du groupe *glaucus* sont caractérisées par la couleur verte de leurs colonies, avec un centre jaune lié à la présence de cléistothèces.

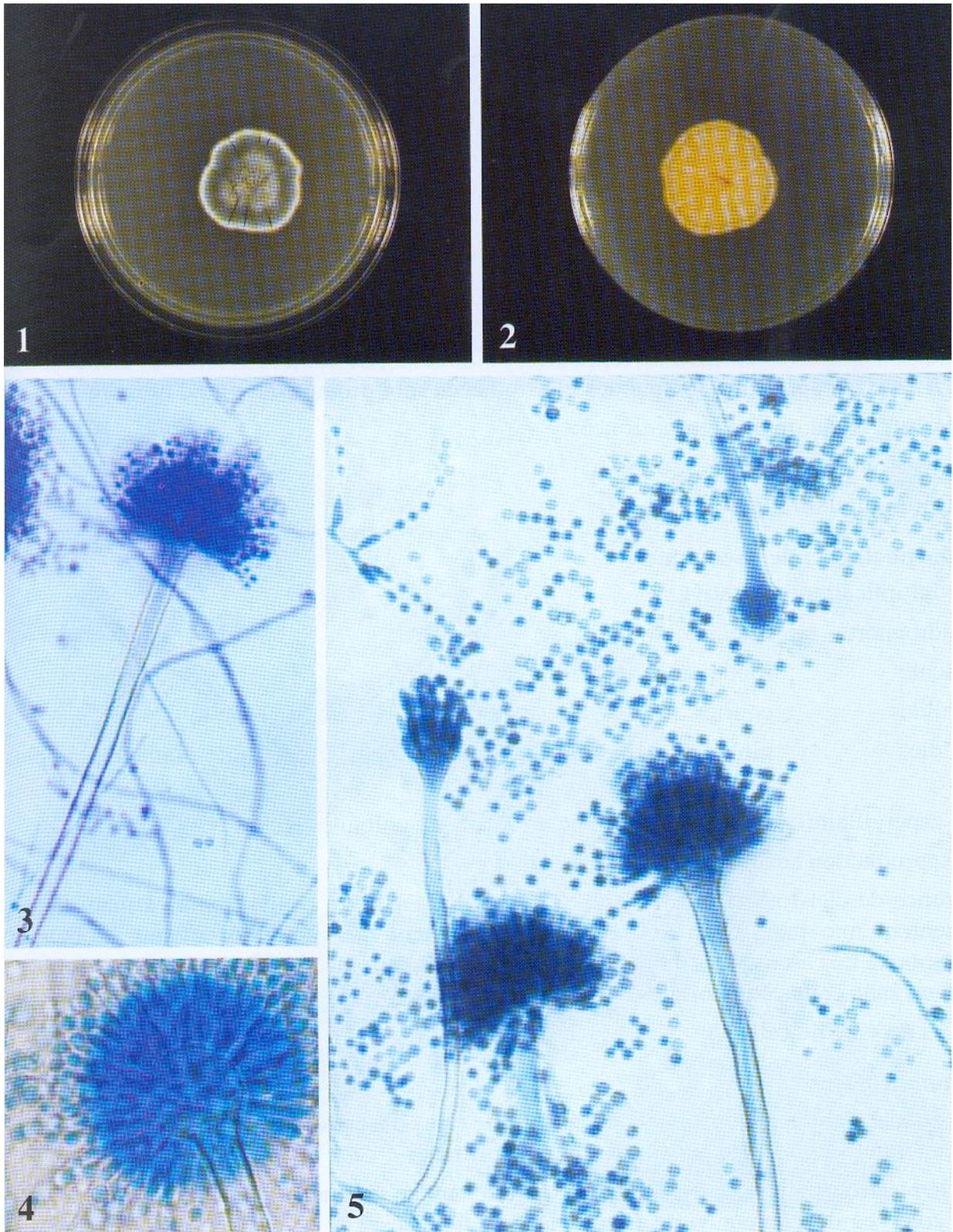


Figure 11 : *Aspergillus versicolor*

Culture sur gélose de Sabouraud à 8 jours : (1) (2)

Têtes aspergillaires : objectif 40 (3) (5), objectif 100 (4)

(Chabasse *et al.* 2002)

Répartition, fréquence, habitat

Aspergillus repens est l'une des espèces du groupe *glaucus* les plus fréquentes. Ce champignon est cosmopolite, malgré une prédominance dans les zones tropicales et subtropicales. En France, on l'isole de façon sporadique dans l'atmosphère, mais on le trouve également dans les sols, sur diverses plantes, ou même sur des fruits ou céréales après leur récolte. Il peut donc contaminer directement des produits alimentaires, et du fait qu'il produit diverses toxines, il peut donc être responsable d'intoxication.

Caractères culturaux/ Aspect macroscopique

Ce champignon a une vitesse de croissance variable. Par contre, on peut observer une augmentation de cette vitesse de croissance sur les milieux enrichis en glucides, notamment en saccharose. Les colonies apparaissent peu extensives, planes, poudreuses et de couleur verte. On observe des sphères jaunes qui apparaissent lorsque les cléistothèces sont produits en grande quantité. Le verso de la colonie est jaune, orange voire marron. L'optimum thermique pour la croissance de ce champignon est compris entre 25 et 30°C, mais il pousse jusqu'à 40°C. L'actidione inhibe le développement de cet *Aspergillus*.

Morphologie microscopique

➤ Forme asexuée

Les conidiophores sont dispersés sur toute la colonie. A partir des hyphes végétatives apparaissent des filaments dressés (stipes) de 500 à 1000 µm de long. Leur paroi est épaisse, lisse et incolore. La vésicule est ronde et porte directement des phialides courtes et trapues. Les conidies sont globuleuses ou ovales, assez grandes, et le plus souvent échinulées. Les têtes aspergillaires sont donc unisériées, radiées ou en forme de colonnes lâches.

➤ Forme sexuée

Cette forme est caractérisée par la présence de cléistothèces de 75 à 200 μm de diamètre. Ils sont de couleur jaune, ont une paroi bien délimitée, et contiennent de nombreux asques globuleux, octosporés. Les ascospores sont unicellulaires, incolores à jaune, de forme lenticulaire avec ou sans crêtes équatoriales. Par les caractères précédents, ce champignon peut également être classé parmi les Ascomycètes, de l'ordre des Eurotiales ; dans ce cas on le nomme *Eurotium repens*. Il occupe alors avec *A. nidulans*, une double place dans la classification (figure 12).

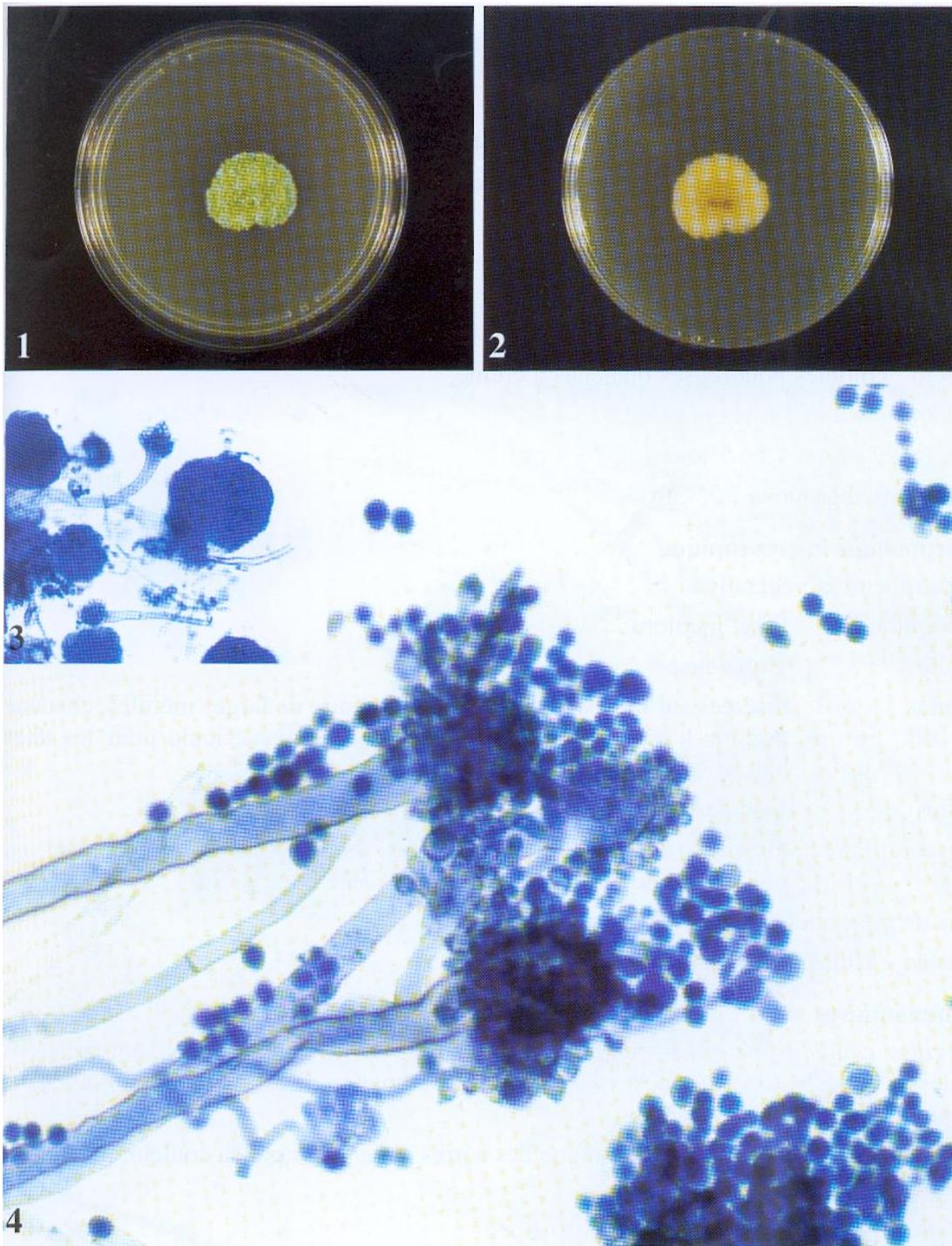


Figure 12 : *Aspergillus* du groupe *glaucus*

Culture sur gélose de Sabouraud à 8 jours : (1) (2)

Têtes aspergillaires : objectif 10 (3), objectif 100 (4)

(Chabasse *et al.* 2002)

Chapitre 2

Enjeu et problématique des infections fongiques à *Aspergillus*

Dans ce chapitre, après avoir défini le contexte pré-clinique des infections aspergillaires et après avoir expliqué l'action pathogène du champignon, nous aborderons dans un premier temps les défenses pulmonaires antifongiques, et ensuite nous présenterons la relation hôte/parasite. L'essentiel des informations de ce chapitre provient des travaux rapportés dans Anonyme 2002, notamment toutes les études présentées dans ce chapitre.

Pour les *Aspergillus*, la contamination se fait essentiellement par inhalation de spores présentes dans l'atmosphère, d'où la localisation initiale pulmonaire retrouvée dans 80% des cas d'aspergilloses profondes, les 20% restants étant quasi essentiellement des aspergilloses invasives à point de départ sinusien. Les spores inhalées sont capables de germer dans les alvéoles pulmonaires sous certaines conditions et grâce à certains mécanismes régulateurs. Cependant, beaucoup plus rarement, la contamination directe par déposition de spores sur la peau abîmée, telles des plaies ou brûlures, ou un site opératoire, peut aboutir à des infections d'abord locales mais à risque de dissémination en fonction du contexte clinique. Des infections localisées, post-traumatiques ou pas, peuvent aussi résulter d'une contamination directe et atteindre la peau, les ongles, le conduit auditif externe ou la cornée. Encore plus rarement, la contamination est d'origine digestive (Desoubeaux et Chandenier 2010a).

La sphère pulmonaire est donc le siège privilégié des infections à *Aspergillus*.

Dans tous les cas, l'atteinte respiratoire résulte de 3 paramètres :

- Le type et la quantité d'agents inhalés,
- L'état anatomique du poumon,
- Les défenses immunitaires de l'hôte.

En effet la colonisation de l'arbre trachéo-bronchique par un champignon passe par une inhalation de spores fongiques. Cette inhalation est une condition nécessaire, mais généralement non suffisante à l'infection, sauf lors d'une exposition massive qui peut aboutir à une infection aiguë. Mais souvent la mycose pulmonaire ne peut se développer qu'en cas d'environnement favorable chez l'hôte. De plus, on note que l'état anatomique du poumon modifie la réponse locale de l'hôte. La perte d'intégrité des épithéliums, notamment l'altération du tapis muco-ciliaire et les cavités préformées sont des facteurs favorisant les atteintes par *Aspergillus* (ANOFEL 2010).

La diminution des défenses immunitaires générales de l'hôte (que ce soit les polynucléaires neutrophiles ou les composants de l'immunité cellulaire) fait également partie des facteurs qui majorent la sensibilité au champignon et par conséquent la gravité de l'infection.

L'aspergillose, sous toutes ses formes, est une illustration des différences de réactions pathologiques entre le champignon et l'hôte. Les atteintes pulmonaires dues à l'*Aspergillus* sont nombreuses et variées. Leur type est fonction de l'état anatomique local et de l'état immunologique général.

Sur un terrain atopique, une allergie de type I sera responsable d'un asthme aspergillaire. Une allergie de type III sera responsable d'une aspergillose bronchopulmonaire allergique. Après une inhalation massive, une allergie de type IV sera responsable d'une alvéolite allergique extrinsèque ou pneumopathie d'hypersensibilité pouvant évoluer vers la fibrose. Une immunodépression locale (ex: diminution des macrophages due à une caverne détergée ou à des bronchectasies) sera responsable d'une colonisation aspergillaire avec formation d'un aspergillome. Si le champignon devient plus invasif localement, on pourra observer une trachéobronchite micro-invasive. Un déficit de l'immunité globale (corticothérapie prolongée, aplasie, greffe de moelle osseuse, SIDA, hémopathie maligne, neutropénie, traitement immunosuppresseur...) sera responsable d'une dissémination de l'*Aspergillus* au niveau du parenchyme pulmonaire mais aussi dans l'ensemble de

l'organisme. On parle alors d'aspergillose pulmonaire invasive. Elle se caractérise par la pénétration intra-tissulaire, et notamment intra-vasculaire pulmonaire du champignon qui sera responsable de nécroses aiguës ou extensives chroniques : aspergillose chronique nécrosante. La possible dissémination dans l'organisme provoquera des aspergilloses invasives extra-pulmonaires.

✓ Action pathogène du champignon *Aspergillus*

Elle se réalise selon diverses modalités :

- **Action mécanique** : les filaments mycéliens favorisent la dissociation cellulaire et l'étouffement des cellules. On observe un phénomène d'obstruction dans le cas de bronches de petits calibres et bronchioles.
- **Action irritative et inflammatoire** : ce qui aboutit à la formation de granulomes, ou d'inflammations exsudatives.
- **Action toxique locale** : on observe alors un phénomène de nécrose. La nécrose des parois vasculaires explique l'invasion des vaisseaux et la nécrose des foyers granulomateux aboutit à la formation de cavernes.
- **Action allergisante** : on observe des phénomènes d'hypersensibilité retardée qui expliquent certaines formes graves d'aspergillose. On a observé également des syndromes d'hypersensibilité de type I avec des symptômes respiratoires, du type rhume des foins ou asthme véritable, associés à des infiltrats éosinophiles pulmonaires.
- **Action antigénique** : les antigènes aspergillaires peuvent exercer un effet immunodéprimant.
- **Action protéasique** : suite à des microlésions de la membrane, certaines protéines de l'hôte ne seront plus masquées. Le champignon pourra alors se fixer dessus, ce qui entraînera une dégradation de ces molécules par des protéases fongiques. Ces exoprotéases peuvent aussi dégrader des protéines plasmatiques (fibrinogène) et ainsi interagir avec l'hémostase (risque hémorragique : hémoptysies) (Euzéby 1992).

1. Les défenses pulmonaires antifongiques

Le poumon est l'organe qui présente la plus grande surface épithéliale de l'organisme en contact avec l'extérieur. La surface de l'arbre respiratoire est très régulièrement en contact avec des agents pathogènes qui pénètrent par inhalation.

Physiologiquement, un système de défense très élaboré assure la stérilité des voies aériennes. Ce système doit être lui-même extrêmement contrôlé afin que les réponses immunes et inflammatoires locales ne produisent pas de processus cicatriciels qui pourraient altérer les structures pulmonaires et leurs fonctions. Les défenses anti-infectieuses sont établies sur la coopération interactive entre deux types d'immunité : l'immunité innée et l'immunité acquise spécifique.

L'immunité innée est responsable de l'élimination des agents pathogènes du poumon grâce au système phagocytaire dans lequel les macrophages et les polynucléaires neutrophiles jouent un rôle crucial. Le poumon dispose, en supplément des cellules phagocytaires et d'un certain nombre de médiateurs solubles, d'un élément qui lui est propre : le surfactant.

L'immunité acquise spécifique repose sur les réponses cellulaires et humorales montées par les cellules présentatrices d'antigènes et les lymphocytes (figure 13).

- L'immunité innée

Elle représente l'ensemble des moyens de défense naturels, non spécifiques à un micro-organisme donné. Elle permet la réponse inflammatoire. Les défenses cellulaires se font par l'intermédiaire des macrophages, des polynucléaires neutrophiles et des cellules *natural killers* (NK). Sa caractéristique essentielle est de ne pas posséder de mémoire. Elle ne varie pas en nature ni en identité, avec les présentations de l'antigène. Le rôle de cette immunité est d'empêcher la colonisation épithéliale par des agents infectieux et d'empêcher le passage de l'état de colonisation à l'état d'infection caractérisée. Elle permet l'élimination des agents pathogènes présents dans les alvéoles pulmonaires, grâce à

	Immunité innée	Immunité spécifique (adaptative)
Facteurs solubles	Lysozyme Système du complément Protéines de la phase aiguë : CRP, Interféron gamma, Cytokines (IL1, IL6)	Anticorps Médiateurs solubles
Cellules	Polynucléaires neutrophiles Macrophages, Cellules dendritiques, Cellules NK	Lymphocytes T et B spécifiques d'antigènes Cellules présentatrices de l'antigène

Figure 13

Immunité innée et Immunité acquise

(Anonyme 2002)

l'activation immédiate du système phagocytaire (macrophages et polynucléaires). Les acteurs cellulaires de l'immunité innée ont des propriétés différentes. En effet, certains sont dotés essentiellement d'un pouvoir phagocytaire et également d'un pouvoir de présentation antigénique. Ils reconnaissent les pathogènes grâce à des récepteurs à leur surface, notamment les carbohydrates qui sont des constituants de la paroi des champignons. Ils ont aussi des récepteurs pour les anticorps et pour le complément.

➤ Les cellules résidentes

Les macrophages alvéolaires résidents sont la première ligne de défense contre les agents infectieux. Au-delà de la phagocytose, ils jouent un rôle primordial dans l'orchestration des réponses inflammatoires et immunes en permettant le recrutement et l'activation locale des cellules qui y participent.

➤ Le recrutement cellulaire

Il représente la deuxième étape du processus de défense immunitaire pulmonaire avec l'activation des cellules inflammatoires au site de l'infection (basophiles, éosinophiles, mastocytes...). Cette étape est orchestrée par différents acteurs (figure 14), tout d'abord par des molécules d'adhésion exprimées à la fois au niveau des cellules inflammatoires et endothéliales sous l'effet des chémokines. Cet afflux concernera les polynucléaires neutrophiles et des cellules mononucléées : macrophages et lymphocytes. Une augmentation de l'adhérence des leucocytes aux cellules endothéliales, sous la dépendance de couples de molécules d'adhésion (intégrines, sélectines), permet leur diapédèse vers le site infectieux.

Les cellules phagocytaires adhèrent aux agents infectieux, soit directement par l'intermédiaire de récepteurs pour les carbohydrates, soit grâce à l'opsonisation de ces agents par des

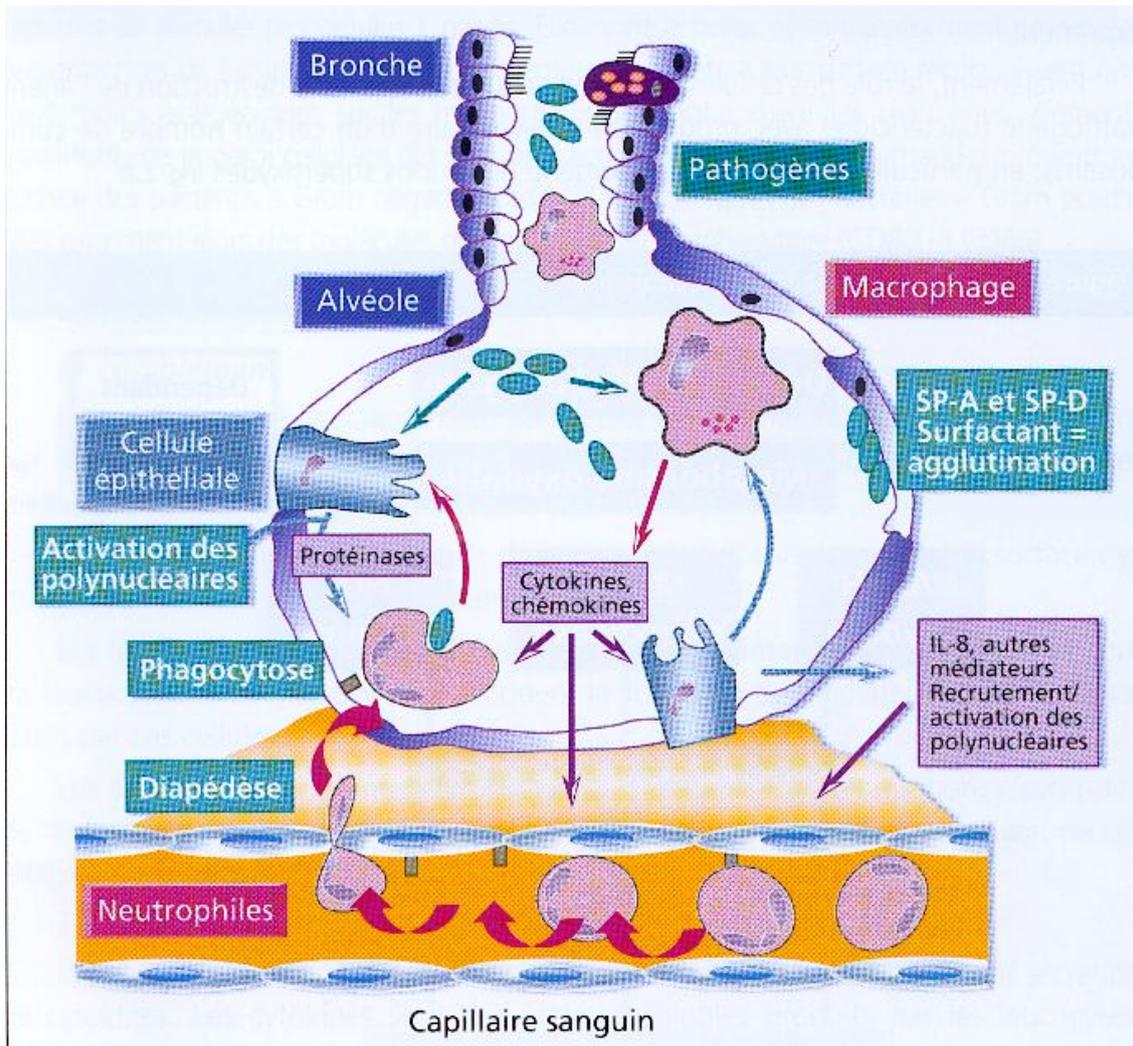


Figure 14

Recrutement cellulaire au niveau de l'alvéole pulmonaire

(Anonyme 2002)

anticorps ou par le complément (pour lesquels les cellules phagocytaires sont également dotées de récepteurs).

Sans spécificité non plus, les cellules NK détruisent les cellules infectées sans qu'elles aient été auparavant sensibilisées aux antigènes qu'elles expriment.

Les cellules dendritiques interdigitées jouent un rôle fondamental dans le développement et la régulation de l'immunité. Elles ont un rôle de «sentinelles» et sont des cellules présentatrices d'antigènes (CPA) capables de stimuler des cellules T naïves. Elles sont activées et transformées en CPA, lorsque les récepteurs présents à leur surface reconnaissent certains motifs antigéniques, comme les mannanes qui sont des éléments constitutifs de la paroi des champignons. Elles expriment alors des molécules de co-stimulation lymphocytaire. On peut alors dire qu'elles ont une fonction d'initiatrice de la différenciation des lymphocytes T et de l'acquisition des réponses T spécifiques.

➤ Les facteurs solubles

▪ Le complément

Il peut être activé directement au contact des parois microbiennes, le cas échéant par le complexe antigène-anticorps, ou encore par l'interaction des carbohydrates avec la *mannose-binding-protein* du plasma.

Le fragment C3b et son produit de dégradation le C3bi, se déposent à la surface des microorganismes et interviennent dans la phagocytose.

Les fragments C3a et C5a doués de propriétés chimiotactiques et activatrices pour les leucocytes et mastocytes, provoquent la libération de médiateurs pro-inflammatoires par ces cellules. Les éléments solubles interviennent dans l'opsonisation, c'est-à-dire qu'ils

renforcent la capacité phagocytaire (quand l'agent infectieux est recouvert de ces éléments).

- Les cytokines

Ce sont des médiateurs. En effet, les communications intercellulaires se font soit par contact direct, soit par sécrétion de cytokines. Ce sont des facteurs solubles produits par les leucocytes. On distingue les cytokines pro-inflammatoires produites essentiellement par les macrophages et les cytokines issues de la différenciation lymphocytaire.

- L'immunité acquise spécifique

Elle représente l'ensemble des moyens de défense spécifiques à un agent infectieux. Elle comprend la réponse cellulaire (activation des lymphocytes T) et la réponse humorale (activation des lymphocytes B). Contrairement à l'immunité innée, elle voit ses réponses augmenter en intensité et en spécificité, au fur et à mesure de la réintroduction du même antigène dans l'organisme. Il existe ici une mémoire immunitaire. Ce processus est possible grâce à la mobilisation et l'activation des lymphocytes T et B, de plus en plus spécifiques des antigènes grâce aux CPA (cellules dendritiques) et aux médiateurs solubles, dont certains sont issus de la différenciation lymphocytaire T. Les cytokines produites dans ce cadre sont essentielles. En effet, en l'absence d'activation (notamment par l'INF γ), les cellules phagocytaires ne peuvent effectuer la destruction effective du pathogène.

- La réponse T

Parmi la population des lymphocytes T, on distingue les CD8 qui ont un rôle classique de cellules cytotoxiques, et les CD4 qui se différencient en deux sous-populations aux fonctions radicalement différentes dont le rôle est précis dans le cadre des infections fongiques.

Les lymphocytes T différenciés suivant la voie Th1, sont des producteurs de médiateurs intercellulaires (notamment INF γ). Ce sont eux qui forcent les cellules phagocytaires à acquérir un pouvoir d'élimination des pathogènes préalablement phagocytés.

Les lymphocytes T différenciés suivant la voie Th2, sécrètent plusieurs cytokines. Ces Th2 s'opposent d'une part à la production bénéfique des cytokines Th1 et d'autre part, elles sont capables de désactiver directement les capacités de destruction des pathogènes des cellules phagocytaires.

En résumé, la voie Th1 accroît l'immunité cellulaire, l'activation des macrophages et leur capacité à tuer les cibles. Alors qu'à l'inverse, la voie Th2 régule négativement toutes les actions bénéfiques de la voie Th1 mises à profit dans les défenses antifongiques en particulier.

- **L'autre défense antifongique : le surfactant et ses protéines SP-A et SP-D**

Les alvéoles pulmonaires sont tapissées par une couche continue de cellules épithéliales de deux types : les pneumocystes I et II. Le surfactant, qui est sécrété par les pneumocystes II, s'étale dans la lumière alvéolaire et forme un film mono-moléculaire à l'interface air-liquide. Une fine couche liquidienne, l'hypophase, sépare ce film de la surface de l'épithélium. Au sein de l'hypophase, se trouvent les macrophages alvéolaires. Ce surfactant alvéolaire est constitué de 90% de phospholipides et de 10% de protéines. Il diminue la tension superficielle eau-air au niveau des alvéoles. Ses principales fonctions sont de diminuer la force de rétraction élastique liée à l'interface air-eau, de stabiliser les unités alvéolaires de tailles inégales, et de contribuer à l'équilibre des fluides intra-pulmonaires.

Les macrophages participent également à l'élimination de l'excédent de surfactant.

De plus, on observe au sein du surfactant, la présence de protéines particulières de la famille des collectines, dont le rôle est primordial. Ces protéines SP-A et SP-D (*pulmonary surfactant protein A et D*) ont la

propriété de reconnaître de façon sélective les carbohydrates membranaires de la paroi des champignons. Elles s'agglutinent alors avec les conidies d'*Aspergillus* et forment de larges complexes agglutinés, qui ensuite seront mis à la portée des macrophages alvéolaires.

Le surfactant a donc un rôle démontré dans les défenses innées anti-*Aspergillus*.

Les défenses pulmonaires antifongiques sont nombreuses et multifactorielles. Leurs compétences dépendent de l'existence d'une immunité innée intacte et efficace, mais dépendent également de la capacité d'une immunité fonctionnelle spécifique à se mettre en place (Anonyme 2002).

2. Relations hôte/parasite

- **Sujets immunocompétents**

Les spores d'*Aspergillus* parvenues dans l'organisme, le plus souvent par voie respiratoire, peuvent pénétrer jusqu'au niveau bronchiolo-alvéolaire grâce à leur petite taille (diamètre : 2 à 3 microns). Chez les individus sains, les spores sont donc ensuite phagocytées par les macrophages alvéolaires et les polynucléaires neutrophiles. Les cellules ciliées de la muqueuse bronchique font ensuite remonter les macrophages porteurs de spores jusqu'au pharynx, puis ils seront enfin éliminés par voie digestive. Si les spores ont toutefois pu germer, l'organisme immunocompétent peut encore se protéger grâce aux polynucléaires neutrophiles qui adhèrent aux spores et les détruisent par inoculation de protéases (cytotoxicité).

- **Sujets immunodéprimés**

Dans ce cas, l'activité phagocytaire est défaillante. Les spores peuvent alors germer et donner naissance à un mycélium pathogène. Ensuite le processus aspergillaire peut très facilement se disséminer par voie hématogène. Les hyphes envahissent alors facilement les vaisseaux

sanguins, et on peut donc observer des aspergilloses pluri-viscérales voire généralisées (Euzeby 1992).

En effet, l'existence, le type et le degré d'une immunodépression sous-jacente conditionnent l'incidence des aspergilloses invasives : incidence très élevée chez les neutropéniques ; incidence élevée chez les greffés notamment du cœur, de la moelle, ou du poumon ; incidence notable chez les patients atteints du SIDA.

➤ La neutropénie

Le rôle favorisant de la neutropénie chez les immunodéprimés a été mis en évidence rapidement. En effet, dans une étude regroupant 119 pneumopathies microbiologiquement identifiées chez des patients atteints d'hémopathie maligne, l'origine mycologique était de 30% lorsque le patient était neutropénique (polynucléaires neutrophiles $< 500/\text{mm}^3$), contre 13% chez le patient non-aplasique (polynucléaires neutrophiles $> 500/\text{mm}^3$), d'après Anonyme 2002 (figure 15).

➤ Les autres immunodépressions

Indépendamment de la neutropénie, les autres immunodépressions sont, elles aussi, à l'origine de mycoses pulmonaires. Comme en témoigne cette étude menée sur 324 patients immunodéprimés non-neutropéniques ayant une pathologie pulmonaire microbiologiquement documentée. Il faut cependant noter qu'au cours des tumeurs solides, en dehors de l'autogreffe de moelle, les mycoses pulmonaires étaient plus rares que dans les autres pathologies, d'après Anonyme 2002 (figure 16).

	PN < 500/mm ³ (n = 73)	PN > 500/mm ³ (n = 46)
Bacilles à Gram négatif	22 (30 %)	0
Champignons	22 (30 %)	6 (13 %)
Cocci à gram positif	11 (16 %)	5 (11 %)
Bactéries usuelles	9 (12 %)	15 (33 %)
Autres agents opportunistes	9 (12 %)	20 (43 %)

Figure 15

Etiologies des pneumopathies en fonction de la neutropénie

(Anonyme 2002)

Maladie sous-jacente	Bactérie	<i>Pneumocystis carinii</i>	Champignon	Virus
Hémopathie maligne	26	11	6 (13 %)	3
Greffe rénale	31	19	6 (10 %)	4
Collagénose	21	3	2 (7,5 %)	-
Greffe de moelle	25	7	2 (5 %)	6
Tumeur solide	18	1	1 (5 %)	-
Infection VIH	25	98	2 (1,5 %)	5 ?

Figure 16

Infections pulmonaires en fonction de la maladie sous-jacente

(Anonyme 2002)

➤ Les greffes d'organes

On observe que chez les patients ayant subi une greffe d'organe, l'incidence des infections fongiques invasives varie beaucoup en fonction du type de transplantation : entre 5 et 17% pour la greffe cardiaque, entre 14 et 22% pour la greffe cœur-poumon, entre 2 et 42% pour la greffe rénale, d'après Anonyme 2002.

Toutefois, les patients ayant subi une transplantation pulmonaire sont plus à même de développer une infection pulmonaire fongique (figure 17).

De plus, on a pu identifier certains facteurs de risque d'infection fongique, chez les patients greffés :

- Les fortes doses de corticoïdes
- Les multiples rejets
- L'hyperglycémie
- La mauvaise fonction du greffon
- La leucopénie
- L'âge avancé

➤ Les patients VIH

L'aspergillose pulmonaire invasive est une cause importante de décès chez les patients atteints du SIDA. Une augmentation attribuée à la durée de vie prolongée des patients ayant un taux de CD4 bas, et pour l'aspergillose, à l'utilisation de thérapeutiques pouvant entraîner une neutropénie et à l'utilisation plus fréquente des corticoïdes. Les mycoses pulmonaires invasives apparaissent le plus souvent, lorsque le taux de CD4 est inférieur à $50/\text{mm}^3$. Elles mettent en jeu le pronostic vital. L'obstacle à leur prise en charge précoce réside dans la difficulté du diagnostic chez ces patients sujets à de multiples et variées infections opportunistes, et notamment au niveau pulmonaire.

Type de greffe	Incidence de l'aspergillose (%)
Poumon	8,4
Moelle	6,4
Cœur	6,4
Foie	1,7
Rein	0,7

Figure 17

Aspergillose invasive en fonction du type de greffe

(Anonyme 2002)

Aujourd'hui, les variations d'incidences rapportées, résultent de facteurs d'augmentation d'incidence, comme l'élargissement des indications des médicaments immunosuppresseurs, ou l'augmentation de durée des immunodépressions induites. Mais elles résultent également de facteurs de baisse d'incidence, comme la diminution des séquelles de tuberculose, le recours à la trithérapie pour le SIDA, ou les mesures de prévention en hématologie.

Chapitre 3

Les manifestations cliniques de l'atteinte aspergillaire

Dans ce chapitre nous aborderons dans un premier temps les aspergilloses de l'appareil respiratoire, ensuite nous aborderons les aspergilloses immuno-allergiques, et enfin les aspergilloses extra-respiratoires. L'essentiel des informations de ce chapitre est tiré des travaux de Badillet *et al.* 1987b, Dupont 1981, Desoubeaux et Chandener 2010a.

1. Les aspergilloses de l'appareil respiratoire

1.1 L'aspergillose pulmonaire invasive (API)

Il s'agit de la forme la plus grave liée aux *Aspergillus*. Elle concerne essentiellement les sujets immunodéprimés, même si de très rares cas de sujets sains ont été décrits. En effet les patients présentant une agranulocytose ou une neutropénie sont les plus à risque. Mais d'autres immunodépressions profondes thérapeutiques, notamment la corticothérapie à forte dose ou les médicaments immunosuppresseurs, peuvent également favoriser une API, tout comme l'infection par le VIH. Ainsi plusieurs catégories de patients sont considérées à haut risque : les patients atteints d'hémopathie maligne, les transplantés (surtout pour les greffes de moelle), les sidéens, mais aussi les patients sous corticothérapie

ou chimiothérapie prolongée, ou encore les grands brûlés et les patients atteints de déficit immunitaire congénital (ANOFEL 2010).

Le pronostic est très mauvais, d'une part en raison de l'état très déficient du terrain qui a donné prise à cette infection opportuniste, d'autre part à cause du retard thérapeutique. Le diagnostic est en effet difficile et pourtant la précocité du traitement est un facteur important pour diminuer la mortalité.

Les filaments mycéliens prolifèrent d'abord à la surface et dans la lumière d'une bronche, puis la traversent et envahissent les tissus avoisinants, colonisant plus particulièrement les petits vaisseaux qu'ils thrombosent. Il en résulte un infarctus local. Quand le processus touche des vaisseaux de plus grande taille, c'est tout un segment pulmonaire qui est touché. De plus, l'invasion des capillaires peut permettre une diffusion hématogène de l'infection.

Les manifestations cliniques ne sont pas spécifiques : fièvre, toux, dyspnée, douleur thoracique. Elles ressemblent à celles d'une pneumopathie bactérienne, virale, parasitaire ou néoplasique, mais ne réagissent pas aux traitements spécifiques de ces maladies (Dupont 1981). Les opacités parenchymateuses radiologiques sont parfois d'apparition tardive. Les aspects les plus fréquents sont la broncho-pneumonie nécrosante qui est due à la prolifération fongique parenchymateuse et l'infarctus hémorragique par envahissement et thrombose vasculaire. Dans ce dernier cas, le début volontiers aigu avec douleur, frottement pleural et parfois hémoptysie fait souvent penser à une embolie pulmonaire. Les abcès aspergillaires peuvent prendre le relais d'un abcès bactérien à pyogènes (staphylocoque, pyocyanique). Les abcès miliaires sont comparables aux pneumonies bactériennes (Dupont 1981).

Les signes radiologiques sont des images d'infiltrats pulmonaires plus ou moins étendus, qui correspondent aux zones d'ischémie et qui sont parfois associés à des opacités sphériques ou triangulaires périphériques. Des images de cavitations secondaires au niveau de ces infiltrats peuvent être aperçues.

L'*Aspergillus* responsable peut être détecté dans les crachats ou dans le liquide de lavage broncho-alvéolaire, et après ponction transtrachéale. Seule la biopsie pulmonaire mettant en évidence les filaments *in situ*, représente une preuve formelle de l'existence d'une API. L'aspergillose pulmonaire invasive est de très mauvais pronostic car elle touche des patients fragilisés et fortement immunodéprimés. Le diagnostic et les traitements antifongiques sont souvent trop tardifs. La mortalité globale de l'API est très élevée, de 60 à 95% selon les études. Les tests disponibles ne permettent pas toujours de prouver l'infection aspergillaire de façon formelle et un traitement antifongique par voie systémique doit être débuté dès lors que le diagnostic est suspecté ; on parle alors de thérapeutique préemptive.

1.2 L'aspergillome

Il s'agit d'une entité aspergillaire complètement différente de l'aspergillose pulmonaire invasive : l'aspergillome consiste en un développement local, contrôlé par l'immunité anti-infectieuse de l'hôte. Parmi l'ensemble des atteintes broncho-pulmonaires par *Aspergillus*, l'aspergillome bronchectasiant se caractérise par la localisation unique, d'une masse de filaments mycéliens d'*Aspergillus* dans une cavité pulmonaire généralement préformée. Cette truffe aspergillaire incluse dans une cavité tapissée de muqueuse bronchique se développe lentement sur place et n'a aucune tendance à perforer la muqueuse et à se disséminer. En effet, le développement d'une colonie d'*Aspergillus* dans une cavité préformée qui communique avec l'arbre aérien par une ou plusieurs bronches, permet l'arrivée des spores et l'aération de la cavité. Les spores vont alors germer d'autant plus facilement que les conditions d'humidité et d'oxygénation sont très favorables (Bouchet *et al.* 1989). L'absence ou l'insuffisance des défenses locales, notamment macrophagiques, liée à l'aspect pathologique du revêtement interne de la cavité, permet la germination des spores et le développement d'une masse mycélienne : la truffe aspergillaire. Cette boule fongique comble

progressivement la cavité. La sphère aspergillaire, de 1 à 4 cm de diamètre ou plus, a effectivement un aspect bosselé et la consistance d'une truffe. Sa teinte est variable, brune, pourpre ou mastic. Elle est donc formée de filaments mycéliens enchevêtrés de diamètres irréguliers, dilatés en périphérie. La masse fongique est libre dans la cavité.

A la radio l'image caractéristique est dite « en grelot ». On observe alors la partie de la cavité non encore obstruée qui forme un croissant aérien clair au-dessus et sur les côtés de la boule fongique, qui apparaît opaque.

La cavité peut être d'origine variable :

- Cavité résiduelle d'une tuberculose
- Abscesses à pyogènes
- Carcinome pulmonaire
- Poumon radique
- Bronchectasie
- Bulle d'emphysème
- Dilatation des bronches
- Dystrophie polykystique congénitale.

Au départ le champignon est vivant et les seules manifestations de sa présence sont des hémoptysies. Elles peuvent se renouveler longtemps sans qu'apparaissent aucuns autres signes. Ces saignements sont provoqués par la production locale d'une toxine nécrosante (Badillet *et al.* 1987b).

L'action pathogène est double : d'abord *mécanique* par dilatation, compression ou obstruction, le développement se révélant par des hémoptysies. Il faut souligner le tropisme particulier des *Aspergillus* pour les vaisseaux qui apportent les éléments indispensables. Ensuite l'action pathogène est *toxique* par la production de toxines nécrosantes responsables de l'ulcération des parois vasculaires, d'où le caractère récidivant des hémoptysies (Bouchet *et al.* 1989). Les hémoptysies peuvent se répéter à intervalle de quelques mois pendant des années

sans entraîner d'inconvénients majeurs. Cependant d'autres symptômes peuvent être observés : fièvre, toux, expectorations purulentes, asthénie et amaigrissement. Même si l'aspect radiologique de l'aspergillome est caractéristique, et que la présence d'*Aspergillus* dans les expectorations est fréquente, le sérodiagnostic reste l'examen clé. Concernant le traitement de l'aspergillome, il repose sur l'exérèse chirurgicale essentiellement.

Remarque :

On désigne actuellement sous le terme d'aspergillose semi-invasive une forme de transition entre l'aspergillome, masse fongique saprophytique dont les filaments périphériques respectent la paroi bronchique, et l'aspergillose pulmonaire invasive vue chez les sujets immunodéprimés, où les filaments mycéliens pénètrent activement dans le tissu pulmonaire.

L'aspergillose semi-invasive se voit chez des individus avec une immunité diminuée. On retrouve souvent chez eux une maladie pulmonaire préexistante, un terrain éthylique ou diabétique, ou un traitement par des corticoïdes ou des médicaments immunosuppresseurs. Les signes cliniques sont banals comme la toux, des expectorations, une asthénie ou une légère fièvre. L'examen radiologique révèle une image d'infiltration d'un lobe supérieur, puis une image cavitaire qui correspond à la formation d'une masse fongique. Le sérodiagnostic reste également l'examen clé. Le traitement repose sur une thérapie antifongique seule ou associée à une exérèse chirurgicale (Badillet *et al.* 1987b).

1.3 La bronchite aspergillaire mucomembraneuse

Cette forme d'infection est rare. Elle se caractérise par le développement dans la lumière des bronches, sans pénétration de l'endothélium, de filaments d'*Aspergillus*. En effet le mycélium se développe en nappe à la surface de l'endothélium bronchique. Ce feutrage endobronchique peut

entraîner l'obstruction d'une lumière bronchique. La symptomatologie clinique comporte un syndrome obstructif avec toux, dyspnée, de rares douleurs thoraciques vives. Parfois une hyperthermie peut accompagner des épisodes d'atélectasies. La toux est souvent productive et ramène des pseudo-membranes où l'on retrouve de nombreux filaments mycéliens. La prolifération mycélienne peut obstruer une bronche, ce qui explique que la ventilation pulmonaire soit perturbée. On peut alors observer des signes radiologiques d'opacification. De plus, à la bronchoscopie, le feutrage mycélien qui recouvre les parois bronchiques est bien visible. On observe un matériel gélatineux épais, brun-rouge, constitué de mucus et de mycélium, et généralement retrouvé sur une grosse bronche. Cette infection reste superficielle et n'envahit pas la paroi bronchique, mais l'épithélium peut cependant être érodé et saigner. Chez le sujet immunodéprimé cette atteinte aspergillaire peut être grave voire mortelle, avec un syndrome d'obstruction bronchique aigu.

1.4 L'aspergillose pulmonaire chronique nécrosante ou semi-invasive

Elle représente une entité plus difficile à définir sur le plan clinique et anatomopathologique. Il s'agit d'une infection indolente d'évolution prolongée, favorisée par une immunodépression modérée qui peut être due à plusieurs facteurs comme le diabète, une cirrhose, une dénutrition, un traitement corticoïde ou immunosuppresseur, mais également à des facteurs locaux comme une broncho-pneumopathie chronique obstructive (BPCO), une fibrose, une pneumonie radique (Desoubeaux et Chandener 2010a). Les filaments mycéliens envahissent le parenchyme, ce qui provoque des plages de nécrose avec formation de cavités sans envahissement vasculaire. Le diagnostic est souvent tardif. La symptomatologie débute par une fièvre, puis une altération de l'état général avec apparition de toux, d'expectorations brunâtres, de douleurs thoraciques et de dyspnée. L'aspect radiologique retrouve des infiltrats avec apparitions de nouvelles cavités ou extensions de cavités préexistantes.

1.5 La sinusite aspergillaire

Il existe parfois une simple colonisation des voies aériennes : sinus, bronches, poumons. Persistante ou transitoire, elle ne justifie pas de traitement immédiat mais une surveillance accrue car ce type d'affection peut aboutir à des troubles ventilatoires sévères.

La sinusite aspergillaire est une affection relativement rare. Elle est la conséquence de l'inhalation de spores d'*Aspergillus* venant se greffer sur une muqueuse en mauvais état. Le champignon peut proliférer dans la cavité sinusienne. Cliniquement il s'agit d'une sinusite chronique, unilatérale et maxillaire, banale. C'est une sinusite amicrobienne qui ne réagit pas aux traitements antibiotiques habituels. La symptomatologie correspond à celle d'une obstruction nasale et d'une rhinorrhée chronique, avec des céphalées et des douleurs faciales. Des croûtelles et un matériel caséux peuvent être rejetés lors d'éternuements, parfois accompagnés d'épistaxis. Au départ de l'infection, la muqueuse est simplement inflammatoire, et on observe un écoulement muco-purulent. Ensuite on observe des masses bourgeonnantes qui sont mêlées à du matériel d'aspect caséux. Rarement, l'infection peut évoluer en aspergillose invasive, notamment locorégionale : sinus para-nasaux, orbites, cerveau. Ce type d'extension est rencontrée essentiellement chez des sujets immunodéprimés, notamment les patients neutropéniques (Badillet *et al.* 1987b). On observe alors une fièvre, une rhinite, des signes d'invasion orbitaire avec des douleurs oculaires souvent unilatérales, des troubles de la vision, des oedèmes du visage. Concernant le traitement, généralement un drainage du sinus par chirurgie résout le problème, sauf dans les formes avec atteinte profonde, où un traitement antifongique doit être associé à la chirurgie. Pour cette affection la notion de terrain est encore essentielle.

2. Les aspergilloses immuno-allergiques

2.1 L'aspergillose bronchopulmonaire allergique (ABPA)

Elle s'inscrit dans le groupe des affections secondaires à des réactions d'hypersensibilité envers l'*Aspergillus*. Elle est aussi appelée maladie de Hinson-Peppys. Le diagnostic est fondé sur plusieurs critères (Tillie-Leblond *et al.* 2002), notamment des critères majeurs :

- Asthme
- Infiltrats pulmonaires
- Eosinophilie sanguine supérieure à 500/mm³
- IgE totales supérieures à 2000 UI/mL
- Tests cutanés positifs envers *Aspergillus* en lecture immédiate
- Présence d'anticorps précipitants envers *Aspergillus* : IgG
- Présence de bronchectasies proximales.

Mais également sur des critères mineurs :

- Présence d'*Aspergillus* dans l'expectoration
- Présence de moules bronchiques dans l'expectoration
- Tests cutanés positifs envers *Aspergillus* en lecture retardée

Différents facteurs contribuent au développement d'une ABPA, notamment un terrain atopique, auquel s'associe une colonisation bronchique par *Aspergillus* qui se développe dans le mucus de certains sujets asthmatiques avec relargage antigénique local responsable chez les sujets sensibilisés d'une réaction immunologique double, IgE et IgG. La répétition de poussées aiguës serait responsable des bronchectasies dans le territoire qui est le siège d'un infiltrat pulmonaire. Elles résultent tout d'abord des phénomènes inflammatoires consécutifs à la réaction immunologique de type III, du relargage local des médiateurs anaphylactiques, mais également d'une éventuelle production locale d'enzymes protéolytiques d'origine aspergillaire, d'après www.germop.univ-lyon1.fr (07/2010).

L'ABPA provoque initialement un malaise, une toux, des sibilances, une dyspnée puis des bronchospasmes et des oedèmes pulmonaires. Le syndrome inflammatoire évolue vers une atteinte de la paroi des bronches, une bronchectasie et la fibrose pulmonaire, avec une possible évolution vers l'insuffisance respiratoire.

Cinq stades évolutifs de cette atteinte ont été décrits (figure 18) :

- Stade I
Exacerbations bronchospastiques avec majoration de la bronchorrhée, fièvre, et apparition ou majoration d'infiltrats pulmonaires.
- Stade II
Période de rémission clinique, radiologique et biologique (IgE totales, éosinophilie sanguine).
- Stade III
Exacerbations récidivantes de la symptomatologie.
- Stade IV
Asthme corticodépendant.
- Stade V
Fibrose pulmonaire.

En effet, le diagnostic est difficile et souvent tardif, la période entre le début des symptômes et le diagnostic pouvant aller de 10 à 30 ans. Toutefois il se révèle être plus aisé en phase d'exacerbation, où il repose sur l'association d'une dyspnée fébrile avec infiltrats pulmonaires et de signes biologiques de réaction d'hypersensibilité immédiate (hyperéosinophilie sanguine, augmentation des IgE totales) et semi-retardée (synthèse d'anticorps précipitants anti-aspergillaires, augmentation des titres des anticorps réaginique spécifiques IgE, IgA et IgG), d'après Dupont 1981.

Les caractéristiques radiologiques de l'ABPA incluent des opacités fugaces des alvéoles pulmonaires, des bronchectasies plutôt proximales souvent dans le lobe supérieur, un épaissement des parois bronchiques.

<i>Clinique</i>	<i>Biologie</i>	<i>Radiologie</i>	<i>Traitement</i>
<i>Stade I – Aigu</i> Fièvre, toux, asthme, expectorations, douleurs thoraciques	IgE élevées et éosinophiles élevés	Infiltrats	Corticoïdes
<i>Stade II – Rémission</i> Asymptomatique	Baisse des IgE et des éosinophiles	Régression des infiltrats	Non
<i>Stade III – Exacerbation</i> Symptomatique ou asymptomatique	IgE élevées	Nouvelles images	Corticoïdes
<i>Stade IV – Asthme corticodépendant</i> Asthme +++	IgE élevées	Variable	Corticoïdes en continu
<i>Stade V – Fibrose</i> Dyspnée, cyanose, insuffisance respiratoire chronique	IgE variables	Fibrose	Corticoïdes en continu

Figure 18

Stades de l'aspergillose bronchopulmonaire allergique

(Tillie-Leblond *et al.* 2002)

Paradoxalement, le traitement classique repose sur la corticothérapie alors même qu'il existe une infestation mycosique aspergillaire. Toutefois on peut avoir recours aux traitements antifongiques (Tillie-Leblond *et al.* 2002). L'évolution de cette pathologie peut donc être sévère, elle dépend de la capacité du traitement à pouvoir d'une part, éliminer le portage bronchique d'*Aspergillus* (les expectorations brunâtres ou les prélèvements bronchiques contiennent généralement des filaments mycéliens et des polynucléaires neutrophiles), et d'autre part, diminuer l'intensité de la réponse immuno-allergique de l'hôte, ce qui explique le recours à la corticothérapie.

2.2 L'asthme aspergillaire

Il se traduit par un asthme sans colonisation, contrairement à l'ABPA, qui survient et s'aggrave dans des conditions de forte exposition aux spores aspergillaires. Il s'inscrit dans un contexte atopique et est accompagné de signes biologiques d'hypersensibilité immédiate (ANOFEL 2010).

Le matériel fongique se comporte comme tout autre allergène, les sujets produisant des anticorps réaginique IgE. Il s'agit donc d'un asthme de type I avec réaction cutanée immédiate positive pour les extraits antigéniques d'*Aspergillus*. Les réactions sont souvent croisées entre les différentes espèces. Les tests de provocation par inhalation donnent une réponse immédiate. Cet asthme aspergillaire est alors accompagné d'une hyperéosinophilie sanguine et d'une augmentation des IgE spécifiques anti-aspergillaire, mais sans précipitines.

2.3 L'alvéolite allergique extrinsèque

Il s'agit d'une alvéolite lymphocytaire provoquée par une inhalation massive et répétée de spores fongiques. Contrairement à l'asthme aspergillaire, elle survient essentiellement chez des sujets non atopiques. Les circonstances d'exposition sont surtout liées à des risques professionnels (manipulation de grain ou de foin moisi, de plants de tabac ou de malt, gavage de pigeon...), l'affection dite « poumon de fermier » en

est l'exemple type. De façon plus rare, il peut s'agir également d'alvéolites domestiques favorisées par des locaux humides, des matériaux organiques en décomposition ou une contamination des systèmes de climatisation. Les agents responsables de cette pathologie sont surtout des Actinomycètes tels *Micropolyspora faeni*, mais certains *Aspergillus* peuvent aussi provoquer ce syndrome, notamment *Aspergillus clavatus* et *A. fumigatus*, la taille des spores permettant une pénétration alvéolaire. Quelques heures après l'exposition, le sujet présente un épisode de broncho-pneumopathie d'allure grippale avec une toux, une dyspnée, de la fièvre, des frissons, des râles crépitants pulmonaires bilatéraux, mais sans signe d'asthme, ni éosinophilie sanguine. L'expectoration est mucopurulente ou hémoptoïque. Un épisode de ce type peut durer entre 24 et 48 heures. Il s'agit d'une hypersensibilité de type IV avec une réaction semi-retardée 6 à 8 heures après l'inhalation. La répétition des accès peut conduire à la chronicité avec un tableau d'asthénie, d'insuffisance respiratoire chronique par fibrose interstitielle, ou de bronchite chronique. On pense qu'il existe probablement un facteur génétique pour cette affection, puisqu'elle ne touche qu'une partie des gens exposés (Desoubeaux et Chandenier 2010a). Les examens radiologiques montrent des images réticulo-nodulaires ou miliaires. Le lavage-broncho-alvéolaire permet souvent de mettre en évidence une hyperlymphocytose à lymphocyte CD8+. Les biopsies pulmonaires peuvent montrer des infiltrats lympho-plasmocytaires interstitiels et des granulomes. L'enquête allergologique est habituellement négative, c'est pourquoi la détection de précipitines en l'absence de tout terrain atopique contribue au diagnostic.

2.4 La sinusite fongique allergique

Elle est aussi appelée : rhino-sinusite fongique éosinophilique. Elle survient habituellement chez des sujets jeunes. Au niveau clinique, elle se manifeste par une sinusite persistante accompagnée d'une obstruction nasale, de polype nasal, et d'une hyperéosinophilie sanguine. Les

champignons les plus souvent en cause appartiennent au genre *Aspergillus*, mais d'autres moisissures peuvent également être retrouvées (ANOFEL 2010).

3. Les aspergilloses extra-respiratoires

3.1 L'aspergillose profonde extra-pulmonaire disséminée

Elle correspond à une forme évolutive de la maladie et elle concerne les sujets atteints d'une affection particulièrement sévère touchant notamment le système hématopoïétique avec forte immunodépression. Les formes disséminées, c'est-à-dire qui concernent au moins deux organes, représentent entre 25 et 35% des aspergilloses. Bien sûr le poumon est l'organe le plus touché. L'atteinte pulmonaire est donc associée à des localisations diverses par dissémination hématogène.

- L'atteinte du système nerveux central est constituée par des abcès du cerveau ou du cervelet, et plus rarement des abcès de la moelle épinière ou par une méningite basilaire. Souvent on observe des foyers d'infarctus et de nécrose qui sont la conséquence du tropisme vasculaire de l'infection aspergillaire. Cette localisation, qui s'intègre systématiquement dans le cadre d'une forme disséminée, correspond à une atteinte hématogène qui prédomine plutôt dans les régions irriguées par la circulation postérieure. Ces lésions se traduisent cliniquement par un affaiblissement de la conscience, une confusion mentale ou des signes neurologiques. Le liquide céphalo-rachidien est en général peu modifié.
- L'atteinte rénale se voit également dans les formes disséminées, elle est d'origine hématogène et réalise de multiples abcès. Le tropisme vasculaire est également mis en cause à ce niveau et peut aboutir à une nécrose. L'hématurie, la protéinurie et la leucocyturie observées chez certains malades ne semblent pas spécifiques et peuvent s'expliquer par le contexte pathologique.

- Le tube digestif peut aussi être atteint avec une fréquence variable. Un même malade peut présenter une ou plusieurs lésions au niveau de l'intestin, de l'œsophage ou de l'estomac. Il s'agit d'ulcérations pouvant atteindre plusieurs centimètres ; elles sont responsables d'hémorragies ou même de perforations.
- L'atteinte cardiaque est bien particulière. Les lésions habituellement observées sont des abcès myocardiques avec éventuellement des zones d'infarctissement par atteinte coronarienne. Les péricardites observées sont en rapport avec, soit une atteinte myocardique sous jacente, soit une extension d'une atteinte pulmonaire voisine. Il est important de noter la survenue d'endocardite fongique à *Aspergillus* notamment suite à un acte de chirurgie cardiaque comme la mise en place de prothèse valvulaire ou les cathétérismes veineux prolongés. Cependant, il est remarquable de constater l'absence d'endocardite parmi les cas d'aspergillose cardiaque sur terrain compromis.
- L'atteinte cutanée est habituellement de type hématogène dans les formes diffuses chez l'immunodéprimé. Il s'agit d'abcès sous-cutanés, de pustules, de cellulite avec ulcérations. Cependant des cas d'aspergillose cutanée peuvent être observés chez des patients présentant des zones dermo-épidermiques nécrosées, notamment suite à un traumatisme ou chez les grands brûlés.
- L'atteinte osseuse est plus rarement signalée. Elle se rencontre soit par extension d'une infection aspergillaire voisine : atteinte de la paroi sinusienne dans l'aspergillose du sinus, atteinte costale dans l'aspergillose pulmonaire ; soit dans le cadre d'une aspergillose diffuse chez l'immunodéprimé.
- Parmi les autres organes éventuellement atteints on peut citer le foie, la thyroïde et la rate.

3.2 L'aspergillose oculaire

Généralement cette atteinte est primaire et post-traumatique (projectiles inertes ou végétaux souillés par des *Aspergillus*). Il s'agit principalement de kératite ou de chorioretinite. Cependant toutes les parties de l'œil peuvent être atteintes. L'atteinte des voies lacrymales, des conjonctives et des paupières est presque toujours due à *A. niger*, ce qui donne une teinte noirâtre aux lésions ou aux sécrétions. Il peut s'agir de dacryocanaliculite, de dacryocystite et, secondairement, de conjonctivite. Au niveau des paupières on a observé des blépharites et des granulomes. L'atteinte de la cornée est bien plus fréquente. Elle est souvent d'origine traumatique et surtout due à *A. fumigatus*. On distingue les kératites primitives avec deux formes différentes : une forme superficielle, nodulaire, peu inflammatoire ; et une forme profonde ulcéreuse, qui aboutit souvent à une perforation. Mais on distingue également les kératites secondaires à une lésion préexistante, comme l'herpès. Celles-ci ont un aspect clinique beaucoup moins évocateur. Toutefois, rarement l'atteinte oculaire peut être liée à une extension locorégionale d'une aspergillose nasosinusienne. L'orbite peut alors être parasitée. Le symptôme majeur en est une exophtalmie douloureuse. Ce genre d'atteinte peut mener à la cécité. On a observé également des infections intra-oculaires qui peuvent soit succéder à une blessure ou à un acte chirurgical, soit n'être qu'une des localisations d'une aspergillose invasive.

3.3 L'aspergillose de l'oreille ou otite externe aspergillaire ou otomycose

L'otomycose se rencontre principalement sous les climats chauds et humides. Cette atteinte du conduit auditif externe est favorisée par des lésions préexistantes (eczéma, otorrhée chronique, malformation anatomique) et par l'usage des corticoïdes locaux, même si des débris épithéliaux desquamants et la présence de cérumen sont des facteurs favorisants. Le champignon prolifère dans le conduit auditif externe provoquant une otite externe, souvent accompagnée de surinfection bactérienne avec suppuration (Bouchet *et al.* 1989). La plupart des cas

sont unilatéraux et les patients se présentent avec des douleurs auriculaires, des démangeaisons du canal auditif et une sensation de vertige. Les otorrhées, baisse de l'audition et acouphènes sont moins fréquents mais pas rares. On observe des lésions érythémato-squameuses du conduit qui peuvent gagner le pavillon, mais respectent toujours le tympan. A un stade plus évolué, le prurit peut être intense et l'abondance des squames entraîner une obstruction du conduit auditif externe. Un examen direct du conduit auditif met en évidence des filaments mycéliens et les têtes aspergillaires associées aux squames.

3.4 L'aspergillose pleurale

Une cavité pleurale résiduelle quelle que soit son étiologie peut être contaminée par voie aérienne s'il existe une fistule broncho-pleurale et devenir alors le siège d'une infection aspergillaire. Cette contamination par *Aspergillus* vient toujours de l'air ambiant porteur de spores fongiques ; elle peut prendre divers aspects : celui d'une truffe dans les cavités petites et mal ventilées, celui d'une plaque de feutrage mycélien, ou bien celui d'un « gâteau mycélien avec fructification » quand le contact avec l'air est libre (Badillet *et al.* 1987b). L'analyse des images radiologiques est souvent difficile : l'épaississement des parois cavitaires est un bon signe, l'existence d'une image ronde voire d'un grelot bien qu'évocatrice est assez rare ou d'individualisation malaisée parmi les opacités pleuro-pulmonaires séquellaires. Le sérodiagnostic est donc encore une fois la clé de confirmation pour cette atteinte aspergillaire.

On a aussi observé une atteinte pleurale bien différente : la pleurésie aspergillaire par surinfection d'une pleurésie d'autre nature ou plus souvent en tant que complication post-opératoire après thoracotomie. Les ponctions répétées, l'intervention septique ou le drainage post-opératoire sont le mode de contamination. C'est un tableau de pleurésie purulente où l'ensemencement du liquide pleural donne une culture pure d'*Aspergillus*.

3.5 L'onxyis aspergillaire

Les moisissures sont rarement responsables d'onychomycoses, comparativement aux champignons dermatophytes ou aux levures. Le diagnostic se révèle délicat ; c'est pourquoi il ne sera affirmé que sur la présence répétée (au moins trois fois) d'*Aspergillus sp.*, à l'examen direct et en culture pure, à tous les points d'ensemencement. L'atteinte est essentiellement sous-unguéale distale (95%) ou représentée par des leuconychies superficielles. *Aspergillus versicolor* et *Aspergillus candidus* sont les espèces les plus souvent impliquées (Desoubeaux et Chandener 2010a).

Chapitre 4

Le diagnostic biologique

Dans ce chapitre nous aborderons les différentes étapes du diagnostic biologique de l'infection aspergillaire avec notamment : les prélèvements, l'examen mycologique, l'examen histologique, la biologie moléculaire, la détection des anticorps circulants, la détection des antigènes circulants, la recherche des signes biologiques non spécifiques, les épreuves d'hypersensibilité cutanée, et enfin nous discuterons de l'apport de l'imagerie dans le diagnostic aspergillaire. L'essentiel de ces informations provient des travaux de Euzeby 1992, Anonyme 2002, Desoubeaux et Chandener 2010b.

Le diagnostic des infections aspergillaires est très difficile car il se heurte d'une part à la faible sensibilité des méthodes actuellement disponibles, et d'autre part au problème de la signification de l'isolement des champignons.

Les conidies sont effectivement présentes en grand nombre dans l'atmosphère et peuvent alors être de simples contaminants des prélèvements plutôt que de réels agents pathogènes. Les difficultés rencontrées lors du diagnostic sont particulièrement aiguës et surtout lourdes de conséquences dans l'aspergillose invasive, encore responsable d'une très lourde mortalité, notamment chez les patients ayant subi une greffe de moelle. Grâce à la combinaison des diverses techniques disponibles, la biologie peut cependant apporter une contribution essentielle au diagnostic des différentes formes cliniques de la maladie aspergillaire.

Ce diagnostic aspergillaire est d'autant plus délicat que les *Aspergillus* sont des champignons à caractère ubiquitaire, ce qui nécessite une grande prudence dans l'interprétation des résultats de l'investigation biologique. Cette investigation comprend plusieurs catégories d'examen : mycologique (isolement et caractérisation du champignon), anatomopathologique, et sérologique (dont les résultats doivent être confrontés avec la clinique) (Bouchet *et al.* 1989).

Il est toutefois nécessaire de rappeler qu'un diagnostic complet et précis repose non seulement sur des critères biologiques, mais également sur des critères cliniques et sur l'imagerie.

1. Les prélèvements

Tout type de prélèvement biologique peut porter contribution à l'établissement du diagnostic des aspergilloses. Il peut être ciblé, en fonction des différents points d'appel cliniques, ou sanguin pour la mise en évidence d'une dissémination hématogène. Chaque prélèvement doit se faire dans des conditions strictes d'asepsie, dans un récipient stérile, et doit être conservé à +4°C en attendant son acheminement rapide au laboratoire.

L'isolement des *Aspergillus* ou d'autres moisissures à partir de produits biologiques issus de sites habituellement stériles (biopsies d'organes à l'aiguille ou chirurgicales, liquide céphalo-rachidien, liquide pleural, urines vésicales) affirme le diagnostic. Toutefois l'isolement des *Aspergillus* à partir de produits biologiques issus de sites anatomiques pouvant être colonisés (arbre respiratoire ou sites superficiels) est d'interprétation plus délicate et doit nécessairement prendre en compte le contexte clinique et l'ensemble des arguments diagnostiques.

Par contre les prélèvements respiratoires protégés (liquide de lavage bronchiolo-alvéolaire, prélèvement trans-trachéal protégé...) ont une valeur supérieure à l'examen des expectorations (ANOFEL 2010).

2. Examen mycologique

Cet examen doit être réalisé par un laboratoire expérimenté, et doit systématiquement être associé à un examen direct et une mise en culture sur milieu spécifique approprié.

La valeur supérieure d'un examen positif sur un échantillon provenant d'un site stérile, par rapport à un échantillon provenant d'un site potentiellement colonisé, s'applique à toutes les moisissures mais tout particulièrement aux *Aspergillus* du fait de leur caractère ubiquitaire.

➤ L'examen direct

Il repose sur les méthodes d'examen microscopique des produits biologiques issus des lésions et sur la mise en évidence des colonies fongiques en culture. Cet examen s'effectue en milieu humide entre lame et lamelle avec éventuellement ajout d'un agent dissociant comme la potasse à 10%, qui permet d'éclaircir le milieu, ou le bleu lactique. Il permet de mettre en évidence les filaments mycéliens de type aspergillaire. Ces derniers mesurent entre 2 et 4 μm de diamètre, ils apparaissent hyalins, septés et parfois ramifiés. L'observation des têtes aspergillaires est beaucoup plus rare (prélèvement au cours de sinusite, otite ou aspergillome) mais offre une forte spécificité.

Certaines méthodes de marquage ou de coloration (imprégnation argentique, coloration de Giemsa) peuvent être utilisées car elles ont l'avantage d'être assez sensibles et rapides à mettre en œuvre (Desoubeaux et Chandener 2010b).

Il est important de rappeler :

- que les filaments mycéliens et les têtes aspergillaires ne sont décelables qu'au niveau des localisations en des points humides et aérés, et, d'un point de vue pratique, dans les prélèvements ayant la coloration jaune-vert-brun que leur confère l'appareil sporifère des *Aspergillus*.
- qu'au sein des tissus ces filaments peuvent être très modifiés.
- que les filaments aspergillaires sont à différencier des filaments des *Mucorales*, qui peuvent intéresser les mêmes organes que les aspergilloses. Les filaments des *Mucorales* sont de diamètre supérieur (10 à 12 μm), ils ne sont pas septés et leurs ramifications sont irrégulières.

➤ Culture

Elle permet l'identification précise du genre et de l'espèce du champignon. Elle est réalisée sur milieu fongique spécifique coulé dans une boîte de Petri ou en tube. Les milieux que l'on utilise classiquement sont ceux de Sabouraud Dextrose Agar. On peut y ajouter des antibiotiques comme le chloramphénicol ou la gentamycine, ce qui permet de limiter les proliférations bactériennes, surtout pour les prélèvements potentiellement multi-contaminés. Par contre, il faut éviter l'utilisation d'actidione dans le milieu de Sabouraud car elle inhibe la croissance des *Aspergillus* (Euzéby 1992). Le milieu de Czapek est également utilisé, en deuxième intention, car il permet d'étudier la macroscopie et la vitesse de croissance. Enfin le milieu à l'extrait de malt peut aussi être utile, notamment car il permet un examen microscopique optimal grâce à l'apparition de fructifications abondantes.

Les géloses sont ensuite placées à l'étuve et incubées à 37°C. Les *Aspergillus* se développent en moyenne en 2 à 5 jours à cette température. L'aspect macroscopique est ras à poudreux, velouté parfois cotonneux, et de couleur variée selon les espèces.

L'analyse microscopique est réalisée par la technique du drapeau qui consiste à appliquer un morceau de ruban adhésif transparent sur la colonie, puis ensuite à le déposer dans une goutte de bleu de lactophénol sur une lame de verre. Ce réactif est ajouté afin d'imprégner les structures fongiques et de faciliter la lecture au microscope. L'examen microscopique met en évidence la tête aspergillaire dont les caractéristiques affineront l'identification. Cette forme de fructification asexuée est composée d'une vésicule située à l'apex d'un fragment de filament appelé «stipe». Elle est recouverte d'une rangée de phialides (ou cellules conidiogènes) portée ou non par une rangée de métules, et de très nombreuses conidies naissant à partir de ces phialides. La présence ou non de certains de ces éléments, leurs formes et couleurs respectives permettent de porter une identification précise sur l'espèce aspergillaire isolée.

L'isolement d'*Aspergillus* a une grande valeur diagnostique chez l'immunodéprimé ; généralement cela signifie une aspergillose pulmonaire

invasive dans 2/3 des cas. Par contre, il faut souligner que la culture n'est positive que dans 50% des cas d'aspergilloses avérées (Desoubeaux et Chandener 2010b). De plus, chez les patients atteints de BPCO ou de mucoviscidose, l'isolement d'*Aspergillus* peut correspondre à une simple colonisation bronchique sans infection réelle. Par ailleurs, il faut redoubler de vigilance face à une culture positive obtenue à partir d'échantillons potentiellement multi-contaminés comme les crachats. C'est pourquoi il est important de toujours confronter les résultats des cultures mycologiques avec la clinique et les autres examens pratiqués. Enfin il faut rester prudent sur les possibilités de souillures et de contaminations dues à la germination secondaire de spores contenues dans l'atmosphère ; c'est pourquoi il est recommandé au laboratoire de toujours travailler sous une hotte.

3. Examen histologique

L'histopathologie permet de mettre en évidence un agent fongique dans un liquide de lavage broncho-alvéolaire (LBA), une biopsie ou une pièce opératoire. Dans l'aspergillose invasive du sujet neutropénique, la sensibilité de l'examen cytologique du LBA est faible (30 à 50%). Certes les prélèvements de LBA et leur analyse peuvent être répétés et couplés à d'autres techniques. En ce qui concerne les biopsies, elles ont des indications restreintes liées à l'état du patient, au risque hémorragique et à la localisation des lésions. C'est pourquoi elles ne sont réalisées que dans 15 à 25% des cas. En revanche leur sensibilité et spécificité sont meilleures (65 à 80%). On note que les LBA sont plus souvent positifs dans les lésions proximales et les biopsies dans les lésions distales (Anonyme 2002). Si le LBA et les biopsies permettent un diagnostic de certitude dans environ un cas sur deux, on évoque encore trop souvent un diagnostic d'aspergillose «probable» compte tenu de la négativité des examens cytologiques et anatomopathologiques.

Voici les différents prélèvements et techniques utilisés lors du diagnostic histologique des aspergilloses :

- Le LBA : Cette méthode est la plus simple et la moins traumatisante. De plus elle permet une mise en évidence de nombreux agents pathogènes par les colorations usuelles.

- Le brossage bronchique protégé : Il est considéré comme moins sensible que le LBA dans l'aspergillose.
- La fibroscopie et biopsies trans-bronchiques : Ce sont des techniques lourdes, agressives, et difficiles à mettre en œuvre à cause du risque majeur d'hémorragies et de décompensation respiratoire.
- Les biopsies pulmonaires chirurgicales : C'est également une technique extrêmement lourde et rarement mise en œuvre (Anonyme 2002).

L'histologie reste cependant l'un des outils majeurs du diagnostic mycologique, c'est un examen précieux dont la positivité permet à elle seule d'affirmer le diagnostic d'infection fongique invasive. La découverte de filaments mycéliens permet d'affirmer le diagnostic de mycose, mais elle ne permet pas de distinguer l'aspergillose des autres mycoses présentant le même aspect histologique. C'est pourquoi cet examen doit toujours être associé à une étude mycologique.

L'histologie classique utilise des techniques de coloration non spécifiques (comme HES = hémalun éosine safran) ou spécifiques (comme PAS = periodic acid Schiff, ou des techniques d'imprégnation argentique = Gomori Grocott, Musto). L'HES est une technique rapide, peu onéreuse et qui permet la visualisation de la réponse tissulaire de l'hôte. Le PAS permet une meilleure visualisation des éléments osidiques et fongiques, qui sont souvent difficile à discerner à l'HES, tout en conservant la possibilité d'observer la réponse tissulaire. Enfin, les techniques d'imprégnation argentique qui colorent la paroi fongique en sombre, permettent de mettre en évidence l'ensemble des éléments mycéliens, mais ne permettent pas d'analyser la réponse tissulaire de l'hôte.

Dans le cas des aspergilloses, l'examen histologique montre des filaments mycéliens septés de type aspergillaire et peut objectiver un processus d'invasion tissulaire, notamment vasculaire. On observe souvent une inflammation nécrosante et purulente. Parfois on distingue des têtes aspergillaires.

4. Biologie moléculaire

La biologie moléculaire a sa place dans le diagnostic des infections aspergillaires. Certaines techniques d'amplification génique par PCR (polymerase chain reaction) ont été développées. Cependant deux aspects limitent encore leur utilisation en routine :

- Ces méthodes sont très rapides, mais elles nécessitent un équipement et une organisation spécifiques.
- Ces méthodes sont très sensibles et permettent la détection de quantités infimes d'ADN aspergillaire, mais elles rendent délicate la distinction entre la colonisation (portage asymptomatique) et l'infection réelle (ANOFEL 2010).

Il existe des PCR panfongiques et des PCR spécifiques d'espèce. Les PCR panfongiques ciblent des séquences ribosomales ou mitochondriales communes à plusieurs genres de champignons. Les PCR spécifiques d'espèces ciblent des séquences plus spécifiques telles que les ITS (Inter Transcribed Sequence de l'ARNr). La sensibilité de ces méthodes varie en fonction du nombre d'échantillons testés et en fonction de l'évolution de la maladie. La sensibilité a été évaluée entre 50 et 70% par rapport à des tests de détection antigénique. Cependant, il est important de signaler que la contamination des tubes par des spores au moment des prélèvements est possible, et peut engendrer de fausses positivité. On estime que 25% des échantillons de LBA de personnes saines sont positifs avec ces techniques de PCR. Ce nombre de faux positifs est supérieur à ceux rapportés pour d'autres techniques telles que la détection d'antigènes galactomannanes. Par contre, on observe qu'avec les échantillons de sérum ou de sang, la contamination par les conidies aspergillaires est moins fréquente qu'avec les prélèvements d'origine respiratoire. De plus, les prélèvements sanguins sont plus faciles à réaliser, c'est pourquoi il faut encourager les techniques de PCR sur ce type de prélèvements. Néanmoins, le passage du champignon *Aspergillus* directement dans la lumière des vaisseaux sanguins périphériques est très tardif au cours de l'infection. De plus, la nécrose semblerait nécessaire pour la décharge d'acides nucléiques aspergillaires, ce qui pourrait limiter l'usage de la PCR dans le cadre du diagnostic précoce d'aspergillose.

Pour l'instant, à cause du manque de standardisation et d'une disponibilité limitée, la biologie moléculaire reste dans le domaine de l'expérimental. Cependant,

l'optimisation des techniques d'amplification (notamment la PCR en temps réel) et des méthodes de typage moléculaire, laissent présager un bel avenir à ces méthodes. En effet la PCR en temps réel diminue le risque de contamination, elle permet également d'éviter les manipulations post-amplification, et surtout elle a une sensibilité et une spécificité accrues (sondes marquées fluorescentes). Elle permet alors une approche quantitative de la charge fongique, ce qui est très intéressant pour le suivi des traitements (Desoubeaux et Chandener 2010b).

5. Détection des anticorps circulants

Les *Aspergillus* par leur constitution chimique, leur métabolisme, leurs produits de dégradation sont immunogènes. Des anticorps anti-aspergillaires sont alors décelables dans le sérum des malades. Cette recherche d'anticorps est un examen fondamental, car spécifique, et il traduit la présence du champignon dans l'organisme et la réaction de celui-ci. Les anticorps le plus souvent recherchés sont surtout les IgG, les IgM que l'on retrouve souvent dans la pathologie d'installation, et les IgE que l'on retrouve lors des aspergilloses immuno-allergiques.

De nombreuses techniques sont utilisées pour mettre en évidence ces anticorps.

La technique de référence reste la mise en évidence d'anticorps précipitants IgG et IgM, appelés précipitines, par immunoélectrophorèse, ou double immunodiffusion en gel. Ces méthodes sont peu sensibles et nécessitent une concentration préalable du sérum. En contrepartie, ce sont des méthodes simples et peu coûteuses. La positivité des techniques de précipitation est généralement définie par la présence d'un arc à activité enzymatique (catalasique ou chymotrypsique) ou de 3 à 4 arcs sans activités enzymatiques. Le principal défaut de ces méthodes réside dans leur incapacité à quantifier de façon précise les anticorps.

L'électrosynérèse sur acétate de cellulose correspond à une amélioration des techniques précédentes. Cette méthode est plus rapide, plus sensible, et elle utilise moins d'antigènes. La révélation enzymatique peut également être utilisée (technique ELIEDA).

Il existe également des techniques de dépistage rapide comme l'hémagglutination indirecte qui est une méthode plus sensible, mais moins spécifique. Cette technique est réalisée à l'aide d'hématies sensibilisées par l'antigène aspergillaire, et permet la

mise en évidence des anticorps agglutinants. Elle donne à la fois une appréciation qualitative et quantitative des anticorps sériques. Toutefois la méthode manque de spécificité.

On peut également utiliser les techniques d'immunofluorescence indirecte, ou d'ELISA. Elles sont spécifiques du genre *Aspergillus*, mais ne permettent pas l'identification de l'espèce rencontrée. En cas de positivité, les filaments mycéliens fixés sur les lames présentent une fluorescence pariétale verte en lumière ultra violette.

Aujourd'hui, il est recommandé d'associer une technique de dépistage et une technique de confirmation en cas de dépistage positif.

La recherche d'anticorps est principalement utilisée pour le diagnostic de maladies aspergillaires chroniques. Elle traduit la réponse immunitaire humorale d'un hôte au contact du champignon. Dans l'aspergillose invasive, la détection d'anticorps anti-aspergillaires a un intérêt diagnostique très limité, du fait de l'immunodépression souvent très profonde des patients qui développent cette pathologie. En revanche, les anticorps anti-aspergillaires sont de bons marqueurs pronostiques. En effet l'augmentation des titres d'anticorps à la fin d'un protocole d'immunosuppression est un signe de rémission de l'aspergillose invasive, alors que leur diminution ou l'absence d'anticorps détectables est de mauvais pronostic. De plus, il faut noter que l'augmentation des IgE totales ou spécifiques sont des marqueurs non spécifiques qui doivent être recherchés au cours des aspergilloses immunoallergiques.

Ces réactions immunologiques sont couramment utilisées et ont un réel intérêt dans le diagnostic. Elles sont en général négatives en l'absence d'aspergillose. De plus, elles permettent de reconnaître très tôt une affection aspergillaire (Bouchet *et al.* 1989).

6. Détection des antigènes circulants

➤ Les galactomannanes

Ce sont des constituants hétéropolysaccharidiques thermostables de la paroi fongique. Ils sont libérés par les hyphes en phase de croissance : il s'agit d'une chaîne linéaire de mannoses non immunogénique sur laquelle sont

greffés des groupements de résidus polymérisés de β -1,5-galacto-furanose. La structure antigénique généralement détectée par les tests actuels est composée par ces polymères de galacto-furanose. Souvent une recherche qui se révèle positive dans le sang, est un argument biologique majeur pour le diagnostic de l'aspergillose invasive, en particulier chez le patient neutropénique.

La technique la plus couramment utilisée pour détecter les antigènes galactomannanes est la technique ELISA en sandwich. C'est une technique rapide et surtout plus sensible que le test d'agglutination au latex. Les échantillons doivent être prétraités afin de dissocier d'éventuels complexes antigènes-anticorps. Cependant cette étape peut induire la dégradation de certains épitopes antigéniques. Ces antigènes galactomannanes peuvent être observés 5 à 8 jours en moyenne avant l'expression clinique ou radiologique de la maladie chez 65 à 70% des patients, et avant les résultats de la culture mycologique chez 100% des patients (Desoubeaux et Chandener 2010b).

Toutefois il existe des limites pour cette technique. Tout d'abord en terme de sensibilité. Cette sensibilité est estimée autour de 70-80% dans la population de greffés de moelle, pour qui l'on recommande de faire une détection systématique bi-hebdomadaire. Cette sensibilité est moindre en pédiatrie. Ensuite en terme de spécificité. Il existe en effet un risque de fausse positivité estimé entre 5 et 15% (les valeurs élevées sont retrouvées dans la population pédiatrique). Cela impose la confirmation de toute détection douteuse ou positive sur un second prélèvement. On a distingué plusieurs causes de cette fausse positivité, notamment les translocations à partir d'antigènes galactomannanes présents dans l'alimentation (comme dans le lait, les pâtes, le pain, les céréales, le riz...), mais aussi les réactions croisées avec des antigènes pariétaux d'autres champignons, ou encore les réactions croisées avec certains médicaments (www.sante.univ-nantes.fr 07/2010).

L'évolution des concentrations de galactomannanes peut également être utile dans le suivi de la réponse au traitement antifongique, car les taux relatifs sont liés à la charge fongique individuelle. La persistance de taux

élevés de galactomannanes aspergillaires au-delà du cinquième jour de traitement semble associée à une évolution péjorative de la maladie.

Alors que le test n'est validé que pour la détection d'antigènes sériques, des travaux évoquent son intérêt pour une détection dans le LBA, le LCR ou même dans les urines. En effet les galactomannanes étant hydrosolubles, il est possible de les retrouver dans ce type de prélèvement. Toutefois, se pose toujours le problème d'une éventuelle colonisation sans réelle infection associée.

➤ Les (1-3) β -D-glucanes

Les β -D-glucanes sont présents dans la paroi cellulaire de la plupart des agents fongiques pathogènes à des taux significatifs, notamment chez les *Aspergillus*. Leur mesure dans le sérum représente une aide au diagnostic des pathologies fongiques et mycoses profondes, comme l'aspergillose invasive. Cette recherche se fait grâce à une méthode colorimétrique ou cinétique. La détection des β -D-glucanes semble être plus sensible que celle des galactomannanes dans les aspergilloses invasives, donc avec des seuils de détection plus faibles. Ces faibles quantités peuvent s'expliquer par le fait que les β -D-glucanes sont normalement des constituants faisant partie intégrante de la paroi fongique et qui, contrairement aux galactomannanes, ne sont pas relargués dans la circulation sanguine par la cellule aspergillaire. Cette méthode est donc dotée d'une bonne sensibilité, mais le manque de spécificité intrinsèque des β -D-glucanes nécessite d'intégrer les résultats dans un contexte global : clinique, radiologique et microbiologique.

La cinétique sérologique de ces antigènes est mal maîtrisée, mais leur détection chez les patients sous traitement antifongique et présentant une amélioration sur le plan clinique, semble être prolongée par rapport à celle des galactomannanes.

Cette recherche des antigènes aspergillaires β -D-glucanes peut être utilisée en diagnostic d'élimination, notamment pour exclure une aspergillose invasive dans certaines situations cliniques. Elle peut aussi être utilisée pour consolider le diagnostic d'une aspergillose invasive si la recherche de

galactomannanes s'est révélée positive. En effet la recherche combinée de β -D-glucanes et de galactomannanes semble être plus efficace que chaque test mené isolément. La valeur prédictive positive de ces tests menés conjointement s'approche de 100% s'ils se révèlent tous les deux positifs (Desoubeaux et Chandener 2010b).

Enfin, la recherche de β -D-glucanes peut être utilisée dans le suivi des patients sous traitement antifongique.

Ainsi, ce test pourrait devenir un outil important pour la surveillance des aspergilloses invasives et autres infections fongiques chez les populations à risque, à condition qu'il soit pratiqué de façon routinière.

La mise en évidence de l'antigénémie est très spécifique et peut même précéder la manifestation clinique du processus d'aspergillose invasive chez l'homme. Mais la sensibilité de ces méthodes n'est pas encore parfaite. Il faut souligner l'importance de la répétition fréquente de la recherche des antigènes circulants, qui permet de mieux apprécier la valeur de la méthode. Le renouvellement des épreuves avec le sérum d'un même individu fait apparaître de larges variations du taux des antigènes, qui peuvent être liées à la médication instituée. Cependant les sérums de sujets sains sont toujours négatifs.

7. Recherche de signes biologiques non spécifiques

Les signes biologiques tels que l'hyperéosinophilie sanguine, ou encore l'augmentation des IgE totales, sont des marqueurs non spécifiques importants et qui doivent être recherchés au cours des aspergilloses immuno-allergiques, surtout pendant les phases d'exacerbation de la maladie (figure 19).

Cependant les IgE spécifiques anti-*Aspergillus* présentes dans le sérum, sont aussi très intéressantes pour l'étude du phénomène allergique de la maladie aspergillaire.

8. Epreuves d'hypersensibilité cutanée

On a vu que les deux types de réactions d'hypersensibilité, immédiate et retardée, sont observés chez les sujets atteints d'aspergillose viscérale.

		Mise en évidence du champignon	Détection d'anticorps circulants	Détection d'antigènes circulants	Marqueurs non spécifiques (éosinophiles et IgE)
Aspergillome		++	++	-	-
Aspergillose localisée		++	+	-	-
Aspergillose invasive		++	+/-	+++	-
Aspergilloses immunoallergiques	ABPA	+/-	++	-	+++
	Asthme	-	-	-	++
	Alvéolite extrinsèque	-	++	-	-

Figure 19

Principales indications des tests diagnostiques

D'après ANOFEL 2010

La réaction immédiate, de type anaphylactique, paraît plus spécifique que la réaction retardée. Cependant, la réaction d'hypersensibilité retardée est intéressante, car positive chez la plupart des malades immuno-compétents. La considération des deux types réactionnels est alors intéressante. Les réponses semi-tardives (sixième heure : réaction de type III), qui peuvent persister pendant 24 heures, confirment la réaction précoce. Dans les deux cas, la papule réactionnelle doit être assez large, égale ou supérieure à 10 mm de diamètre (Euzeby 1992).

9. Apport de l'imagerie dans le diagnostic aspergillaire

Les infections aspergillaires pulmonaires représentent actuellement une préoccupation de plus en plus fréquente en pratique clinique et radiologique, en particulier au cours de la prise en charge des patients immunodéprimés. L'analyse de clichés standards et de coupes scanographiques permet d'évoquer différents diagnostics selon le type d'images et surtout selon le tableau clinique. L'imagerie a un rôle important dans l'élaboration du diagnostic précoce des infections pulmonaires aspergillaires. Les images les plus évocatrices d'aspergillose sont le signe du halo, relativement précoce, et le signe du croissant, plus tardif. La radiographie standard, même si elle est incontournable dans la surveillance régulière des patients, est cependant décevante dans les premiers temps de l'infection fongique, contrairement au scanner thoracique. Aussi le scanner thoracique devrait être envisagé comme examen de première intention.

Deux études illustrent l'intérêt de nouvelles stratégies :

- D'après Anonyme (2005), une étude a été effectuée afin de comparer deux périodes, l'une sans scanner thoracique systématique, l'autre avec scanner systématique. La réalisation de ce dernier raccourcit le délai entre signes et diagnostic d'environ 5 jours, et permet alors un traitement plus précoce. Sa sensibilité est évaluée à 94%. La mortalité attribuable à l'aspergillose passe de 50 à 21%.
- Kami *et al.* (2000) ont effectué une étude portant sur 30 aspergilloses. Ils montrent que sur les 10 patients ayant une radiographie standard normale, 9 d'entre eux ont un scanner anormal. Les anomalies sont observées au scanner

plus précocement que sur la radiographie standard sur 22 patients ; simultanément sur 7 patients ; et plus tardivement sur un seul patient. En ne considérant comme significatifs que les signes du halo et du croissant, la sensibilité est à 44% et la spécificité à 98%. En incluant les nodules multiples, la sensibilité passe à 94%.

La réalisation précoce d'explorations scannographiques permet alors la mise en route plus rapide de mesures diagnostiques et thérapeutiques.

La tomodensitométrie est une technique qui apporte une sensibilité très supérieure à la radiographie standard, car elle permet la détection grâce à des coupes en haute résolution, des petites lésions nodulaires et des anomalies interstitielles souvent méconnues. Elle permet un diagnostic positif et surtout topographique plus précis. L'apport diagnostique est fondamental grâce à la haute résolution et à l'injection de produits de contraste intraveineux permettant d'élaborer un risque potentiel par rapport au médiastin et aux artères pulmonaires. La tomodensitométrie autorise un diagnostic topographique précis et une évaluation de la gravité de l'infection intra-parenchymateuse (figure 20).

Le diagnostic des différentes formes d'aspergilloses repose, en pratique courante, sur un faisceau d'arguments, parmi lesquels la clinique, l'imagerie, et la biologie ont tous leur importance. Le diagnostic repose également sur une confrontation entre le terrain sur lequel elles surviennent et la nature de l'infection suspectée. Cependant, aujourd'hui encore, le diagnostic d'aspergillose invasive demeure bien trop tardif, alors qu'il est largement démontré que seul l'établissement d'un diagnostic précoce préjuge d'une évolution favorable.

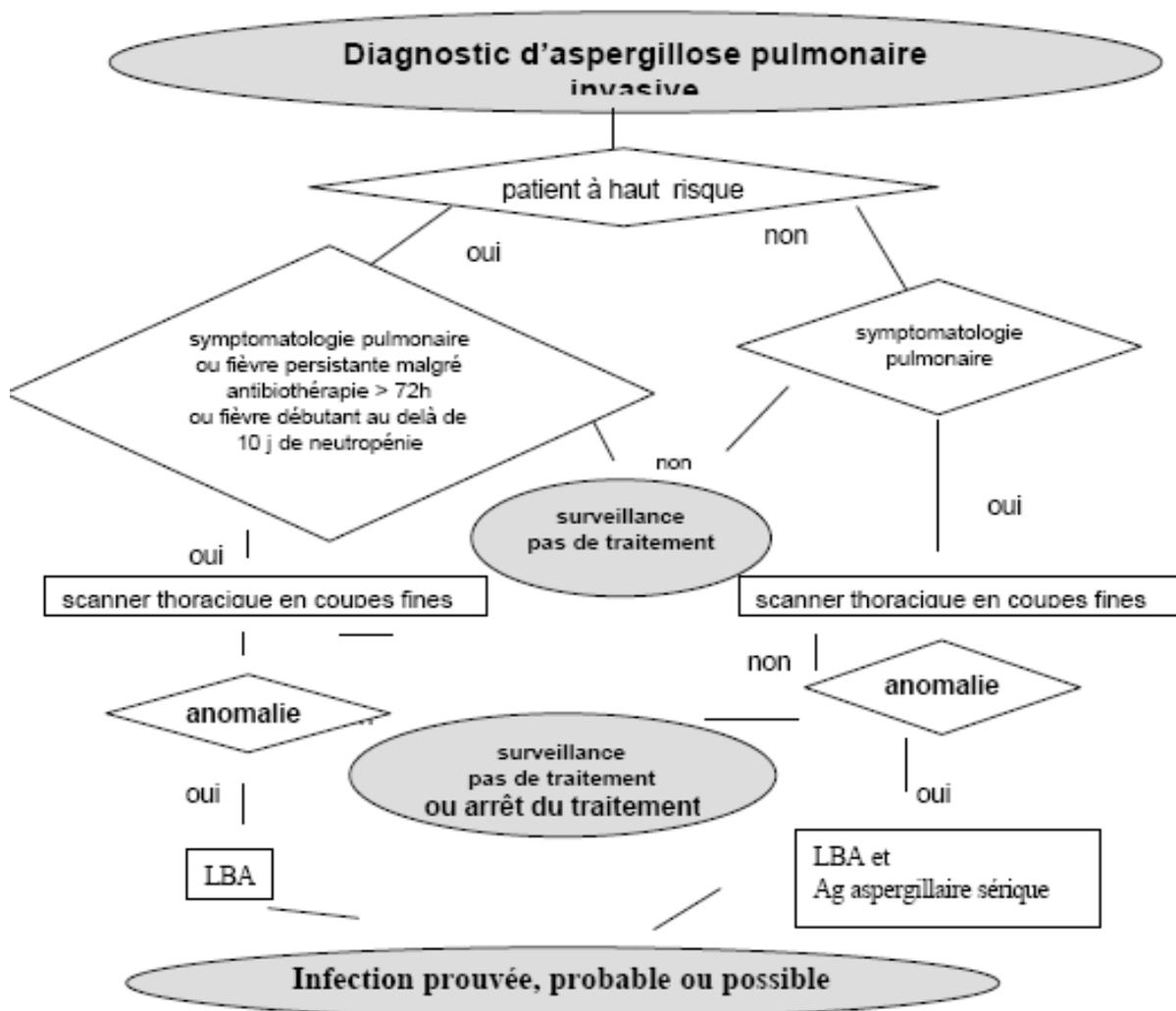


Figure 20

Diagnostic d'aspergillose pulmonaire invasive chez le patient immunodéprimé

(Anonyme 2005)

Chapitre 5

Traitement des maladies aspergillaires

Le choix thérapeutique disponible aujourd'hui pour le traitement des maladies aspergillaires reste encore relativement limité, même s'il s'est enrichi récemment de nouveaux antifongiques. Nous allons d'abord faire le point sur les médicaments utilisés pour traiter ces pathologies. Dans un second temps, nous expliquerons les principales indications de ces traitements. Enfin nous terminerons ce chapitre par la prophylaxie et la conduite à tenir pour limiter la survenue des infections aspergillaires.

1. Médicaments utilisés

1.1 L'amphotéricine B

L'essentiel des informations de cette partie est tiré des travaux de Chavanet 1997, Deroure *et al.* 2006, Andrès *et al.* 2001, Desoubeaux et Chandénier 2010c.

- **Généralités**

L'amphotéricine B, isolée de *Streptomyces nodosus*, est un antifongique de la famille des macrolides polyéniques comprenant 200 composés, tous caractérisés par une structure cyclique contenant une fonction lactone, des doubles liaisons conjuguées donnant le caractère hydrophobe, et une région hydrophile composée des groupements hydroxyles (d'où le nom d'amphotère) (figure 21). C'est un composé insoluble dans l'eau à pH neutre. Son utilisation

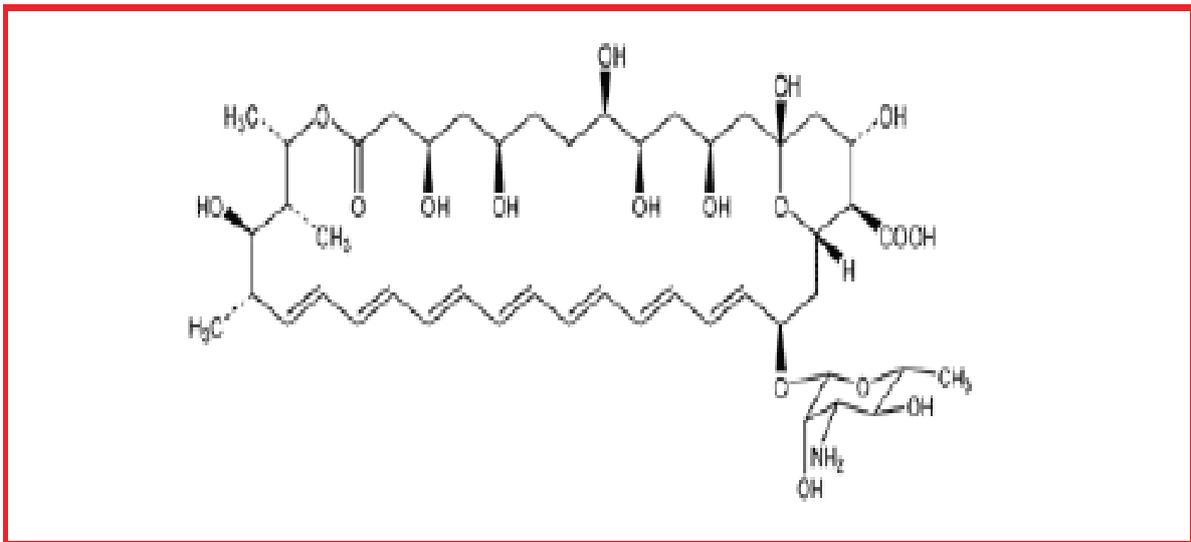


Figure 21

Formule chimique de l'amphotéricine B

(Desoubaux et Chandenier 2010c)

par voie intraveineuse nécessite l'association au désoxycholate de sodium : Fungizone®, pour obtenir une préparation soluble dans l'eau ou le soluté glucosé à 5%, sous forme colloïdale faite de micelles. En solution aqueuse, l'amphotéricine B se répartit schématiquement en trois états : une forme agrégée responsable de la toxicité, une forme oligomère (surtout dimère) douée d'une moindre toxicité, et une forme monomérique peu toxique responsable de l'activité antifongique. L'équilibre entre ces trois formes n'est pas figé et varie selon la concentration d'amphotéricine B et le solvant. On verra alors l'importance du choix du support de solubilisation pour réduire la proportion de forme toxique.

L'amphotéricine B est actuellement le traitement de référence des mycoses systémiques. Diverses formulations lipidiques d'amphotéricine B (Amphotéricine B associée à Intralipide®, Amphocil®, Abelcet®, Ambisome®) ont été développées afin de réduire sa toxicité et d'augmenter son index thérapeutique.

Tous les médicaments ayant comme principe actif l'amphotéricine B sont des médicaments de liste I. Ils sont soumis à une prescription hospitalière et dispensés uniquement à l'hôpital. Ils sont tous destinés à être administré par voie intraveineuse et sont conservés à une température comprise entre 2 et 8°C. Cependant il existe des formes disponibles à l'officine : Fungizone® lotion, Fungizone® gélule, et Fungizone® suspension buvable, qui sont destinées à traiter des affections localisées comme les candidoses buccales, intestinales, vaginales ou cutanées, mais qui ne sont pas utilisées pour le traitement des pathologies aspergillaires.

- Mécanismes d'action

L'amphotéricine B a une affinité très forte pour l'ergostérol, qui est le principal stérol de la paroi des membranes fongiques. Par ce biais, l'amphotéricine B induit la formation de pores membranaires, car les polyènes dépolarisent la bicouche phospholipidique. Ces pores sont alors à l'origine de la lyse du champignon par rupture de l'intégrité osmotique (figure 22). Cela entraîne des troubles de la perméabilité : sorties d'ions et de divers composés

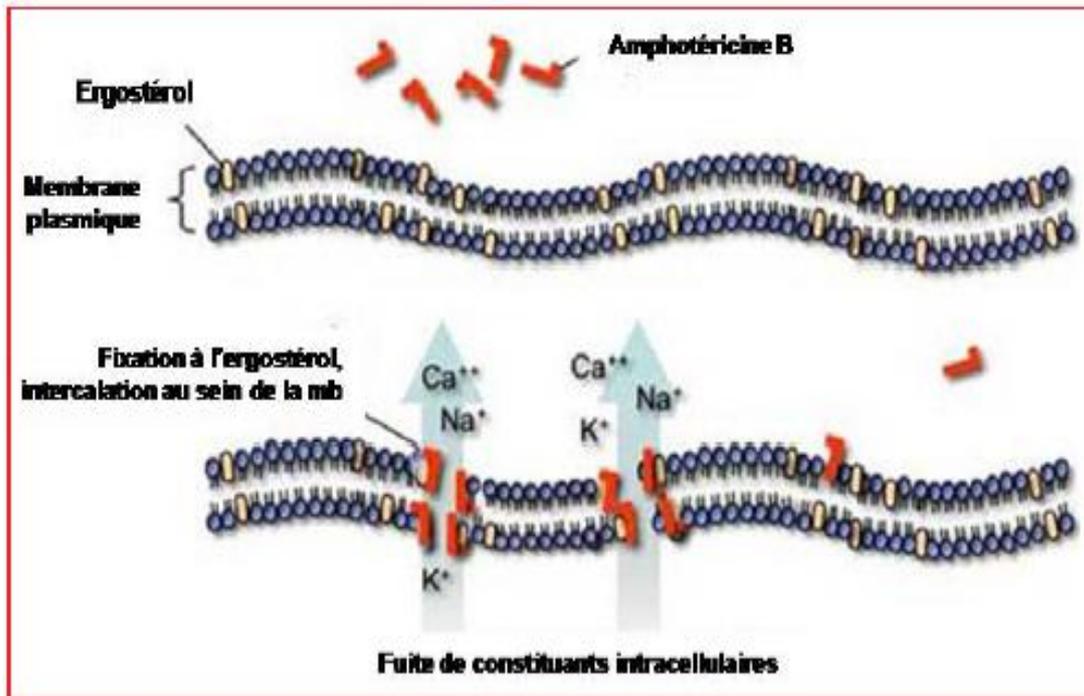


Figure 22

Mode d'action de l'amphotéricine B

(Desoubeaux et Chandenier 2010c)

intracellulaires, qui mènent à la mort de la cellule fongique. Son affinité moindre pour le cholestérol (principal stérol des membranes cellulaires des mammifères) explique pour une part la toxicité observée. D'autres mécanismes sont également impliqués dans le mode d'action de l'amphotéricine B, comme l'inhibition de la pompe à protons chez *Candida albicans* ou l'induction d'une peroxydation des lipides membranaires.

- Spectre d'activité

Il s'étend à la majorité des agents fongiques responsables d'infections humaines, notamment la plupart des espèces d'*Aspergillus* et de *Candida*, mais aussi *Cryptococcus neoformans*. Le spectre d'action de l'amphotéricine B inclut également certains protozoaires comme *Leishmania* sp.

- Données pharmacologiques

La pharmacocinétique de l'amphotéricine B est complexe. Elle se lie fortement aux protéines plasmatiques (91 à 95%) après administration par voie intraveineuse. Sa demi-vie plasmatique est de 24 à 48 heures, mais sa demi-vie d'élimination est proche de 15 jours. Sa distribution suit alors un modèle tricompartmental. Des concentrations élevées d'amphotéricine B sont trouvées dans le foie (14 à 41% de la dose administrée), les reins (0,3 à 2%) et les poumons (1,2 à 6%). L'amphotéricine B pénètre dans les cellules (notamment les macrophages) et exerce ainsi son activité sur les agents fongiques phagocytés (figure 23). L'élimination urinaire et biliaire est faible. En pratique, il faut noter que les concentrations sériques ne reflètent pas les concentrations tissulaires.

- Aspects cliniques/Posologie

L'amphotéricine B à la posologie de 0,5 à 1,5 mg/kg/j reste le traitement de référence de la plupart des mycoses systémiques, notamment chez les immunodéprimés. Son efficacité est variable suivant la nature de l'agent fongique incriminé et du terrain sous-jacent : greffes d'organes ou de moelle, hémopathies et cancers, infection par le VIH, corticothérapie, diabète... Une

	Fungizone®	Intralipide®	Amphocil®	Abelcet®	Ambisome®
structure	Emulsion	Emulsion	Ruban	Disque	Liposome unilamellaire
composition	Désoxycholate		Sulfate de cholestérol	Phospholipides	Phospholipides
Posologie (mg/kg)	1	1	5	5	3
Pic Plasmaticque (mg/L)	1,7	1,15	3,1	1,7	14,4
Demi-vie plasmaticque (h)	26,8	30,7	27	ND	13
Aire sous la courbe (mg.h/L)	25	16	36	14	171
Volume de distribution (L/kg)	2 à 4	3	18	131	0,4

Figure 23

Données pharmacocinétiques pour l'AmB conventionnelle et les formes lipidiques

D'après Andrès *et al.* 2001

réponse à l'amphotéricine B est ainsi observée dans 20 à 83% des aspergilloses pulmonaires invasives (cette grande dispersion souligne l'importance du terrain), (Andrès *et al.* 2001).

- Effets secondaires

Des réactions d'intolérance immédiates sont observées chez 70 à 90% des patients. Elles comportent de la fièvre, des frissons, des céphalées, des nausées, des vomissements et des diarrhées. Exceptionnellement on peut observer un bronchospasme, une hypotension, voire des troubles du rythme cardiaque. Une partie de ces effets secondaires serait liée à la libération de prostaglandines et de cytokines. Parmi les autres manifestations rapportées directement à l'administration d'amphotéricine B, on note des veinites, des thrombophlébites et des réactions allergiques. Plusieurs substances telles que le paracétamol ou le néfopam sont susceptibles d'atténuer ces effets secondaires. La durée optimale de perfusion reste un sujet de controverse. En effet une meilleure tolérance lors de perfusion rapide (1 heure) a été suggérée, mais généralement on recommande une perfusion intraveineuse en 4 heures notamment lors de l'instauration du traitement ou s'il existe une insuffisance rénale, une hypokaliémie ou des troubles cardiaques.

Toutefois, les effets secondaires les plus préoccupants sont : l'insuffisance rénale (dose dépendante et plus ou moins réversible), et les troubles métaboliques comme l'hypokaliémie, l'hypomagnésémie et l'acidose lactique. Cette néphrotoxicité concerne 24 à 80% des patients. Elle s'explique par une tubulopathie (avec lésions tubulaires) à l'amphotéricine B qui est constante et par une atteinte glomérulaire (dépôt d'oligomères dans les glomérules). La responsabilité d'une vasoconstriction des artères rénales est envisagée. De plus, il faut souligner le rôle aggravant ou favorisant de la déplétion sodée et de l'association à d'autres médicaments néphrotoxiques (comme la ciclosporine, les aminosides, la vancomycine...). La prévention des désordres hydroélectriques, notamment une expansion volémique adéquate et une alcalinisation des urines préalable à l'administration du médicament, ainsi que l'apport de sodium (par soluté physiologique) réduisent cette néphrotoxicité.

Enfin, une toxicité médullaire (anémie, leucopénie ou thrombopénie) est rarement signalée.

Il faut noter que les seules contre-indications absolues de l'amphotéricine B sont l'allergie à un composé de la famille des macrolides polyéniques et l'insuffisance rénale.

- Les différentes formulations lipidiques de l'amphotéricine B

Afin de répondre à la nécessité thérapeutique d'un antifongique puissant tel que l'amphotéricine B, tout en atténuant sa néphrotoxicité, de nombreuses alternatives ont été explorées. Plusieurs formulations lipidiques ont été développées afin d'en améliorer la tolérance rénale, mais elles permettent également une excellente diffusion tissulaire du médicament (on parle de vectorisation du médicament sur des supports lipidiques), sans qu'il puisse interagir avec le cholestérol membranaire des cellules humaines. Au contact de la membrane fongique, la couverture lipidique se délite et l'amphotéricine B peut alors se complexer à l'ergostérol membranaire pour former un pore.

- ❖ L'amphotéricine B en complexe lipidique (ABLC) : Abelcet®

C'est une suspension d'amphotéricine B et de phospholipides (dimyristoyl phosphatidylcholine et dimyristoyl phosphatidylglycérol). Les particules forment alors des rubans de 1600 à 6000 nm de long.

- ❖ L'amphotéricine B incorporée dans les liposomes : Ambisome®

Ce médicament correspond à une formulation lipidique d'amphotéricine B incorporée dans des liposomes unilamellaires. Ces liposomes sont constitués de phosphatidylcholine hydrogéné, de cholestérol et de distéaroyl phosphatidylglycérol. Ils forment des sphères de 80 nm de diamètre.

- ❖ L'amphotéricine B en dispersion colloïdale : Amphocil®

Ce médicament est composé d'amphotéricine B liée à du sulfate de cholestérol, selon un mélange équimolaire. Les particules ont une forme de disque de 120 à 140 nm de diamètre et de 4 nm d'épaisseur.

❖ L'amphotéricine B associée à l'Intralipide®

L'amphotéricine B étant une molécule amphotère, il est possible de l'incorporer dans des vecteurs lipidiques : émulsions lipidiques, structures lipidiques plus ou moins complexes (disques, rubans) et liposomes. L'emploi d'une émulsion extemporanée de nutrition parentérale (Intralipide® à 20%) a ainsi été développé.

L'amphotéricine B conventionnelle reste actuellement le traitement de référence des infections fongiques sévères et profondes. Cependant les données disponibles sur les nouvelles formulations lipidiques de l'amphotéricine B sont suffisantes pour soutenir les notions de meilleure tolérance et d'efficacité au moins équivalente à l'amphotéricine B conventionnelle dans diverses mycoses systémiques, notamment dans les aspergilloses. La place de ces formes d'amphotéricine B en seconde intention (échec ou toxicité de l'amphotéricine B conventionnelle) ou en cas d'atteinte rénale préalable peut donc se concevoir. De plus, étant donné la meilleure tolérance clinique de ces produits, les doses peuvent être revues à la hausse par rapport à l'amphotéricine B désoxycholate et les posologies recommandées sont respectivement de : 5 mg/kg/j pour Abelcet®, 3-5 mg/kg/j (jusqu'à 15 mg/kg/j pour les formes les plus graves, mais avec une augmentation de la toxicité rénale à partir de 10 mg/kg/j) pour Ambisome®, 3-4 mg/kg/j pour Amphocil®, 1 mg/kg/j pour la forme Intralipide® ; contre 0,5-1,5 mg/kg/j pour la forme conventionnelle. Toutefois, en dehors du problème du coût (car ces formulations lipidiques sont plus onéreuses), des études sont encore nécessaires pour comparer les différentes formulations entre elles, déterminer les doses optimales et envisager une utilisation plus large.

1.2 Les dérivés triazolés : voriconazole, itraconazole et posaconazole

L'essentiel des informations de ce paragraphe est tiré des travaux de Dupont 2003, Desoubeaux et Chandener 2010c.

- **Généralités**

D'un point de vue historique, le kétoconazole (Nizoral®) et le fluconazole (Triflucan®) sont les deux produits azolés les plus anciens. Le premier, du fait de sa grande toxicité, et le second, à cause de son inefficacité sur les champignons filamenteux, ne sont pas utilisés dans le traitement des aspergilloses. Néanmoins, les nouveaux produits issus de cette classe médicamenteuse dérivent généralement des structures primaires de ces molécules qui ont été modifiées de façon à améliorer leur tolérance et leur efficacité vis-à-vis des champignons filamenteux.

- **Mode d'action**

Les dérivés azolés agissent en inhibant la synthèse de l'ergostérol, qui est un des constituants principal de la paroi fongique. En effet les dérivés azolés bloquent une enzyme : la déméthylase du 14 α -lanostérol par inhibition du cytochrome P450. L'inactivation de cette enzyme entraîne l'accumulation de stérols intermédiaires toxiques. Cette action contribue à fragiliser la membrane fongique, et la perméabilité membranaire s'en trouve accrue. De plus la croissance fongique est freinée (figure 24).

- **Intéactions médicamenteuses**

Les dérivés azolés sont des inhibiteurs du cytochrome P450 qui intervient sur bon nombre d'enzymes. On peut alors observer de nombreuses interactions médicamenteuses : rifamycine, anti-épileptiques, anti-protéases du VIH, médicaments immunosuppresseurs (tacrolimus, sirolimus, ciclosporine)...

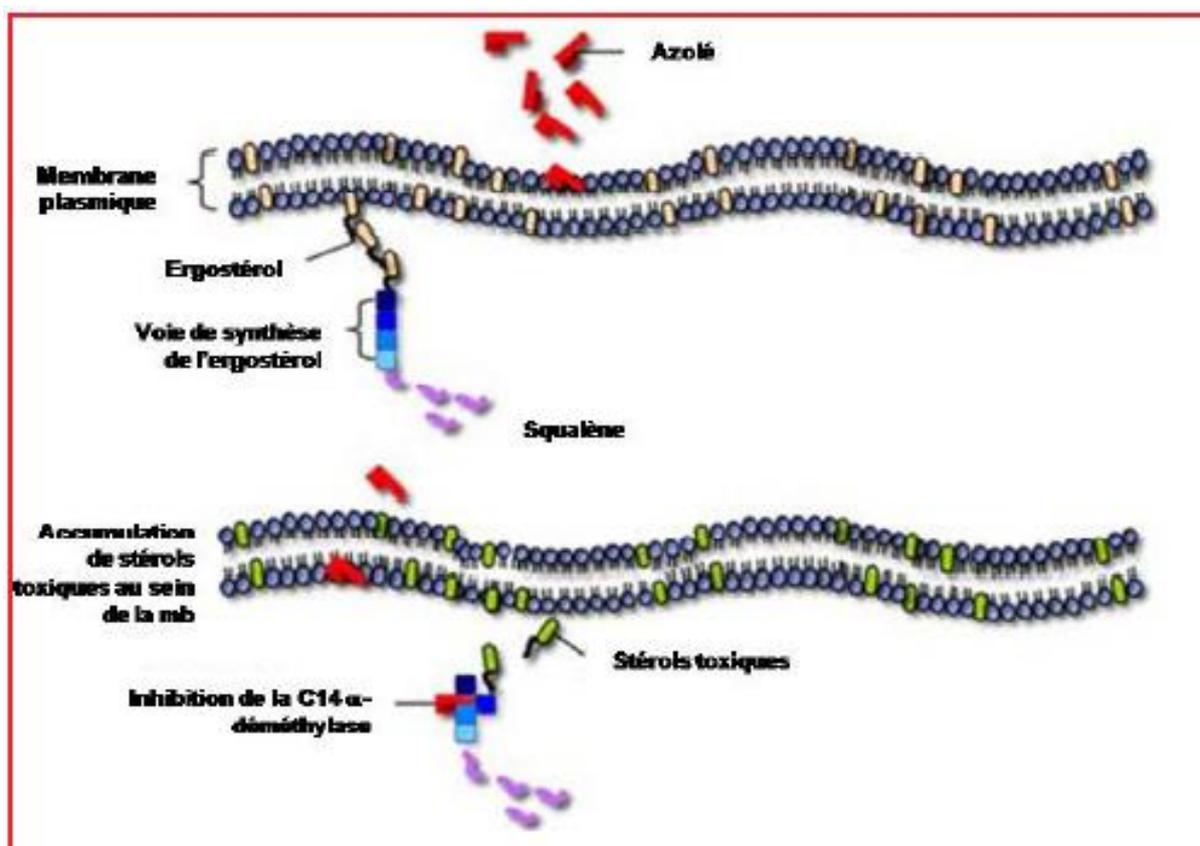


Figure 24

Mode d'action des azolés

(Desoubeaux et Chandener 2010c)

1.2.1 Le voriconazole (V-Fend®)

Ce médicament de liste I possède plusieurs présentations : la forme comprimé à 50 ou 200 mg, la forme poudre pour suspension buvable à 40 mg/mL, et la forme poudre pour solution pour perfusion (IV) à 200 mg (ces deux dernières sont à conserver à une température comprise entre 2 et 8°C). Pour cette dernière forme, la poudre est reconstituée à l'aide de 19 mL d'eau pour préparations injectables, fournissant alors un volume total utilisable de 20 mL d'une solution limpide à 10 mg/mL de voriconazole. Ce médicament est soumis à une prescription hospitalière et dispensé uniquement à l'hôpital.

Le voriconazole est une molécule triazolée qui est dérivée du fluconazole dont l'activité restreinte aux levures a pu être étendue aux champignons filamenteux par modification de sa structure chimique (figure 25). Toutefois son activité contre les moisissures serait limitée aux *Aspergillus*, *Fusarium*, et certaines espèces de *Scedosporium*.

Le voriconazole a une action fongicide vis-à-vis des *Aspergillus* à la dose de charge de 6 mg/kg x2 en IV le premier jour, suivie de 4 mg/kg/j x2 en IV. Une formulation orale, à prendre en dehors des repas, permet un relais du traitement intra-veineux à partir de la première semaine de traitement. La durée totale de traitement est définie en fonction du terrain et de l'évolution clinique et biologique de l'infection, mais en général elle s'étend sur plusieurs semaines.

Le voriconazole diffuse bien dans les tissus lipidiques, ce qui en fait une alternative de choix en cas d'aspergillose cérébrale. Des méthodes de dosage sanguin existent, mais la pharmacocinétique non linéaire, due à l'effet du premier passage hépatique, et l'absence de relation évidente entre les taux sériques et l'efficacité dans les études cliniques, n'incitent pas à s'écarter des posologies standard. Toutefois, des ajustements de posologies sont préconisés chez les patients atteints d'insuffisance hépatique, et chez certaines populations particulières qui métabolisent lentement le principe actif du produit (polymorphisme individuel du cytochrome P450).

Le voriconazole est bien toléré en dehors d'effets indésirables rares, notamment des perturbations du bilan biologique hépatique, des troubles

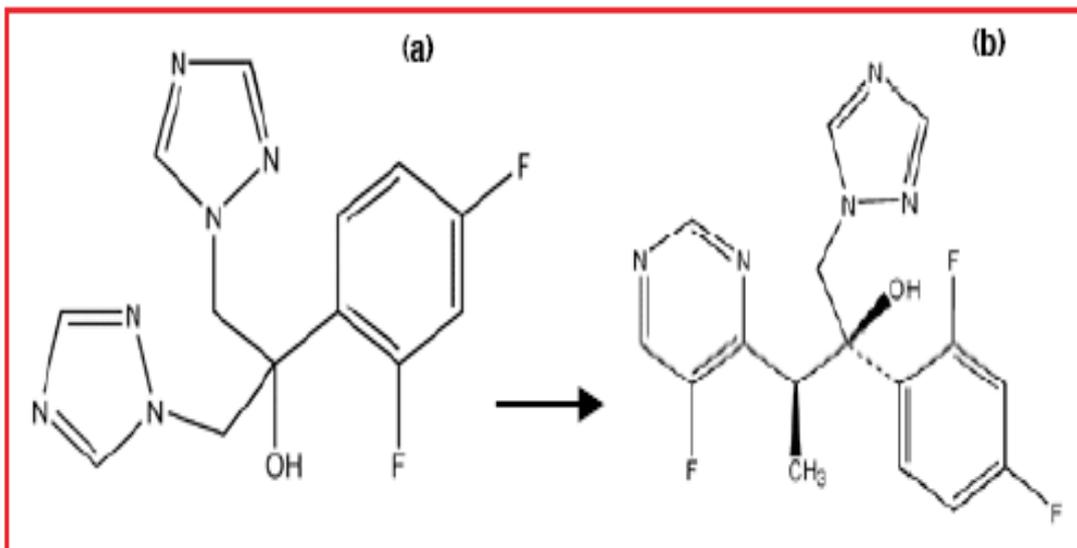


Figure 25

Formule chimique du fluconazole (a) et du voriconazole (b)

(Desoubeaux et Chandener 2010c)

cutanés, et des anomalies de la vision (avec un flou visuel, une diplopie, une dyschromatopsie ou une photophobie) rapidement réversibles à l'arrêt du traitement. Cependant, comme pour la plupart des azolés, il faut tenir compte des interactions médicamenteuses dues à l'inhibition enzymatique du cytochrome P450. De plus, le voriconazole est contre indiqué avec la prise concomitante de millepertuis, ou en cas d'hypersensibilité à l'un des constituants. Enfin, l'administration intraveineuse en bolus rapide est également contre indiquée.

Le voriconazole a démontré sa supériorité par rapport à l'amphotéricine B dans le traitement de première intention de l'aspergillose invasive. Une étude ouverte a confirmé son efficacité dans les aspergilloses invasives avec un taux de réponse proche de 50% chez les patients traités en première ligne ou après un échec du traitement antérieur (Denning *et al.* 2002). L'essai randomisé de Herbrecht *et al.* (2002), portant sur des patients atteints d'aspergillose invasive a comparé le voriconazole et l'amphotéricine B désoxycholate. Les auteurs ont observé que le taux de réponse et la survie à 12 semaines étaient significativement meilleurs avec le voriconazole, et de plus avec moins d'effets secondaires.

1.2.2 L'itraconazole (Sporanox®)

Ce médicament de liste I possède plusieurs présentations. Il existe une forme injectable à 10 mg/mL et deux formes orales : des gélules à 100 mg et une solution buvable à 10 mg/mL. Ce médicament est soumis à une prescription hospitalière. Les formes orales sont disponibles à l'officine, mais la forme injectable est uniquement dispensée à l'hôpital.

Initialement, cet antifongique triazolé était plutôt réservé aux infections non invasives (figure 26). Au cours de l'aspergillose invasive, l'intérêt d'une formulation administrable par voie intraveineuse en première intention est discutable. De plus, son utilisation en relais par voie orale a beaucoup diminué depuis l'introduction du voriconazole *per os*. Toutefois, les différentes études rapportées dans les travaux de Desoubeaux et Chandener 2010c ont mis en évidence des taux de réponse de l'aspergillose compris entre 39 et 63%.

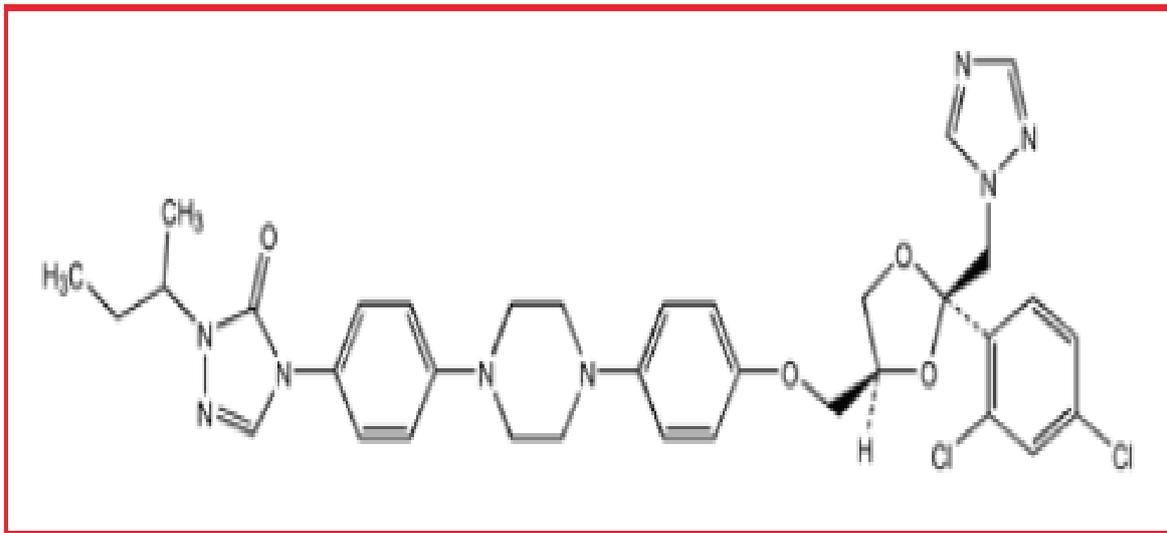


Figure 26

Formule chimique de l'itraconazole

(Desoubieux et Chandenier 2010c)

La posologie usuelle de l'itraconazole au cours des affections aspergillaires est généralement comprise entre 100 et 400 mg/j en 2 fois.

L'itraconazole est très lipophile ; par conséquent on le retrouve à de fortes concentrations dans les tissus gras. Un suivi de l'itraconazolémie est recommandé du fait de la variabilité individuelle de l'absorption digestive de l'itraconazole qui est influencée par la prise alimentaire et l'acidité gastrique. Il existe également un effet de premier passage hépatique qui rend la pharmacocinétique du produit non linéaire. La biodisponibilité a toutefois été améliorée par la formulation en suspension buvable (augmentation de 30% par rapport aux gélules), mais la tolérance digestive de cette dernière est médiocre. Les effets indésirables de l'itraconazole sont rares, souvent de faible intensité, et réversibles à l'arrêt du traitement. On a pu observer : des troubles gastro-intestinaux (dyspepsie, nausées, vomissements, diarrhées, douleur abdominale, constipation), de l'hypertension, une hypokaliémie, des oedèmes, des céphalées, et des troubles hépatiques. De plus, comme pour la plupart des dérivés azolés, il faut être vigilant en ce qui concerne les interactions médicamenteuses.

Il est important de préciser que quelques souches d'*A. fumigatus* ont été décrites comme résistantes à l'itraconazole. Un mécanisme de résistance par efflux a été évoqué, ainsi qu'une modification de la cible enzymatique de la drogue (Desoubeaux et Chandener 2010c).

1.2.3 Le posaconazole (Noxafil®)

Le posaconazole est un médicament de liste I, qui n'a été utilisé jusqu'à présent que sous la forme d'une suspension buvable à 40 mg/mL. Ce médicament est soumis à une prescription hospitalière et est uniquement dispensé à l'hôpital.

Le posaconazole est un nouvel antifongique triazolé à large spectre (figure 27). En plus des *Aspergillus sp.*, il couvre également les *Candida sp.*, ainsi que les *Fusarium sp.*, les *Scedosporium sp.*, et certaines mucorales.

Par rapport à l'itraconazole, le posaconazole est un inhibiteur plus puissant de la C14-déméthylation des stérols fongiques, surtout chez les *Aspergillus*. Malgré une demi-vie longue, la dose quotidienne doit être fractionnée en raison d'une

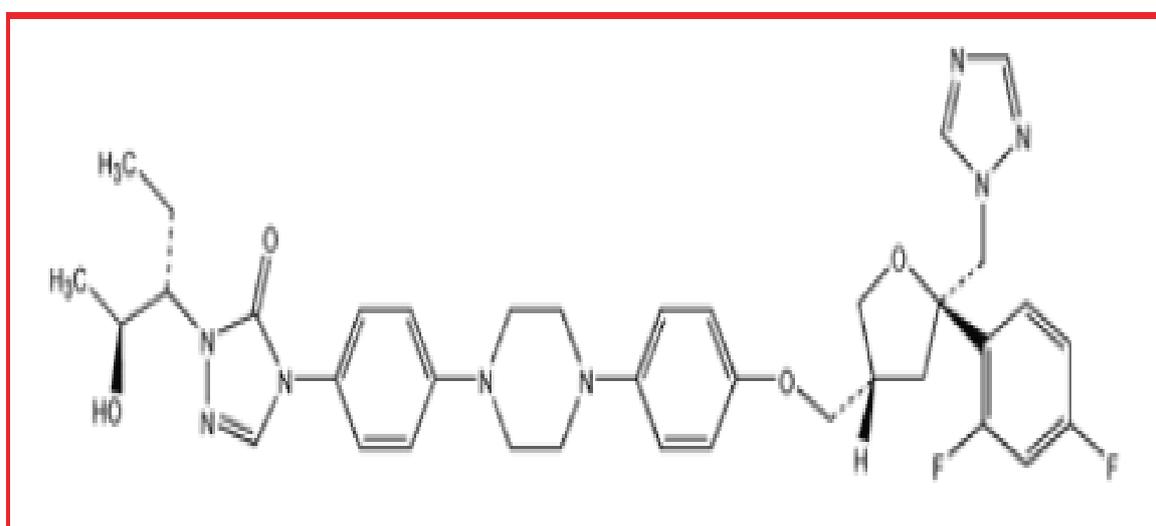


Figure 27

Formule chimique du posaconazole

(Desoubeaux et Chandener 2010c)

saturation de l'absorption. Cependant une alimentation riche en lipides augmente sa biodisponibilité. Les difficultés d'absorption de ce produit justifient un dosage des concentrations sériques résiduelles. La posologie pour le traitement de l'aspergillose est généralement de 400 mg deux fois par jour. Le posaconazole est relativement bien toléré, en dehors de quelques effets indésirables comme des nausées, des céphalées, et des modifications des marqueurs biologiques hépatiques. Toutefois, ce médicament est contre indiqué chez la personne de moins de 18 ans. Comme pour les autres dérivés azolés il faut être vigilant en ce qui concerne les interactions médicamenteuses. Actuellement, le posaconazole est utilisé en seconde intention chez l'adulte pour le traitement des aspergilloses invasives réfractaires au voriconazole. Cependant ce médicament a trouvé sa place dans la prévention des pathologies aspergillaires chez les patients à risque.

1.3 La caspofungine (Cancidas®)

L'essentiel des informations de ce paragraphe est tiré des travaux de Dupont 2003, Datry et Bart-Delabesse 2005, Desoubeaux et Chandénier 2010c.

- **Généralités**

La caspofungine est un hexapeptide cyclique hydrosoluble de la classe des échinocandines (figure 28). Elle est un dérivé aminé semi-synthétique de la pneumocandine B, produit naturel de la fermentation d'un champignon filamenteux : *Glarea lozoyensis*. La caspofungine est le premier représentant d'une nouvelle famille d'antifongiques avec un mode d'action original au niveau de la paroi fongique. Deux autres médicaments sont en expérimentation clinique : la micafungine (Mycamine®) et l'anidulafungine (Ecalta®). Cependant aujourd'hui, seule la caspofungine (Cancidas®) possède une autorisation de mise sur le marché. Cette AMM a été obtenue après une étude portant sur des patients présentant une aspergillose réfractaire ou une intolérance aux autres traitements. Le taux de réponse globale était de 44%, dont 39% en cas d'atteinte réfractaire et de 75% en cas d'intolérance (Desoubeaux et Chandénier 2010c). C'est un médicament de liste I soumis à prescription

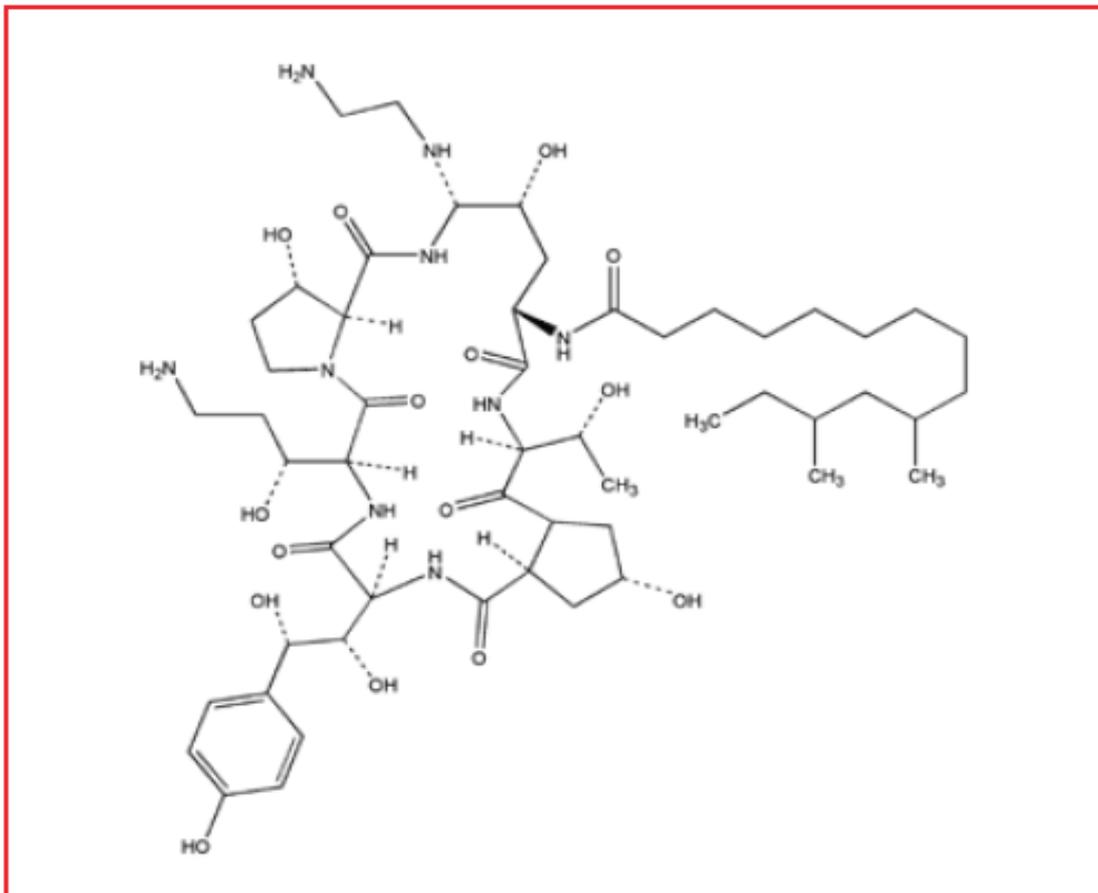


Figure 28

Formule chimique de la caspofungine

(Desoubeaux et Chandener 2010c)

hospitalière et dispensé uniquement à l'hôpital. Il se présente uniquement en poudre pour solution à diluer pour perfusion à 50 ou à 70 mg. Ce produit doit être conservé entre +2°C et +8°C.

- Mécanisme d'action

Le mode d'action caractéristique de la famille des échinocandines est l'inhibition de la synthèse de β -(1,3)-D-glucane, qui est un élément majeur de la structure de la paroi d'un grand nombre de champignons, dont les *Aspergillus*. Les échinocandines agissent alors en inhibant la β -(1,3)-D-glucane synthase. Le blocage de cette enzyme aboutit à une altération de la paroi par déplétion en polymères de glucanes, ce qui rend la cellule fongique sensible au stress osmotique (figure 29). De plus, cette enzyme étant absente de l'organisme humain, cela laisse présager une action très sélective avec un minimum de toxicité liée au mode d'action.

- Spectre d'activité

La caspofungine a un large spectre d'activité, il concerne en particulier les *Candida* et les *Aspergillus*. Mais la caspofungine est également active sur d'autres champignons comme : *Bipolaris sp.*, *Pseudallescheria boydii*, *Acremonium strictum*, *Blastomyces dermatitidis*, *Histoplasma capsulatum*...

- Données pharmacologiques

Les concentrations plasmatiques augmentent de manière proportionnelle à la dose administrée. La caspofungine est fortement liée aux protéines plasmatiques (96 à 99%), surtout à l'albumine, et elle a un faible volume de distribution. Elle présente une bonne distribution tissulaire. Son métabolisme est hépatique, il est réalisé par hydrolyse peptidique et N-acétylation, et ne fait donc pas intervenir le système des cytochromes P450. La caspofungine est ensuite éliminée lentement, surtout par les voies urinaire (41%) et fécale (35%).

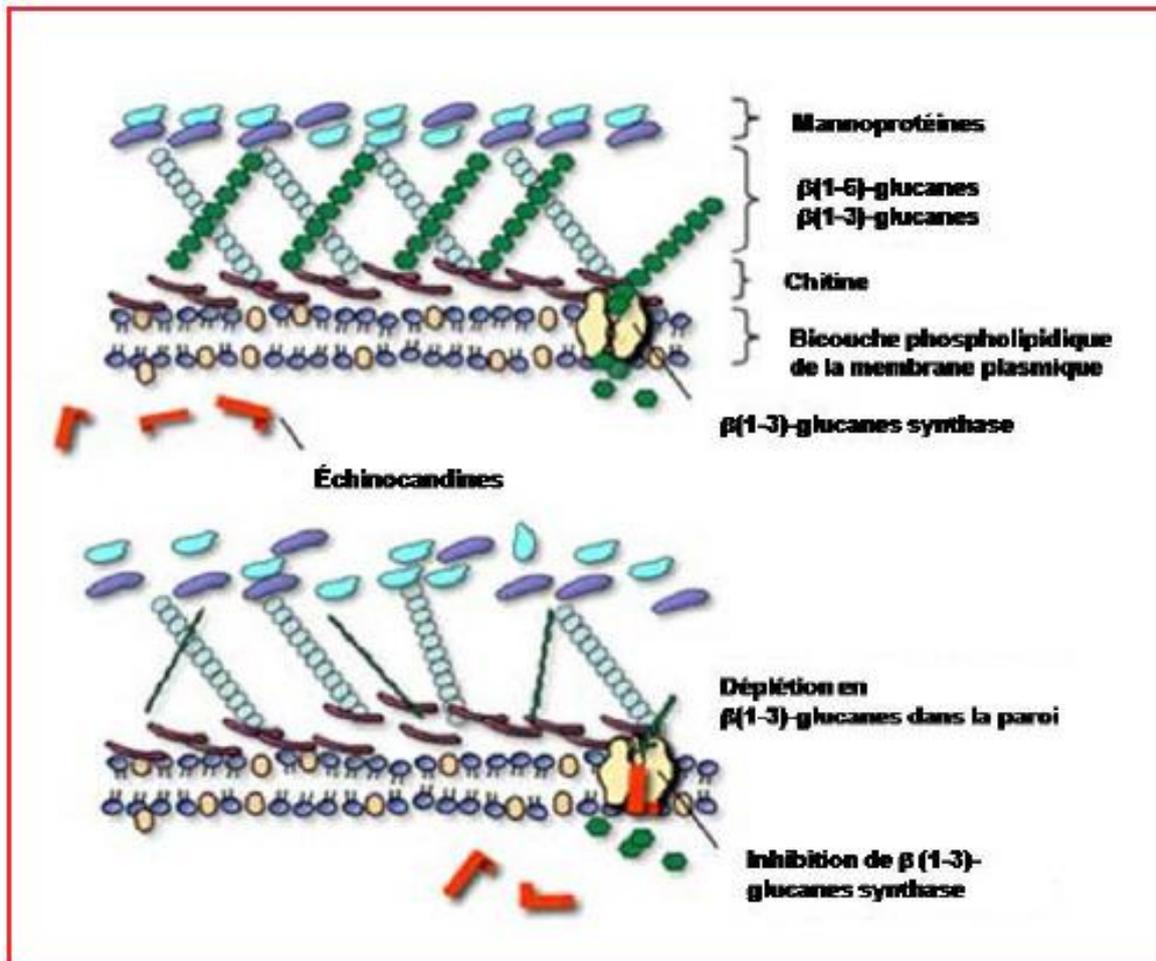


Figure 29

Mode d'action des échinocandines

(Desoubeaux et Chandener 2010c)

- Aspects cliniques/Posologie

L'administration de la caspofungine est uniquement intra-veineuse. La posologie est généralement de 70 mg le premier jour, puis de 50mg/j les jours suivants. La durée de traitement dépend de la sévérité de la maladie, du statut immunitaire et de la réponse clinique. La caspofungine est aujourd'hui utilisée en seconde intention dans le traitement des aspergilloses invasives de patients réfractaires ou intolérants aux traitements classiques.

- Effets secondaires

Le médicament est dans l'ensemble très bien toléré. L'effet secondaire le plus fréquent est l'irritation veineuse sur cathéter périphérique. Les troubles digestifs, les réactions fébriles et les rashes cutanés sont peu fréquents. La tolérance biologique est également bonne : les modifications des tests hépatiques, de la fonction rénale ou des électrolytes restent rares et discrètes. A titre exceptionnel, certains patients peuvent présenter au début de la perfusion un rash, une tachycardie et une gêne respiratoire, faisant évoquer une réaction de type libération histaminique. La posologie n'est pas modifiée chez les patients ayant une insuffisance rénale et chez les sujets âgés. Par contre en cas d'insuffisance hépatique, après une dose initiale de 70 mg, la posologie est réduite à 35 mg/j.

- Interactions médicamenteuses

Il existe peu d'interactions médicamenteuses avec la caspofungine. Cependant, des études rapportées dans les travaux de Dupont 2003, ont montré que la ciclosporine augmente d'environ 35% l'aire sous la courbe (ASC) de la caspofungine. Cette augmentation est probablement due à une réduction de la clairance hépatique de la caspofungine. Même si aucun effet indésirable hépatique grave n'a été observé, cette association nécessite une surveillance étroite des enzymes hépatiques. D'autres études rapportées également des travaux de Dupont 2003, ont montré que la caspofungine réduit les concentrations résiduelles de tacrolimus d'environ 25%, ce qui justifie pour cette association des dosages sériques de tacrolimus et un éventuel ajustement

posologique. Enfin, une contradiction existe concernant l'association avec la rifampicine. Selon Dupont 2003, l'administration simultanée de rifampicine et de caspofungine diminue d'environ 30% l'ASC de la caspofungine, probablement par induction d'un transport actif de l'antifongique. Or, selon le VIDAL 2010, cette association caspofungine/rifampicine provoque une augmentation de 60% de l'ASC de la caspofungine ainsi qu'une augmentation de 170% de la concentration minimale de caspofungine le premier jour. Puis, après deux semaines d'association, la rifampicine a un effet limité sur l'ASC de la caspofungine, mais les concentrations minimales sont 30% inférieures à celles des patients ayant reçu la caspofungine seule. Le mécanisme évoqué est une inhibition initiale suivie d'une induction ultérieure du transport de protéines.

- Les nouvelles échinocandines

La micafungine (Mycamine®) et l'anidulafungine (Ecalta®) sont encore en cours d'évaluation, mais elles présentent déjà d'excellents profils de tolérance. Ces deux échinocandines ont un spectre d'activité comparable à celui de la caspofungine. La micafungine est aujourd'hui utilisée dans les unités de soins américaines et japonaises, sur la base d'études démontrant une efficacité clinique dans les aspergilloses invasives. Les données précliniques actuelles suggèrent que ces deux médicaments, de même que la caspofungine, sont particulièrement intéressants en association avec des médicaments appartenant à d'autres classes d'antifongiques. En ce qui concerne l'aspergillose, un essai pilote d'association anidulafungine/amphotéricine B liposomale a été mené en première ligne, montrant d'ores et déjà l'absence d'effets secondaires inattendus ou d'interactions pharmacologiques entre les deux antifongiques. De plus, une nouvelle étude est en cours sur l'efficacité de l'association anidulafungine/voriconazole (Desoubeaux et Chandener 2010c).

2. Principales indications

L'essentiel des informations de cette partie est tiré des travaux de : Garcia et Humbert 2003, Blanchet *et al.* 2004, Kontoyiannis 2007, Gellen-Dautremer *et al.* 2010, Desoubeaux et Chandener 2010c.

2.1 Traitement curatif

- Aspergillose invasive

La prise en charge des aspergilloses invasives est complexe et nécessite souvent une prise en charge multiple. Les patients à risque forment une population hétérogène qui présente généralement des pathologies associées, une immunodépression, ou de multiples co-morbidités. Ces patients sont souvent âgés et polymédiqués, ils sont donc sujets aux interactions médicamenteuses. De plus, les cliniciens doivent faire face pour le diagnostic des infections fongiques invasives, à des tests dont la sensibilité et la spécificité ne sont pas optimales, et nécessitant fréquemment une stratégie de traitement empirique. De nombreux pathogènes sont souvent présents chez les patients atteints d'aspergillose pulmonaire invasive et leur dissémination n'est pas rare, ainsi, chez les patients immunodéprimés, des infiltrats peuvent avoir une autre étiologie que l'aspergillose pulmonaire invasive, compliquant donc le diagnostic. De nombreux problèmes rendent donc le diagnostic et le traitement des aspergilloses difficiles. Cependant la mise sous traitement antifongique efficace est une urgence, le moindre retard augmentant la probabilité de décès. Le traitement antifongique mis en place peut consister en une monothérapie, bien qu'aujourd'hui les associations thérapeutiques soient souvent utilisées. Jusqu'à récemment, l'amphotéricine B injectable était le traitement de référence de l'aspergillose invasive, à une posologie de 1 mg/kg/j en perfusion intraveineuse. Aujourd'hui, le traitement de première intention est le voriconazole par voie intraveineuse. Cependant son utilisation peut être limitée par des variabilités pharmacocinétiques inter-individu, ou pour des problèmes de tolérance ou d'interactions médicamenteuses. L'amphotéricine B sous ses formulations lipidiques est donc maintenant indiquée en seconde intention en

cas d'intolérance au voriconazole. En cas d'échec du traitement, une thérapie de secours par l'amphotéricine B, l'acétate de caspofungine, ainsi que les autres triazolés : itraconazole et posaconazole, peut être envisagée.

Néanmoins les associations d'antifongiques, même si elles ne sont pas encore validées par des études prospectives en terme d'efficacité, sont de plus en plus utilisées, en particulier pour les formes pulmonaires rapidement évolutives ou pour les formes disséminées et cérébrales. Les associations préconisées sont caspofungine/voriconazole et caspofungine/amphotéricine B en formulation lipidique. Quant à l'association amphotéricine B/triazolés, elle n'a pas grand intérêt en raison d'un antagonisme théorique entre les deux classes, les azolés inhibant la synthèse du substrat sur lequel se fixe l'amphotéricine B (figure 30). La durée du traitement d'une aspergilliose n'est pas codifiée. Elle est toujours longue et dépendra de la rapidité et de la qualité de la réponse au traitement et d'une éventuelle restauration des fonctions immunitaires. Généralement elle est de 10 à 12 semaines, mais en cas de persistance d'un déficit immunitaire significatif, il est recommandé de prolonger le traitement.

L'indication de la chirurgie est principalement posée dans la prévention de complications hémorragiques, lorsque la lésion aspergillaire jouxte une artère pulmonaire, mais aussi plus tardivement dans les formes localisées afin de permettre l'exérèse complète de la lésion aspergillaire et d'éviter ainsi les rechutes lors de la reprise du traitement immunosuppresseur. Ces gestes potentiellement à risque doivent se discuter au cas par cas.

- L'aspergillome

Pour ces entités cliniques qui évoluent sur un mode chronique, le traitement repose essentiellement sur la chirurgie. Dans ce cas, l'acte chirurgical permet d'enlever la cavité et la truffe aspergillaire, lorsqu'il s'agit de lésions non-complicquées et que le terrain sous-jacent du patient permet l'intervention. Ces gestes lourds doivent être réalisés dans des services spécialisés. Les complications post-opératoires sont principalement : les bullages prolongés au niveau du redon de drainage, des défauts de ré-expansion du poumon opéré donnant un pneumothorax, des emphysèmes et des saignements itératifs. Dans

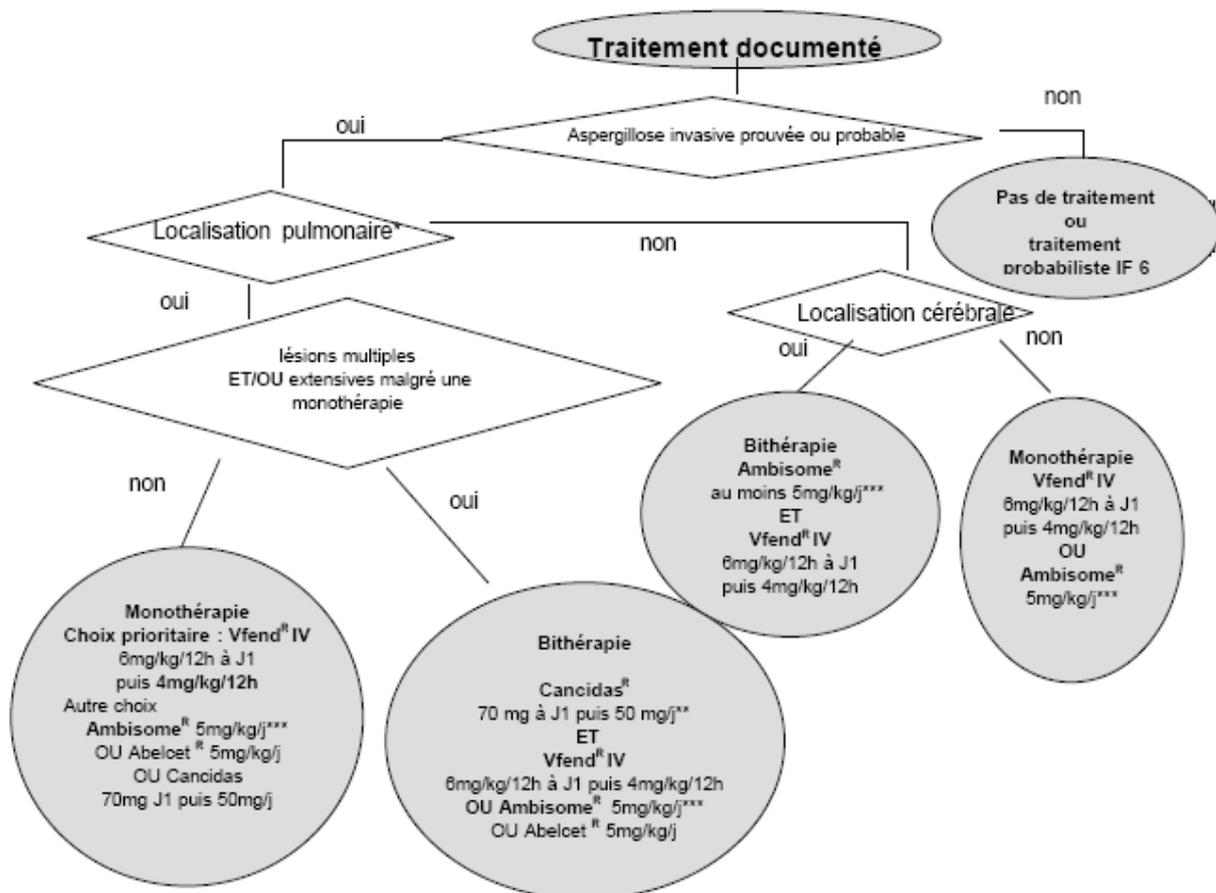


Figure 30

Traitement documenté de l'aspergillose invasive chez le patient immunodéprimé

(Anonyme 2005)

le cas où le geste chirurgical n'est pas envisageable, l'attitude dépendra de la présence ou non de signes d'évolutivité clinique, mycologique, radiologique et sérologique : on met alors en place un traitement antifongique (ex : itraconazole par voie orale en cure prolongée d'au moins 6 mois) ou une simple surveillance.

- *Aspergillose immuno-allergique*

Généralement, la prise en charge des aspergilloses immuno-allergiques associe un traitement anti-inflammatoire, des soins locaux avec les médicaments bronchodilatateurs et les médicaments mucolytiques, une éviction de l'exposition à l'allergène et une kinésithérapie respiratoire.

Dans le cas d'une alvéolite allergique extrinsèque (ex : poumon du fermier), une corticothérapie est préconisée, ainsi que la cessation d'activités favorisant la contamination, y compris professionnelles.

Dans le cas d'une aspergillose broncho-pulmonaire allergique (ABPA) où le patient colonisé, souvent asthmatique, avec parfois une mucoviscidose associée, présente une réaction bronchique inflammatoire majeure, une corticothérapie orale à haute dose (0,5 à 0,7 mg/kg/j) est indiquée. Cette corticothérapie orale est d'abord réalisée deux à six mois, puis réévaluée en fonction des symptômes cliniques, des épreuves fonctionnelles respiratoires, du taux d'IgE sériques totales et des résultats radiologiques. La plupart du temps, la poursuite d'une corticothérapie orale prolongée est cependant nécessaire, au risque d'effets secondaires sévères comme l'ostéoporose, le diabète ou la prise de poids. Les corticoïdes inhalés à fortes doses permettent, quant à eux, de contrôler les symptômes d'asthme au cours des périodes de rémission, mais ne permettent pas de contrôler les exacerbations d'ABPA. De plus, toujours dans le cas d'ABPA, un traitement antifongique oral est souvent associé à cette corticothérapie. On utilise généralement l'itraconazole à la dose de 200 mg/j pendant 6mois, mais on peut également utiliser le voriconazole à la même posologie.

- Aspergilloses localisées

L'objectif du traitement est de supprimer la masse fongique, principalement par chirurgie, curetage ou drainage, en association avec un traitement antifongique par voie orale si possible : itraconazole ou voriconazole.

2.2 Traitement empirique

Un traitement empirique antifongique est généralement mis en place devant un épisode fébrile réfractaire à une antibiothérapie à large spectre sans étiologie identifiée chez les sujets à risque, c'est-à-dire chez les patients présentant une immunodépression, notamment le patient neutropénique et le plus souvent après une chimiothérapie aplasante. Les bases fondamentales du traitement empirique reposent sur des études qui démontrent l'intérêt de l'adjonction d'amphotéricine B conventionnelle à une antibiothérapie classique. En effet, l'amphotéricine B prescrite après 5 jours de neutropénie fébrile réduirait le nombre d'infections fongiques potentielles, d'après l'European Organisation for Research and Treatment of Cancer (EORTC 1989).

Actuellement, l'amphotéricine B incorporée dans les liposomes (Ambisome®) et l'acétate de caspofungine (Cancidas®) sont les deux médicaments indiqués dans le traitement empirique des neutropénies fébriles résistant à une antibiothérapie à large spectre. Cependant, une orientation radiologique ou sérologique permettrait d'appliquer un traitement pré-emptif plus ciblé, mais l'objectif principal dans cette situation reste de documenter mycologiquement l'infection au plus vite, afin de mettre en place un traitement curatif adapté (figure 31).

3. Prophylaxie et conduite à tenir

3.1 Prophylaxie secondaire

Elle est essentiellement indiquée chez les patients ayant présenté une aspergillose invasive d'évolution favorable sous traitement. Cette prophylaxie a pour but de limiter le risque de rechute. Il s'agit généralement d'une chimioprophylaxie, mais la place de la chirurgie reste à évaluer dans cette indication. La nécessité d'une telle prophylaxie est reconnue par tous, du fait qu'il

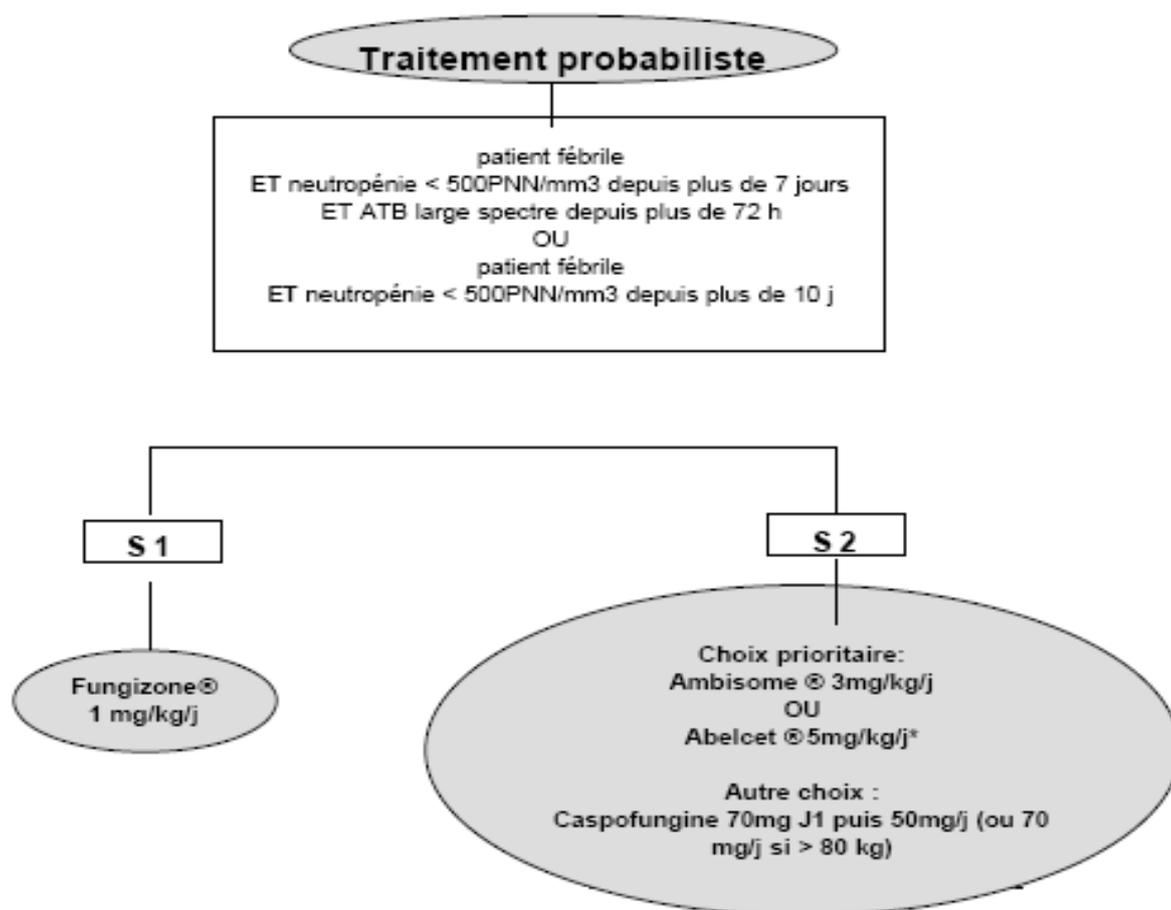


Figure 31

Traitement probabiliste de l'aspergillose invasive chez le patient immunodéprimé

(Anonyme 2005)

y a un risque très élevé de récurrence d'une aspergillose (entre 30 et 50%) lors d'une nouvelle phase de neutropénie prolongée ou lors d'une greffe de moelle. Généralement le voriconazole par voie orale est préconisé (Desoubeaux et Chandener 2010c).

3.2 Prophylaxie primaire

Les études exposées dans ce paragraphe sont rapportées dans les travaux de Desoubeaux et Chandener 2010c.

Actuellement, aucun protocole de chimioprophylaxie primaire n'a été l'objet d'un consensus. En effet, jusqu'à présent de nombreuses études de prévention s'articulaient autour de la prise d'un antifongique de façon empirique. Toutefois, les premières recommandations de prophylaxie primaire commencent à apparaître à destination des principales populations à risque de développer une infection fongique invasive. Les premières études cliniques et expérimentales de prophylaxie primaire ont été basées sur l'utilisation de l'amphotéricine B par voie injectable, aussi bien sous formulation classique que sous formulation lipidique. A de rares exceptions près, ces études ont montré des résultats encourageants, sans permettre néanmoins de conclure formellement du fait d'un certain nombre de limites méthodologiques comme : des effectifs faibles, des groupes « contrôles » inadéquats, l'absence de standardisation des durées de traitement et des posologies. Les problèmes de tolérance et de contraintes liées à l'administration d'amphotéricine B par voie intraveineuse, ont conduit à évaluer d'autres antifongiques en prophylaxie primaire.

Les triazolés : voriconazole, itraconazole et posaconazole, sont de loin les plus étudiés. L'itraconazole semble capable de réduire l'incidence des aspergilloses systémiques, mais pas la mortalité, chez différents patients à risque en utilisant la forme suspension buvable et en adaptant la posologie individuellement pour obtenir des concentrations plasmatiques résiduelles supérieures à 0,25 mg/L. L'efficacité prophylactique du voriconazole a également été démontrée chez des patients à risque, et s'est révélée supérieure à celle de l'itraconazole dans certains cas. Par contre on ne distingue aucune différence significative au niveau de la survie globale à 6 mois pour ces deux médicaments. En ce qui concerne le

posaconazole, des essais randomisés multicentriques récents ont montré l'efficacité de ce médicament en prophylaxie primaire, avec notamment un bénéfice en terme de mortalité chez les patients neutropéniques. Suite à ces études, le posaconazole a obtenu, en 2008, une AMM dans la prophylaxie des infections fongiques invasives au cours des chimiothérapies d'induction et de consolidation pour les leucémies myéloïdes chroniques ou les syndromes myélodysplasiques qui sont connus pour induire une neutropénie prolongée, et chez les patients allogreffés sous traitement immunosuppresseur pour maladie du greffon contre l'hôte. Toutefois, il a été observé que la prescription en prophylaxie primaire de triazolés, notamment l'itraconazole, serait associée à l'émergence de souches résistantes aux triazolés, ce d'autant que la posologie employée est faible (Herbrecht *et al.* 2000). Cela doit avoir un impact sur la stratégie thérapeutique en cas de traitement empirique ou curatif. Les patients ayant été exposés aux azolés doivent être considérés comme suspects d'être porteurs de souches résistantes imposant le choix d'une autre famille thérapeutique. A l'inverse, un patient n'ayant jamais reçu de triazolés peut bénéficier d'un triazolé en première intention, s'il n'est pas à haut risque de présenter une aspergillose (Rex *et al.* 2000).

Enfin, l'efficacité des échinocandines en prophylaxie antifongique a aussi été testée, mais de façon encore très limitée.

A l'avenir, l'amélioration des techniques biologiques (antigénémie et PCR quantitative) devraient permettre de définir des seuils individualisés de mise en route de prophylaxie, à l'instar de ce qui est déjà réalisé pour les infections à CMV, par exemple (figure 32).

3.3 Mesures de prévention de l'aspergillose invasive chez le patient neutropénique ou immunodéprimé

En cas de neutropénie profonde et de longue durée, l'objectif à atteindre est un environnement exempt de spores fongiques. C'est dans ce but que des secteurs dits protégés sont mis en place, notamment dans les services d'Hématologie clinique, permettant un isolement protecteur du patient. Idéalement, ils comprennent un système de filtration de l'air de haute efficacité « HEPA » associé

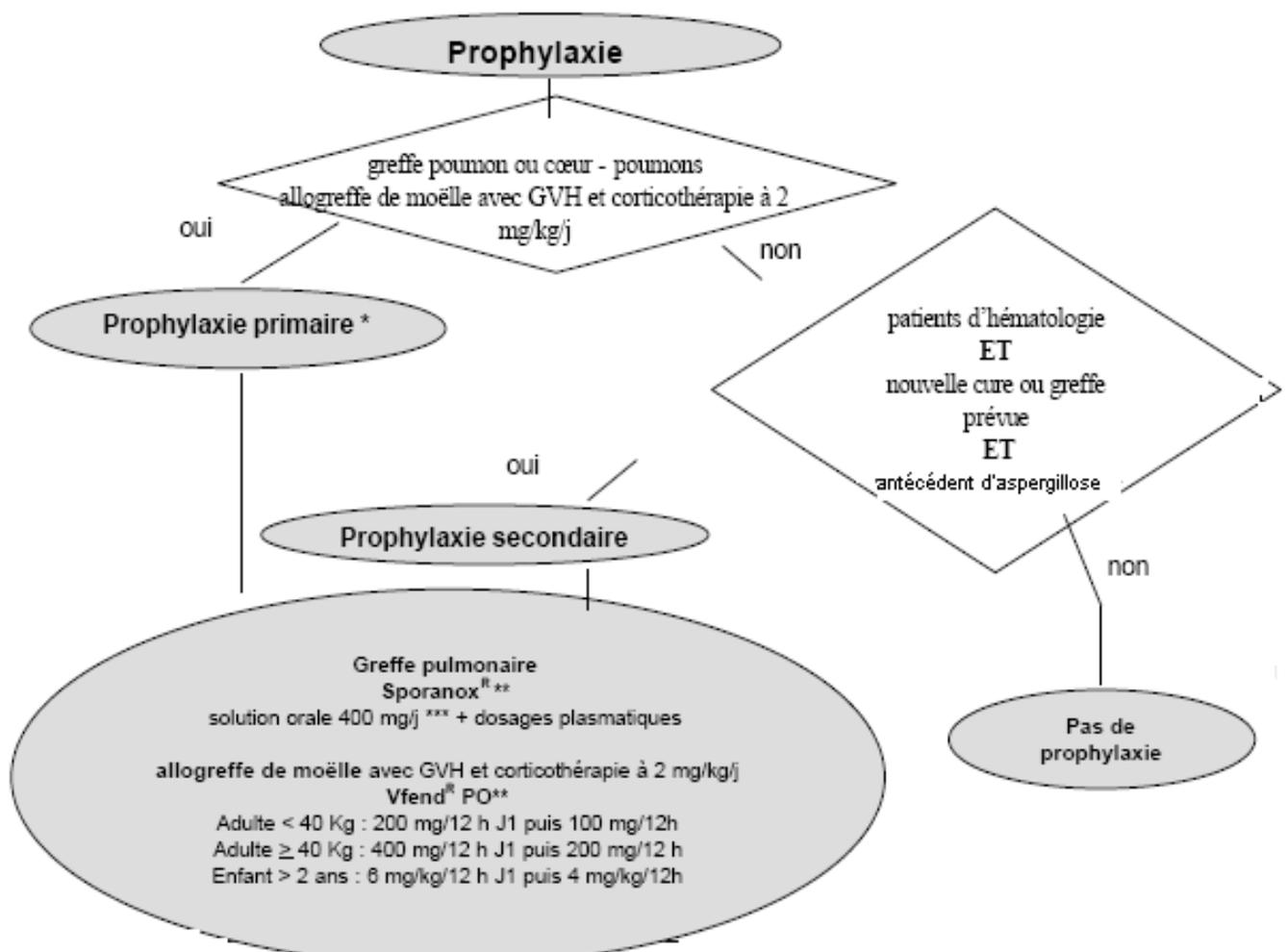


Figure 32

Traitement prophylactique de l'aspergillose invasive chez le patient immunodéprimé

(Anonyme 2005)

à un haut renouvellement d'air avec ou sans flux laminaire. Ces installations sous-entendent une organisation architecturale des locaux spécifiques avec des systèmes de sas à l'entrée du service et des chambres, et une cascade de pression positive. De plus, l'eau et l'alimentation distribuées aux patients à haut risque doivent être exemptes de spores fongiques. En parallèle, des règles rigoureuses de circulation des personnes (habillement, masque) et des biens (plantes, fleurs, matériels cartonnés ou empoussiérés) vecteurs de spores, des protocoles de nettoyage utilisant des désinfectants de surface fongicides, et des procédures d'isolement de zones de travaux et de prévention de l'environnement (arrosage et bâchage des gravats) devront être mis en place. La surveillance de la biocontamination fongique environnementale (par prélèvements d'air et de surfaces) permettra de mesurer l'efficacité des mesures mises en place, d'après www.sante.univ-nantes.fr (07/2010).

3.4 Mesures de prévention de la colonisation massive chez des patients présentant des pathologies pulmonaires chroniques ou une hypersensibilité aux moisissures

Il s'agit d'une prévention à long terme qui ne peut donc avoir comme objectif l'éradication totale des spores présentes dans l'environnement du patient à risque. Cependant, il est possible de diminuer drastiquement l'exposition à un réservoir environnemental : d'une part en contre-indiquant les professions à risque (l'alvéolite allergique extrinsèque est une maladie professionnelle), d'autre part en évitant les attitudes à risque (vie dans des locaux humides colonisés par les moisissures, travaux de réfection des sols/murs/plafonds, travaux de jardinage, rempotage de plantes...).

3.5 Conduite à tenir

L'essentiel des informations de ce paragraphe provient des travaux rapportés dans Anonyme 2002.

A ce jour, les aspergilloses restent en France une pathologie redoutable en raison du terrain sur lequel elles surviennent, d'un fréquent retard au diagnostic et d'une efficacité insuffisante des traitements. De ce fait, les défis sont à relever sur trois fronts : la prévention, le diagnostic et le traitement.

- **La prévention**

La prévention du risque aspergillaire, notamment chez les patients immunodéprimés, repose sur des mesures d'efficacité inégale : mesures environnementales, chimioprophylaxie, amélioration des moyens de défense de l'hôte (cytokines, transfusions granulocytaires).

Les mesures environnementales : l'isolement protecteur comprend un isolement géographique, l'interdiction de toutes plantes, aliments, aromates pouvant être contaminés par des spores aspergillaires (thé, poivre, potages lyophilisés, fruits notamment kiwi), une restriction des visites, la présence d'un sas, une chambre dont les matériaux de revêtement sont adaptés et dont la maintenance impose une surveillance constante. De plus, le traitement de l'air est important pour réduire l'aérocontamination aspergillaire. Il repose sur l'association de trois procédés : la filtration de l'air entrant, la surpression contre la pénétration de spores aspergillaires dans la chambre, et le taux de renouvellement d'air élevé, en flux laminaire. Si l'impact de l'environnement protecteur sur la morbidité aspergillaire est clair, en revanche, les données sont trop imprécises pour en définir le niveau adapté à la gravité du risque (figure 33).

La chimioprophylaxie : la chimioprophylaxie primaire de l'aspergillose est à discuter chez les patients neutropéniques et chez les patients immunodéprimés. De plus, chez les patients ayant déjà développé une aspergillose invasive, les hauts risques de rechute impliquent la mise en place d'une chimioprophylaxie secondaire.

La surveillance épidémiologique : elle est recommandée dans chaque institution avec déclaration systématique de tout cas avéré.

- **Le diagnostic précoce, notamment chez les immunodéprimés**

L'importance d'un diagnostic précoce de la pathologie aspergillaire est primordial afin d'améliorer la prise en charge des malades. Ont été ainsi mis en évidence l'apport de la tomodensitométrie thoracique précoce chez le patient à risque et l'apport des nouveaux outils de diagnostic microbiologique (antigénémie, métabolites, biologie moléculaire).

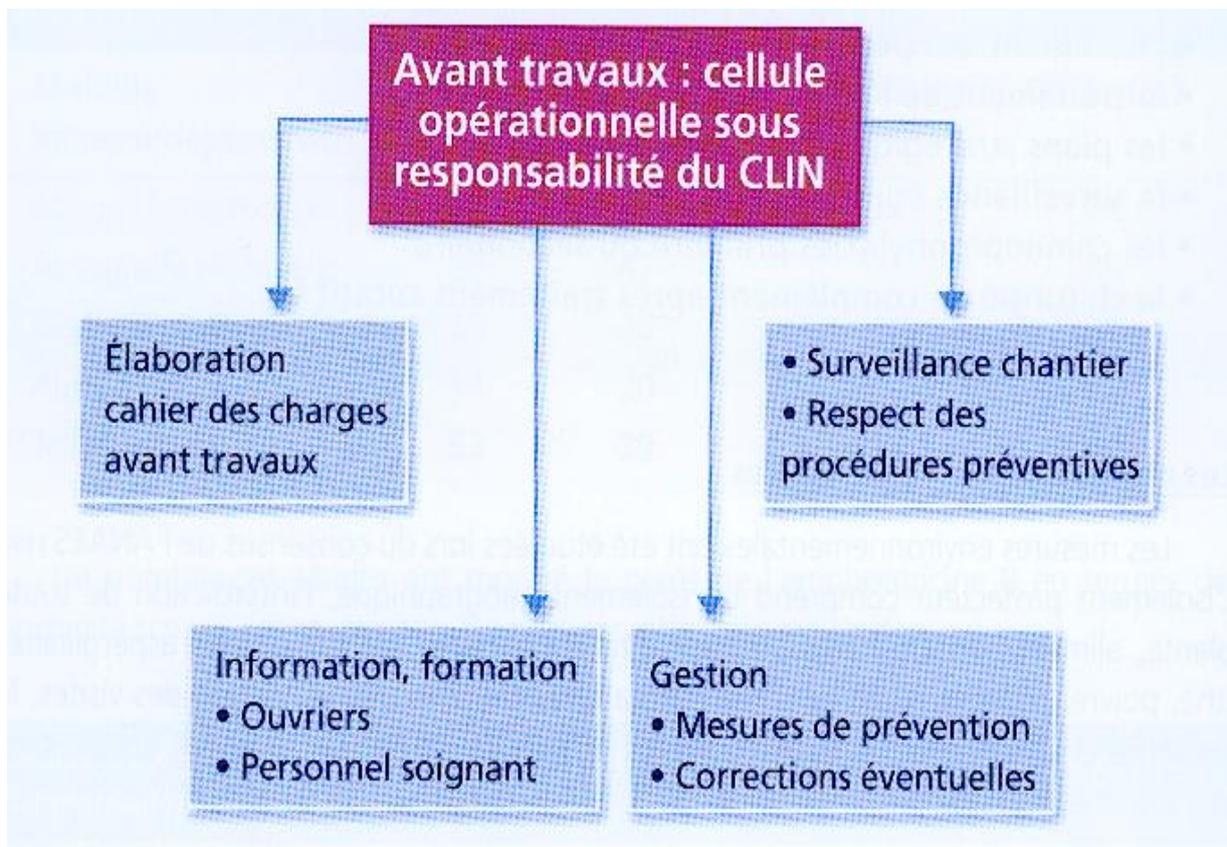


Figure 33

Conduite préventive en cas de travaux

(Anonyme 2002)

- **Un traitement plus efficace et moins toxique**

Outre la restauration immunitaire quand celle-ci est possible, les avancées actuelles concernent : les formulations lipidiques de l'amphotéricine B, le voriconazole, le posaconazole, les échinocandines et le traitement chirurgical en cas de menace d'hémoptysie massive. L'amphotéricine B, longtemps le seul médicament à opposer à l'aspergillose pulmonaire invasive, a posé des problèmes de tolérance (effets secondaires immédiats et toxicité à long terme). Les complexes lipidiques d'amphotéricine B ont réalisé une avancée vers une meilleure tolérance de l'amphotéricine B. Les azolés prennent dorénavant une grande place dans le traitement des aspergilloses. Les traitements prolongés sont possibles avec une tolérance satisfaisante. De plus, les échinocandines sont une avancée supplémentaire en terme de stratégie thérapeutique avec un mode d'action différent.

CONCLUSION

Au cours des dix dernières années, on a observé une nette recrudescence des aspergilloses invasives, ce qui peut s'expliquer notamment par l'augmentation du nombre de sujets à risque, mais également par l'utilisation accrue des thérapeutiques immunosuppressives. Les infections aspergillaires sont difficiles à diagnostiquer et sont encore responsables d'une lourde mortalité. En effet, le diagnostic d'aspergillose invasive demeure bien trop tardif, alors que seul un diagnostic précoce préjuge d'une évolution favorable. Toutefois, même si les moyens diagnostiques n'ont pas progressé de façon significative, les moyens para-cliniques tels que la détection des anticorps ou des antigènes circulants, mais aussi les méthodes d'imagerie comme la tomodensitométrie ou étude scannographique, constituent une avancée encourageante. De plus, la maîtrise des moyens de contrôle de l'environnement des patients à risque, et l'amplification des moyens thérapeutiques avec de nouveaux médicaments comme les échinocandines ou le posaconazole, laissent présager une amélioration du pronostic de l'aspergillose. Cependant, on peut s'interroger sur l'impact engendré par l'utilisation croissante des médicaments immunosuppresseurs, et donc sur l'utilité de pratiquer de façon régulière une batterie de tests diagnostiques visant à limiter le nombre d'aspergilloses graves chez les sujets à risque ; toutefois se pose la question du financement d'un tel protocole de dépistage.

BIBLIOGRAPHIE

- Andrès E., Tiphine M., Letscher-Bru V., Herbrecht R. Nouvelles formes lipidiques de l'amphotéricine B. Revue de littérature. *Revue de Médecine Interne*, 2001, **22**, 141-150.
- ANOFEL. *Parasitoses et mycoses des régions tempérées et tropicales*. 2010, MASSON éd., Paris, 321 p.
- Anonyme. *Infections fongiques pulmonaires*. 2^{ème} journée interdisciplinaire sur les infections fongiques. 2002, OPTIMED éd., Paris, 157 p.
- Anonyme. *Stratégies diagnostique et thérapeutique dans les aspergilloses pulmonaires invasives des patients atteints d'hémopathies malignes*, 2005, 32p. (antifong-ID-Lille2004.pdf)
- Badillet G., De Bièvre C., Guého E. Champignons contaminants des cultures, champignons opportunistes. *Atlas clinique et biologique*. Tome I, 1987a, VARIA éd., Paris, 131 p.
- Badillet G., De Bièvre C., Guého E. Champignons contaminants des cultures, champignons opportunistes. *Atlas clinique et biologique*. Tome II, 1987b, VARIA éd., Paris, 228 p.
- Blanchet B., Huet E., Astier A., Hulin A. Suivi thérapeutique des médicaments antifongiques. *Revue Française des Laboratoires*. 2004, n°365, 39-47.
- Botton B., Breton A., Fèvre M., Guy P., Larpent JP., Veau P. *Moisissures utiles et nuisibles*. 1990, MASSON éd., Paris, 364 p.
- Bouchet P., Guignard JL., Madulo-Leblond G., Règle P. *Mycologie générale et médicale*. 1989, MASSON éd., Paris, 179 p.
- Chabasse D., Bouchara JP., De Gentile L., Cimon B., Brun S., Penn P. Les moisissures d'intérêt médical. *Cahier de Formation Biologie Médicale*, 2002, n°25, EGOPRIM éd., Paris, 189 p.

- Chavanet P. Amphotéricine B déoxycholate (Fungizone®) : vieux médicament, nouvelles versions. *Revue de Médecine Interne*, 1997, **18**, 153-165.
- Datry A., Bart-Delabesse E. La caspofungine : du mécanisme d'action aux applications thérapeutiques. *Revue de Médecine Interne*, 2005, **27**, 32-39.
- Denning DW., Ribaud P., Milpied N., Caillot D., Herbrecht R., Thiel E., Haas A., Ruhnke M., Lode H. Efficacy and safety of voriconazole in the treatment of acute invasive aspergillosis. *Clin Infect Dis*, 2002, **34**, 563-571.
- Deroure B., Charpentier B., Saliba F., Dürrbach A. Néphrotoxicité de l'amphotéricine B : mise au point. *Journal de Mycologie Médicale*, 2006, **16**, 82-86.
- Desoubeaux G., Chandenier J. *Aspergillus* et maladies aspergillaires. *Feuillets de Biologie*, 2010a, **51**, n°293, 11 p.
- Desoubeaux G., Chandenier J. Diagnostic biologique d'une infection aspergillaire. *Feuillets de Biologie*, 2010b, **51**, n°294, 8 p.
- Desoubeaux G., Chandenier J. Traitements antifongiques actuels des maladies aspergillaires. *Feuillets de Biologie*, 2010c, **51**, n°295, 9 p.
- Drouhet E. Mycoses du cœur. *Encyclopédie Médico-Chirurgicale*, Paris, Cœur-Vaisseaux, 1973, **7**, 11027 C 10.
- Dupont B. *Candidoses, Cryptococcoses, Aspergilloses*. 1981, CEPRIME éd., Paris, 96p.
- Dupont B. Nouveaux antifongiques : voriconazole et caspofungine. *Archives de Pédiatrie*, 2003, **10**, Suppl.5, 592-598.
- EORTC International Antimicrobial Therapy Cooperative Group. Empiric antifungal therapy in febrile granulocytopenic patients. *American Journal of Medicine*, 1989, **86**, 668-672.
- Euzéby J. *Mycologie médicale comparée : les mycoses des animaux et leurs relations avec les mycoses de l'homme*. 1992, Tome I, Fondation Mérieux éd., Lyon, 451 p.
- Garcia G., Humbert M. Traitement de l'aspergillose broncho-pulmonaire allergique. *Revue Française d'Allergologie et d'Immunologie Clinique*, 2004, **44**, 89-91.
- Gellen-Dautremer J., Lanternier F., Dannaoui E., Lortholary O. Associations antifongiques dans les infections fongiques invasives. *Revue de Médecine Interne*, 2010, **31**, 72-81.

- Herbrecht R., Neuville S., Letscher-Bru V., Natarajan-Amé S., Lortholary O. Fungal infections in patients with neutropenia : challenges in prophylaxis and treatment. *Drugs Aging*, 2000, **17**, 339-351.
- Herbrecht R., Denning DW., Patterson TF., Bennett JE., Greene RE., Oesmann JW., Kern WV., Marr KA., Ribaud P., Lortholary O., Sylvester R., Rubin RH., Wingard JR., Stark P., Durand C., Caillot D., Thiel E., Chandrasekar PH., Hodges MR., Schlamm HT., Troke PF., de Pauw B ; Invasive Fungal Infections Group of the European Organisation for Research and Treatment of Cancer and the Global *Aspergillus* Study Group. Voriconazole versus amphotericin B for primary therapy of invasive aspergillosis. *N Engl J Med*, 2002, **347**, 408-415.
- Kami M., Tanaka Y., Kanda Y., Ogawa S., Masumoto T., Ohtomo K., Matsumura T., Saito T., Machida U., Kashima T., Hirai H. Computed tomographic scan of the chest, latex agglutination test and plasma (1AE3)-beta-D-glucan assay in early diagnosis of invasive pulmonary aspergillosis : a prospective study of 215 patients. *Haematologica*, 2000, **85**, 745-752.
- Kontoyiannis D. Points critiques dans le traitement d'une aspergillose invasive. *Médecine et Maladies Infectieuses*, 2007, **37**, 9-11.
- Rex JH., Walsh TJ., Sobel JD., Filler SG., Pappas PG., Dismukes WE., Edwards JE. Practice guidelines for the treatment of candidiasis. Infectious Diseases Society of America. *Clin Infect Dis*, 2000, **30**, 662-678.
- Tillie-Leblond I., Scherpereel A., Iliescu C. L'aspergillose broncho-pulmonaire allergique. *Revue Française d'Allergologie et d'Immunologie Clinique*, 2002, **42**, 231-240.
- www.germop.univ-lyon1.fr (07/2010) : *Aspergillose broncho-pulmonaire allergique (ABPA)*.
- www.sante.univ-nantes.fr (07/2010) : *Aspergilloses*.

TABLE DES MATIERES

SOMMAIRE	1
INTRODUCTION	2
CHAPITRE I : LE GENRE ASPERGILLUS	3
1. Caractères généraux	4
2. Epidémiologie	5
3. Répartition et dissémination dans l'environnement	5
4. Caractères morphologiques	6
5. Croissance et cycle fongique	6
6. Caractères cultureux	8
7. Mode de contamination	8
8. Pouvoir pathogène	10
9. Pouvoir toxigène	13
10. Diagnostic d'espèces	16
11. Les principales espèces d'<i>Aspergillus</i> impliquées dans les aspergilloses	18
11.1 <i>Aspergillus fumigatus</i> (Fresenius 1863)	18
Répartition, fréquence, habitat	18
Caractères cultureux/Aspect macroscopique	18
Morphologie microscopique	19
11.2 <i>Aspergillus flavus</i> (Link 1809)	19
Répartition, fréquence, habitat	21
Caractères cultureux/Aspect macroscopique	21
Morphologie microscopique	21
11.3 <i>Aspergillus niger</i> (Van Thieghem 1867)	22
Répartition, fréquence, habitat	22
Caractères cultureux/Aspect macroscopique	22
Morphologie microscopique	24
11.4 <i>Aspergillus nidulans</i> (Eidam/Winters 1884)	24
Répartition, fréquence, habitat	24
Caractères cultureux/Aspect macroscopique	26
Morphologie microscopique	26
➤ Forme asexuée	26
➤ Forme sexuée	26
11.5 <i>Aspergillus terreus</i> (Thom 1918)	27
Répartition, fréquence, habitat	27
Caractères cultureux/Aspect macroscopique	27
Morphologie microscopique	29
11.6 <i>Aspergillus versicolor</i> (Vuillemin/Tiraboschi 1929)	29
Répartition, fréquence, habitat	29
Caractères cultureux/Aspect macroscopique	29
Morphologie microscopique	31

11.7 <i>Aspergillus repens</i>, groupe <i>glaucus</i> (Link 1809)	31
Répartition, fréquence, habitat	33
Caractères culturels/Aspect macroscopique	33
Morphologie microscopique	33
➤ Forme asexuée	33
➤ Forme sexuée	34

CHAPITRE II : ENJEU ET PROBLEMATIQUE DES INFECTIONS FONGIQUES

A ASPERGILLUS	36
1. Les défenses pulmonaires antifongiques	40
• L'immunité innée	40
➤ Les cellules résidentes	42
➤ Le recrutement cellulaire	42
➤ Les facteurs solubles	44
▪ Le complément	44
▪ Les cytokines	45
• L'immunité acquise spécifique	45
• La réponse T	45
• L'autre défense antifongique : le surfactant et ses protéines SP-A et SP-D	46
2. Relation hôte/parasite	47
• Sujets immunocompétents	47
• Sujets immunodéprimés	47
➤ La neutropénie	48
➤ Les autres immunodépressions	48
➤ Les greffes d'organes	50
➤ Les patients VIH	50

CHAPITRE III : LES MANIFESTATIONS CLINIQUES DE L'ATTEINTE ASPERGILLAIRE

1. Les aspergilloses de l'appareil respiratoire	54
1.1 L'aspergillose pulmonaire invasive (API)	54
1.2 L'aspergillome	56
1.3 La bronchite aspergillaire mucomembraneuse	58
1.4 L'aspergillose pulmonaire chronique nécrosante	59
1.5 La sinusite aspergillaire	60
2. Les aspergilloses immunoallergiques	61
2.1 L'aspergillose bronchopulmonaire allergique (ABPA)	61
2.2 L'asthme aspergillaire	64
2.3 L'alvéolite allergique extrinsèque	64
2.4 La sinusite fongique allergique	65
3. Les aspergilloses extra-respiratoires	66
3.1 L'aspergillose profonde extra-pulmonaire disséminée	66
3.2 L'aspergillose oculaire	68
3.3 L'aspergillose de l'oreille	68
3.4 L'aspergillose pleurale	69
3.5 L'onxyx aspergillaire	70

CHAPITRE IV : LE DIAGNOSTIC BIOLOGIQUE	71
1. Les prélèvements	73
2. Examen mycologique	73
➤ L'examen direct	74
➤ Culture	75
3. Examen histologique	76
4. Biologie moléculaire	78
5. Détection des anticorps circulants	79
6. Détection des antigènes circulants	80
➤ Les galactomannanes	80
➤ Les (1-3) β -D-glucanes	82
7. Recherche de signes biologiques non spécifiques	83
8. Epreuves d'hypersensibilité cutanée	83
9. Apport de l'imagerie dans le diagnostic aspergillaire	85
CHAPITRE V : TRAITEMENT DES MALADIES ASPERGILLAIRES	88
1. Médicaments utilisés	89
1.1 L'amphotéricine B	89
• Généralités	89
• Mécanisme d'action	91
• Spectre d'activité	93
• Données pharmacologiques	93
• Aspects cliniques/Posologie	93
• Effets secondaires	95
• Les différentes formulations lipidiques de l'amphotéricine B	96
❖ L'amphotéricine B en complexe lipidique (APLC) : Abelcet®	96
❖ L'amphotéricine B incorporée dans les liposomes : Ambisome®	96
❖ L'amphotéricine B en dispersion colloïdale : Amphocil®	96
❖ L'amphotéricine B associée à l'Intralipide®	97
1.2 Les dérivés triazolés : voriconazole, itraconazole, posaconazole	98
• Généralités	98
• Mécanisme d'action	98
• Interactions médicamenteuses	98
1.2.1 Le voriconazole (V-Fend®)	100
1.2.2 L'itraconazole (Sporanox®)	102
1.2.3 Le posaconazole (Noxafil®)	104
1.3 La caspofungine (Cancidas®)	106
• Généralités	106
• Mécanisme d'action	108
• Spectre d'activité	108
• Données pharmacologiques	108
• Aspects cliniques/Posologie	110
• Effets secondaires	110
• Interactions médicamenteuses	110
• Les nouvelles échinocandines	111

2. Principales indications	112
2.1 Traitement curatif	112
• Aspergillose invasive	112
• Aspergillome	113
• Aspergillose immuno-allergique	115
• Aspergilloses localisées	116
2.2 Traitement empirique	116
3. Prophylaxie et conduite à tenir	116
3.1 Prophylaxie secondaire	116
3.2 Prophylaxie primaire	118
3.3 Mesures de prévention de l'aspergillose invasive chez le patient neutropénique ou immunodéprimé	119
3.4 Mesures de prévention de la colonisation massive chez des patients présentant des pathologies pulmonaires chroniques ou une hypersensibilité aux moisissures	121
3.5 Conduite à tenir	121
○ La prévention	122
Les mesures environnementales	122
La chimioprophylaxie	122
La surveillance épidémiologique	122
○ Le diagnostic précoce, notamment chez les immunodéprimés	122
○ Un traitement plus efficace et moins toxique	124
 CONCLUSION	 125
 BIBLIOGRAPHIE	 126
 TABLE DES MATIERES	 129

QUATRESOUS Nicolas (2011)

Aspergillose humaine.

Epidémiologie, diagnostic biologique, contrôle. Nb de pages : 132p.

RESUME

Au cours des dix dernières années, on a observé une nette recrudescence des aspergilloses invasives, ce qui peut s'expliquer notamment par l'augmentation du nombre de sujets à risque, mais également par l'utilisation accrue des thérapeutiques immunosuppressives. Les infections aspergillaires sont difficiles à diagnostiquer et sont encore responsables d'une lourde mortalité. En effet, le diagnostic d'aspergillose invasive demeure bien trop tardif, alors que seul un diagnostic précoce préjuge d'une évolution favorable. Toutefois, même si les moyens diagnostiques n'ont pas progressé de façon significative, les moyens para-cliniques tels que la détection des anticorps ou des antigènes circulants, mais aussi les méthodes d'imagerie comme la tomographie par densité ou étude scannographique, constituent une avancée encourageante. De plus, la maîtrise des moyens de contrôle de l'environnement des patients à risque, et l'amplification des moyens thérapeutiques avec de nouveaux médicaments comme les échinocandines ou le posaconazole, laissent présager une amélioration du pronostic de l'aspergillose.

DISCIPLINE : Pharmacie

MOTS-CLES : Aspergillose, Epidémiologie, Diagnostic, Traitement, Prophylaxie

ADRESSE DE L'UFR

Faculté de Pharmacie

2, rue du Docteur Marcland

87025 LIMOGES Cedex