

MÉMOIRE

DU DIPLÔME D'ÉTUDES SPÉCIALISÉES DE BIOLOGIE MÉDICALE

Soutenu devant le jury interrégional

Le 11 octobre 2018

Par Adélaïde CHESNAY

Conformément aux dispositions du Décret n° 2012-172 du 3 février

THÈSE POUR LE DIPLÔME D'ÉTAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE

L'aspergillose pulmonaire invasive au CHRU de Tours de 2012 à 2017

Perspective thérapeutique par « *antibody drug conjugates* » (ADC)

Président :

Mr LE PAPE Patrice, Professeur des Universités - Praticien Hospitalier de Parasitologie – Mycologie (Nantes)

Membres du jury :

Mr DESOUBEAUX Guillaume, Professeur des Universités - Praticien Hospitalier de Parasitologie – Mycologie (Tours)

Mr CHANDENIER Jacques, Professeur des Universités - Praticien Hospitalier de Parasitologie – Mycologie (Tours)

Mr BAILLY Éric, Praticien Hospitalier de Parasitologie – Mycologie (Tours)

Mr JUSTE Matthieu, Maître de Conférences des Universités de Parasitologie (Tours)

Remerciements

Le processus de genèse de la présente thèse, des premières réflexions aux ultimes corrections, a avant tout été un travail collectif. Naturellement, j'adresse mes sincères remerciements à toutes les personnes qui m'ont accompagnées, soutenues et encouragées dans ce projet (la liste des participants passés est sans nul doute ici peu exhaustive), mais aussi plus largement dans mes études de pharmacie et dans ma vie moins scientifique :

Au Professeur Patrice Le Pape, pour avoir accepté de présider cette thèse, mais aussi pour m'avoir chaleureusement accueillie au sein du service nantais de Parasitologie-Mycologie.

Aux Professeurs Jacques Chandenier et Guillaume Desoubieux qui m'ont encadrée assidûment avec beaucoup de pédagogie. Votre soutien bienveillant et votre enthousiasme contagieux m'ont aidée à me lancer avec confiance dans chacun des projets entamés à vos côtés. Votre émerveillement devant toute recherche parasitologique ou mycologique fructueuse et vos enseignements quotidiens ont nourri avec certitude mon attachement passionné pour la Parasitologie-Mycologie.

Au Docteur Éric Bailly, pour ses conseils et ses discussions déroutantes qui me rappellent l'importance de conserver un esprit critique devant toute situation, et pour avoir accepté d'être membre de mon jury.

Au Docteur Matthieu Juste, pour sa disponibilité et sa présence en tant que membre du jury de cette thèse.

A toute l'équipe de l'unité INSERM U1100 du Centre d'Étude des Pathologies Respiratoires et plus particulièrement, Nathalie Heuzé Vourc'h, pour ses précieux conseils et son généreux accueil, et David Chauvin, futur docteur, pour m'avoir accompagnée et pour m'avoir initiée aux petits rats et aux anticorps. Une pensée spéciale à la masse informe et ses gourous méconnus, et aux internes apprentis chercheurs avec qui j'ai eu le plaisir de partager une année entière.

A tous les membres de l'équipe de Parasitologie-Mycologie du CHRU de Tours. Si le coup de foudre avec notre spécialité a frappé, vous faites sans aucun doute partie intégrante de l'étincelle. J'ai soif de nouvelles découvertes à vos côtés mais également d'entendre à nouveau la cloche sonner l'heure de Miss Flan.

A l'ensemble du service de Parasitologie-Mycologie du CHU de Nantes, pour m'avoir intégrée dans votre équipe et pour avoir partagé vos connaissances et savoir-faire ; sans oublier nos apérositologies estivaux.

A tous les personnels de laboratoire de biologie médicale, techniciens, biologistes, aide de laboratoire, qui m'ont accueillie, transmis leurs savoirs et qui ont participé activement à ma formation.

A Jorge Pinto, qui m'a initié à l'univers de la recherche.

A tous les enseignants que j'ai rencontrés, qui ont éveillé et attisé ma curiosité scientifique.

A l'ensemble des membres des différentes associations d'internes avec qui j'ai eu le plaisir de travailler, plus particulièrement à Julie, parce que c'est Juste.

A mes co-internes. Aux bégettes, Joëlle, Eve-Anne et Noémie, vous avez été les premières avec qui j'ai partagé ma condition d'interne, ces goûters si équilibrés et un semestre d'anthologie. Même si l'hématologie vous a fait les yeux doux, je suis sûre que notre compatibilité amicale restera entière. A Sébastien et Claire, pour nos réunions intellectuelles et nos boules à neige si féériques. A JB et Nico, pour nos découvertes parasitologiques et notre trinôme qui a sûrement laissé quelques traces. A Caro, Emmanuelle, Romane, José et Noémie, pour notre belle entente. A Nounours, pour ton humour de rien. A Claire, pour ton entièreté attachante et notre complicité dans la folie. A tous les internes, avec qui je n'ai pas eu la chance de partager un semestre, mais qui ont égayé mon internat et mes sorties tourangelles : Caroline, Karl, Luc, Steph, Pierre et tous les autres.

Aux Pharmacopines qui ont partagé mes études de pharmacie et bien plus encore. A mon cher coquelicot aux poils perpendiculaires, pour qui l'éclipse est un art de vivre. A Matata, pour nos soirées partagées autour d'une bonne boîte de croquettes et ta relecture attentive. A Fanny, en souvenir de Scrat et nos sorties à crampons. A Emilie, pour toutes nos vacances endiablées et nos travaux pratiques enflammés. A la mouflette dorée, pour les cous montés et autre moonwalk. A Marie, pour l'amour de Zébrichou. A Melle Carton et son Rocky trop rôti. A Bernard et ses bébés mouettes. A Baulinette, pour que tu bèles encore. A SGM pour qu'enfin des écussons mickey parent nos blouses de chimie. A PP, pour que l'amine explose enfin au nez de tous.

A mes amies, Amandine, Anne-Charlotte et Maéva, pour toutes ces années à vos côtés et toutes celles à venir.

A mon Bison, pour ton amitié si précieuse, pour ta simplicité, pour ton écoute, pour ta présence indéfectible et pour toutes ces années de pharmacie passées ensemble. Cet internat, c'est un peu grâce à toi.

A ma famille.

A mon Pépé. Tu as connu les débuts de ma scolarité et signé mes cahiers du jour, j'espère te rendre fier aujourd'hui.

A Margaux, Léon, Lou-Anne, Clément et Maxence, une si jolie bande de belettes et belettons dont l'insouciance et la joie de vivre sont une source intarissable de bonheur.

A mes frères, Hugues, Pierre et Marc, et leurs valeurs ajoutées, Mélaine, Aurélie et Claire. A vous, qui vous demandez quand il sera possible de dire que votre sœur a fini ses études ; ce n'est toujours pas aujourd'hui. Pour tous nos moments partagés et ce lien qui nous unit.

A ma Maman et mon Papa. Votre confiance et votre soutien m'ont accompagnée à chaque étape. Je ne saurais vous remercier pour la liberté que vous m'avez donnée dans mon entêtement. Je vous dédie cette thèse avec bonheur et fierté.

Table des matières

| | |
|--|----|
| Remerciements | 0 |
| Table des matières | 4 |
| Liste des figures | 4 |
| Liste des tableaux | 9 |
| Liste des acronymes et abréviations | 10 |
| Introduction | 13 |
| I. <i>Aspergillus fumigatus</i> : description générale | 15 |
| I.1. Taxonomie | 15 |
| I.2. Cycle fongique..... | 15 |
| I.3. Facteurs de virulence | 17 |
| I.4. Interactions entre l’Homme et <i>Aspergillus fumigatus</i> | 18 |
| II. L’aspergillose pulmonaire invasive | 21 |
| II.1. Place de l’aspergillose pulmonaire invasive au sein des maladies aspergillaires | 21 |
| II.2. Epidémiologie..... | 23 |
| II.3. Démarche et outils diagnostiques | 25 |
| II.3.1. Imagerie médicale | 25 |
| II.3.2. Examen mycologique..... | 27 |
| II.3.3. Examen anatomopathologique..... | 30 |
| II.3.4. Antigènes fongiques..... | 31 |
| II.3.4.1. Antigène galactomannane | 32 |
| II.3.4.2. Antigène (1-3)- β -D-glucane | 33 |
| II.3.5. Anticorps anti-aspergillaires | 34 |
| II.3.6. Biologie moléculaire | 35 |
| II.3.7. Définitions de l’aspergillose pulmonaire invasive selon les critères EORTC/MSG..... | 36 |

| | |
|--|----|
| III. Six ans d'aspergillose pulmonaire invasive au CHRU de Tours | 38 |
| IV. Prise en charge thérapeutique de l'aspergillose pulmonaire invasive..... | 43 |
| IV.1. Arsenal thérapeutique | 44 |
| IV.1.1. Les triazolés | 44 |
| IV.1.2. Les polyènes..... | 45 |
| IV.1.3. Les échinocandines | 46 |
| IV.2. Différentes stratégies thérapeutiques..... | 47 |
| IV.2.1. Traitement prophylactique | 47 |
| IV.2.2. Traitement empirique..... | 47 |
| IV.2.3. Traitement préemptif | 48 |
| IV.2.4. Traitement curatif..... | 48 |
| IV.3. Suivi thérapeutique | 49 |
| IV.4. Mesures associées aux traitements antifongiques | 49 |
| V. Stratégie thérapeutique innovante à base d' <i>antibody drug conjugates</i> | 51 |
| V.1. Anticorps monoclonaux thérapeutiques : généralités..... | 51 |
| V.2. Anticorps monoclonaux en thérapeutique infectieuse..... | 54 |
| V.3. Les protéines Crh, motifs antigéniques aspergillaires, potentielles cibles d'anticorps monoclonaux | 56 |
| V.4. <i>Antibody drug conjugates</i> anti- <i>Aspergillus</i> | 58 |
| V.4.1. Dosage protéique et intégrité des scFv-Fc anti-Crf2 | 61 |
| V.4.2. Conception des constructions amphotéricine B – <i>linker</i> et évaluation de leur efficacité antifongique in vitro..... | 63 |
| V.4.2.1. Méthode d'évaluation de l'efficacité antifongique | 64 |
| V.4.2.2. Couplage des <i>linkers</i> L1 et L2 sur la fonction amine de l'amphotéricine B | 66 |
| V.4.2.3. Couplage du <i>linker</i> L3 sur la fonction acide carboxylique de l'amphotéricine B | 69 |
| Discussion – Perspectives | 71 |

| | |
|--------------------|----|
| Conclusion..... | 75 |
| Bibliographie..... | 76 |

Liste des figures

| | |
|---|----|
| Figure 1 : Cycle naturel d' <i>Aspergillus</i> dans l'environnement..... | 16 |
| Figure 2 : Représentation schématisée d'une tête aspergillaire..... | 16 |
| Figure 3 : Interactions entre les phagocytes et <i>Aspergillus fumigatus</i> | 19 |
| Figure 4 : Recrutement des cellules immunitaires après inhalation des conidies aspergillaires..... | 20 |
| Figure 5 : Spectre clinique des aspergilloses. | 21 |
| Figure 6 : Images tomодensitométriques évocatrices d'aspergilloses pulmonaires invasives. | 26 |
| Figure 7 : Filaments mycéliens colorés à l'Uvitex 2B®..... | 28 |
| Figure 8 : Aspects macroscopiques d' <i>Aspergillus</i> de la section <i>Fumigati</i> | 29 |
| Figure 9 : Aspects microscopiques d' <i>Aspergillus</i> de la section <i>Fumigati</i> | 29 |
| Figure 10 : Images histologiques d' <i>Aspergillus</i> spp. | 31 |
| Figure 11 : Représentation schématique de la paroi cellulaire d' <i>Aspergillus fumigatus</i> . .. | 31 |
| Figure 12 : Structure chimique de l'antigène galactomannane..... | 32 |
| Figure 13 : Structure chimique de l'antigène (1,3)- β -D-glucane..... | 34 |
| Figure 14 : Critères d'une infection fongique invasive probable ou possible selon l'EORTC/MSG (<i>European Organisation for Research and Treatment of Cancer/Mycoses Study Group</i>). | 37 |
| Figure 15 : Diagramme en flux des cas d'aspergillose pulmonaire invasive au CHRU de Tours, de janvier 2012 à décembre 2017. | 38 |
| Figure 16 : Principaux symptômes cliniques et images radiologiques retrouvés chez les patients atteints d'aspergillose pulmonaire invasive au CHRU de Tours de 2012 à 2017..... | 39 |
| Figure 17 : Champignons isolés à partir des prélèvements issus des patients atteints d'aspergillose pulmonaire invasive au CHRU de Tours de 2012 à 2017..... | 41 |
| Figure 18 : Structures chimiques des antifongiques triazolés à usage systémique. | 44 |
| Figure 19 : Structure chimique de l'amphotéricine B. | 45 |
| Figure 20 : Structures chimiques des échinocandines..... | 46 |
| Figure 21 : Représentation d'un anticorps de classe Immunoglobuline G. | 52 |
| Figure 22 : L'évolution des anticorps monoclonaux..... | 53 |
| Figure 23 : Fragments d'anticorps. | 54 |
| Figure 24 : Anticorps thérapeutiques approuvés aux Etats-Unis. | 56 |
| Figure 25 : Domaines des protéines issues des gènes de la famille <i>CRH</i> | 58 |

| | |
|--|----|
| Figure 26 : Structure d'un scFv-Fc (<i>single chain Fragment variable – Fragment cristallisable</i>)..... | 59 |
| Figure 27 : Caractéristiques idéales d'un <i>antibody drug conjugate</i> dirigé contre <i>Aspergillus fumigatus</i> | 60 |
| Figure 28 : Évaluation de l'intégrité des anticorps scFv-Fc (<i>single chain Fragment variable – Fragment cristallisable</i>)..... | 63 |
| Figure 29 : Amphotéricine B, et <i>linkers</i> synthétisés pour le couplage des ADC (<i>Antibody Drug Conjugates</i>)..... | 64 |
| Figure 30 : Synthèse chimique des couples amphotéricine B – <i>linker</i> par la fonction amine de l'amphotéricine B. | 67 |
| Figure 31 : Évaluation de l'effet antifongique de l'amphotéricine B seule, associée ou couplée au <i>linker</i> L1 à 48 h. | 68 |
| Figure 32 : Évaluation de l'effet antifongique de l'amphotéricine B seule, associée ou couplée au <i>linker</i> L2 à 48 h. | 68 |
| Figure 33 : Synthèse chimique du couple amphotéricine B – <i>linker</i> L3 par la fonction acide carboxylique de l'amphotéricine B. | 69 |
| Figure 34 : Évaluation de l'effet antifongique de l'amphotéricine B seule, associée ou couplée au <i>linker</i> L3 à 48 h. | 70 |

Liste des tableaux

| | |
|--|----|
| Tableau I : Caractéristiques des aspergilloses pulmonaires invasives recensées au CHRU de Tours de 2012 à 2017 selon leur facteur de risque principal..... | 40 |
| Tableau II : Dosage protéique des scFv-Fc (<i>single chain Fragment variable – Fragment cristallisable</i>)..... | 61 |

Liste des acronymes et abréviations

ABPA : Aspergillose Broncho-Pulmonaire Allergique

AcMo : Anticorps Monoclonal

ADC : *Antibody Drug Conjugates*

ADCC : *Antibody Dependent Cellular Cytotoxicity*

ADCP : *Antibody Dependent Cellular Phagocytosis*

ADN : Acide DésoxyriboNucléique

AI : Aspergillose Invasive

API : Aspergillose Pulmonaire Invasive

BPCO : Broncho-Pneumopathie Chronique Obstructive

BSA : *Bovine Serum Albumine*

CBM18 : *Carbohydrate-binding module 18*

CH : *Constant Heavy chain*

CD : *Cluster de Différenciation*

CDC : *Complement Dependent Cytotoxicity*

CDR : *Complementary Determining Region*

CL : *Constant Light chain*

CEPR : Centre d'Études des Pathologies Respiratoires

CHRU : Centre Hospitalier Régional Universitaire

CMI : Concentration Minimale Inhibitrice

CNPA : *Chronic Necrotizing Pulmonary Aspergillosis*

CNRMA : Centre National de Référence Mycoses invasives et Antifongiques

CNRS : Centre National de Recherche Scientifique

CPA : *Chronic Pulmonary Aspergillosis*

CYP 2C19 : Cytochrome P450 2C19

DMF : DiMéthylFormamide

ECIL : *European Conference for Infections in Leukaemia*

ELISA : *Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*

EORTC : *European Organisation for Research and Treatment of Cancer*

EUCAST : *EUropean Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing*

Fab : *Fragment antigen binding*

Fc : Fragment cristallisable

FcγR : *Fc-γ Receptor*

FcRn : *Neonatal Fc Receptor*
FDA : *Food and Drug Administration*
G-CSF : *Granulocyte - Colony Stimulating Factor*
GH16 : *Glycohydrolase 16*
GICC : Génétique, Immunothérapie, Chimie et Cancer
GM : GalactoMannane
GM-CSF : *Granulocyte-Macrophage - Colony Stimulating Factor*
GPI : Glycosyl-Phosphatidyl-Inositol
GvH : *Graft versus Host*
HES : Hématoxyline Éosine Safran
HPLC : *High Performance Liquid Chromatography*
ICH : *ImmunoCompromised Host*
IFI : Infection Fongique Invasive
IFN- γ : Interféron- γ
IgG : Immunoglobulines de classe G
IgE : Immunoglobulines de classe E
INSERM : Institut National de la Santé Et de la Recherche Médicale
LAL : Leucémie Aiguë Lymphoïde
LAM : Leucémie Aiguë Myéloïde
LASER : *Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation*
MALDI-TOF : *Matrix Assisted LASER Desorption Ionisation - Time Of Flight*
MPM : Marqueur de Poids Moléculaire
MSG : *Mycoses Study Group*
NADPH : Nicotinamide Adénine Dinucléotide Phosphate
PAMP : *Pathogens Associated Molecular Patterns*
PCR : *Polymerase Chain Reaction*
PMSI : Programme de Médicalisation des Systèmes d'Information
PNN : PolyNucléaires Neutrophiles
PRR : *Pathogens Recognition Receptors*
RESSIF : RESeau de Surveillance des Infections Fongiques en France
RMN : Résonance Magnétique Nucléaire
ROS : *Reactive Oxygen Species*
RPMI : *Roswell Park Memorial Institute medium*

SAFS : *Severe Asthma with Fungal Sensitization*

SAIF : groupe de Surveillance des Aspergilloses Invasives en France

scFv : *single chain Fragment variable*

SDS-PAGE : *Sodium Dodecyl Sulfate PolyAcrylamide Gel Electrophoresis*

TDM : TomoDensitoMétrie

TNF : *Tumor Necrosis Factor*

VH : *Variable Heavy chain*

VIH : Virus de l'Immunodéficience Humaine

VL : *Variable Light chain*

VRS : Virus Respiratoire Syncytial

WFCC-MIRCEN : *World Data Center for Microorganisms*

Introduction

Dans le spectre des pathologies microbiennes actuelles, les infections fongiques posent de nouveaux défis d'envergure aux médecins et scientifiques du XXI^{ème} siècle. L'augmentation de leur prévalence, la complexité de leurs manifestations cliniques, de leur diagnostic et de leur prise en charge imposent les infections fongiques comme un réel sujet contemporain de recherche médicale. Dans le multiple éventail des mycoses recensées, le groupe des infections fongiques invasives (IFI) représente un véritable challenge médical pour les services hospitaliers. Parmi ces infections, l'aspergillose pulmonaire invasive (API) a pour agent principal le champignon *Aspergillus fumigatus* dans plus de 80 % des cas et se présente comme une redoutable mycose opportuniste chez l'immunodéprimé notamment, puisque sa mortalité excède les 30 % (1). Malgré la gravité de cette pathologie, les outils diagnostiques et l'arsenal thérapeutique restent restreints et incitent à la réflexion quant aux évolutions nécessaires de prise en charge globale des patients.

La première partie de la présente thèse se propose de revenir sur l'agent pathogène, *Aspergillus fumigatus*, sa place dans le règne des *Fungi* et ses attributs capables de devenir de véritables facteurs de virulence lors d'interactions avec l'Homme. Le foyer d'intérêt se précisera ensuite sur l'aspergillose pulmonaire invasive et les difficultés rencontrées lors de la démarche diagnostique malgré l'arsenal des outils disponibles. L'étude des cas tourangeaux d'API entre janvier 2012 et décembre 2017 sera l'occasion de se rendre compte de l'épidémiologie locale et de la comparer à l'épidémiologie d'échelle nationale pour en confirmer certaines tendances. Puis les thérapeutiques actuellement disponibles pour les cliniciens seront passées en revue. L'analyse de ces différents éléments permettra de nourrir la réflexion autour du besoin d'alternatives thérapeutiques. C'est suite au développement d'anticorps ciblant des motifs antigéniques d'*A. fumigatus* nouvellement décrits (2,3) par l'équipe de l'Université de Braunschweig en Allemagne, qu'a été initiée la conception d'une stratégie thérapeutique à base d'*antibody drug conjugates* (ADC) au sein de l'équipe 3 du Centre d'Études des Pathologies Respiratoires (CEPR, Unité INSERM U1100). Des anticorps dirigés contre un motif antigénique aspergillaire sont couplés à un antifongique par l'intermédiaire d'un *linker*. Cette stratégie permettrait de bénéficier des avantages de ciblage pour obtenir une action spécifique de l'antifongique, et de recruter des cellules et molécules de l'immunité innée grâce à la fonction effectrice des anticorps. Bien qu'encore émergent, ce nouveau type de construction

pourrait bien incarner un réel espoir dans le traitement de l'aspergillose pulmonaire invasive. La dernière partie de cette thèse se propose de décrire la conception des précurseurs des ADC entiers, associant un antifongique et un *linker*, leur caractérisation et l'évaluation de leur efficacité antifongique.

I. *Aspergillus fumigatus* : description générale

I.1. Taxonomie

Les champignons représentent un groupe majeur d'êtres vivants sur Terre par leur richesse en espèces, leur rôle primordial au cœur de différents écosystèmes mais aussi par l'émergence des menaces qu'ils représentent pour ces mêmes biotopes (4). Ces eucaryotes hétérotrophes sont munis de parois cellulaires riches en chitine mais dépourvus de chloroplastes, ce qui les différencie indéniablement des végétaux. Ainsi séparés officiellement du groupe des Plantes depuis 1969, les champignons appartiennent au clade des *Opisthokontes*. Parmi ce groupe monophylétique voisin de celui des animaux, les micromycètes asexués du genre *Aspergillus*, membres du phylum des *Ascomycota* et de l'ordre des *Eurotiales* (5), comptent actuellement plus de 180 espèces recensées, réparties en dix-huit sections (6). La biologie moléculaire a été à l'origine de nouvelles catégories et sous-sections au sein du genre *Aspergillus*. C'est donc dans la section *Fumigati*, comprenant une trentaine d'espèces aspergillaires (7), que l'on retrouve *Aspergillus fumigatus*, l'espèce la plus communément impliquée en pathologie humaine (8).

I.2. Cycle fongique

Les champignons du genre *Aspergillus* sont retrouvés communément au niveau du sol et des matières organiques humides en décomposition. Ces saprophytes sont notamment largement impliqués dans le processus de recyclage du carbone et de l'azote en dégradant les polysaccharides des parois cellulaires des plantes grâce à leur équipement enzymatique (9). Leurs fonctions et niches écologiques sont ainsi directement reliées.

Dans l'environnement, le développement asexué de ces moisissures fait intervenir trois phases successives à partir de la forme de résistance appelée spore ou conidie, aussi responsable de la dissémination : la germination, la croissance et la fructification. Dans un milieu nutritif et des conditions de température et d'humidité qui leur sont favorables, les conidies, peuvent germer. Elles gonflent et donnent naissance à un tube germinatif évoluant en filaments ou hyphes. Ceux-ci se développent et se ramifient pour former l'appareil végétatif, le thalle mycélien (Figure 1).

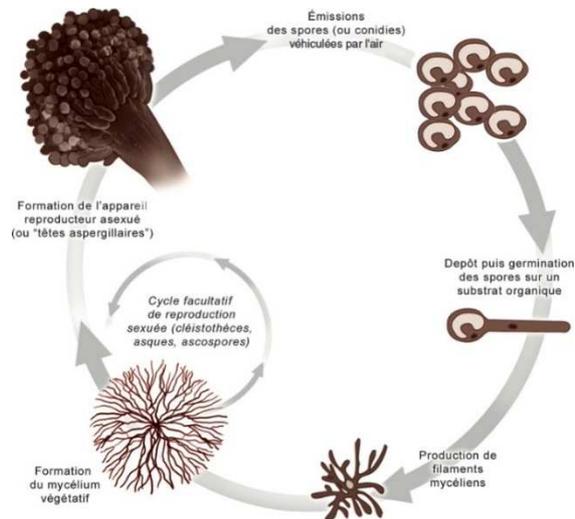


Figure 1 : Cycle naturel d'*Aspergillus* dans l'environnement.
(d'après Gangneux *et al.*, 2002 (10))

En culture, les colonies d'*A. fumigatus* apparaissent macroscopiquement duveteuses et veloutées de couleur grise à verte. Microscopiquement, les filaments aspergillaires sont de diamètre régulier (2 à 5 μm) et cloisonnés par des *septa*. Les ramifications se font à angles aigus. La disposition des ramifications des filaments par rapport à l'apex, mais aussi l'angle qu'elles dessinent avec l'hyphe principale, sont caractéristiques de l'espèce aspergillaire. Les conidiophores s'individualisent à partir des filaments mycéliens et portent à leur extrémité la tête aspergillaire (Figure 2). Une seule rangée de phialides insérées directement sur une vésicule compose alors la tête aspergillaire unisériée (5). La conidiogénèse par bourgeonnement à partir des phialides permet la libération de conidies unicellulaires, globuleuses et finement échinulées dont la taille varie de 2 à 3 μm . Les conidies sont facilement dispersées par voie aéroportée.

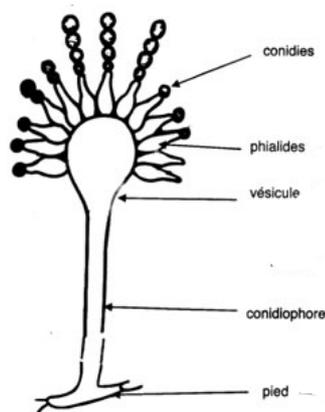


Figure 2 : Représentation schématisée d'une tête aspergillaire.
(d'après <http://www.microbiologie-medicale.fr>)

La thermotolérance et la psychrophilie permettent à *A. fumigatus* de survivre dans des conditions extrêmes de stress, de température ou de pH par adaptation de leur métabolisme (11).

Il a récemment été découvert que *A. fumigatus* possédait un cycle sexué entraînant la production de cléistothèces et d'ascospores. La forme sexuée *Neosartorya fumigata*, appelée aussi téléomorphe, a ainsi été décrite en 2009 (12).

I.3. Facteurs de virulence

L'espèce *A. fumigatus* exploite les défaillances qualitatives et quantitatives des défenses immunitaires de l'hôte et peuvent être à l'origine d'infections fongiques invasives. Même si le débat sur l'existence de véritables facteurs de virulence persiste encore, les attributs fongiques de ces champignons ne sont pas à négliger, *A. fumigatus* étant responsable de près de 80 % des aspergilloses invasives (AI) (13).

Les conidies d'*A. fumigatus* sont de taille et de forme idéale pour rejoindre les alvéoles pulmonaires. Leur petite taille de 2 à 3µm de diamètre les distingue des conidies d'autres champignons pathogènes tels que *Aspergillus flavus* ou *Aspergillus niger*, de plus grande taille, qui restent dans le tractus respiratoire supérieur et sont plus facilement évacuées par la clairance mucociliaire (14). Les spores aspergillaires sont également pourvues de protéines hydrophobes, les hydrophobines, véritables facteurs d'adhérence aux protéines du surfactant pulmonaire (15). Les parois des conidies représentent une interface clé entre le champignon et le système immunitaire. De multiples études ont notamment montré l'intérêt majeur de la mélanine dans l'arsenal de protection des conidies aspergillaires contre les défenses immunitaires de l'hôte (16–18). Ce pigment diminuerait notamment la lyse cellulaire en masquant les polysaccharides de surface, l'antigène (1,3)-β-D-glucane, et retarderait ainsi l'activation macrophagique. La mélanine participerait aussi à la détoxification des espèces réactives de l'oxygène, mais aussi en piégeage des radicaux oxygénés.

La thermotolérance aspergillaire est également un élément important à prendre en compte dans la pathogénicité de ces moisissures. En effet, *A. fumigatus* peut croître jusqu'à 55 °C et survivre jusqu'à 70 °C, sa température optimale de développement se situant entre 37 et 42 °C (19).

Cette propriété lui permet non seulement d'être ubiquitaire dans l'environnement mais aussi théoriquement de germer facilement dans le corps humain.

L'équipement enzymatique d'*A. fumigatus* lui permet de résister au stress oxydatif par l'intermédiaire, entre autres, de la superoxyde dismutase. Les enzymes cataboliques participent à la dégradation des polymères polysaccharidiques présents dans leur environnement. Chez l'Homme, ces enzymes possèdent une dimension virulente, puisqu'elles sont impliquées dans la dégradation des tissus de l'hôte, mais aussi dans le phénomène d'angio-invasivité. D'autres attributs des champignons leur permettent de se fournir en nutriments et participent ainsi à leur croissance et à leur pouvoir invasif. C'est le cas par exemple des sidérophores, capteurs de fer (20).

Les métabolites secondaires ne sont pas en reste quant à leur contribution à la pathogénicité d'*A. fumigatus*. La gliotoxine, par exemple, est riche de nombreuses propriétés immunosuppressives (21) : l'inhibition de la phagocytose et du *burst* oxydatif, le blocage de la transcription des médiateurs inflammatoires, la prévention de l'activation de la NADPH oxydase...

I.4. Interactions entre l'Homme et *Aspergillus fumigatus*

Aspergillus fumigatus est retrouvé à toutes les latitudes du globe terrestre (8). Les conidies aspergillaires sont fréquemment retrouvées dans l'eau, la poussière des maisons mais aussi les aliments comme le poivre (22). Du fait de l'ubiquité de ces champignons, l'Homme est y constamment exposé et inhale quotidiennement plusieurs dizaines de spores aspergillaires (23). Plusieurs acteurs de l'immunité innée permettent d'assurer la clairance aspergillaire (24). Par l'action combinée du mucus et des cils de la muqueuse respiratoire, la clairance mucociliaire constitue le premier rempart défensif après le dépôt des spores au niveau des espaces alvéolaires et des bronchioles. Les cellules épithéliales sécrètent des peptides antimicrobiens. Ces molécules solubles, comprenant les β -défensines notamment, participent également à la résistance anti-aspergillaire. Rapidement, les motifs moléculaires associés aux pathogènes, les PAMP (*Pathogens Associated Molecular Patterns*), sont reconnus par les PRR (*Pathogens Recognition Receptors*) des macrophages alvéolaires et des cellules dendritiques de l'arbre respiratoire. Les macrophages alvéolaires assurent la phagocytose et l'élimination des spores

par mécanisme oxydatif (25). Ils initient également la réponse pro-inflammatoire *via* les cytokines et chimiokines, et par le recrutement des polynucléaires neutrophiles (26). Ces derniers interviennent lorsque les spores ont échappé aux macrophages et commencent leur processus de germination. Les polynucléaires neutrophiles exercent une action fongicide *via* la production d'espèces réactives de l'oxygène par la NADPH oxydase, la séquestration ferrique par la lactoferrine et la formation de pièges extracellulaires (27) (Figure 3).

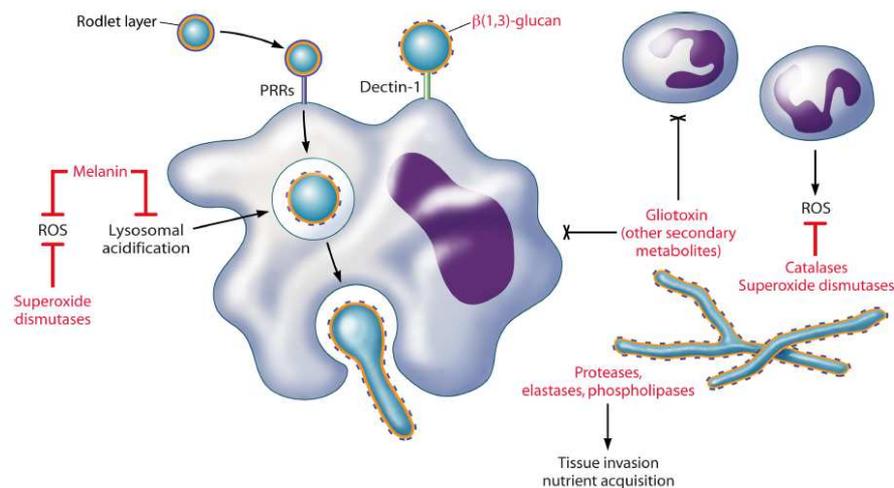


Figure 3 : Interactions entre les phagocytes et *Aspergillus fumigatus*.

(d'après Dagenais et Keller, 2009 (14))

Les macrophages alvéolaires phagocytent les conidies inhalées via leur Pathogens Recognition Receptors. Le gonflement conidien (à l'intérieur ou à l'extérieur du macrophage) libère la couche de bâtonnets de protection, exposant les β-D(1,3)-glucanes à la reconnaissance par la Dectin-1. Les interactions Dectin-1–glucanes sont principalement responsables de l'activation de la réponse pro-inflammatoire des macrophages, dont le killing des conidies détruites directement à l'intérieur des phagosomes par la génération de Reactive Oxygen Species (ROS) de façon NADPH-dépendante. Les PNN s'attachent aux hyphes, dégranulent et les dégradent par des mécanismes oxydatifs et non oxydatifs. Les polynucléaires neutrophiles (PNN) peuvent également faire agréger les conidies et empêcher leur germination. Ainsi, l'altération de la fonction phagocytaire est le principal facteur de risque pour les aspergilloses pulmonaires invasives. Les produits fongiques (police en rouge) peuvent contribuer à la pathogénicité du champignon chez ces sujets immunodéprimés en échappant ou modulant les défenses de l'hôte.

Les polynucléaires neutrophiles sont appuyés par le recrutement d'une deuxième vague de cellules immunitaires (Figure 4). Dès lors, chaque déficience de ces mécanismes de défense compromet le contrôle de la germination des spores et les formes filamenteuses peuvent alors proliférer *in situ*, puis se disséminer aux autres organes par voie sanguine.

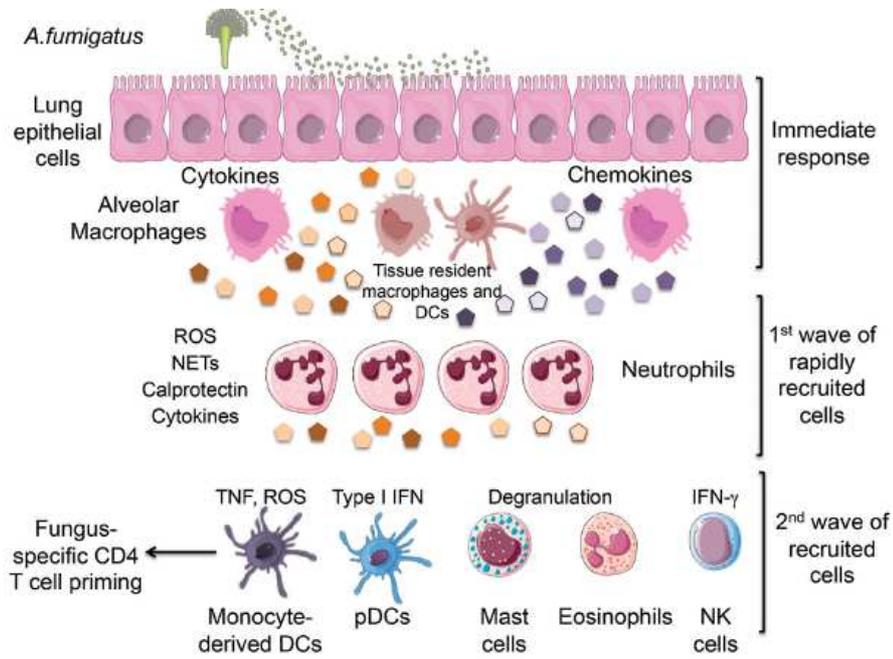


Figure 4 : Recrutement des cellules immunitaires après inhalation des conidies aspergillaires.

(d'après Espinosa *et al.*, 2016 (27))

L'inhalation de conidies d'Aspergillus fumigatus conduit à la reconnaissance initiale de l'infection par les cellules épithéliales pulmonaires et les cellules innées résidentes, y compris les macrophages alvéolaires et les cellules dendritiques. Les polynucléaires neutrophiles sont rapidement recrutés puis sont soutenus par le recrutement d'une deuxième vague de cellules immunitaires.

II. L'aspergillose pulmonaire invasive

II.1. Place de l'aspergillose pulmonaire invasive au sein des maladies aspergillaires

Le spectre des atteintes pulmonaires liées à *A. fumigatus* est très large (23,28). Les caractéristiques cliniques et le pronostic de ces infections dépendent grandement du degré de déficience des défenses immunitaires de l'hôte, mais aussi de l'intégrité du tissu pulmonaire. Ainsi l'interaction entre le pathogène, le poumon et l'immunité du patient, que celle-ci soit déficiente ou en hyperactivité, détermine le syndrome clinique susceptible de se développer (Figure 5).

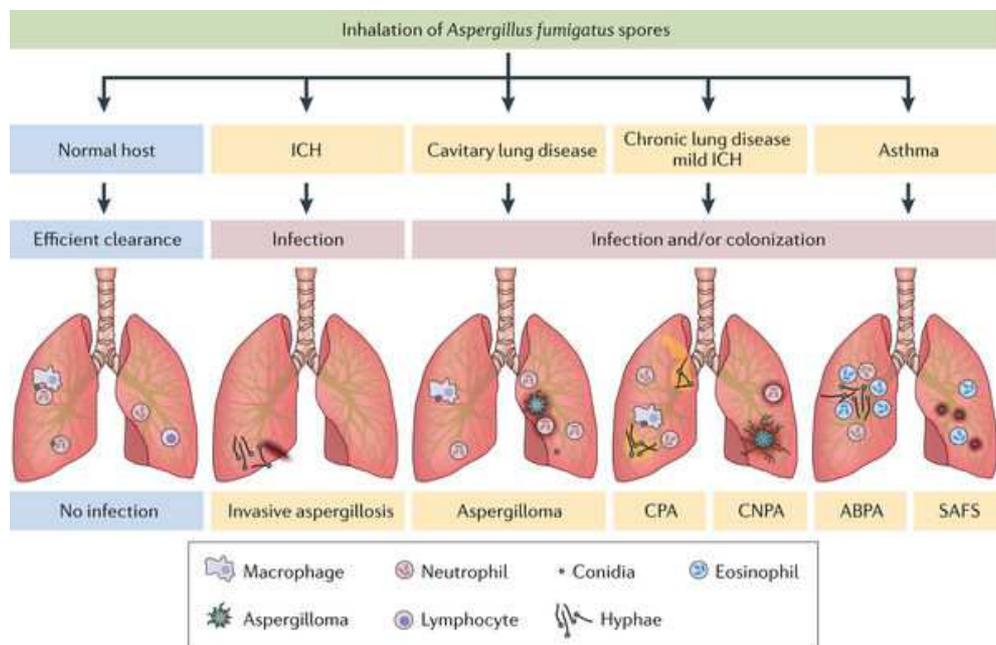


Figure 5 : Spectre clinique des aspergilloses.

(d'après Van de Veerdonk *et al.*, 2017 (29))

ICH : ImmunoCompromised Host, *CPA* : Chronic Pulmonary Aspergillosis, *CNPA* : Chronic Necrotizing Pulmonary Aspergillosis, *ABPA* : Allergic BronchoPulmonary Aspergillosis, *SAFS* : Severe Asthma with Fungal Sensitization

Les aspergilloses immuno-allergiques se développent lorsqu'il existe une hyperactivité du système immunitaire. Chez les patients atopiques, l'inhalation des spores entraîne une réponse immune immédiate avec production d'immunoglobulines IgE spécifiques, c'est l'asthme aspergillaire avec sensibilisation fongique. L'aspergillose broncho-pulmonaire allergique (ABPA), engendrée par la colonisation aspergillaire trachéo-bronchique, survient sur des

terrains à risque tels que les patients atteints de mucoviscidose ou d'asthme. Elle associe notamment des réactions d'hypersensibilité immédiate et semi-retardée (30,31).

En revanche, les patients présentant une lésion pulmonaire préexistante sont à risque de développer un aspergillome ou une aspergillose pulmonaire cavitaire chronique. L'aspergillome résulte de la colonisation d'une cavité préformée (caverne tuberculeuse, kyste...) par le champignon qui forme alors une véritable « truffe aspergillaire ». La découverte se fait le plus souvent de manière fortuite sur un cliché radiographique. L'aspergillose pulmonaire cavitaire chronique se caractérise par des symptômes généraux ou respiratoires évoluant depuis au moins trois mois (32).

L'aspergillose semi-invasive ou aspergillose pulmonaire nécrosante chronique est caractérisée histologiquement par la présence d'une inflammation granulomateuse et de plages de nécroses pulmonaires. Les facteurs favorisant le développement de cette forme d'aspergillose pulmonaire sont variés tels que le diabète non insulino-dépendant, l'alcoolisme, une maladie pulmonaire obstructive chronique préexistante ...

Enfin, parmi les aspergilloses invasives, on retrouve les formes pulmonaires pures, les plus fréquentes, puis les autres (cérébrales, vertébrales...) qui peuvent être ou non associées à une forme pulmonaire. L'aspergillose pulmonaire invasive (API) est la conséquence de l'invasion du parenchyme pulmonaire par les filaments de champignons du genre *Aspergillus*. La présentation clinique est relativement rapide, de l'ordre de plusieurs jours à quelques semaines, mais la symptomatologie n'est pas spécifique à l'API. Au début de la maladie, l'insuffisance respiratoire générée par l'envahissement du tissu pulmonaire par les filaments aspergillaires est à l'origine de la symptomatologie pulmonaire : douleur thoracique, toux, dyspnée, hypoxie, détresse respiratoire (33). Cette présentation clinique peut s'accompagner d'une fièvre rebelle aux antibiotiques depuis plus de 48 heures ; mais cette hyperthermie peut être masquée par l'utilisation concomitante de corticostéroïdes. Plus tard, dans le cas d'une aspergillose pulmonaire angio-invasive, l'angio-invasion des filaments peut alors conduire à la survenue d'hémorragies et d'hémoptysies. La dissémination sanguine à partir du foyer initial vers d'autres organes peut être à l'origine d'atteintes méningées et viscérales avec localisations rénale, cérébrale, hépatique ou encore cardiaque. L'entité clinique « API » regroupe deux formes : la forme angio-invasive et la forme alvéolo-broncho-invasive, dont la distinction se fait essentiellement sur l'analyse des images scannographiques et des coupes histologiques

(34,35). La première a d'abord été décrite chez les patients présentant une neutropénie profonde et prolongée, essentiellement les patients atteints de leucémie aiguë. Cette forme angio-invasive est caractérisée histologiquement par l'invasion et l'occlusion d'artères pulmonaires de petite à moyenne taille par des hyphes aspergillaires. Il n'est pas exceptionnel que ce phénomène d'angio-invasion se propage et dissémine vers d'autres organes. Chez les sujets présentant une aspergillose pulmonaire alvéolo-broncho-invasive, l'invasion aspergillaire est limitée à la membrane basale des voies respiratoires profondes. Le facteur de risque le plus commun de cette deuxième forme d'API est l'utilisation de corticoïdes. Elle a notamment été décrite chez des receveurs d'organes solides, des patients atteints de broncho-pneumopathie chronique obstructive (BPCO) ou hospitalisés en soins intensifs. Il convient donc, lorsque cela est possible, de faire la différence entre ces deux formes qui ne présentent pas tout à fait les mêmes éléments de physiopathologie et pour lesquelles la rentabilité des outils diagnostiques n'est pas la même.

II.2. Epidémiologie

Les infections fongiques invasives, dont font partie les aspergilloses pulmonaires invasives, voient leur taux d'incidence croître. Ce phénomène peut s'expliquer en partie par la diversification des populations dites à risque. Plusieurs récentes études françaises permettent d'estimer un peu mieux l'importance des aspergilloses invasives dans le paysage médical français mais aussi de décrire leurs caractéristiques épidémiologiques et les facteurs de risque associés. Dans les études présentées ci-dessous, il est fait mention d'aspergilloses invasives de manière générale ; mais dans ces mêmes études, les formes pulmonaires représentaient plus de 90 % des aspergilloses invasives (1,36). Nous avons donc considéré que l'épidémiologie des API pouvait raisonnablement se superposer à celle des aspergilloses invasives.

Le Programme de médicalisation des systèmes d'information (PMSI) a publié des données recueillies entre 2001 et 2010 sur les mycoses invasives, analysées par Bitar *et al.*, en 2013. Sur cette période, l'incidence et la létalité des infections fongiques invasives ont augmenté respectivement de 1,5 % et 2,9 % par an (36). Les aspergilloses invasives représentaient 23,9 % de ces IFI ; 91,7 % d'entre elles étaient des API. En dix ans, la tendance s'est inversée entre les API et les pneumocystoses. Alors qu'au début des années 2000, les pneumocystoses étaient majoritaires, leur incidence a diminué au profit de celles des API à partir de 2004. Ce phénomène peut en partie s'expliquer par la diminution de l'incidence de la pneumocystose à

Pneumocystis jirovecii chez les patients séropositifs pour le Virus de l'Immunodéficience Humaine (VIH) et la généralisation des antirétroviraux ayant un fort impact sur la restauration de l'immunité de ces patients. L'incidence des aspergilloses invasives augmentait de 4,4 % par an, s'élevait à 1,4 cas pour 100 000 personnes par an avec des taux d'incidence plus élevés en Ile de France et dans le grand quart est du pays mais sans prédominance saisonnière.

Les populations à risque se sont diversifiées, même si les hémopathies malignes aiguës restent en tête des facteurs de risque d'API (1). Les leucémies aiguës myéloïdes (LAM) sont plus souvent incriminées que les leucémies aiguës lymphoïdes (LAL), représentant près des deux-tiers des aspergilloses invasives survenant chez les patients leucémiques. Soixante-dix pour cent des API se déclenchent d'ailleurs pendant la phase d'induction de la chimiothérapie, phase de neutropénie profonde et prolongée (< 500 cellules/mm³ pour une durée > 10 jours) (1). Les patients greffés de cellules souches hématopoïétiques sont d'autant plus à risque qu'il s'agisse d'une allogreffe, avec deux pics de survenue ; le premier pendant la phase précoce d'aplasie faisant suite à la greffe et le second après le centième jour post greffe lors du traitement des réactions du greffon contre l'hôte (*Graft versus Host* GvH) chroniques par corticoïdes (37,38). De nouvelles catégories de patients émergent, comme les sujets atteints de lymphopathies chroniques telles que les lymphomes, la leucémie lymphoïde chronique ou encore le myélome multiple. Dans la prise en charge de ces malades, l'intensification des traitements et l'accumulation des périodes d'immunodépression pourraient favoriser la survenue des API. Bien que plus rares chez les transplantés d'organes solides, les API sont en augmentation au sein de cette population de malades ; les transplantés cardiaques et pulmonaires étant les plus souvent touchés. Chez les receveurs de transplantation pulmonaire, l'exposition continue de l'organe à l'environnement, associée à une clairance mucociliaire réduite et un réflexe de toux émoussé, contribue à la vulnérabilité à l'API (39). Chez les receveurs de transplantation cardiaque, ce sont les procédures invasives pré-transplantation qui concourraient au risque d'API. Les sujets souffrant de pathologies inflammatoires systémiques nécessitant un traitement par corticostéroïdes au long cours ou par anti-inflammatoires tels les anti-TNF α (*Tumor Necrosis Factor*), sont également à risque. Il ne faut pas non plus oublier les patients souffrant de pathologies respiratoires chroniques, comme la BPCO, qui présentent une altération de la clairance mucociliaire et donc un terrain adéquat pour le développement d'API. Enfin, dans de très rares cas, l'aspergillose pulmonaire invasive affecte des patients porteurs de pathologies génétiques concernant les défenses immunitaires, comme c'est le cas lors de la granulomatose septique chronique (40).

La létalité moyenne varie selon les études. Elle s'élevait à 28,5 % selon les données du PMSI 2001-2010, et était maximale aux âges extrêmes de la vie (58 % les premiers jours de vie et 42 % après 90 ans). Selon une étude prospective conduite pendant trois ans (2005-2007) dans 12 hôpitaux universitaires français, le groupe de Surveillance des Aspergilloses Invasives en France (SAIF) a évalué la létalité à 44,8 % (1). Cette létalité est évidemment très dépendante du terrain sous-jacent, de la rapidité et de l'efficacité de la prise en charge. Ainsi, l'épidémiologie des aspergilloses pulmonaires invasives pousse à la réflexion sur la sensibilisation des praticiens aux infections fongiques invasives, mais aussi à l'amélioration de la prise en charge, tant en termes de délais que d'outils diagnostiques, thérapeutiques et de suivi.

II.3. Démarche et outils diagnostiques

II.3.1. *Imagerie médicale*

Considérant la localisation pulmonaire de l'API, il apparaît indispensable de procéder le plus précocement possible à un examen d'imagerie médicale thoracique devant toute symptomatologie suspecte survenant chez un patient à risque. Les examens de radiographie conventionnelle ne présentent que peu d'intérêt dans le cadre du diagnostic d'API, puisqu'ils ne mettent en évidence que des anomalies aspécifiques (opacités, infiltrats pleuraux...). En revanche, le scanner thoracique ou tomодensitométrie thoracique est l'examen de référence, et une large gamme d'anomalies tomодensitométrique peut être observée (Figure 6). La plupart des patients, 80 % à 94 % selon les études (1,41), présentent un ou plusieurs macronodules de taille supérieure à 1 cm ou bien des micronodules, mais ces signes ne sont pas pathognomoniques. Si l'on considère les formes angio-invasives et les formes alvélo-broncho-invasives, la première présente plutôt un nodule accompagné du signe du halo alors que la deuxième se révèle de préférence par des micronodules centrolobulaires. Le signe du halo, lorsqu'il est détecté chez les patients immunodéprimés, est un signe précoce d'API. Le signe du halo est défini comme une hyperdensité en verre dépoli entourant une opacité dense. Il traduit l'hémorragie périfocale d'un nodule aspergillaire nécrotique consécutive à un infarctus (Figure 6). Selon Alves *et al.*, lorsque le signe du halo est observé chez les patients dont l'immunité est compromise, il s'agit dans 78 % des cas d'une API (42). En revanche, quand le sujet ne semble pas à risque et qu'il est dit immunocompétent, le signe du halo est synonyme dans près de 90 % des cas de néoplasies primaires ou métastases cancéreuses. L'existence du

signe du halo semble variable selon les études puisqu'il est présent dans 15 à 70 % des cas d'API (41) selon que l'on s'intéresse à l'API dans sa globalité ou juste à la phase débutante de celle-ci. La détection précoce du signe du halo semble aller de pair avec le raccourcissement du délai diagnostique. D'autres éléments radiologiques peuvent être rapportés comme des aires de consolidation, des lésions cavitaires ou encore des épanchements pleuraux.

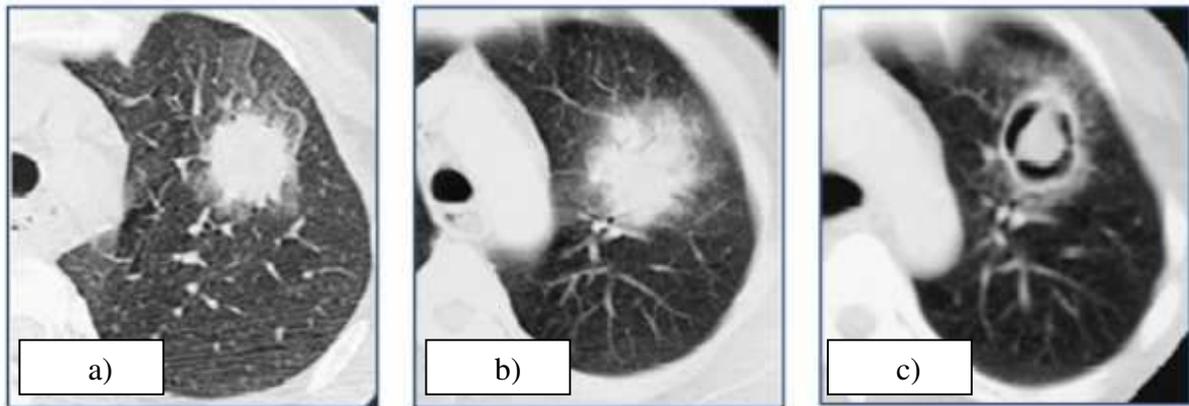


Figure 6 : Images tomодensitométriques évocatrices d'aspergilloses pulmonaires invasives.

(d'après Caillot *et al.*, 2001 (43))

a) J0-J5 : signe du halo, hyperdensité en verre dépoli entourant une opacité dense. Précoce mais fugace, il doit faire suspecter une infection fongique invasive (le plus souvent aspergillaire).

b) J5-J10 : condensation alvéolaire, correspondant à un infarctus pulmonaire.

c) J10-J15 : signe du croissant gazeux, zone de densité aérique de la forme d'un croissant en périphérie d'un nodule ou d'une condensation ; signe tardif apparaissant lors de la phase de correction de la neutropénie.

Il est important de signaler que lorsque des examens d'imagerie pulmonaire sont effectués pour le suivi, le volume des lésions pulmonaires a tendance à augmenter au cours de la première semaine malgré un traitement antifongique efficace. Dès lors que le patient n'est plus en profonde neutropénie, il y a excavation des nodules et formation d'une image dite en « croissant gazeux » (Figure 6). Ce signe tardif, associé à un pronostic favorable, est observé lors de la phase de correction de la neutropénie.

L'apport du scanner thoracique n'est donc pas à négliger puisqu'il permet d'évaluer les rapports entre lésions parenchymateuses pulmonaires et structures vasculaires notamment (44). Lorsque le foyer aspergillaire est à proximité de l'artère pulmonaire et qu'il existe un risque d'érosion artérielle, le scanner thoracique permet d'anticiper une intervention endovasculaire pour lever le plus rapidement possible toute menace d'hémoptysie massive.

Plus récemment, l'angiographie pulmonaire par tomographie assistée par ordinateur (CTPA) a été présentée comme un outil prometteur pour mettre en évidence l'interruption du vaisseau artériel secondaire à l'angio-invasion du champignon (45).

II.3.2. *Examen mycologique*

L'examen mycologique associe classiquement un examen direct et une culture, comme pour toute suspicion de pathologie fongique (33,46). Depuis l'avènement de la spectrométrie de masse, l'identification protéique s'ajoute à ces deux techniques traditionnelles. La qualité et le rendement de cet examen mycologique dépendent grandement de la qualité du prélèvement. En effet, le prélèvement doit être le plus profond possible pour éviter les zones non stériles, mais aussi le plus près possible de la lésion suspecte, là où se développent les filaments mycéliens, pour être le plus sensible possible. Le lavage broncho-alvéolaire (LBA), bien que constituant un prélèvement profond, n'est pas suffisant pour permettre à lui seul de poser le diagnostic d'API, en cas de positivité à l'examen mycologique. Le plus haut degré de pertinence est obtenu par un prélèvement obtenu stérilement d'un site compatible avec l'infection, normalement stérile et cliniquement ou radiologiquement anormal. Une attention particulière est apportée afin d'éviter toute contamination de l'échantillon, de l'étape du prélèvement à celle de la prise en charge par le laboratoire de mycologie sous hotte en passant par le transport dans un contenant stérile.

L'examen direct, rapide, constitue un atout majeur pour la prise en charge précoce du patient, notamment lorsqu'il est positif. Il se réalise sur un échantillon frais, entre lame et lamelle, et s'observe au microscope. Des filaments fins hyalins septés et parfois ramifiés à angle aigu sont observés lorsque l'examen est positif. Afin d'augmenter la sensibilité de l'examen par rapport à un état frais classique, il est possible d'employer un agent éclaircissant, comme l'hydroxyde de potassium à 10 % ou le noir chlorazole, ou un agent fluorescent comme le calcofluor, l'Uvitex 2B® (Figure 7) ou le Blankophor®. Ces colorants se lient spécifiquement aux polysaccharides liés à la bêta-glycoside des parois cellulaires fongiques. Même s'il est possible de définir les filaments vus en microscopie comme des filaments de type aspergillaires, seule la culture peut permettre de poser un diagnostic de genre. De plus, malheureusement, la

positivité de l'examen mycologique est souvent corrélée à un envahissement pulmonaire massif et donc à un stade avancé de la maladie.

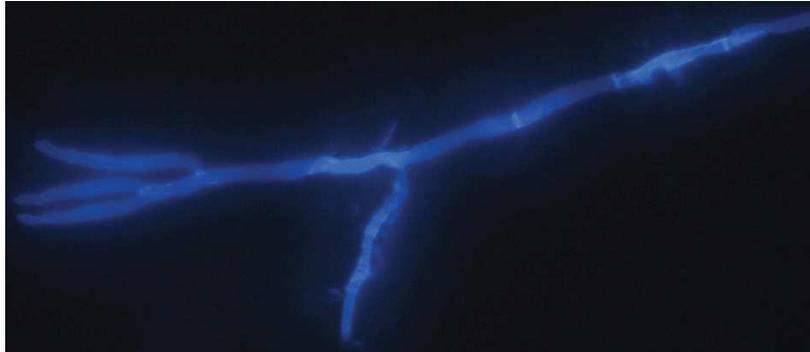


Figure 7 : Filaments mycéliens colorés à l'Uvitex 2B®.

(Collection du laboratoire de Parasitologie – Mycologie du CHRU de Tours)

Examen au microscope à fluorescence après imprégnation des filaments par le calcofluor, Uvitex 2B® (grossissement x 500).

La culture présente une sensibilité d'environ 50 % (47). Elle se réalise sur gélose dextrose agar Sabouraud, en tube ou en boîte. Ce milieu, couramment utilisé en laboratoire, est additionné d'antibiotiques, comme le chloramphénicol ou la gentamicine, pour inhiber la croissance de bactéries commensales. Le milieu Czapek quant à lui détecte les pigments aspergillaires. Les géloses sont incubées entre 30 et 37 °C pendant plusieurs jours. L'identification du genre et de la section aspergillaire prend en compte quatre caractéristiques importantes : le temps et la température de pousse, l'aspect macroscopique et l'aspect microscopique. Les espèces d'*Aspergillus* de la section *Fumigati* poussent relativement vite en deux à trois jours. D'un point de vue macroscopique, les colonies sont duveteuses et veloutées, grises à vertes avec une bordure blanche (Figure 8). L'aspect microscopique s'observe grâce à la technique dite du drapeau. Un fin morceau de cellophane adhésive est déposé délicatement sur la colonie puis apposé sur une lame colorée au bleu de lactophénol pour être observé entre lame et lamelle au microscope. L'œil averti du mycologue saura reconnaître les structures fongiques importantes : les conidiophores, les vésicules, les phialides et les conidies échinulées (Figure 9). Grâce à l'ensemble de ces éléments, il est possible de déterminer le genre et la section aspergillaire. En effet, la trentaine d'espèces qui composent la section *Fumigati*, morphologiquement similaires, ne peuvent pas être distinguées les unes des autres sur l'examen mycologique seul.



Figure 8 : Aspects macroscopiques d'*Aspergillus* de la section *Fumigati*.
Colonies duveteuses et veloutées, grises à vertes avec une bordure blanche.



Figure 9 : Aspects microscopiques d'*Aspergillus* de la section *Fumigati*.
Photographies de têtes aspergillaires colorées au bleu de lactophénol à partir d'une culture sur milieu de Sabouraud (grossissement x 400).

Malgré la positivité de l'examen direct sur un échantillon, il est très difficile de différencier contamination, colonisation et infection. La profondeur et la qualité du prélèvement sont donc indispensables pour l'interprétation.

De plus en plus utilisées dans les laboratoires de microbiologie, les techniques par spectrométrie de masse permettent de séparer des peptides, transformés en ions et se déplaçant dans une atmosphère gazeuse. Le système est constitué de la source MALDI (*Matrix Assisted LASER Desorption Ionisation*) et de l'analyseur TOF (*Time Of Flight*). La première étape consiste à mélanger l'échantillon, obtenu à partir d'une culture, avec de la matrice favorisant l'ionisation. Une fois dans le spectromètre, le dépôt subit des tirs de LASER qui désorbent les molécules du mélange et forment des ions. Les ions traversent alors le tube de vol et atteignent le détecteur. Les signaux reçus sont ensuite convertis en spectres. Après comparaison du spectre obtenu pour l'échantillon analysé à la banque de données, il est possible d'identifier l'espèce aspergillaire incriminée à condition de disposer d'une base de données suffisamment fournie.

Cette technologie permet de compléter l'examen mycologique standard, classant uniquement le champignon selon son genre et sa section, et de déterminer avec certitude l'espèce (48). La spectrométrie de masse permet ainsi de différencier *A. fumigatus* des autres espèces de la section *Fumigati*. Certains paramètres restent cependant à standardiser et à qualifier tel le prétraitement de l'échantillon. Il est également important de ne pas oublier que les résultats obtenus avec la technologie MALDI-TOF sont toujours dépendants d'une culture positive et dispose donc de la même sensibilité et de la même spécificité que celle-ci.

II.3.3. *Examen anatomopathologique*

Lorsqu'un échantillon tissulaire est prélevé dans le cadre d'une suspicion d'API, il est indispensable de faire une demande expresse à l'anatomo-cytopathologiste pour qu'il applique des colorations spécifiques aux coupes histologiques. La coloration Hématoxyline Éosine Safran (HES) permet de révéler l'architecture tissulaire et la réaction inflammatoire des tissus de l'hôte (Figure 10). La coloration à l'Acide Périodique de Schiff (PAS) spécifique des sucres, dont ceux de la paroi fongique, peut être utilisée pour mettre en évidence des champignons dans des sections tissulaires. La coloration argentique de Gomori-Grocott teinte facilement les éléments fongiques. Ainsi, ces trois colorations sont complémentaires pour détecter la présence du champignon et établir les relations existantes entre le champignon et le tissu environnant.

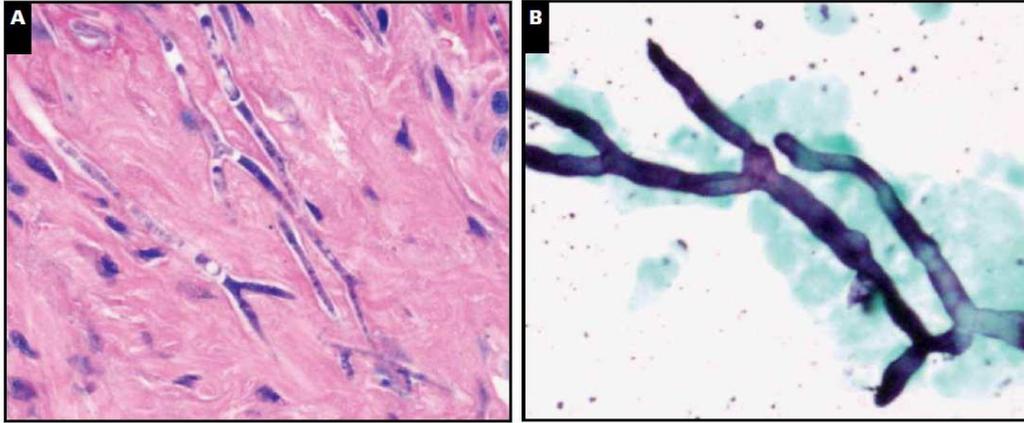


Figure 10 : Images histologiques d'*Aspergillus* spp.

(d'après Shah et Hazen., 2013 (49))

A) *Aspergillus* spp dans une biopsie sinusale (coloration Hematoxyline Eosine Safran, grossissement $\times 400$)

B) *Aspergillus* spp dans un liquide broncho-alvéolaire (coloration Gomori-Grocott, grossissement $\times 400$)

II.3.4. Antigènes fongiques

Les marqueurs biologiques représentent une alternative intéressante face aux techniques invasives parfois inenvisageables chez les sujets immunodéprimés. Deux marqueurs antigéniques aspergillaires sont utilisés en routine : le galactomannane (GM), antigène spécifique du genre *Aspergillus*, et l'antigène (1,3)- β -D-glucane, présent chez la plupart des pathogènes fongiques (Figure 11).

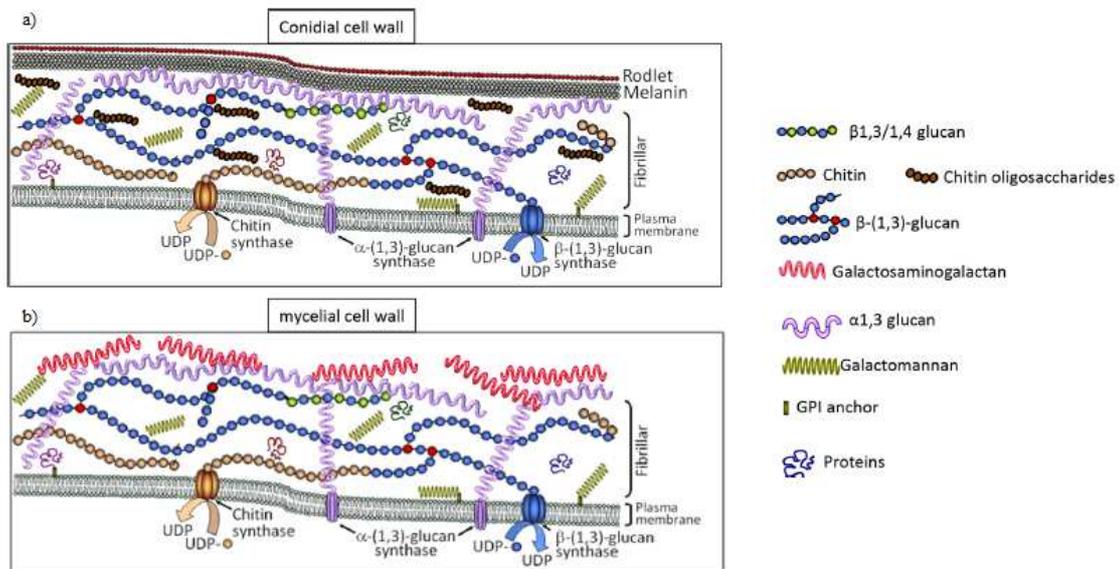


Figure 11 : Représentation schématique de la paroi cellulaire d'*Aspergillus fumigatus*.

(d'après Beauvais *et al.*, 2014 (50))

a) paroi cellulaire d'une conidie

b) paroi cellulaire d'un filament mycélien

II.3.4.1. Antigène galactomannane

L'antigène galactomannane est un hétéropolysaccharide de la paroi fongique de la plupart des espèces d'*Aspergillus*. Il est composé d'une chaîne de mannose sur laquelle sont greffées des chaînes latérales contenant des unités galactofurane (Figure 12) (51). Cette molécule étant relarguée pendant la phase de croissance du champignon, sa production serait théoriquement proportionnelle à la charge fongique tissulaire. Le kit Platelia™ *Aspergillus* EIA (BioRad) est l'unique test commercialisé pour la détection de l'antigène galactomannane. Il s'agit d'une technique immuno-enzymatique ELISA de type sandwich en une étape réalisée sur *serum* ou LBA. L'échantillon doit être prétraité par chauffage afin de dissocier les éventuels complexes antigènes-anticorps par précipitation. Le résultat est exprimé sous forme d'index de densité optique entre échantillon et contrôle.

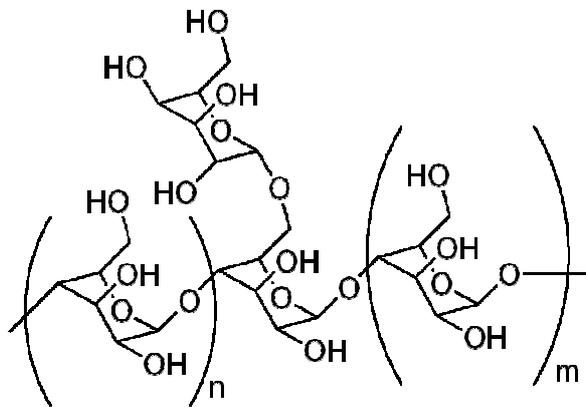


Figure 12 : Structure chimique de l'antigène galactomannane.

Les performances de ce test sont très variables selon les populations étudiées, avec une sensibilité pouvant varier de 22 à 100 % (52). Ainsi chez les sujets leucémiques, la sensibilité du test est affichée à 70 %, alors qu'elle est de 82 % chez les patients adultes ayant subi une greffe de cellules souches hématopoïétiques (52). Une approche diagnostique active a donc été mise en place progressivement par plusieurs groupes de travail pour suivre les patients à risque avec un *screening* réalisé deux fois par semaine (53). Selon les recommandations de l'ECIL (*European Conference for Infections in Leukaemia*) (53), les critères de positivité sont fixés à un index supérieur ou égal à 0,7 sur un *serum* unique ou un index entre 0,5 et 0,7 sur deux *sera*; les critères EORTC/MSG (*European Organisation for Research and Treatment of Cancer/Mycoses Study Group*) se limitant à un seul test positif supérieur à 0,5 (54). En revanche chez les patients à risque ne présentant pas de neutropénie profonde, la démarche n'est pas la même. En effet, au sein des nouvelles populations émergentes à risque, la physiopathologie est

différente (14,29). La masse fongique est plus faible, ce qui induit un nombre de faux négatifs plus important au sein de ces populations. Ainsi pour ces autres populations à risque, le *screening* ne semble pas pertinent en raison de sa faible sensibilité. La mise en place d'un traitement antifongique peut également entraîner une diminution de la sensibilité du test en limitant le développement du champignon.

Il est également important d'avoir connaissance des limites de ce test, notamment en ce qui concerne la spécificité. Il existe une réactivité croisée avec des substances d'origine iatrogène tels que des antibiotiques semi-synthétiques (pipéracilline-tazobactam, amoxicilline et amoxicilline-acide clavulanique), certaines immunoglobulines polyvalentes ou encore des solutions contenant du gluconate de calcium (55,56). Des résultats faussement positifs peuvent s'observer lors d'infections dues à d'autres champignons pathogènes opportunistes (*Cryptococcus neoformans*, *Magnusiomyces capitatus*, *Histoplasma capsulatum*...) (57). Enfin, il existe des facteurs d'hôte chez les patients en post allogreffe de moelle osseuse au cours des GvH digestives ou chez les jeunes enfants favorisant la translocation de molécules GM-like (10,58). Malgré ces différentes sources de faux positifs, il semble acceptable de traiter en excès les patients à risque suspects d'API devant le pronostic sombre de cette pathologie.

Afin de surmonter les risques de faux positifs, la recherche de l'antigène galactomannane peut être réalisée dans le LBA. Avec un *cut-off* optimal de 1,0, cette technique apparaît appropriée et indispensable dans les LBA de patients d'hématologie pour diagnostiquer l'API, avec une sensibilité supérieure mais une spécificité inférieure à celles du *serum*. Sa détection dans le LBA est plus discutable chez les patients de réanimation (59).

II.3.4.2. Antigène (1-3)- β -D-glucane

L'antigène (1,3)- β -D-glucane est un des composants majeurs de la paroi fongique d'un grand nombre d'espèces de champignons pathogènes, à l'exception des Zygomycètes et des Basidiomycètes (Figure 13). Le kit standardisé Fungitell® est un test colorimétrique assez délicat. Des interférences possibles avec le dosage peuvent survenir avec des β -D-glucanes exogènes provenant du matériel de soins, mais aussi par interférence optique avec des *sera* hémolysés, lipémiques ou ictériques. Le seuil de positivité sérique est aujourd'hui fixé à 80 pg/mL. Le dosage repose sur la capacité du (1,3)- β -D-glucane à activer la cascade de

coagulation de l'hémolymphe des limules. Malheureusement, selon Angebault *et al.*, plus de 45 % des *sera* étaient négatifs au moment du diagnostic (60). Les performances de ce test ne sont donc pas idéales pour qu'il constitue un biomarqueur de choix dans le diagnostic. De plus, plusieurs réactivités croisées avec des substances d'origine iatrogène entraîneraient des résultats faussement positifs. C'est le cas des immunoglobulines polyvalentes, des produits dérivés du sang, mais aussi des anciennes membranes de cellulose utilisées lors d'hémodialyse, et de certaines compresses chirurgicales (61).

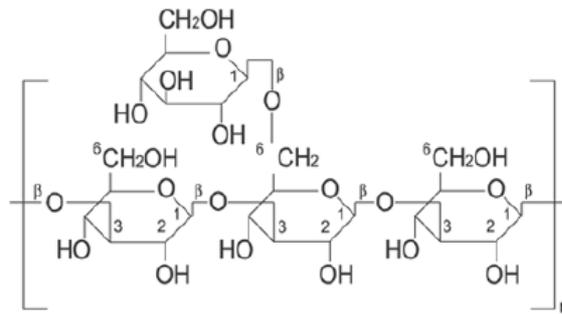


Figure 13 : Structure chimique de l'antigène (1,3)- β -D-glucane.

L'utilisation du dosage de l'antigène (1,3)- β -D-glucane est donc limitée et doit être complétée par la détection de l'antigène galactomannane dans la démarche diagnostique d'API ou dans le cadre de suivi d'un traitement. En revanche, sa haute valeur prédictive négative permettrait de l'utiliser comme test diagnostique d'élimination d'une API.

II.3.5. *Anticorps anti-aspergillaires*

Les anticorps aspergillaires ne semblent pas être une option satisfaisante dans le cadre du diagnostic de l'API. En effet, les principaux patients à risque sont en situation de profonde immunodépression et leur capacité à produire des anticorps est plus que limitée. De plus, la cinétique de synthèse des anticorps, de deux à trois semaines, n'est pas compatible avec une infection aiguë. Ainsi, la détection des anticorps anti-aspergillaires peut apparaître intéressante dans le cas d'un diagnostic rétrospectif d'API chez des patients ayant reconstitué leur capital immunologique (62).

II.3.6. *Biologie moléculaire*

Pendant longtemps les techniques de PCR ont démontré une grande hétérogénéité et ne figurent toujours pas dans les critères révisés de définition d'une API selon l'EORTC/MSG. Devant ce constat, en 2006 un groupe de travail européen, *European Aspergillus PCR (Polymerase Chain Reaction) Initiative* (EAPCRI) a été créé et un recueil des informations minimales requises pour la publication d'articles traitant de la PCR quantitative (qPCR) a été publié (63).

L'échantillon utilisé pour réaliser la PCR est un premier point de questionnement. Springer *et al.* ont démontré qu'il n'existait pas de différence entre l'utilisation du sang total et du *serum* pour le diagnostic d'API lorsqu'il est basé sur la PCR (64). Cependant, l'extraction à partir du *serum* est plus facile et rapide que celle à partir du sang et permet de réaliser sur un même échantillon la PCR et la détection de galactomannane. Lorsque la recherche est effectuée sur LBA, plusieurs interrogations restent en suspens ; doit-on faire la PCR sur le surnageant, le culot ou l'ensemble du LBA ? Où doit-on fixer le seuil qui permettrait de différencier une colonisation d'une infection ?

Le format de la PCR semble maintenant acquis. La PCR quantitative est à privilégier, alors que la PCR nichée est à éviter en raison de problèmes de contamination, du manque de quantification et de l'impossibilité d'incorporer un contrôle interne. Une cible spécifique permettra d'obtenir de meilleures sensibilité et reproductibilité, mais ne recherchera que l'espèce ciblée.

Le contrôle interne de l'amplification permet de contrôler le rendement de la PCR et doit être spécifique pour chaque test. Composé d'ADN, il faut à tout prix éviter de choisir de l'ADN humain et privilégier un ADN exogène. Un contrôle négatif permettra d'évaluer une possible contamination et d'éviter les faux positifs.

L'étude menée par les investigateurs du protocole PREVERT en 2013 a montré que la positivité de la PCR quantitative *Aspergillus* était un argument prédictif indépendant d'aspergillose invasive (65). De plus d'après une méta-analyse de 2014, il a été montré que la positivité de deux PCR quantitatives devait être considérée comme hautement prédictive d'une infection active à *Aspergillus spp* (66). Ainsi la PCR quantitative pourrait être utilisée en *screening* hebdomadaire chez les patients d'hématologie (67).

Devant les efforts de standardisation réalisés ces dernières années et la commercialisation de kits de PCR quantitative, les critères EORTCC/MSG de définition de l'API devraient évoluer et intégrer la PCR dans la prise en charge des patients à haut risque.

II.3.7. Définitions de l'aspergillose pulmonaire invasive selon les critères EORTC/MSG

La démarche diagnostique de l'API reste complexe et requiert le plus souvent un faisceau d'arguments cliniques, biologiques et radiologiques aussi variés que ceux précédemment décrits (cf. II.3.1 à II.3.8.). En 2002, un groupe consensus, composé d'experts de l'EORTC et du MSG, a posé les bases des définitions des infections fongiques invasives (68). Ces critères, révisés en 2008, permettent de classer les API selon trois niveaux de probabilité : « prouvée », « probable » et « possible », du plus au moins certain (54). Cette classification harmonisée permet de s'entendre à grande échelle sur le niveau de preuve des infections et de faciliter la prise en charge des patients atteints d'API.

L'API est prouvée lorsqu'elle repose sur :

- un examen histopathologique montrant la présence d'hyphes de champignons filamenteux associés à des lésions tissulaires à partir d'une biopsie ou d'une ponction aspiration
- ou l'isolement d'*Aspergillus* spp. à partir d'une culture d'un prélèvement obtenu stérilement d'un site compatible avec l'infection, normalement stérile et cliniquement ou radiologiquement anormal (LBA exclu).

L'API probable est présentée comme l'association :

- d'un critère lié à l'hôte (Figure 14)
- d'un critère microbiologique direct ou indirect
- et d'un critère clinique/radiologique majeur sur un site anormal lié à l'infection.

Enfin, l'API possible n'est pas soutenue par une documentation microbiologique, mais associée uniquement :

- un critère lié à l'hôte
- et un critère clinique/radiologique majeur sur un site anormal lié à l'infection.

Ces critères ne semblent pas complètement adaptés aux patients hospitalisés en soins intensifs ou même ceux contrôlés séropositifs pour le VIH. En 2012, un nouvel algorithme a d'ailleurs été conçu par Blot *et al.* pour distinguer la colonisation aspergillaire et l'API putative chez les patients hospitalisés en soins intensifs avec des critères ajustés, ce qui n'était pas permis par la classification EORTC/MSG (69). D'autre part les critères de diagnostic de l'API imposent des critères d'hôtes que ne remplissent pas nécessairement les patients ayant des pathologies respiratoires chroniques par exemple. Par ailleurs, comme toute lecture interprétative, le décryptage des images scannographiques peut être complexe mais également variable selon les termes utilisés par différents spécialistes. Enfin, la classification EORTC/MSG a été proposée il y a plus de dix ans, et une nouvelle version actualisée est attendue.

| Critères microbiologiques | Critères liés à l'hôte | Critères cliniques / radiologiques |
|--|--|--|
| <p>- Eléments de diagnostic direct : Présence d'éléments fongiques évocateurs de moisissures sur l'examen direct ou la culture d'échantillons d'expectoration, de LBA, de brosse bronchique ou d'aspiration naso-sinusienne</p> <p>- Eléments de diagnostic indirect (détection d'antigènes ou de constituants de la paroi cellulaire) :</p> <ul style="list-style-type: none"> • Détection de l'antigène galactomannane dans le plasma, le sérum, le LBA ou le LCR • Détection de l'antigène (1,3)-β-D-glucane dans le sérum | <ul style="list-style-type: none"> - Antécédents récents de neutropénie (<500 neutrophiles / mm³ depuis plus de 10 jours) - Greffe allogénique de cellules souches hématopoïétiques - Utilisation prolongée de corticostéroïdes (sauf chez les patients atteints d'ABPA) à la dose minimale moyenne de 0,3 mg/kg/jour d'équivalent prednisone pour une durée supérieure à trois semaines - Traitement avec d'autres immunosuppresseurs, tels que la cyclosporine, les anti-TNF-α, les anticorps monoclonaux spécifiques (alemtuzumab...) ou des analogues nucléosidiques, au cours des 90 derniers jours - Immunodéficience sévère héréditaire (granulomatose septique chronique, immunodéficience combinée sévère ...) | <ul style="list-style-type: none"> - Atteinte fongique des voies respiratoires inférieures avec la présence sur le scanner thoracique d'un ou plusieurs des signes suivants : <ul style="list-style-type: none"> • lésion(s) dense(s) bien circonscrite(s) avec ou sans signe de halo • signe du croissant gazeux • cavité pulmonaire - Trachéobronchite avec observation lors de la bronchoscopie d'un ou plusieurs des signes suivants : <ul style="list-style-type: none"> • pseudomembranes • ulcération trachéo-bronchique • un ou plusieurs nodules - Infection naso-sinusienne avec la présence d'un ou plusieurs des signes suivants : <ul style="list-style-type: none"> • douleur localisée aiguë • ulcère nasal • extension du sinus paranasal à travers les barrières osseuses - Atteinte du système nerveux central avec la présence d'au moins un des signes suivants à l'imagerie : <ul style="list-style-type: none"> • lésions focales • Méningite |

Figure 14 : Critères d'une infection fongique invasive probable ou possible selon l'EORTC/MSG (European Organisation for Research and Treatment of Cancer/Mycoses Study Group).

(d'après de Pauw *et al.*, 2008 (54))

III. Six ans d'aspergillose pulmonaire invasive au CHRU de Tours

Le service de Parasitologie-Mycologie de l'hôpital universitaire de Tours est impliqué dans la démarche nationale de surveillance de l'épidémiologie des infections fongiques invasives. En effet, les mycologues du service déclarent chaque nouvelle infection fongique invasive survenant chez un patient hospitalisé au CHRU de Tours auprès du RÉSeau de Surveillance des Infections Fongiques en France (RESSIF). Ce réseau a été mis en place en 2012 par le Centre national de référence Mycoses invasives et Antifongiques (CNRMA) afin de surveiller l'évolution et les caractéristiques des infections fongiques invasives, et de déterminer avec plus de précision l'incidence de ces mycoses.

Grâce au registre de fiches RESSIF, il a été possible de réaliser une étude rétrospective de tous les cas d'aspergilloses pulmonaires invasives déclarés au sein du CHRU de Tours, de 2012 à 2017.

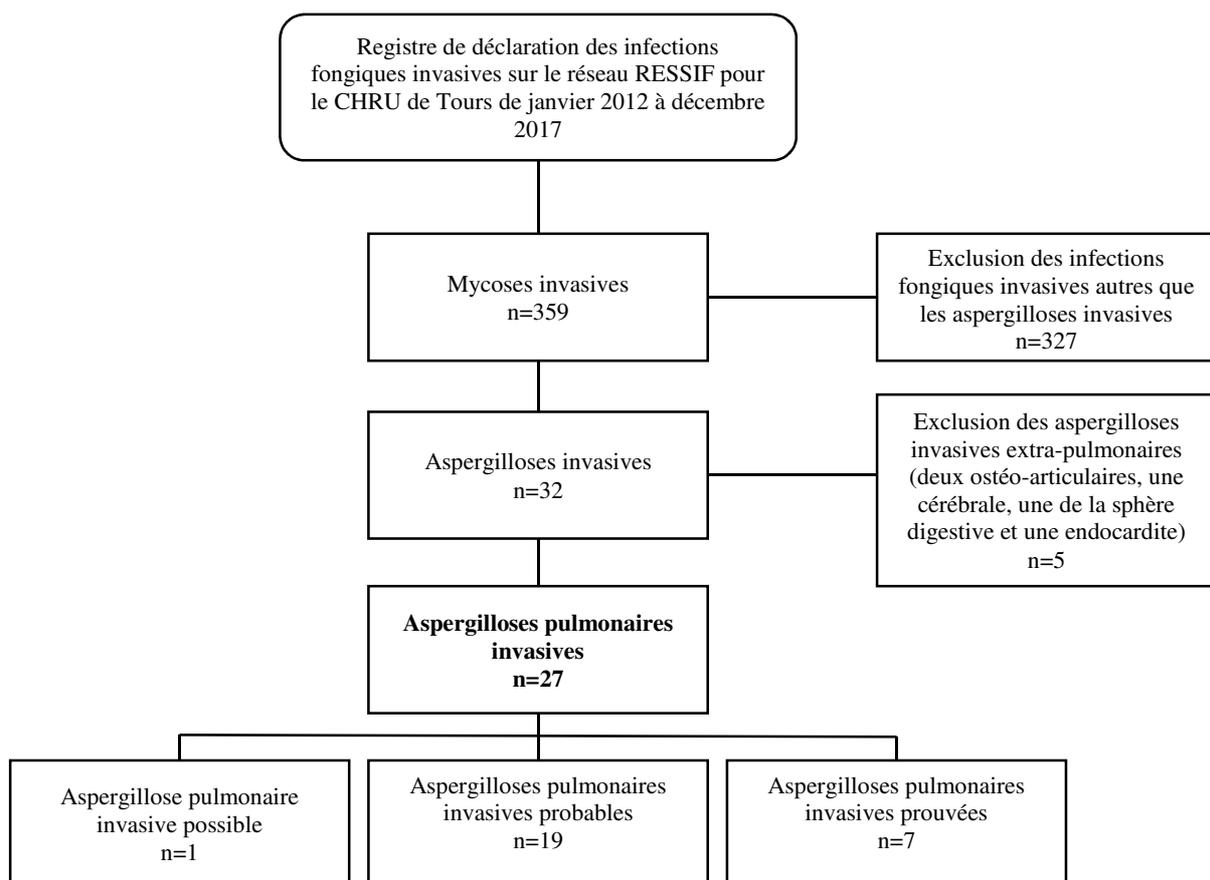


Figure 15 : Diagramme en flux des cas d'aspergillose pulmonaire invasive au CHRU de Tours, de janvier 2012 à décembre 2017.

Après recensement, 32 aspergilloses invasives ont été signalées en six ans auprès du RESSIF, dont 27 formes pulmonaires et 5 invasives extra-pulmonaires (Figure 15). Ces cinq dernières n'étaient accompagnées d'aucun symptôme, signe clinique, argument biologique ou radiologique incriminant une localisation pulmonaire primitive. Au sein de ces aspergilloses invasives extra-pulmonaires, deux d'entre elles étaient localisées au niveau ostéo-articulaire, une au niveau cérébral, une autre touchait la sphère digestive et enfin la dernière était une endocardite aspergillaire chez un patient ayant reçu une transplantation d'organe solide. Ces cinq aspergilloses invasives non pulmonaires n'ont donc pas été prises en compte dans cette étude rétrospective.

L'étude des cas tourangeaux a retrouvé une prédominance masculine de l'API (63 %) avec un âge médian de 54 ans (extrêmes de 34 jours à 88 ans) et une proportion de 26 % d'API prouvées (n=7) après application des critères EORTC/MSG de définition des mycoses invasives (Figure 15). Sur les aspects cliniques et radiologiques, aucune singularité n'a été décelée (Figure 16). La symptomatologie était assez frustrante avec comme principaux symptômes, des signes pulmonaires aspécifiques et de la fièvre. Un scanner pulmonaire a été réalisé chez 24 patients (89 %). Dans 67 % des cas (n=18), une image nodulaire a été rapportée, associée à un signe du halo dans 15 % des cas (n=4) et une image cavitaire dans 11 % des cas (n=3). Les patients ont été répartis en sept groupes selon leur principale pathologie sous-jacente (Tableau I). Globalement, les hémopathies malignes constituaient le principal facteur de risque d'API, représentant 40 % des 27 API recensées (n=11).

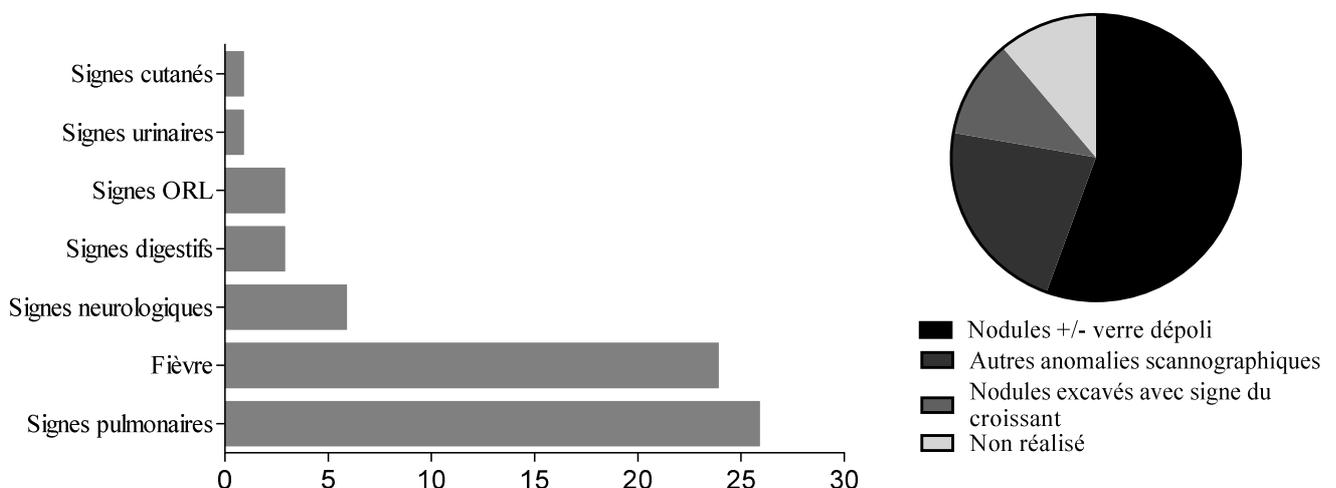


Figure 16 : Principaux symptômes cliniques et images radiologiques retrouvés chez les patients atteints d'aspergillose pulmonaire invasive au CHRU de Tours de 2012 à 2017.

Tableau I : Caractéristiques des aspergilloses pulmonaires invasives recensées au CHRU de Tours de 2012 à 2017 selon leur facteur de risque principal.

| | <i>Leucémies aiguës</i> | <i>Syndromes lymphoprolifératifs chroniques</i> | <i>Transplantations d'organe solide</i> | <i>Tumeurs solides</i> | <i>Maladies inflammatoires</i> | <i>Maladies pulmonaires chroniques</i> | <i>Autres pathologies</i> | <i>Total</i> |
|---|-----------------------------|---|---|----------------------------|------------------------------------|--|-------------------------------|--------------|
| | n = 5 | n = 6 | n = 4 | n = 3 | n = 1 | n = 3 | n = 5 | n = 27 |
| <i>Age moyen en années</i> | 44 | 56 | 50 | 65 | 24 | 73 | 31 | 48 |
| <i>Hommes, n (%)</i> | 1 (20 %) | 6 (100 %) | 2 (50 %) | 3 (100 %) | 1 (100 %) | 2 (67 %) | 2 (40 %) | 17 (63 %) |
| <i>API prouvées, n (%)</i> | 0 | 0 | 1 (25 %) | 1 (33 %) | 0 | 1 | 4 (80 %) | 7 (26 %) |
| <i>Neutropénie (<500 /mm³ au moment du diagnostic), n (%)</i> | 2 (40 %) | 3 (50 %) | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 5 (19%) |
| <i>GM : patients avec au moins deux sera positifs, n (%)</i> | 5 (100 %) | 3 (50 %) | 1 (33 %) | 1 (50 %) | 1 (100%) | 0 | 1 (20%) | 12 (46 %) |
| <i>Examen direct positif : nombre de positifs sur nombre testé, n (%)</i> | 1 (33 %) | 4 (80 %) | 4 (100%) | 2 (67 %) | 0 | 2 (67 %) | 4 (80 %) | 17 (71 %) |
| <i>Culture positive : nombre de positifs sur nombre testé, n (%)</i> | 1 (33 %) | 5 (100%) | 4 (100 %) | 3 (100 %) | 1 (100 %) | 3 (100 %) | 5 (100 %) | 22 (92 %) |
| <i>Champignon isolé : nombre d'Aspergillus section Fumigati sur nombre testé, n (%)</i> | 1 (33 %) | 5 (100 %) | 3 (75 %) | 3 (100 %) | 0 | 3 (100 %) | 4 (80 %) | 19 (79 %) |
| <i>Traitement prophylactique, n (%)</i> | 3 (60 %) | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 (20 %) | 4 (15 %) |
| <i>Traitement empirique, n (%)</i> | 2 (40 %) | 3 (50 %) | 1 (25 %) | 0 | 0 | 1 (33 %) | 0 | 7 (26 %) |
| <i>Traitement curatif, n (%)</i> | 5 (100 %) | 5 (83 %) | 4 (100 %) | 3 (100 %) | 1 (100 %) | 2 (66 %) | 4 (80 %) | 24 (89 %) |
| <i>Voriconazole seul, n (%)</i> | 4 (80 %) | 3 (60 %) | 2 (50 %) | 3 (100 %) | 1 (100 %) | 1 (50 %) | 4 (100 %) | 19 (79 %) |
| <i>Caspofungine seule, n (%)</i> | 1 (20 %) | 1 (20 %) | 2 (50 %) | - | - | 1 (80 %) | - | 4 (17 %) |
| <i>Caspofungine + L-Amphotéricine B, n (%)</i> | - | 1 (20 %) | - | - | - | - | - | 1 (4 %) |
| <i>Décès dans les 90 jours, n (%)</i> | 1 (20 %) | 3 (50 %) | 2 (50 %) | 3 (100 %) | 0 | 0 | 1 (20 %) | 10 (40 %) |

Les syndromes lymphoprolifératifs chroniques étaient majoritaires (n=6) par rapport aux leucémies aiguës (n=5). Chez les patients atteints de leucémies aiguës, 80 % d'entre eux (n=4) ont reçu une allogreffe de cellules souches hématopoïétiques parmi lesquels 100 % ont déclaré une GvH. Les transplantations d'organe solide (n=4) représentaient également un facteur de risque, notamment lorsqu'elles concernaient le cœur (n=3). De plus, l'atteinte des poumons ou du système ORL par l'intermédiaire de cancers solides (n=3) ou de pathologies pulmonaires chroniques (n=3) rendaient plus vulnérables les patients à la survenue d'API. Le syndrome d'Alagille, la maladie de Basedow ou encore la granulomatose septique chronique faisaient partie des autres pathologies sous-jacentes rencontrées.

La recherche de l'antigène galactomannane a été réalisée pour 96 % des patients (n=26). Pour 50 % des patients (n=12), au moins deux tests à la recherche de l'antigène galactomannane ont été rapportés positifs, avec une inégalité selon la pathologie sous-jacente, avec 100 % pour les leucémies aiguës, 50 %, 20 % et 0 % pour les syndromes lymphoprolifératifs chroniques, les autres pathologies et les maladies pulmonaires chroniques respectivement. Par ailleurs, tous les patients neutropéniques présentaient au moins deux dosages sériques d'antigène galactomannane positif. D'autre part, le dosage du galactomannane dans le LBA n'a été que très peu effectué (n=2) au CHRU de Tours sur la période 2012-2017. Pour 89 % des patients, au moins un prélèvement pour examen mycologique a été adressé au laboratoire de Parasitologie-Mycologie avec 71 % d'examen direct positif (n=17) et 92 % de culture positive (n=22). *Aspergillus* section *Fumigati* a été isolé dans 86 % des cultures positives (n=19) devant *Aspergillus* section *Terrei*, *Aspergillus* section *Flavi* et *Aspergillus* spp. de section non déterminée (Figure 17). Concernant les cinq patients atteints de leucémies aiguës, trois ont eu un prélèvement respiratoire pour examen mycologique et *Aspergillus* section *Fumigati* n'a pu être isolé que chez un seul d'entre eux.

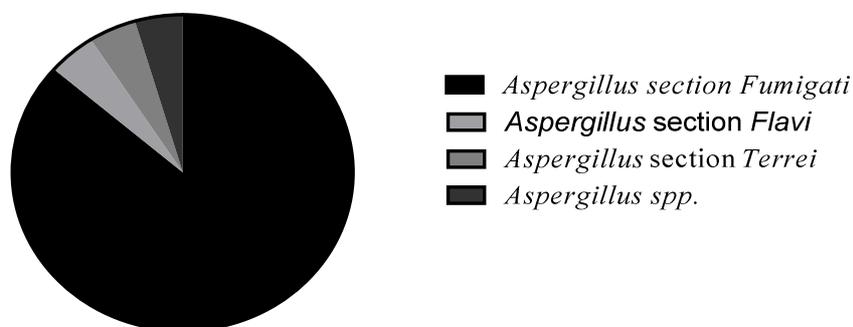


Figure 17 : Champignons isolés à partir des prélèvements issus des patients atteints d'aspergillose pulmonaire invasive au CHRU de Tours de 2012 à 2017.

Un traitement antifongique à visée prophylactique (*cf IV.2.1.*) a été administré à 15 % des patients (n=4). Soixante pour cent des patients atteints de leucémie aiguë (n=3) ont bénéficié d'une prophylaxie antifongique, par posaconazole. Le dernier patient ayant reçu un traitement prophylactique était atteint de granulomatose septique chronique et s'est vu administré du fluconazole. Les deux autres patients atteints de leucémie aiguë qui n'avaient pas bénéficié d'un traitement prophylactique ont été traités de manière empirique (*cf IV.2.2.*) par voriconazole. Les cinq patients non atteints de leucémie aiguë qui ont reçu un traitement empirique, ont été traités par caspofungine. Enfin, un traitement antifongique curatif (*cf IV.2.4.*) a été administré à 89 % des patients atteints d'API (n=24) ; les patients n'ayant pas reçu de traitement antifongique étant décédés le jour ou le lendemain du diagnostic. Une monothérapie antifongique curative a été prescrite dans 96 % des cas (n=23), alors qu'une association d'antifongiques (caspofungine + amphotéricine B liposomale) n'a été administrée qu'à un seul patient. Le voriconazole seul a été donné à 79 % des patients (n= 19), alors que la caspofungine seule représentait 17 % (n=4) des prescriptions d'antifongique à visée curative.

Le suivi à 90 jours a pu se faire pour la majeure partie des patients (n=25). La mortalité à 90 jours était de 40 %. Selon les groupes à risque, la mortalité s'élevait à 20 % chez les patients avec une leucémie aiguë (n=1), 50 % chez les patients ayant subi une transplantation d'organe solide (n=2) et chez ceux atteints d'un syndrome lymphoprolifératif chronique (n=3), et 100 % chez les patients présentant une tumeur solide (n=3).

IV. Prise en charge thérapeutique de l'aspergillose pulmonaire invasive

Il existe plusieurs types de traitement dans la prise en charge de l'API : prophylactique, empirique, préemptif et curatif. Le choix de la stratégie, qui peut d'ailleurs combiner plusieurs de ces différentes thérapeutiques, varie selon les facteurs de risque que possède le patient, mais aussi de la temporalité de la maladie, c'est-à-dire si l'on se trouve en amont ou en aval du diagnostic de la maladie. La précocité de la mise en place d'un traitement antifongique adapté constitue un facteur pronostique fondamental dans l'évolution de l'API (70).

Pour les patients atteints de leucémies, ces traitements reposent notamment sur les recommandations de l'ECIL rédigées par un groupe d'experts après analyse de la littérature. Chaque proposition a été évaluée en fonction de la force de la recommandation (échelle à trois niveaux: A, B ou C ; A étant la force de recommandation la plus élevée) et de la qualité de la preuve (échelle à trois niveaux: I, II ou III ; I étant le niveau le plus élevé) (53). Considérant que ces recommandations ne concernent que les patients atteints de leucémies, les informations données dans les paragraphes IV.2.1. à IV.2.4 ci-dessous se rapporteront à ces patients.

Le traitement *prophylactique* consiste à prendre en charge tous les patients à risque pour éviter la survenue de l'évènement « API ». C'est par exemple le cas des patients présentant une neutropénie lors d'une LAM, mais aussi des patients receveurs d'allogreffe de cellules souches hématopoïétiques. Le traitement *empirique* s'applique aux patients présentant une fièvre persistante ou récurrente sous antibiothérapie large spectre, élément considéré comme précurseur d'infection fongique invasive. Lors du traitement *préemptif*, tous les patients présentant un certain nombre de facteurs cliniques, biologiques et/ou même d'imagerie, évocateurs d'infection fongique précoce sont pris en charge. Enfin, le traitement *curatif* concerne tous les patients qui ont une API prouvée ou probable selon les critères EORTC/MSG.

IV.1. Arsenal thérapeutique

IV.1.1. Les triazolés

Les triazolés inhibent la voie de biosynthèse de l'ergostérol, stérol prépondérant de la membrane fongique, par interaction avec la lanostérol 14- α -déméthylase médiée par le cytochrome P450 fongique. Les azolés sont fongicides envers les champignons du genre *Aspergillus* par l'accumulation de 14 α -méthylstérol, un stérol toxique, et par un déficit en ergostérol de la membrane cellulaire fongique. L'inhibition de cytochrome P450, partagée par tous les azolés, est indispensable à prendre en compte dans la prise en charge thérapeutique globale du patient, notamment au regard des possibles interactions médicamenteuses. Cependant les structures chimiques des triazolés sont très hétérogènes (Figure 18), ce qui leur confère des propriétés pharmacocinétiques distinctes. Le voriconazole, par exemple, connaît non seulement une pharmacocinétique non linéaire, c'est-à-dire que la concentration n'est pas proportionnelle à la dose administrée, mais également une pharmacocinétique variable entre les individus par un polymorphisme du cytochrome P450 2C19 (CYP 2C19) (71). L'itraconazole et le posaconazole voient leur absorption varier en fonction de leur galénique et selon qu'ils soient pris à jeun ou au cours d'un repas. Prenant en considération l'ensemble de ces points critiques susceptibles d'entraîner une variabilité pharmacocinétique des azolés, le dosage de ces principes actifs est indispensable pour s'assurer de leur concentration efficace et non toxique. Ainsi, il existe pour chaque azolé, des concentrations-cibles en fonction de leur utilisation.

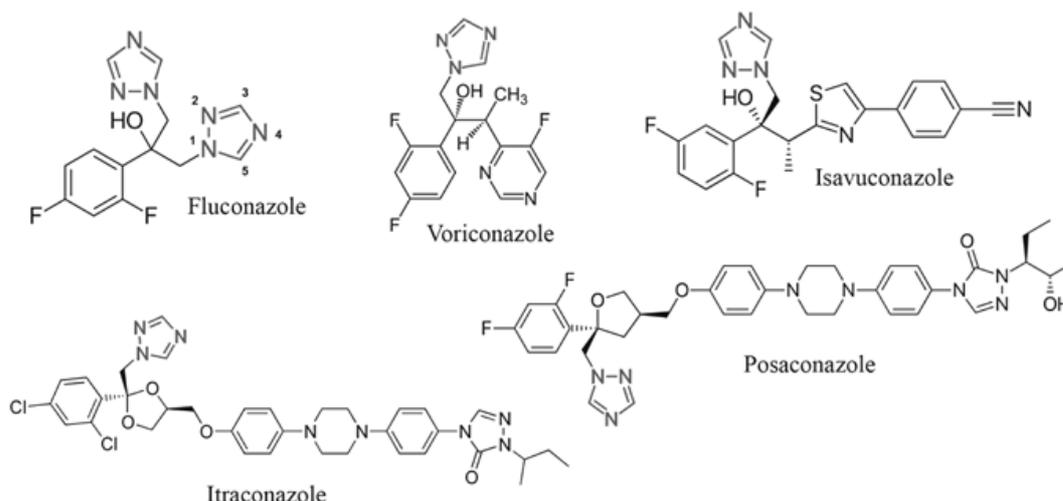


Figure 18 : Structures chimiques des antifongiques triazolés à usage systémique.

Les champignons du genre *Aspergillus* étant naturellement résistants au fluconazole, seuls le voriconazole, l'itraconazole, le posaconazole et l'isavuconazole pourront être utilisés dans la prise en charge des API. Cependant, la résistance des champignons *A. fumigatus* aux antifongiques azolés est de plus en plus signalée en Europe, depuis la fin des années 2000. Elle est principalement due à des mutations touchant le gène *CYP51A*, gène codant pour la lanostérol 14- α -déméthylase, l'enzyme cible des triazolés, et son promoteur (72). Elle apparaît dans deux contextes différents, la sélection *in vivo* d'une résistance résultant d'un traitement par azolé à long terme ou l'acquisition *de novo* d'une souche résistante directement issue de l'environnement. Cette deuxième voie de résistance est liée à l'utilisation généralisée de fongicides azolés en agriculture et a initialement été décrite aux Pays-Bas (73). D'autre part, l'identification précise jusqu'à l'espèce est indispensable devant toute résistance aux azolés. En effet, *Aspergillus lentulus*, appartenant à la section *Fumigati*, possède une résistance dite innée aux azolés.

IV.1.2. *Les polyènes*

L'amphotéricine B (Figure 19) se fixe sur l'ergostérol de la membrane fongique et provoque une perte de fluidité et de perméabilité membranaire provoquant sa lyse. L'amphotéricine B exerce une action fongicide (74). Même si elle cible spécifiquement l'ergostérol, cette molécule n'est pas dénuée d'effets indésirables puisqu'elle peut se fixer aux stérols membranaires des cellules humaines à l'origine d'effets indésirables comme une néphrotoxicité. L'amphotéricine B existe sous trois formes galéniques: la forme déoxycholate, la forme suspension avec des phospholipides, et la forme intégrée dans des liposomes. Ces formulations différentes lui confèrent des propriétés pharmacodynamiques distinctes. L'amphotéricine B liposomale est notamment moins néphrotoxique que l'amphotéricine B déoxycholate.

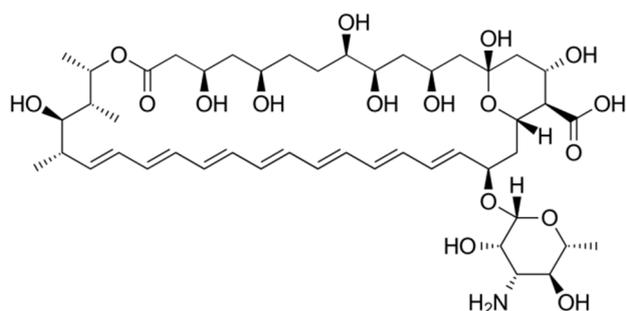


Figure 19 : Structure chimique de l'amphotéricine B.

Aucune résistance d'*A. fumigatus* à l'amphotéricine B n'a été recensée à ce jour. Ainsi, lorsqu'une souche isolée en laboratoire semble résistante à l'amphotéricine B, il convient d'en vérifier l'identification. En effet, *A. lentulus*, de la même section qu'*A. fumigatus*, mais aussi *Aspergillus terreus* de la section *Terrei* sont naturellement résistants à l'amphotéricine B.

IV.1.3. *Les échinocandines*

Les échinocandines, lipopeptides semi-synthétiques (Figure 20), inhibent la β -D-glucane synthétase et donc la synthèse de (1,3)- β -D-glucane, constituant essentiel de la paroi cellulaire de nombreux champignons (*cf. II.3.6.2.*). Les échinocandines ont une action fongistatique sur les champignons du genre *Aspergillus*.

Des souches d'*A. fumigatus* résistantes aux échinocandines ont été isolées récemment. Cette résistance est due à une mutation dans *FKS1*, gène codant pour la sous-unité Fks1 du complexe glucane synthase (75).

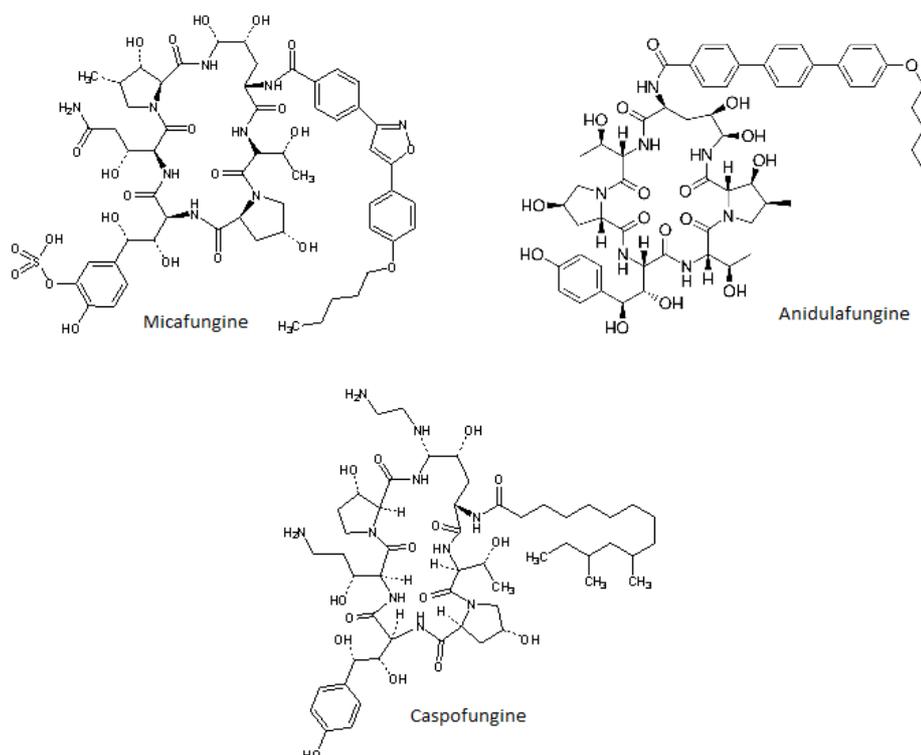


Figure 20 : Structures chimiques des échinocandines.

IV.2. Différentes stratégies thérapeutiques

IV.2.1. *Traitement prophylactique*

Le bénéfice d'un traitement prophylactique dépend de l'incidence naturelle de la pathologie dans une situation donnée ; le bénéfice est d'autant plus grand que l'incidence est spontanément élevée. Quelques études ont démontré un bénéfice du traitement prophylactique des IFI sur la survie des patients atteints d'hémopathies (76,77). Il est essentiel, comme dans toute stratégie préventive, de considérer la toxicité du traitement, les interactions médicamenteuses possibles, mais aussi le coût engendré par le traitement en lui-même et le suivi associé (dosage des triazolés), sans oublier le risque de sélection de souches résistantes. C'est ainsi par exemple que les recommandations de l'ECIL pour la prise en charge prophylactique antifongique chez les patients hémopathes sont donc restreintes à des cas bien précis.

Lors de la prise en charge d'un patient atteint de LAM et traité par chimiothérapie anticancéreuse intensive, la chimioprophylaxie primaire recommandée se base sur l'utilisation du posaconazole en solution buvable ou comprimés (niveau de preuve A-I) (78). L'équipe de Cornely (77) a notamment démontré la diminution de l'API dans les populations hémopathes neutropéniques sous prophylaxie par posaconazole en comparaison au fluconazole ou à l'itraconazole. Au contraire, aucun traitement prophylactique antifongique n'est recommandé pour les patients atteints de LAL.

Chez les patients ayant bénéficié d'une allogreffe de cellules souches hématopoïétiques, au moment à risque de GvH, le traitement de prophylaxie se base sur l'utilisation du posaconazole (niveau de preuve A-I). En revanche, lorsqu'il s'agit d'une autogreffe, aucune chimioprophylaxie n'est recommandée en raison du faible risque de survenue d'API.

IV.2.2. *Traitement empirique*

Le traitement empirique guidé par une fièvre persistante ou récurrente sous antibiothérapie large spectre est historique. Dans les années 1980, chez les patients d'hématologie traités par de lourdes chimiothérapies anticancéreuses, il était difficile de documenter une infection fongique en l'absence de LBA, de marqueurs sériques ou d'images scannographiques, compliquées à réaliser chez des patients immunodéprimés. Le diagnostic

n'était bien souvent posé qu'à l'autopsie. Bien que de nouvelles méthodes diagnostiques non invasives des API aient été adoptées, les recommandations d'un traitement empirique des API persistent devant la difficulté toujours actuelle de poser un diagnostic précoce et précis. Ainsi l'amphotéricine B et la caspofungine sont recommandées en traitement empirique des API chez les patients présentant une neutropénie profonde et prolongée, additionnée d'une fièvre persistante ou récurrente sous antibiothérapie large spectre (niveau de preuve A-I) (79).

IV.2.3. *Traitement préemptif*

Devant le risque de sur-traitement et le surcoût engendrés par la prise en charge empirique, une nouvelle stratégie thérapeutique dite préemptive, guidée par la clinique, l'imagerie et la détection des antigènes aspergillaires, est apparue. Le traitement préemptif, principalement constitué d'amphotéricine B liposomale, se place ainsi juste avant le traitement curatif. L'étude ouverte multicentrique menée par Cordonnier *et al.*, en 2009 (80), a montré que la stratégie préemptive basée sur les signes cliniques et la détection de l'antigène galactomannane deux fois par semaine, n'avait pas d'effet sur la survie à l'aplasie en comparaison à la stratégie empirique basée sur la fièvre. De plus, un plus grand nombre d'infections fongiques ont été diagnostiquées en particulier pendant les phases d'induction des leucémies aiguës. En pratique, la stratégie préemptive a une place dans la prise en charge des consolidations de leucémies aiguës et autogreffes.

IV.2.4. *Traitement curatif*

En 2002, Herbrecht *et al.* publient les résultats d'une étude ouverte, randomisée comparant l'efficacité, la sécurité et la tolérance du voriconazole avec celle de l'amphotéricine B en traitement de première ligne de l'API chez les patients immunodéprimés. Le voriconazole présentait une amélioration de la survie, un meilleur taux de réponse à douze semaines et à la fin du traitement, avec moins d'effets indésirables graves que l'amphotéricine B (81). Depuis, le voriconazole est le traitement de première ligne recommandé dans la prise en charge de l'API (niveau de preuve A-I) (53). L'isavuconazole, aussi efficace que le voriconazole, peut également être utilisé en première intention (niveau de preuve A-I) (53). L'amphotéricine B liposomale constitue une alternative thérapeutique de choix, notamment lorsque l'aspergillose

se développe sous prophylaxie azolée et /ou si l'on suspecte une co-infection fongique. L'association des thérapies antifongiques n'est pas recommandée en première intention. Elle peut être éventuellement utilisée en traitement de sauvetage, à condition d'associer deux principes actifs de mode d'action différent (82).

La durée minimum de traitement est de six à douze semaines et peut être prolongée chez les patients immunodéprimés, jusqu'à régression de l'immunodépression.

IV.3. Suivi thérapeutique

Le suivi thérapeutique est indispensable et comprend plusieurs axes. Le monitoring des azolés ou contrôle des taux plasmatiques est indispensable, devant les variabilités pharmacocinétiques propres aux différents azolés (*cf.* IV.1.1.), pour s'assurer de l'efficacité et de l'innocuité du traitement. L'évaluation clinique permettra d'apprécier la régression des symptômes en cas de réponse positive au traitement. Le suivi thérapeutique pourra également comprendre un ou plusieurs scanners thoraciques afin de se rendre compte de l'évolution des lésions pulmonaires. Pour rappel de ce qu'il est possible d'observer à l'imagerie lors du suivi d'une API, une excavation des nodules en « croissant gazeux » est signe de bon pronostic puisqu'elle témoigne de la correction de la neutropénie. Enfin, la détection de l'antigène galactomannane pourra être informative d'un mauvais pronostic si la valeur de l'index est égale ou supérieure aux valeurs obtenues lors du diagnostic (83). En revanche, la diminution de l'index n'est pas suffisante pour faire suspendre à elle seule le traitement antifongique.

IV.4. Mesures associées aux traitements antifongiques

Dans certaines situations, la résection chirurgicale des tissus infectés est fortement recommandée. En effet, lorsque les lésions sont contiguës à des vaisseaux ou au péricarde, lorsque le risque d'hémoptyisie fatale est élevé, la prise en charge chirurgicale s'avère indispensable devant la mise en jeu du pronostic vital.

La régression de la neutropénie et de l'immunosuppression est un facteur important dans la réussite de traitement de l'API. Une neutropénie profonde persistante est souvent associée à un pronostic sombre (84). Plusieurs stratégies existent pour faire reculer l'immunodépression.

Fréquemment utilisés en traitement adjuvant des chimiothérapies anticancéreuses et lors des GvH, les facteurs de croissance G-CSF (*Granulocyte – Colony Stimulating Factor*) et GM-CSF (*Granulocyte-Macrophage – Colony Stimulating Factor*) permettent de stimuler la récupération médullaire. Néanmoins, aucune étude n'a pu démontrer l'intérêt de ces facteurs sur le pronostic des API. Chez les patients atteints de granulomatose septique chronique, l'Interféron γ (IFN- γ) augmenterait les propriétés fonctionnelles des cellules phagocytaires et agirait en tant que traitement antifongique d'appoint pour les infections invasives (85). Dans un autre registre, le transfert de leucocytes semble séduisant pour pallier la neutropénie. Pourtant le nombre limité de donneurs, le risque de réactions indésirables lors de la transfusion et de transmission du *Cytomégalo*virus, virus affectant les monocytes et macrophages et pouvant donc affaiblir la réponse immune anti-aspergillaire, en font une option très controversée. Enfin, la gestion de la corticothérapie par diminution des doses de corticostéroïdes administrées diminuerait le risque de persistance de l'API (70). Malheureusement, ceci n'est pas possible dans toutes les prises en charge, particulièrement lorsque la pathologie initiale est contrôlée grâce au traitement à base de corticostéroïdes.

La maîtrise de l'environnement du malade est donc essentielle dans sa prise en charge. Le patient hémopathe doit être placé en isolement protecteur dans une chambre à atmosphère contrôlée pour diminuer le nombre de spores aspergillaires présentes dans l'air de l'environnant (86). Un contrôle strict de l'alimentation et du linge doit être assuré. De même, lors de la réalisation de travaux à proximité, mêmes minimales, la mise en conformité de la zone de travaux devra être garantie par l'isolement du chantier. Enfin, des modes de surveillance de l'aéro-biocontamination doivent être mis en place.

V. Stratégie thérapeutique innovante à base d'*antibody drug conjugates*

L'aspergillose pulmonaire invasive reste une pathologie présentant une mortalité élevée malgré les dernières avancées réalisées dans les domaines du diagnostic et de la prise en charge thérapeutique. Devant ce constat, mais aussi en considérant les effets indésirables non négligeables des molécules de première intention et l'émergence de résistances vis-à-vis des antifongiques azolés (72), de nouvelles stratégies thérapeutiques doivent être au cœur d'un travail de réflexion scientifique. C'est dans ce contexte et suite à la mise en évidence de nouveaux motifs antigéniques d'*A. fumigatus*, qu'a été initiée l'idée d'une stratégie thérapeutique à base d'*antibody drug conjugates* (ADC). Des anticorps dirigés contre un motif antigénique aspergillaire sont couplés à un principe actif, ici un antifongique commercial, afin d'agir spécifiquement sur le champignon. Cette stratégie permettrait de bénéficier des avantages de ciblage afin d'obtenir une action spécifique de l'antifongique utilisé et de recruter des cellules et molécules de l'immunité innée grâce à la fonction effectrice des anticorps.

V.1. Anticorps monoclonaux thérapeutiques : généralités

Les immunoglobulines sont catégorisées en cinq classes : M, D, G, E et A, selon la nature des chaînes lourdes μ , δ , γ , ϵ ou α qui les composent. Ce sont des glycoprotéines dotées d'une fonction d'anticorps ; leurs capacités à reconnaître un épitope spécifique et à initier différents mécanismes immunologiques sont assurées par deux parties distinctes des anticorps (Figure 21). La première, le Fab (*Fragment antigen binding*), permet la reconnaissance et la fixation de l'épitope. À l'extrémité de la portion Fab, se trouvent les domaines variables (*Variable Heavy chain* : VH et *Variable Light chain* VL), qui portent chacun trois boucles CDR (*Complementarity Determining Region*). L'association de ces CDR, six au total, constitue le site de reconnaissance de l'épitope sur l'antigène. La seconde partie, le Fc (*Fragment cristallisable*), permet l'initiation de mécanismes effecteurs de l'immunité *via* son interaction avec les Fc γ R (*Fc- γ Receptor*), et ainsi une destruction de la cellule-cible par activation de la lyse dépendante du complément (CDC pour *Complement Dependent Cytotoxicity*) *via* sa voie classique, par cytotoxicité cellulaire dépendante des anticorps (ADCC pour *Antibody Dependent Cellular Cytotoxicity*) *via* le recrutement des cellules de l'immunité innée telles que les lymphocytes *Natural Killer*, ou par phagocytose cellulaire dépendante des anticorps (ADCP

pour *Antibody Dependent Cellular Phagocytosis*) (87). Le fragment Fc permet également de garantir aux anticorps une plus longue demi-vie par une interaction avec le FcRn (*Neonatal Fc Receptor*), qui limite leur dégradation par les enzymes lysosomales et qui assure leur recyclage (88).

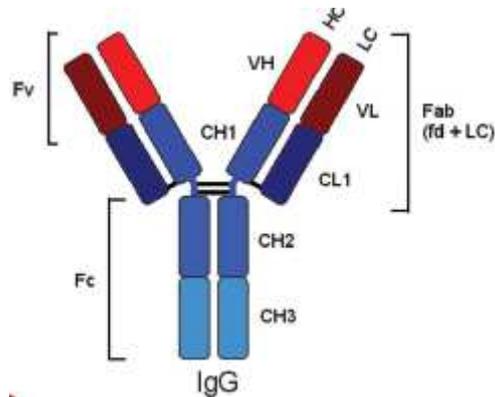


Figure 21 : Représentation d'un anticorps de classe Immunoglobuline G.

(d'après Franzel *et al.*, 2013 (89))

CH : Constant Heavy chain; *CL* : Constant Light chain; *IgG* : *Immunoglobuline G*; *Fab* : Fragment antigen binding Fragment; *scFv* : single chain variable Fragment, *VH* : Variable Heavy chain; *VL* : Variable Light chain.

Les anticorps monoclonaux (AcMo) appartiennent à la famille des biomédicaments ; ce sont des protéines recombinantes produites par des cellules en culture. Les AcMo thérapeutiques se distinguent notamment des médicaments dits « classiques » par leurs méthodes de production, leurs masses moléculaires, mais également leurs mécanismes d'action. Les AcMo peuvent agir selon deux modes principaux, par neutralisation ou antagonisme en se fixant respectivement à une molécule soluble ou à une protéine membranaire (ex : récepteur), ou par effet cytolytique *via* les propriétés effectrices du fragment Fc. Enfin, les AcMo peuvent être conjugués à des médicaments, comme c'est le cas en oncologie avec des AcMo couplés à des cytotoxiques pour donner naissance à des *antibody drug-conjugates*.

Un rapide détour historique permet de situer le début de l'ère des AcMo dans les années 1970. En effet, Köhler et Milstein ont mis au point la technique des hybridomes, permettant les premières productions d'AcMo, en 1975 (90). Près de dix ans plus tard, en 1986, le Muromonab-CD3 (OKT3), un anticorps murin dirigé contre le *cluster* de différenciation CD3, fut le premier AcMo thérapeutique approuvé par la FDA (*Food and Drug Administration*). Malheureusement, la nature murine de ces premiers anticorps monoclonaux a posé plusieurs limites à leur utilisation. De demi-vie courte, ils ne permettaient qu'un faible recrutement des effecteurs immunitaires tout en possédant une forte immunogénicité. Progressivement, les AcMo ont été humanisés avec le

développement des AcMo chimériques, dont seule la portion variable était murine, des AcMo humanisés, dont seuls les CDR étaient murins, puis enfin les anticorps entièrement humains (Figure 22).

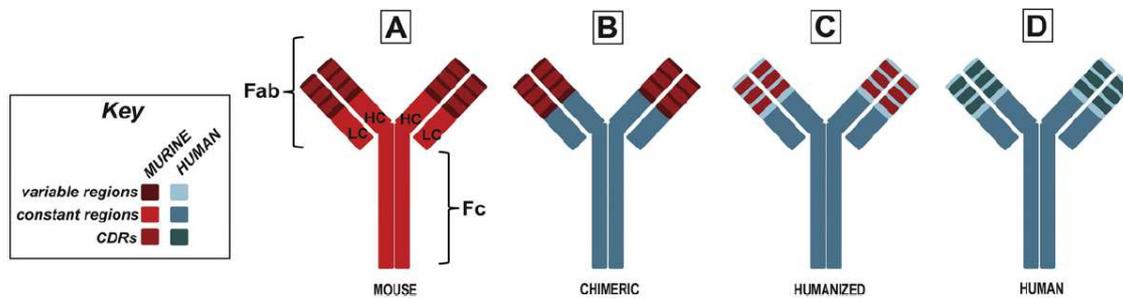


Figure 22 : L'évolution des anticorps monoclonaux.

(d'après Rodgers et Chou, 2016 (91))

A) La première vague d'anticorps monoclonaux approuvés par la FDA a été produite par des hybridomes murins et était entièrement d'origine murine. Les progrès de la technologie de l'ADN recombinant ont permis la création d'anticorps chimériques B) constitués de régions variables murines et de régions constantes humaines et C) des anticorps humanisés, qui remplacent les régions hypervariables des anticorps humains par leurs homologues murins. L'avènement des technologies transgéniques et phagiques a permis la création D) des anticorps entièrement humains.

Depuis les années 1970 et plus encore depuis les derniers progrès d'humanisation des AcMo, ces derniers ont représenté une option attractive dans la recherche de nouvelles stratégies thérapeutiques. Dans ce contexte scientifique, de nombreux projets ont permis d'accroître les possibilités d'utilisation des AcMo tout en améliorant leur efficacité. Dans un premier temps, l'ingénierie des fragments Fc permet de moduler les fonctions effectrices des Ac Mo selon l'objectif thérapeutique, de stabiliser les molécules, mais aussi d'augmenter la demi-vie des AcMo (92). Autre axe de recherche, la conjugaison des AcMo à d'autres molécules a élargi les possibilités de thérapie ciblée. Les AcMo peuvent être conjugués à des radio-isotopes ou des principes actifs, ils permettent ainsi d'acheminer sélectivement la drogue sur la cible thérapeutique souhaitée. Grâce aux techniques de génie génétique notamment, des avancées considérables ont été réalisées sur les fragments d'anticorps et les diverses combinaisons possibles avec les différents domaines des anticorps (Figure 23). Le plus petit format d'un fragment d'anticorps fonctionnel est le scFv (*single chain Fragment variable*), au sein duquel, les domaines variables VH et VL sont associés l'un à l'autre par un court peptide flexible (93). En jouant sur la longueur de ce peptide flexible et en utilisant les fragments scFv comme unité fonctionnelle, de plus grandes structures peuvent être synthétisées (94). Il est possible de produire des fragments d'anticorps recombinants monospécifiques et polyvalents (*diabody*, *triabody* et *tetrabody*) ou encore des fragments d'anticorps recombinants bispécifiques et

bivalents. L'apparition de ces nouveaux formats d'anticorps a amorcé un changement dans le développement clinique des AcMo (95). Plus petits et plus faciles à produire que les AcMo entiers, ils peuvent être utilisés pour améliorer la diffusion tissulaire et accéder à des antigènes cryptiques difficiles à atteindre. Néanmoins sujets à la clairance rénale, ils sont dotés d'une demi-vie plus courte que les AcMo entiers ; dépourvus du domaine Fc, ils sont également démunis de fonctions effectrices.

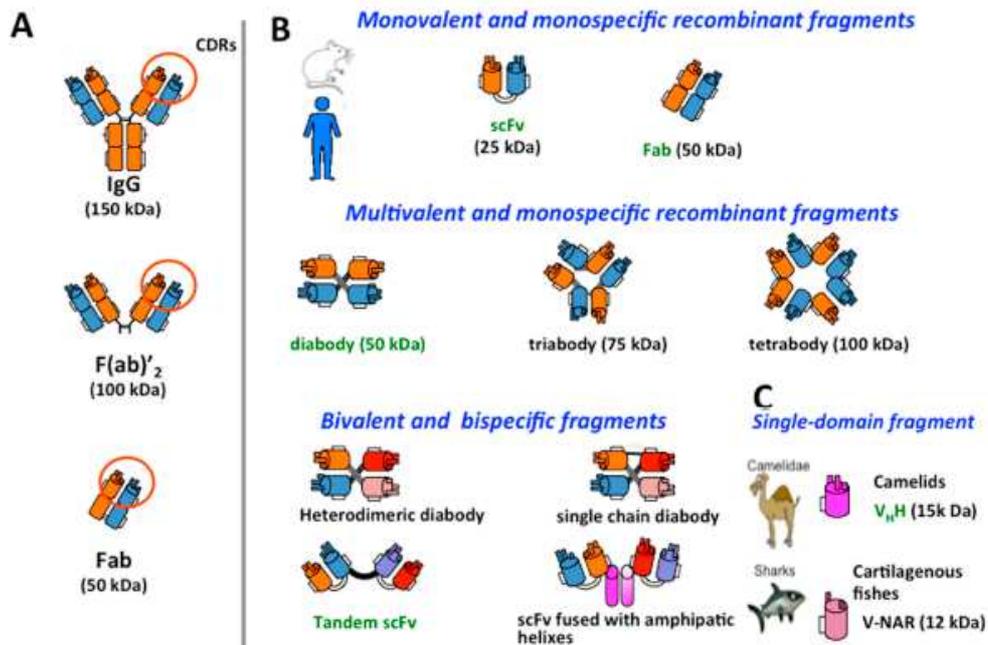


Figure 23 : Fragments d'anticorps.

(d'après Alvenrega *et al.*, 2014 (96))

A) La protéolyse contrôlée des molécules d'Immunoglobuline G entières permet de préparer des fragments fonctionnels F(ab)₂ ou Fab (Fragment antigen binding)..

B) L'ingénierie moléculaire permet de concevoir de nouveaux formats de fragments d'anticorps, mono- ou multivalents, mono- ou bi-spécifique. Ils diffèrent les uns des autres par leur taille, leurs propriétés pharmacocinétique et pharmacodynamique lorsqu'ils sont injectés.

C) Des fragments d'anticorps recombinants dérivés de camélidés ou poissons cartilagineux constituent des alternatives aux anticorps conventionnels.

V.2. Anticorps monoclonaux en thérapeutique infectieuse

Depuis l'approbation du Muromonab-CD3, ce ne sont pas moins de 63 AcMo à usage thérapeutique qui ont été approuvés par la FDA en 30 ans, couvrant des champs de plus en plus large : oncologie, rhumatologie, prise en charge des maladies inflammatoires chroniques et des maladies auto-immunes, ophtalmologie, neurologie... Alors que le nombre d'AcMo approuvés par la FDA par an ne cesse de croître, l'utilisation des anticorps monoclonaux thérapeutiques dans le domaine de l'infectiologie reste à ce jour limitée (Figure 24). Seulement

quatre AcMo thérapeutiques ayant une application en infectiologie ont été approuvés par la FDA. Parmi ces quatre biomédicaments, seuls deux possèdent une Autorisation de Mise sur le Marché en France : le palivizumab et le bezlotoxumab. Le palivizumab (Synagis®) est un anticorps monoclonal humanisé ciblant la protéine de fusion F présente à la surface du Virus Respiratoire Syncytial (VRS), empêchant ainsi la fusion des membranes virales avec celles de cellules de l'hôte (Figure 24). Il est indiqué en prévention des infections respiratoires basses graves dues au VRS, nécessitant une hospitalisation chez les enfants à risque élevé d'infection à VRS (97). Le bezlotoxumab (Zinplava®) est un anticorps monoclonal humain anti-toxine qui se lie à la toxine B du *Clostridium difficile* avec une haute affinité et neutralise son activité. Il est indiqué en prévention des récurrences d'infection à *Clostridium difficile* chez les adultes à haut risque de récurrence (98). Le raxibacumab et l'obiltoxaximab, ont été approuvés par la FDA mais ne possèdent pas d'AMM en France (99,100). Ces deux AcMo sont utilisés dans la prévention et le traitement de l'anthrax par inhalation due à *Bacillus anthracis* ; ils agissent par neutralisation toxinique (101).

Le faible contingent d'AcMo autorisés sur le marché du médicament français et international, ne signifie pas pour autant que l'intérêt est minime pour ces biomédicaments dans le secteur de l'infectiologie. Au contraire, ils représentent une réelle option face aux enjeux actuels rencontrés en microbiologie. L'apparition et l'évolution des résistances des micro-organismes aux anti-infectieux, l'émergence de nouveaux pathogènes, mais également l'augmentation du nombre de patients immunodéprimés et exposés au risque d'infections opportunistes positionnent les AcMo comme une nouvelle alternative thérapeutique. Ils présentent de nombreux avantages dans la prise en charge des pathologies infectieuses. Leur spécificité permet de cibler les pathogènes sans mettre en danger le microbiote ou les tissus environnants. La tolérance de ces biomédicaments s'annonce ainsi bonne, avec peu d'effets indésirables par rapport aux thérapeutiques classiques. En parallèle, les avancées techniques et scientifiques des méthodes de synthèse des anticorps ont été majeures et les connaissances des cibles thérapeutiques en réel essor depuis quelques années, permettant d'envisager plus facilement le développement d'AcMo. Malgré l'espoir que peuvent revêtir les AcMo, ils présentent quelques limites, notamment de production comme leur coût élevé, mais aussi les conditions de synthèse et de stockage particulières liées à leur nature protéique. Ces limites peuvent représenter un obstacle pour le développement des biomédicaments.

Parmi les AcMo en cours de développement, peu ont été développés contre les champignons. Ils ciblaient principalement les levures (102,103). Par exemple, l'efungumab est un anticorps au format scFv ciblant la protéine de choc thermique 90 (Hsp90) qui pourrait être utilisé en combinaison avec d'autres agents antifongiques pour le traitement de la candidose invasive (104).

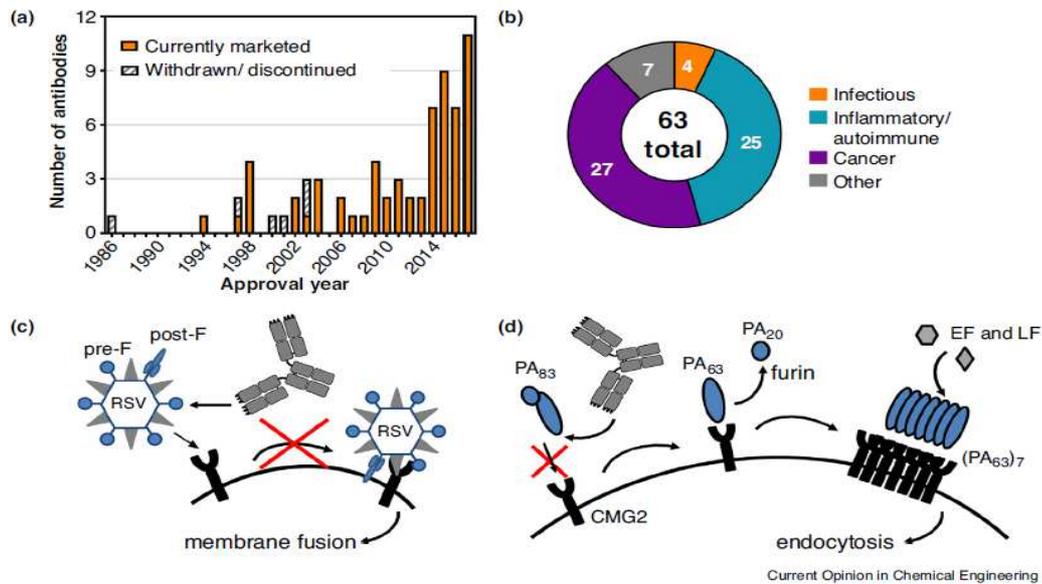


Figure 24 : Anticorps thérapeutiques approuvés aux États-Unis.

(d'après Wagner et Maynard, 2018 (101))

a) Approbations des anticorps thérapeutiques aux États-Unis par année. Les barres pleines indiquent des anticorps qui sont toujours commercialisés, tandis que les barres hachurées indiquent des anticorps qui ont été retirés ou abandonnés après approbation.

b) Anticorps actuellement commercialisés selon leur indication clinique.

c) Mécanisme d'action du palivizumab. Cet anticorps se lie aux conformations de préfusion et postfusion de la protéine F de fusion à la surface des particules du Virus Respiratoire Syncytial VRS, empêchant ainsi la fusion des membranes virales avec celles des cellules eucaryotes.

d) Mécanisme d'action du raxibacumab et obiltoxaximab. Les activités de la toxine anthrax sont initiées par la liaison de l'antigène protecteur de 83 kDa (PA) au récepteur CMG2 majeur. PA est alors clivé par des protéases de type furine pour libérer un fragment de 20 kDa, permettant au fragment de 63 kDa lié au récepteur de polymériser et de former des sites de liaison pour les sous-unités enzymatiques du facteur d'œdème (EF) et du facteur létal (LF). Ce complexe multi-protéique est ensuite soumis à l'endocytose médiée par les récepteurs, aboutissant finalement au transport de EF et LF dans le cytoplasme de la cellule hôte. Les deux anticorps se lient au domaine 4 de PA83, l'empêchant ainsi de se lier au récepteur.

V.3. Les protéines Crh, motifs antigéniques aspergillaires, potentielles cibles d'anticorps monoclonaux

Dans la conception d'anticorps anti-*A. fumigatus*, le choix du motif antigénique contre lequel sont dirigés les anticorps est essentiel. Celui-ci doit être spécifique d'*A. fumigatus* et présent en quantité suffisante chez toutes les souches de cette espèce. Cet antigène doit

également être exprimé à la surface du champignon, de manière à rester facilement accessible aux anticorps. En considérant l'ensemble de ces critères, la paroi fongique, d'ailleurs cible directe ou indirecte de la plupart des antifongiques conventionnels actuellement commercialisés, semble être un point de départ intéressant. La paroi fongique participe à la morphogénèse et détermine la forme du champignon, le protège contre certaines pressions de l'environnement et interagit avec les récepteurs du système immunitaire. Elle permet ainsi au champignon de s'adapter et survivre dans l'environnement, tout en contrôlant sa croissance, aidant alors le champignon à envahir de nouveaux territoires. La paroi d'*A. fumigatus* est composée à plus de 90 % de polysaccharides dont certains s'articulent en ramifications, alors que d'autres agissent comme ciment, remplissant les pores entre ces polysaccharides fibrillaires. Lors de la biosynthèse de la paroi, les synthèses produisent les chaînes linéaires polysaccharidiques qui doivent ensuite être remodelées et réticulées pour constituer le réseau tridimensionnel caractéristique de la paroi fongique. Des protéines à ancre GPI (Glycosyl-Phosphatidyl-Inositol), les glycosylhydrolases / glycosyltransférases, sont chargées du remodelage pariétal. Parmi ces protéines à ancre GPI communes à l'ensemble des champignons (*Ecm33*, *Gel*, *Crh* et *Dfg*) (105,106), nous nous intéressons particulièrement à celles appartenant à la famille *Crh*. Les protéines de cette famille, codées par une famille de cinq gènes orthologues *CRH*, et nommées *Crh1*, *Crh2*, *Crh3*, *Crh4* et *Crh5*, possèdent une structure de base commune (Figure 25) (107). Cette redondance de l'activité enzymatique de réticulation assure le remodelage fonctionnel de la paroi fongique. Le gène *CRH5* ou *CRF* est situé sur le chromosome 1 du champignon et est à l'origine de plusieurs transcrits codant pour les isoformes protéiques *Crf1*, *Crf2* et *Aspf9*. Historiquement, la première des protéines codées par ce gène, *Asp f9*, fut identifiée en tant qu'allergène, à partir de *sera* de patients allergiques à *A. fumigatus* (108). *Asp f16*, qui partage une grande partie de sa structure avec *Asp f9* et qui est codée par le même gène, fut identifiée peu de temps après, mais son existence est aujourd'hui fortement remise en cause du fait d'une probable erreur de séquençage (109). *Crf1* est la seule protéine codée par le gène *CRH5* possédant une ancre GPI, et fut découverte en 2007 (3). Enfin, la protéine la plus récemment découverte est *Crf2* (2).

Des premiers travaux en cours de publication menés par l'équipe 3 du Centre d'Études des Pathologies Respiratoires (CEPR, Unité INSERM U1100), ont montré que le gène codant pour les protéines *CRH5* était hautement conservé et que les protéines *Crh5* étaient retrouvées chez 98 % des souches cliniques isolées au CHRU de Tours. Par leur nature et fonction, les protéines issues des gènes *CRH* représentent ainsi une cible prometteuse pour le développement d'AcMo dirigés contre *A. fumigatus*.

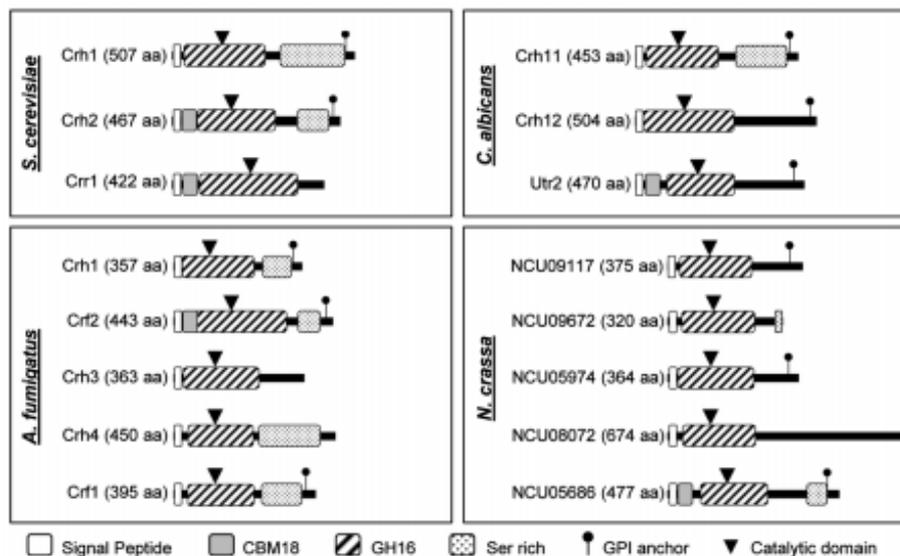


Figure 25 : Domaines des protéines issues des gènes de la famille CRH.

(d'après Arroyo *et al.*, 2016 (107))

Protéines orthologues *Crh* chez *Candida albicans*, *Aspergillus fumigatus*, *Neurospora crassa* et *Saccharomyces cerevisiae*. *CBM18* : carbohydrate-binding module 18, *GH16* : glycohydrolase 16

V.4. *Antibody drug conjugates anti-Aspergillus*

En 2009, Schütte *et al.* ont identifié la protéine Crf2, variant de la protéine Crh5, lors d'une API à *A. fumigatus* et développé des constructions de type scFv anti-Crf2, à l'Université de Braunschweig en Allemagne (2). Ces scFv ont été obtenus par *phage display* à la suite de l'immunisation d'un macaque avec une protéine Crf2 recombinante. Le principe du phage display repose sur l'expression d'un répertoire protéique à la surface de bactériophages. Les phages recombinants sont sélectionnés pour leur capacité de liaison à une cible déterminée. Après étude de la stabilité et détermination de l'affinité par Biacore, plusieurs scFv ont été sélectionnés. Le Biacore est un biocapteur utilisant le principe physique de la résonance plasmonique de surface. Il permet de mesurer en temps réel, et sans marquage spécifique, les caractéristiques d'interaction entre deux molécules sur une surface biospécifique. L'objectif initial de l'équipe allemande était de développer un outil diagnostique utilisable en immunohistochimie ou par des techniques ELISA. Puis, dans le cadre d'une collaboration initiée par notre équipe avec l'Université de Braunschweig, les scFv ont été associés à la partie Fc d'une IgG1 humaine, constituant ainsi un format scFv-Fc (*single chain Fragment variable – Fragment cristallisable*). Ce nouveau format, possédant une structure générale proche de celle d'une IgG classique (Figure 26), permet d'augmenter la demi-vie de l'anticorps mais également

de recruter les effecteurs immunitaires disponibles. L'idée est alors d'utiliser ces formats d'anticorps comme outil thérapeutique.

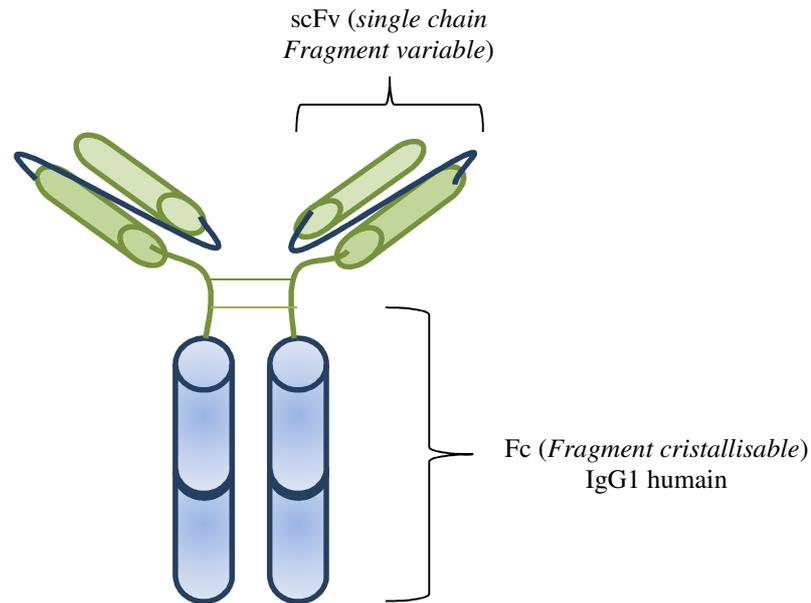


Figure 26 : Structure d'un scFv-Fc (*single chain Fragment variable* – *Fragment cristallisable*).

Deux scFv dirigés contre la protéine Crf2 d'*A. fumigatus* sont couplés de façon covalente au fragment Fc d'une IgG1 humaine via un lien peptidique. La structure générale est proche de celle d'une Immunoglobuline G (IgG1) classique.

Plusieurs constructions d'anticorps au format scFv-Fc ont été produites. Les affinités pour les protéines Crf2 et une protéine recombinante Crf2 étaient très élevées avec des constantes K_D de l'ordre de 10^{-8} à 10^{-9} . La spécificité de fixation a été approuvée par immunofluorescence, immunoblotting et immuno-histochimie. Des études *in vivo* sur un modèle animal d'aspergillose pulmonaire invasive menées par l'équipe 3 du CEPR, ont montré que ces anticorps administrés par nébulisation intratrachéale à des rats stimulaient le recrutement de cellules immunitaires, malheureusement sans inhiber la croissance fongique. Par ailleurs, d'autres résultats obtenus *in vitro* par le laboratoire ont montré que ces anticorps apparaissaient incapables d'assurer un effet fongicide si utilisés seuls.

Une nouvelle option a donc émergé : la conception d'ADC. Les ADC sont composés d'un anticorps spécifique de la cible à détruire auquel une drogue (anticancéreux, antibiotique ou autre) est conjuguée par l'intermédiaire d'un bras espaceur ou *linker* qui relie les deux entités. Les anticorps sont liés au *linker* par l'un de leurs ponts disulfures. L'exemple majeur des études sur les ADC utilisés en microbiologie est celui de Lehar *et al.* qui ont publié en 2015 des

résultats très encourageants sur l'utilisation d'un format d'ADC particulier, l'AAC (*Antibody-Antibiotic Conjugate*), dans l'élimination du réservoir intracellulaire de *Staphylococcus aureus* (110). Les AAC ainsi construits permettaient de cibler les micro-organismes difficilement atteignables tout en diminuant la quantité totale d'antibiotique utilisée et en améliorant la tolérance globale du traitement. S'appuyant sur ces résultats engageants, nous avons initié le projet qui se propose de concevoir des ADC couplant un AcMo dirigé contre *A. fumigatus* avec un antifongique. Cet ADC serait composé d'un scFv-Fc anti-Crf2 aspergillaire, d'un *linker* et d'un antifongique systémique, l'amphotéricine B (Figure 27). Le choix de l'antifongique s'est porté sur l'amphotéricine B en raison de son action fongicide sur les champignons du genre *Aspergillus*, mais également de son action directe, physique sur la paroi fongique. De plus, l'amphotéricine B étant utilisée depuis plusieurs dizaines d'années, les connaissances médicales sont nombreuses à son égard ; sans oublier que cette molécule est toujours largement utilisée dans le traitement empirique, préemptif et curatif de l'API (*cf IV.1.2.*). Les anticorps anti-Crf2 serviraient alors de véhicule spécifique pour l'amphotéricine B jusqu'à la cible.

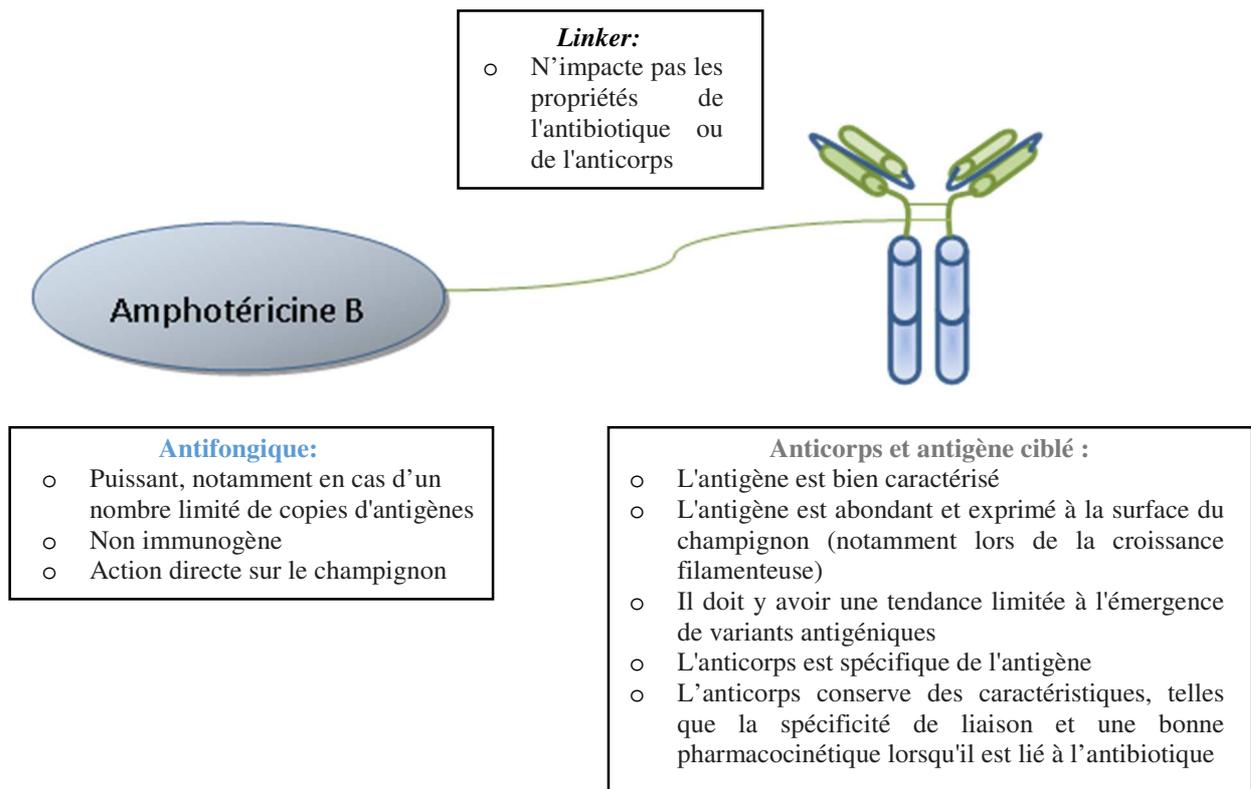


Figure 27 : Caractéristiques idéales d'un *antibody drug conjugate* dirigé contre *Aspergillus fumigatus*.

Ainsi, les ADC représentent un véritable challenge de conception puisqu'ils associent trois entités qui possèdent des caractéristiques bien particulières que leur conjugaison ne doit pas impacter (Figure 27).

V.4.1. Dosage protéique et intégrité des scFv-Fc anti-Crf2

Deux constructions scFv-Fc, nommées IIA1 et IIB1, fournies par l'*Institut für Biochemie und Biotechnologie (Technische Universität de Braunschweig, Allemagne)*, ont été retenues parmi une quinzaine d'autres candidats, du fait de leur bonne affinité vis-à-vis de la protéine Crf2 du champignon *A. fumigatus*, et de leur bonne stabilité (2).

Dans un premier temps, la concentration protéique des solutions d'anticorps a été déterminée par l'intermédiaire de deux méthodes. La première, basée sur la méthode du Biuret, permet une quantification des protéines par un dosage colorimétrique avec le kit *Pierce™ BCA Protein Assay* (Thermo Scientific™). La deuxième est un dosage par spectrophotométrie utilisant le Nanodrop 2000 (Thermo Scientific™) à 280 nm. Les méthodes de dosage colorimétrique et spectrophotométrique ont montré des résultats différents quant à la concentration protéique des deux constructions d'anticorps IIA1 et IIB1 (Tableau II). Cette distinction était notamment très marquée pour l'anticorps IIB1 avec une concentration allant presque du simple au double, de 3661 à 6059 µg/mL. La gamme d'étalonnage ayant été réalisée en BSA (*Bovine Serum Albumine*), protéine très différente des scFv-Fc, les valeurs obtenues par le Nanodrop ont été retenues.

Tableau II : Dosage protéique des scFv-Fc (*single chain Fragment variable – Fragment cristallisable*).

Les concentrations des anticorps IIA1 et IIB1, sont situées entre 628 et 6059 µg/mL avec des résultats différents selon la méthode utilisée. Cette hétérogénéité de résultat est d'ailleurs très marquée pour l'anticorps IIB1 avec une variation quasiment du simple au double.

| <i>Anticorps</i> | <i>IIA1</i> | <i>IIB1</i> |
|---|-------------|-------------|
| <i>Concentration (µg/mL)</i> <i>Nanodrop</i> | 628 | 3661 |
| <i>Concentration (µg/mL)</i> <i>Kit BCA</i> | 866 | 6059 |

L'intégrité des scFv-Fc anti-Crf2 a été vérifiée au moyen d'une électrophorèse sur gel de polyacrylamide (SDS-PAGE, *Sodium Dodecyl Sulfate PolyAcrylamide Gel Electrophoresis*) en conditions dénaturantes et réductrices ou en conditions assimilées aux conditions natives. Les anticorps IIA1 et IIB1 ont été dilués en PBS (*Phosphate Buffer Saline*) afin d'en uniformiser la concentration protéique. Pour les conditions dénaturantes et réduites, 10 µL de chacune de ces dilutions, contenant 3 µg de protéines, ont été ajoutés à 5 µL de *Lithium Dodecyl Sulfate Sample Buffer* (Invitrogen™) et 2 µL de *Reducing Agent* (Invitrogen™), utilisés respectivement pour dénaturer les protéines et permettre la réduction des ponts disulfures, avant chauffage à 70 °C pendant 10 min. Pour les conditions assimilées natives, 10 µL des dilutions contenant 3 µg de protéines ont été ajoutés à 7 µL de *Lithium Dodecyl Sulfate Sample Buffer* (Invitrogen™). L'ensemble des échantillons a ensuite été déposé sur un gel de polyacrylamide 4-12 % Bis-Tris précoulé (Invitrogen™), ainsi que 7 µL de marqueur de poids moléculaire *SeeBlue Plus2 Pre-stained Standard* (Invitrogen™). Le tampon de migration a été préparé à partir de tampon MOPS 20X (Acide morpholino-3-propanesulfonique, Tris Base, SDS, EDTA) dilué au 1 : 20^{ème} en eau ultrapure, auquel ont été rajoutés 500 µL d'antioxydant (Invitrogen™) afin d'éviter toute réoxydation et de maintenir les protéines sous leur forme réduite. La migration a été effectuée pendant 50 min à 200 V. Le gel a ensuite été lavé trois fois 5 min en eau ultrapure, puis a été coloré pendant 1h15 en bleu de Coomassie, avec 25 mL d'*Imperial Protein Stain* (Thermo Scientific™), sous agitation. La décoloration a été effectuée pendant 2h30 en eau ultrapure. En conditions assimilées natives, une bande très intense d'un poids moléculaire équivalent environ à 110 kDa a été mise en évidence pour les deux anticorps (Figure 28). La bande observée à 110 kDa correspondait à la masse moléculaire d'un scFv-Fc complet. En conditions dénaturantes, une bande très intense d'un poids moléculaire équivalent à environ 55 kDa, a été mise en évidence pour les anticorps IIB1 et IIA1 (Figure 28). La bande observée à 55 kDa correspondait à la masse moléculaire d'un scFv-Fc dont les ponts disulfures inter-chaînes ont été réduits. En revanche, dans les deux conditions et pour les deux anticorps, de rares très fines bandes ont été retrouvées, correspondant à des poids moléculaires très variables de produits de dégradation.

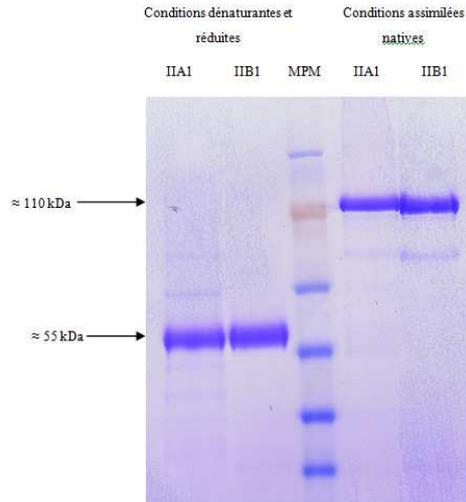


Figure 28 : Évaluation de l'intégrité des anticorps scFv-Fc (*single chain Fragment variable – Fragment cristallisable*).

Migration sur gel de polyacrylamide en conditions dénaturantes et réduites ou assimilées natives – coloration au bleu de Coomassie. Dans les conditions dénaturantes et réduites, la bande observée à 55 kDa correspondait à la masse moléculaire d'un scFv-Fc dont les ponts disulfures inter-chaînes ont été réduits. Dans les conditions assimilées natives, la bande observée à 110 kDa correspondait au format scFv-Fc complet.

MPM : Marqueur de Poids Moléculaire

Pour les deux constructions, la différence notable d'intensité entre la bande majoritaire à 55 kDa en conditions dénaturantes et réduites ou à 110 kDa en conditions assimilée natives, et les autres très fines bandes, suggérait que les anticorps étaient essentiellement sous une forme complète et intacte en solution.

V.4.2. Conception des constructions amphotéricine B – linker et évaluation de leur efficacité antifongique in vitro

Dans le processus de conception d'un ADC, il est nécessaire de garantir que le *linker* n'impacte pas les propriétés à la fois de l'anticorps et de la drogue. Procédant par étape, il s'est agi en premier lieu de coupler l'amphotéricine B avec un des *linkers* candidats et de s'assurer de l'intégrité de la fonction fongicide de celle-ci. L'amphotéricine B lyophilisée du laboratoire Inresa de poids moléculaire 924,09 g.mol⁻¹ a été utilisée pour les expériences menées (Figure 29). Trois *linkers* ont été conçus par l'équipe CNRS du GICC (Génétique, Immunothérapie, Chimie et Cancer– UMR 7292) de Tours. Le premier, nommé L1, était un format Poly-Ethylène-Glycol (PEG) à 12 carbones de poids moléculaire : 937,03 g.mol⁻¹. Le

deuxième, nommé L2, était plus court, de poids moléculaire : 427,5364 g.mol⁻¹. Le troisième, nommé L3, était le plus léger des *linkers* avec un poids moléculaire de 218,2535 g.mol⁻¹ (Figure 29).

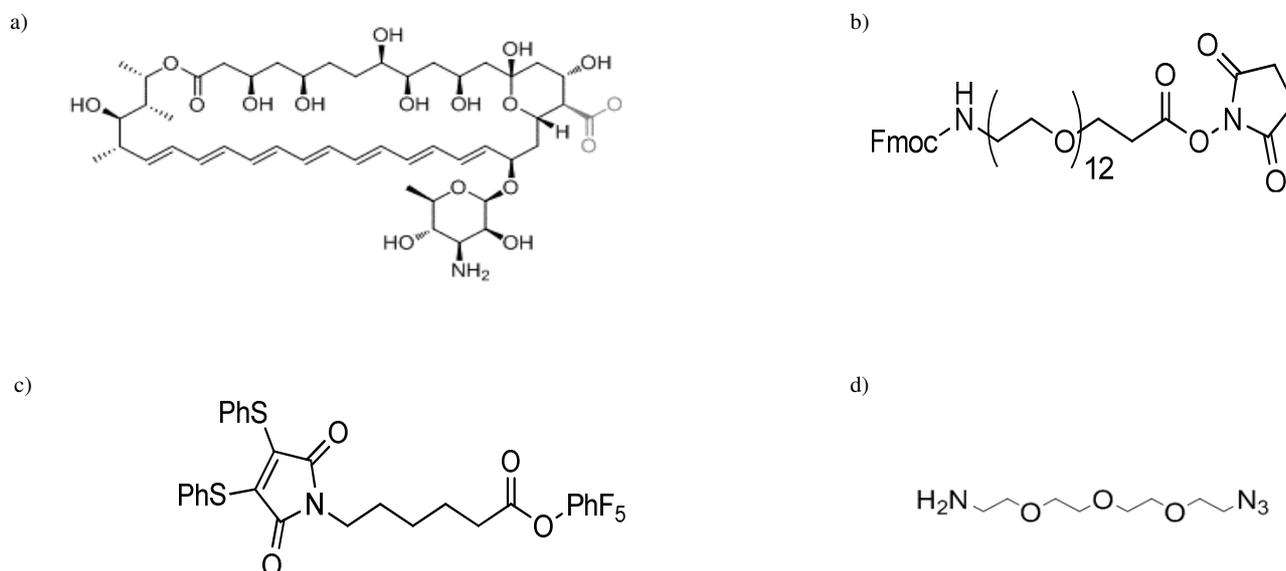


Figure 29 : Amphotéricine B, et *linkers* synthétisés pour le couplage des ADC (*Antibody Drug Conjugates*).

(d'après F. Bryden, CNRS, équipe du GICC - Génétique, Immunothérapie, Chimie et Cancer - UMR 7292)

a) Amphotéricine B

b) Linker 1 de format PEG (*Poly-Ethylène Glycol*) à 12 carbones, nommé L1

c) Linker 2, nommé L2

d) Linker 3, nommé L3

V.4.2.1. Méthode d'évaluation de l'efficacité antifongique

Pour évaluer la capacité fongicide des constructions, nous nous sommes appuyés sur les recommandations EUCAST (*EUropean Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing*) (111,112). La souche d'*A. fumigatus* utilisée lors des manipulations était issue d'un patient du CHRU de Tours atteint d'une API prouvée (d'après les critères de l'EORTC/MSG). Depuis son séquençage et son dépôt dans la collection WFCC-MIRCEN (*World Data Centre for Microorganisms*), elle a été référencée sous le numéro BRFM 1827. Dans un premier temps, cette souche a été ensemencée sur gélose Sabouraud supplémentée en gentamicine et chloramphénicol (Oxoid™). La gentamicine et le chloramphénicol, deux antibiotiques, ont permis l'inhibition de la plupart des bactéries telles que les entérobactéries, *Pseudomonas*, et les staphylocoques. La croissance des champignons a été favorisée par l'apport de substances nutritives comme les peptones et le glucose contenus dans la gélose. Une fois ensemencée, la

gélose a été incubée pendant trois jours à 35 °C. Puis les spores aspergillaires ont été récupérées après inondation des boîtes de culture par 15 mL d'eau physiologique stérile contenant un agent mouillant à 0,05 % (Triton X100, ICN Biomedicals) et grattage doux de la surface de la gélose avec un écouvillon stérile afin de mettre les spores en suspension. Le bouillon ainsi obtenu a été centrifugé pendant 10 minutes à 1700 g à température ambiante, puis le surnageant a été éliminé. Ensuite, un lavage dans 50 mL d'eau physiologique stérile a été effectué dans les mêmes conditions. Après avoir retiré le surnageant, le culot a été remis en suspension dans 10 mL d'eau physiologique stérile, puis la suspension a été diluée au 1 : 20ème. La densité optique de cette suspension-mère a alors été mesurée par spectrophotométrie à 530 nm, puis la concentration de cette dernière a été ajustée en milieu de culture RPMI *Roswell Park Memorial Institute medium* (RPMI 1640 sans rouge de phénol Dutscher, MOPS Sigma-Aldrich®, glucose Dutscher), selon les besoins des différents essais. La concentration des suspensions obtenues a été évaluée par comptage en cellule de Malassez. Ensuite, une plaque transparente 96 puits à fond plat Falcon® a étéensemencée par 100 µL de suspension de spores, soit $3,5 \cdot 10^4$ spores, dans les puits tests, et 200 µL de milieu de culture RPMI dans les puits servant de blancs. Des gammes de dilution d'amphotéricine B ou de constructions synthétisées ont été préparées en milieu de culture RPMI de manière à obtenir des concentrations finales de 0 à 1,623 ou 5,41 nmol/mL (soit 0 à 1,5 ou 5 µg/mL pour l'amphotéricine B). Les différentes dilutions ont ensuite été ajoutées dans les puits tests à raison de 100 µL par puits. Chaque dilution a été testée six fois. La plaque a été placée à 35 °C. La lecture d'absorbance à 530 nm (16 points par puits) a été réalisée sur l'automate Infinite® 200 Pro (Tecan) après 24h et 48h d'incubation. Les puits ont également été observés au microscope afin d'apprécier qualitativement la présence ou l'absence de filaments mycéliens dans les puits tests et de s'assurer de l'absence de filaments mycéliens dans les puits blancs. Les données ainsi recueillies ont permis de construire des graphiques de l'absorbance en fonction de la concentration en amphotéricine B ou en constructions synthétisées. La concentration de la molécule testée, nécessaire à l'inhibition de 50 % de la croissance du champignon *A. fumigatus*, soit la concentration minimale inhibitrice 50 (CMI₅₀), correspond à la concentration pour laquelle la valeur de l'absorbance est égale à la moitié de celle obtenue en l'absence de molécule antifongique. Pour chaque molécule testée, la CMI₅₀ a été déterminée visuellement à partir des graphiques construits.

La CMI₅₀ de l'amphotéricine B seule sur *A. fumigatus* a été déterminée à 0,625 µg/mL soit environ 0,675 nmol/mL. Cette valeur nous a servi de référence pour évaluer l'activité antifongique des produits néosynthétisés.

V.4.2.2. *Couplage des linkers L1 et L2 sur la fonction amine de l'amphotéricine B*

Dans un premier temps, le couplage des *linkers* sur l'amphotéricine B a été testé sur la fonction amine du groupement mycosamine de celle-ci (Figure 30). Cette stratégie a été choisie en première intention puisque plus aisée à réaliser chimiquement et techniquement, malgré les données bibliographiques. En effet, d'après Matsuoka et Murata en 2002 (113), la fonction amine serait impliquée dans l'interaction de l'amphotéricine B avec l'ergostérol. Cette donnée expliquerait les résultats obtenus par Tevyashova *et al.* en 2013 (114), lors de travaux de substitution de divers groupes chimiques de l'amphotéricine B ; la modification de la fonction amine entraînerait une diminution de l'activité antifongique de l'amphotéricine B.

Dans ces couplages, les *linkers* L1 et L2 ont été choisis par l'équipe de chimie du GICC non seulement parce qu'ils s'adaptaient bien au projet d'ADC anti-Crf2, mais également parce que les scientifiques de cette équipe possédaient l'expérience de ces deux *linkers*. Chimiquement, la liaison entre le *linker* L1 ou L2 et l'amphotéricine B a été réalisée en une étape, car les *linkers* étaient tous les deux sous forme ester activé, et ont ainsi pu réagir avec la fonction amine de l'amphotéricine B sans avoir besoin de réactif de couplage peptidique (Figure 30). Ils ont ensuite été purifiés par injection directe du mélange réactionnel brut dans une colonne HPLC (chromatographie en phase liquide à haute performance) semi-préparée, et tous les échantillons correspondant à des pics d'absorption à 350 nm ont été recueillis. Les produits de synthèse ont été identifiés par RMN (Résonance magnétique nucléaire). Le rendement de production, dans le cas du couplage avec le *linker* L1 ou le *linker* L2, était d'environ 50 % après purification.

L'efficacité antifongique de ces produits néosynthétisés a été évaluée selon la méthode précédemment décrite (*cf* V.4.2.1.). Malheureusement, le couple amphotéricine B - L1 n'a montré aucun effet, qu'elles aient été les concentrations d'amphotéricine B testées, jusqu'à 1,623 nmol/mL (Figure 31). Le même constat a été dressé avec le *linker* L2, jusqu'à une concentration de 5,410 nmol/mL d'amphotéricine B (Figure 32). En parallèle, nous avons vérifié que les *linkers* L1 et L2, testés selon la même méthode, ne présentaient aucune activité antifongique lorsqu'ils étaient utilisés seuls (Figures 31 et 32).

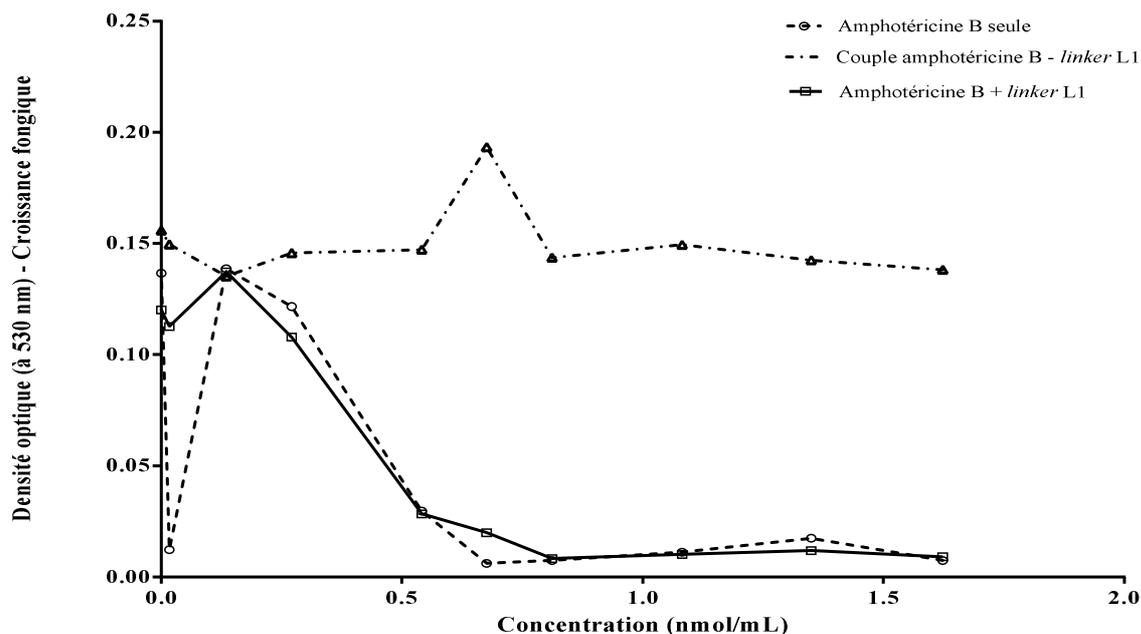


Figure 31 : Évaluation de l'effet antifongique de l'amphotéricine B seule, associée ou couplée au linker L1 à 48 h.

Alors que l'amphotéricine B seule ou associée mais non couplée au premier linker L1, possède une CMI₅₀ d'environ 0,465 nmol/mL, le couple amphotéricine B – L1, ne possède aucune activité antifongique décelable jusqu'à 1,623 nmol/mL.

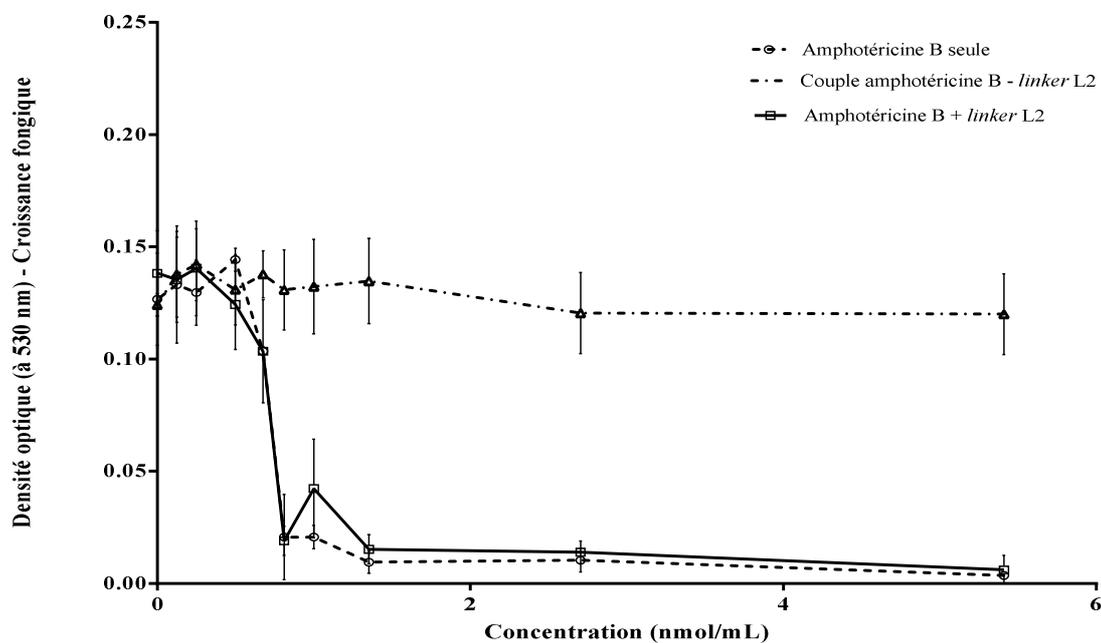


Figure 32 : Évaluation de l'effet antifongique de l'amphotéricine B seule, associée ou couplée au linker L2 à 48 h.

Alors que l'amphotéricine B seule ou associée mais non couplée au linker L2, possède une Concentration Minimale Inhibitrice 50 (CMI₅₀) d'environ 0,675 nmol/mL, le couple amphotéricine B – L2, ne possède aucune activité antifongique décelable jusqu'à 5,41 nmol/mL.

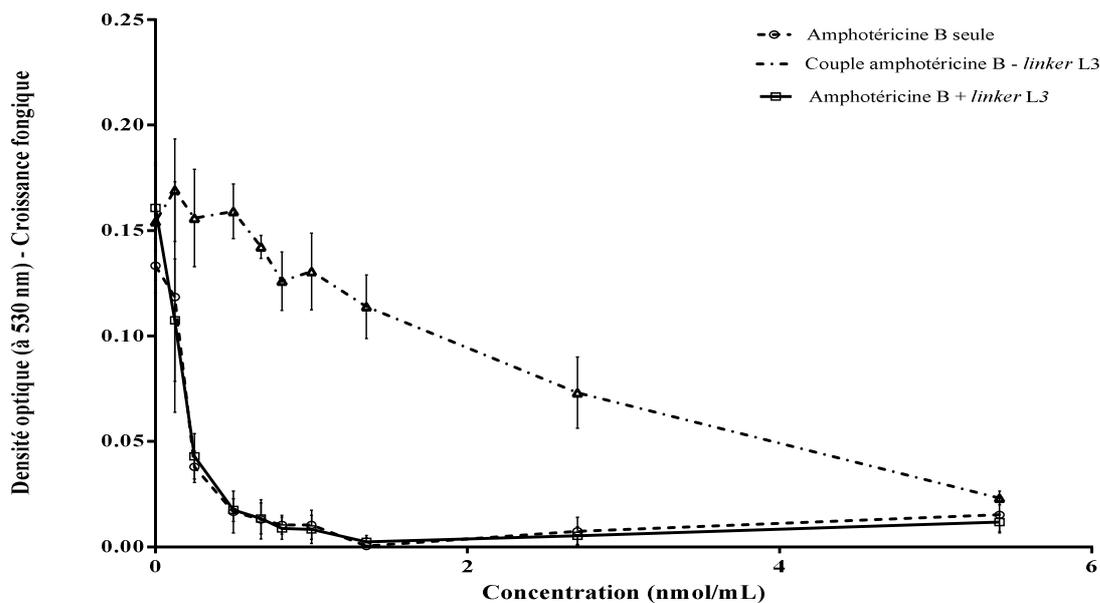


Figure 34 : Évaluation de l'effet antifongique de l'amphotéricine B seule, associée ou couplée au linker L3 à 48 h.

Alors que l'amphotéricine B seule ou associée mais non couplée au linker L2, possède une Concentration Minimale Inhibitrice 50 (CMI_{50}) d'environ 0,425 nmol/mL, le couple amphotéricine B - L3 possède une CMI_{50} à 2,4 nmol/mL.

L'étape suivante a donc consisté en la bio-conjugaison, c'est-à-dire à lier le produit amphotéricine B - L3 sur un anticorps anti-Crf2 au format scFv-Fc, via une tête fonctionnelle alkyne. Hélas, cette construction organique s'est révélée en pratique impossible, en particulier à cause des températures d'incubation requises, trop élevées pour assurer la stabilité des anticorps après bio-conjugaison.

Discussion – Perspectives

Dans le spectre des pathologies engendrées par les champignons du genre *Aspergillus*, l'aspergillose pulmonaire invasive est une mycose opportuniste qui survient essentiellement chez des patients présentant des facteurs d'immunodépression locaux ou généraux. L'API est particulièrement préoccupante en raison de sa sévérité et de son pronostic sombre malgré sa faible fréquence (1,36). La démarche diagnostique est délicate puisqu'elle repose sur un faisceau d'arguments clinico-radio-biologiques dont la précocité et la spécificité font parfois défaut (33,46).

La gravité de l'API et la complexité de sa prise en charge tant sur le plan diagnostique que thérapeutique en font un véritable problème de santé, motivant donc l'étude des cas d'API survenus au CHRU de Tours entre janvier 2012 et décembre 2017. L'âge médian des 27 patients tourangeaux atteints d'API recensés, ainsi que la prédominance masculine, correspondent aux chiffres retrouvés dans différentes études menées à l'échelle nationale ces dernières années (1,13,115). D'après l'analyse de nos cas, les hémopathies malignes représentent le principal facteur de risque et, parmi eux, les syndromes lymphoprolifératifs chroniques devancent les leucémies aiguës, tendance qui avait déjà été pressentie par l'étude nationale du SAIF (1). Les résultats des rapports du CNRMA sur les activités de 2014 et 2016 (13,115) convergent également dans le même sens. L'intensification des traitements des maladies sous-jacentes, ajoutée à l'accumulation de périodes d'immunodépression, imposent d'accorder une surveillance toute particulière à cette population de patients atteints de syndromes lymphoprolifératifs chroniques, qui a réellement émergé depuis les années 2000. Par ailleurs, l'étude des cas tourangeaux confirme la grande susceptibilité pour l'API des patients ayant reçu une allogreffe de cellules souches hématopoïétiques (116,117).

Les marqueurs mycologiques restent à l'heure actuelle un élément important de la démarche diagnostique de l'API, et en particulier, la recherche sérique de l'antigène galactomannane qui est recommandée aux cliniciens devant toute suspicion de l'affection (54,118). Elle a ainsi été pratiquée chez 26 patients de notre étude. En revanche, la positivité de la recherche de l'antigène GM dépend de la pathologie sous-jacente (52). Nous retrouvons cette tendance dans nos résultats puisqu'elle est maximale chez les patients atteints de leucémie aiguë et nulle chez les patients atteints de syndrome lymphoprolifératif chronique. Dans la population des patients qui présentaient une leucémie aiguë, c'est d'ailleurs le seul élément biologique en faveur d'une

API dans 80 % des cas ; l'examen mycologique étant négatif ou non réalisable par absence d'échantillon chez des patients trop fragiles. Ainsi, selon le facteur de risque, neutropénie ou corticothérapie, le développement du champignon et la diffusion de l'antigène galactomannane ne sont pas les mêmes (119). Nous retrouvons ici les deux sous-catégories d'API évoquées précédemment (*cf II.1.*), la forme angio-invasive rencontrée chez les patients présentant une neutropénie profonde et prolongée, essentiellement les patients atteints de leucémies aiguës, et la forme alvéolo-broncho-invasive rencontrée chez les patients sous corticothérapie (34). Le dosage sérique de l'antigène galactomannane présente sa principale limite chez les patients non neutropéniques et il paraît important d'adapter la stratégie diagnostique à la pathologie sous-jacente du patient. L'examen mycologique reste ainsi essentiel dans la démarche diagnostique de l'aspergillose pulmonaire invasive, en particulier chez les patients non neutropéniques (120). Dans notre étude, nous retrouvons la place indispensable de l'examen mycologique dans la démarche diagnostique puisque les positivités de l'examen direct et de la culture atteignaient respectivement 71 % et 92 %, valeurs supérieures à celles observées lors de l'étude nationale du SAIF (1).

L'administration d'un traitement antifongique à visée prophylactique est restreinte à une population bien définie d'hémopathes, les patients atteints de LAM et ceux ayant bénéficié d'une allogreffe de cellules souches hématopoïétiques, et privilégie le posaconazole (53,77,78). Cette recommandation a été suivie à Tours chez 60 % des patients atteints de LAM. A notre connaissance, il n'existe pas d'argument majeur clinique ou pharmacologique qui explique l'absence de prise en charge prophylactique des deux derniers patients atteints de LAM. Néanmoins, ces deux patients ont reçu un traitement empirique par voriconazole, ce qui témoigne du suivi intensif que l'équipe médicale a apporté à ces patients. Parmi les autres patients, pour lesquels aucune chimioprophylaxie antifongique n'est recommandée, cinq ont reçu un traitement empirique à base de caspofungine devant la persistance ou la récurrence d'une fièvre sous antibiothérapie large spectre, ce qui est conforme aux recommandations européennes (79). Malgré ces stratégies thérapeutiques pré-diagnostiques, près de 60 % des 27 patients atteints d'API n'ont reçu aucun traitement antifongique avant la pose du diagnostic alors que la quasi-totalité d'entre eux présentaient une fièvre persistante sous antibiothérapie large spectre. La mortalité chez ces patients n'ayant reçu aucun traitement antifongique avant le diagnostic est d'ailleurs sensiblement plus élevée (44 %) que chez les patients ayant reçu un traitement prophylactique ou empirique (36 %). Une meilleure sensibilisation des cliniciens sur les populations à risque pourrait permettre d'augmenter leur vigilance à propos ces patients

particuliers. Finalement, la prise en charge thérapeutique privilégiant le voriconazole en curatif est en accord avec les recommandations actuelles (53) puisque, dans notre étude, ce traitement a été administré à 79 % des patients traités en curatif.

La mortalité globale à 90 jours de l'API reste élevée aux alentours des 40 % (1,111), valeur retrouvée dans notre étude. La forte mortalité est attribuable en partie au retard diagnostique. Il convient donc d'anticiper au mieux l'API chez le patient à risque à l'aide des outils existants et d'autres nouveaux qui permettraient d'améliorer la démarche diagnostique actuelle (121).

Cependant, comme le soulignent plusieurs auteurs (122–124), outre le challenge diagnostique, il existe un réel besoin de nouveautés thérapeutiques qui pourraient également contribuer à faire baisser cette mortalité, et c'est devant ce constat qu'une réflexion autour d'une stratégie innovante à base d'ADC est née au sein de notre équipe de l'unité INSERM U1100. Rappelons en effet que si des molécules de ce type sont déjà disponibles pour une pathologie infectieuse (110,125), aucune n'est à notre connaissance disponible en mycologie.

Les ADC sur lesquels nous avons travaillé associent l'amphotéricine B à un anticorps au format scFv-Fc dirigé contre *A. fumigatus* par l'intermédiaire d'un *linker*. Le choix du motif antigénique ciblé s'est porté sur les protéines appartenant à la famille Crh, car elles sont exprimées à la surface de la quasi-totalité des filaments et spores d'*A. fumigatus* (3,107). La première étape a consisté en la construction de structures couplant l'amphotéricine B aux *linkers* choisis. Les premiers résultats décevants obtenus après le couplage des *linkers* L1 ou L2 à la fonction amine de l'amphotéricine B (cf Figures 31 et 32 p68), tendent à corroborer les résultats des investigations sur la substitution de divers groupes chimiques de l'amphotéricine B menées par Tevyashova *et al.* (114). Le couplage aurait ainsi endommagé le site actif ou le site de fixation de l'amphotéricine B à sa cible. L'alternative couplant l'amphotéricine B par sa fonction acide carboxylique avec le *linker* L3, présentant une structure plus intéressante puisque cette liaison n'endommagerait ni le site actif, ni le site de fixation de l'amphotéricine B. Les résultats obtenus semblent d'ailleurs prometteurs puisque ce couple possède une activité antifongique même si celle-ci reste diminuée par rapport à celle de l'amphotéricine B seule (cf Figure 34 p70). Suite à ces résultats encourageants obtenus *in vitro*, l'ambition à court terme est de trouver un nouveau *linker* adapté à la bio-conjugaison. De nouvelles options peuvent être envisagées notamment par l'intermédiaire d'un *linker* dit « auto-immolable », c'est-à-dire capable de libérer de façon intègre la drogue directement sur le site actif ciblé par l'anticorps. La libération s'opère par rupture de la liaison covalente grâce aux enzymes du

microenvironnement ou celles relarguées par le champignon *A. fumigatus* (126,127). Grâce à notre collaboration avec l'équipe CNRS du GICC UMR 7292, nous pourrions disposer des anticorps en concentration adéquate (*cf.* V.4.1.), utilisables pour la synthèse future des ADC complets. Une fois le format ADC opérationnel *in vitro*, il deviendra incontournable de le tester *in vivo* sur un modèle animal pour évaluer son efficacité. Pour cela, notre modèle murin d'API par nébulisation intra-trachéale de spores aspergillaires développé depuis plusieurs années (128,129) au sein de l'équipe 3 du CEPR (unité INSERM U1100) sera un outil précieux. Les étapes restantes représentent autant de challenges scientifiques avant de pouvoir placer la stratégie par ADC au cœur de la prise en charge thérapeutique des patients atteints d'API qui demeurera étroitement liée aux stratégies diagnostiques.

Conclusion

L'étude des 27 cas d'aspergillose pulmonaire invasive survenus au CHRU de Tours de janvier 2012 à décembre 2017 a permis de constater une réelle concordance entre l'épidémiologie locale et nationale. Devant la grande sévérité de cette pathologie au sein des populations à risque, nous nous sommes orientés vers une nouvelle perspective thérapeutique basée sur le concept des *antibody drug conjugates*. Les premiers résultats obtenus *in vitro* en utilisant des anticorps dirigés contre une protéine de croissance du champignon couplés à l'amphotéricine B permettent d'envisager les ADC comme une opportunité innovante dans le traitement des patients atteints d'aspergillose pulmonaire invasive.

Bibliographie

1. Lortholary O, Gangneux JP, Sitbon K, Lebeau B, de Monbrison F, Le Strat Y, et al. Epidemiological trends in invasive aspergillosis in France : the SAIF network (2005-2007). *Clin Microbiol Infect.* déc 2011;17(12):1882-9.
2. Schütte M, Thullier P, Pelat T, Wezler X, Rosenstock P, Hinz D, et al. Identification of a putative Crf splice variant and generation of recombinant antibodies for the specific detection of *Aspergillus fumigatus*. *PLoS ONE.* août 2009;4(8):6625.
3. Arroyo J, Sarfati J, Baixench MT, Ragni E, Guillén M, Rodriguez-Peña JM, et al. The GPI-anchored Gas and Crh families are fungal antigens. *Yeast.* avr 2007;24(4):289-96.
4. Fisher MC, Henk DA, Briggs CJ, Brownstein JS, Madoff LC, McCraw SL, et al. Emerging fungal threats to animal, plant and ecosystem health. *Nature.* avr 2012;484(7393):186-94.
5. Chabasse D, Contet-Audonnet N, Bouchara JP, Basile AM. Moisissures dermatophytes levures, du prélèvement au diagnostic. 2008. (Revue francophone des laboratoires; vol. 39).
6. Gams W, Christensen M, Onions AH, Pitt JI, Samson RA. Infrageneric taxa of *Aspergillus*. *Advances in Penicillium and Aspergillus systematics.* Springer, Boston, MA; 1986. p. 55-62.
7. Samson RA, Hong S, Peterson SW, Frisvad JC, Varga J. Polyphasic taxonomy of *Aspergillus* section *Fumigati* and its teleomorph *Neosartorya*. *Stud Mycol.* 2007;59:147-203.
8. Denning DW. Invasive aspergillosis. *Clin Infect Dis.* avr 1998;26(4):781-803.
9. Pitt JI. The current role of *Aspergillus* and *Penicillium* in human and animal health. *J Med Vet Mycol.* 1994;32 Suppl 1:17-32.
10. Gangneux JP, Lavarde D, Bretagne S, Guiguen C, Gandemer V. Transient *Aspergillus* antigenaemia : think of milk. *The Lancet.* avr 2002;359(9313):1251.
11. Paulussen C, Hallsworth JE, Álvarez-Pérez S, Nierman WC, Hamill PG, Blain D, et al. Ecology of aspergillosis: insights into the pathogenic potency of *Aspergillus fumigatus* and some other *Aspergillus* species. *Microb Biotechnol.* 2017;10(2):296-322.
12. O’Gorman CM, Fuller HT, Dyer PS. Discovery of a sexual cycle in the opportunistic fungal pathogen *Aspergillus fumigatus*. *Nature.* janv 2009;457(7228):471-4.
13. Dromer F, Bretagne S, Lortholary O. Rapport annuel d’activité 2017 du Centre national de référence Mycoses Invasives et Antifongiques. 2017.
14. Dagenais TRT, Keller NP. Pathogenesis of *Aspergillus fumigatus* in invasive aspergillosis. *Clin Microbiol Rev.* juill 2009;22(3):447-65.

15. Paris S, Debeaupuis JP, Cramer R, Carey M, Charlès F, Prévost MC, et al. Conidial hydrophobins of *Aspergillus fumigatus*. *Appl Environ Microbiol.* mars 2003;69(3):1581-8.
16. Langfelder K, Streibel M, Jahn B, Haase G, Brakhage AA. Biosynthesis of fungal melanins and their importance for human pathogenic fungi. *Fungal Genet Biol.* mars 2003;38(2):143-58.
17. Thywißen A, Heinekamp T, Dahse HM, Schmalzer-Ripcke J, Nietzsche S, Zipfel PF, et al. Conidial dihydroxynaphthalene melanin of the human pathogenic fungus *Aspergillus fumigatus* interferes with the host endocytosis pathway. *Front Microbiol.* 2011;2:96.
18. Volling K, Thywissen A, Brakhage AA, Saluz HP. Phagocytosis of melanized *Aspergillus* conidia by macrophages exerts cytoprotective effects by sustained PI3K/Akt signalling. *Cell Microbiol.* août 2011;13(8):1130-48.
19. Cooney DG, Emerson R. Thermophilic fungi : an account of their biology, activities, and classification. *Q Rev Biol.* sept 1965;40(3).
20. Brandon M, Howard B, Lawrence C, Laubenbacher R. Iron acquisition and oxidative stress response in *aspergillus fumigatus*. *BMC Syst Biol.* 24 avr 2015;9(19).
21. Sugui JA, Pardo J, Chang YC, Zarembek KA, Nardone G, Galvez EM, et al. Gliotoxin is a virulence factor of *Aspergillus fumigatus* : gliP deletion attenuates virulence in mice immunosuppressed with hydrocortisone. *Eukaryot Cell.* sept 2007;6(9):1562-9.
22. Eccles N, Scott G. *Aspergillus* in pepper. *The Lancet.* mars 1992;339(8793):618.
23. Latgé JP. *Aspergillus fumigatus* and Aspergillosis. *Clin Microbiol Rev.* avr 1999;12(2):310-50.
24. Latgé JP. The pathobiology of *Aspergillus fumigatus*. *Trends Microbiol.* août 2001;9(8):382-9.
25. Philippe B, Ibrahim-Granet O, Prévost MC, Gougerot-Pocidal MA, Sanchez Perez M, Van der Meeren A, et al. Killing of *Aspergillus fumigatus* by alveolar macrophages is mediated by reactive oxidant intermediates. *Infect Immun.* juin 2003;71(6):3034-42.
26. Hohl TM, Feldmesser M. *Aspergillus fumigatus*: principles of pathogenesis and host defense. *Eukaryot Cell.* nov 2007;6(11):1953-63.
27. Espinosa V, Rivera A. First line of defense : innate cell-mediated control of pulmonary aspergillosis. *Front Microbiol.* mars 2016;7.
28. Kosmidis C, Denning DW. The clinical spectrum of pulmonary aspergillosis. *Thorax.* mars 2015;70(3):270-7.
29. Van de Veerdonk FL, Gresnigt MS, Romani L, Netea MG, Latgé JP. *Aspergillus fumigatus* morphology and dynamic host interactions. *Nat Rev Microbiol.* nov 2017;15(11):661-74.

30. Godet C, Germaud P. Aspergillose bronchopulmonaire allergique : pour la pratique. *Lett Pneumol.* nov 2015;18(6):274-8.
31. Tracy MC, Okorie CUA, Foley EA, Moss RB. Allergic bronchopulmonary aspergillosis. *J Fungi.* juin 2016;2(17).
32. Schweer KE, Bangard C, Hekmat K, Cornely OA. Chronic pulmonary aspergillosis. *Mycoses.* mai 2014;57(5):257-70.
33. Desoubeaux G, Bailly É, Chandenier J. Diagnosis of invasive pulmonary aspergillosis : updates and recommendations. *Médecine Mal Infect.* mars 2014;44(3):89-101.
34. Bergeron A, Porcher R, Sulahian A, de Bazelaire C, Chagnon K, Raffoux E, et al. The strategy for the diagnosis of invasive pulmonary aspergillosis should depend on both the underlying condition and the leukocyte count of patients with hematologic malignancies. *Blood.* févr 2012;119(8):1831-7.
35. Franquet T, Müller NL, Giménez A, Guembe P, de la Torre J, Bagué S. Spectrum of pulmonary aspergillosis : histologic, clinical, and radiologic findings. *RadioGraphics.* juill 2001;21(4):825-37.
36. Bitar D, Lortholary O, Dromer F, Coignard B, Che D. Mycoses invasives en France métropolitaine, PMSI 2001-2010 : incidence, létalité et tendances. *Bull Épidémiologique Hebd.* avril 2013;12-13:109-14.
37. Garcia-Vidal C, Upton A, Kirby KA, Marr KA. Epidemiology of invasive mold infections in allogeneic stem cell transplant recipients : biological risk factors for infection according to time after transplantation. *Clin Infect Dis.* oct 2008;47(8):1041-50.
38. Neofytos D, Horn D, Anaissie E, Steinbach W, Olyaei A, Fishman J, et al. Epidemiology and outcome of invasive fungal infection in adult hematopoietic stem cell transplant recipients: analysis of Multicenter Prospective Antifungal Therapy (PATH) Alliance registry. *Clin Infect Dis.* févr 2009;48(3):265-73.
39. Singh N, Singh NM, Husain S. Aspergillosis in solid organ transplantation. *Am J Transpl.* mars 2013;13 Suppl 4:228-41.
40. Pilmis B, Puel A, Lortholary O, Lanternier F. New clinical phenotypes of fungal infections in special hosts. *Clin Microbiol Infect.* août 2016;22(8):681-7.
41. Greene RE, Schlamm HT, Oestmann JW, Stark P, Durand C, Lortholary O, et al. Imaging findings in acute invasive pulmonary aspergillosis : clinical significance of the halo sign. *Clin Infect Dis.* févr 2007;44(3):373-9.
42. Alves GRT, Marchiori E, Irion K, Nin CS, Watte G, Pasqualotto AC, et al. The halo sign: HRCT findings in 85 patients. *J Bras Pneumol.* déc 2016;42(6):435-9.
43. Caillot D, Couaillier JF, Bernard A, Casasnovas O, Denning DW, Mannone L, et al. Increasing volume and changing characteristics of invasive pulmonary aspergillosis on

- sequential thoracic computed tomography scans in patients with neutropenia. *J Clin Oncol.* janv 2001;19(1):253-9.
44. Caillot D, Casasnovas O, Bernard A, Couaillier JF, Durand C, Cuisenier B, et al. Improved management of invasive pulmonary aspergillosis in neutropenic patients using early thoracic computed tomographic scan and surgery. *J Clin Oncol.* janv 1997;15(1):139-47.
 45. Henzler C, Henzler T, Buchheidt D, Nance JW, Weis CA, Vogelmann R, et al. Diagnostic performance of contrast enhanced pulmonary computed tomography angiography for the detection of angioinvasive pulmonary aspergillosis in immunocompromised patients. *Sci Rep.* 30 juin 2017;7(1).
 46. Hope WW, Walsh TJ, Denning DW. Laboratory diagnosis of invasive aspergillosis. *Lancet Infect Dis.* oct 2005;5(10):609-22.
 47. Hoenigl M, Prattes J, Spiess B, Wagner J, Pruellner F, Raggam RB, et al. Performance of galactomannan, beta-d-glucan, Aspergillus lateral-flow device, conventional culture, and PCR tests with bronchoalveolar lavage fluid for diagnosis of invasive pulmonary aspergillosis. *J Clin Microbiol.* juin 2014;52(6):2039-45.
 48. Verwer PEB, Van Leeuwen WB, Girard V, Monnin V, Van Belkum A, Staab JF, et al. Discrimination of *Aspergillus lentulus* from *Aspergillus fumigatus* by Raman spectroscopy and MALDI-TOF MS. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* févr 2014;33(2):245-51.
 49. Shah AA, Hazen KC. Diagnostic accuracy of histopathologic and cytopathologic examination of *Aspergillus* species. *Am J Clin Pathol.* janv 2013;139(1):55-61.
 50. Beauvais A, Fontaine T, Aimanianda V, Latgé JP. *Aspergillus* cell wall and biofilm. *Mycopathologia.* déc 2014;178(5-6):371-7.
 51. Latgé JP, Kobayashi H, Debeaupuis JP, Diaquin M, Sarfati J, Wieruszkeski JM, et al. Chemical and immunological characterization of the extracellular galactomannan of *Aspergillus fumigatus*. *Infect Immun.* déc 1994;62(12):5424-33.
 52. Pfeiffer CD, Fine JP, Safdar N. Diagnosis of invasive aspergillosis using a galactomannan assay : a meta-analysis. *Clin Infect Dis.* 15 mai 2006;42(10):1417-727.
 53. Tissot F, Agrawal S, Pagano L, Petrikos G, Groll AH, Skiada A, et al. ECIL-6 guidelines for the treatment of invasive candidiasis, aspergillosis and mucormycosis in leukemia and hematopoietic stem cell transplant patients. *Haematologica.* mars 2017;102(3):433-44.
 54. De Pauw B, Walsh TJ, Donnelly JP, Stevens DA, Edwards JE, Calandra T, et al. Revised definitions of invasive fungal disease from the European Organization for Research and Treatment of Cancer/Invasive Fungal Infections Cooperative Group and the National Institute of Allergy and Infectious Diseases Mycoses Study Group (EORTC/MSG) consensus group. *Clin Infect Dis.* juin 2008;46(12):1813-21.

55. Gerlinger MP, Rousselot P, Rigaudeau S, Billon C, Touratier S, Castaigne S, et al. False positive galactomannan Platelia due to piperacillin-tazobactam. *Med Mal Infect.* janv 2012;42(1):10-4.
56. Racil Z, Kocmanova I, Lengerova M, Winterova J, Mayer J. Intravenous PLASMA-LYTE as a major cause of false-positive results of platelia Aspergillus test for galactomannan detection in serum. *J Clin Microbiol.* sept 2007;45(9):3141-2.
57. Vergidis P, Walker RC, Kaul DR, Kauffman CA, Freifeld AG, Slagle DC, et al. False-positive Aspergillus galactomannan assay in solid organ transplant recipients with histoplasmosis. *Transpl Infect Dis.* avr 2012;14(2):213-7.
58. Hamaki T, Kami M, Kanda Y, Miyakoshi S, Ueyama J, Morinaga S, et al. False-positive results of Aspergillus enzyme-linked immunosorbent assay in a patient with chronic graft-versus-host disease after allogeneic bone marrow transplantation. *Bone Marrow Transplant.* sept 2001;28(6):633-4.
59. Zou M, Tang L, Zhao S, Zhao Z, Chen L, Chen P, et al. Systematic review and meta-analysis of detecting galactomannan in bronchoalveolar lavage fluid for diagnosing invasive aspergillosis. *PLoS ONE.* août 2012;7(8).
60. Angebault C, Lanternier F, Dalle F, Schrimpf C, Roupie AL, Dupuis A, et al. Prospective evaluation of serum β -glucan testing in patients with probable or proven fungal diseases. *Open Forum Infect Dis.* juin 2016;3(3).
61. Odabasi Z, Mattiuzzi G, Estey E, Kantarjian H, Saeki F, Ridge RJ, et al. Beta-D-glucan as a diagnostic adjunct for invasive fungal infections: validation, cutoff development, and performance in patients with acute myelogenous leukemia and myelodysplastic syndrome. *Clin Infect Dis.* juill 2004;39(2):199-205.
62. Young RC, Bennett JE. Invasive aspergillosis. Absence of detectable antibody response. *Am Rev Respir Dis.* nov 1971;104(5):710-6.
63. Bustin SA, Benes V, Garson JA, Hellemans J, Huggett J, Kubista M, et al. The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clin Chem.* avr 2009;55(4):611-22.
64. Springer J, Morton CO, Perry M, Heinz WJ, Paholcsek M, Alzheimer M, et al. Multicenter comparison of serum and whole-blood specimens for detection of Aspergillus DNA in high-risk hematological patients. *J Clin Microbiol.* mai 2013;51(5):1445-50.
65. Schwarzhinger M, Sagaon-Teyssier L, Cabaret O, Bretagne S, Cordonnier C, PREVERT Investigators. Performance of serum biomarkers for the early detection of invasive aspergillosis in febrile, neutropenic patients: a multi-state model. *PLoS ONE.* 2013;8(6).
66. Arvanitis M, Ziakas PD, Zacharioudakis IM, Zervou FN, Caliendo AM, Mylonakis E. PCR in diagnosis of invasive aspergillosis: a meta-analysis of diagnostic performance. *J Clin Microbiol.* oct 2014;52(10):3731-42.
67. Suarez F, Lortholary O, Buland S, Rubio MT, Ghez D, Mahé V, et al. Detection of circulating Aspergillus fumigatus DNA by real-time PCR assay of large serum volumes

- improves early diagnosis of invasive aspergillosis in high-risk adult patients under hematologic surveillance. *J Clin Microbiol.* nov 2008;46(11):3772-7.
68. Ascioglu S, Rex JH, de Pauw B, Bennett JE, Bille J, Crokaert F, et al. Defining opportunistic invasive fungal infections in immunocompromised patients with cancer and hematopoietic stem cell transplants: an international consensus. *Clin Infect Dis.* janv 2002;34(1):7-14.
 69. Blot SI, Taccone FS, Van den Abeele AM, Bulpa P, Meersseman W, Brusselsaers N, et al. A clinical algorithm to diagnose invasive pulmonary aspergillosis in critically ill patients. *Am J Respir Crit Care Med.* juill 2012;186(1):56-64.
 70. Walsh TJ, Anaissie EJ, Denning DW, Herbrecht R, Kontoyiannis DP, Marr KA, et al. Treatment of aspergillosis : clinical practice guidelines of the Infectious Diseases Society of America. *Clin Infect Dis.* févr 2008;46(3):327-60.
 71. Weiss J, Ten Hoevel MM, Burhenne J, Walter-Sack I, Hoffmann MM, Rengelshausen J, et al. CYP2C19 genotype is a major factor contributing to the highly variable pharmacokinetics of voriconazole. *J Clin Pharmacol.* févr 2009;49(2):196-204.
 72. Lelièvre L, Groh M, Angebault C, Maherault AC, Didier E, Bougnoux ME. Azole resistant *Aspergillus fumigatus*: an emerging problem. *Med Mal Infect.* avr 2013;43(4):139-45.
 73. Van der Linden JWM, Camps SMT, Kampinga GA, Arends JPA, Debets-Ossenkopp YJ, Haas PJA, et al. Aspergillosis due to voriconazole highly resistant *Aspergillus fumigatus* and recovery of genetically related resistant isolates from domiciles. *Clin Infect Dis.* août 2013;57(4):513-20.
 74. Anderson TM, Clay MC, Cioffi AG, Diaz KA, Hisao GS, Tuttle MD, et al. Amphotericin forms an extramembranous and fungicidal sterol sponge. *Nat Chem Biol.* mai 2014;10(5):400-6.
 75. Jiménez-Ortigosa C, Moore C, Denning DW, Perlin DS. Emergence of echinocandin resistance due to a point mutation in the *fkp1* gene of *Aspergillus fumigatus* in a patient with chronic pulmonary aspergillosis. *Antimicrob Agents Chemother.* déc 2017;61(12).
 76. Marr KA, Seidel K, Slavin MA, Bowden RA, Schoch HG, Flowers ME, et al. Prolonged fluconazole prophylaxis is associated with persistent protection against candidiasis-related death in allogeneic marrow transplant recipients: long-term follow-up of a randomized, placebo-controlled trial. *Blood.* sept 2000;96(6):2055-61.
 77. Cornely OA, Maertens J, Winston DJ, Perfect J, Ullmann AJ, Walsh TJ, et al. Posaconazole vs. fluconazole or itraconazole prophylaxis in patients with neutropenia. *N Engl J Med.* janv 2007;356(4):348-59.
 78. Groll AH, Castagnola E, Cesaro S, Dalle JH, Engelhard D, Hope W, et al. Fourth European Conference on Infections in Leukaemia (ECIL-4) : guidelines for diagnosis, prevention, and treatment of invasive fungal diseases in paediatric patients with cancer or allogeneic haemopoietic stem-cell transplantation. *Lancet Oncol.* juill 2014;15(8):327-40.

79. Maertens J, Marchetti O, Herbrecht R, Cornely OA, Flückiger U, Frère P, et al. European guidelines for antifungal management in leukemia and hematopoietic stem cell transplant recipients: summary of the ECIL 3-2009 update. *Bone Marrow Transplant.* mai 2011;46(5):709-18.
80. Cordonnier C, Pautas C, Maury S, Vekhoff A, Farhat H, Suarez F, et al. Empirical versus preemptive antifungal therapy for high-risk, febrile, neutropenic patients: a randomized, controlled trial. *Clin Infect Dis.* avr 2009;48(8):1042-51.
81. Herbrecht R, Denning DW, Patterson TF, Bennett JE, Greene RE, Oestmann JW, et al. Voriconazole versus amphotericin B for primary therapy of invasive aspergillosis. *N Engl J Med.* août 2002;347(6):408-15.
82. Marr KA, Boeckh M, Carter RA, Kim HW, Corey L. Combination antifungal therapy for invasive aspergillosis. *Clin Infect Dis.* sept 2004;39(6):797-802.
83. Miceli MH, Graziutti ML, Woods G, Zhao W, Kocoglu MH, Barlogie B, et al. Strong correlation between serum *Aspergillus* galactomannan index and outcome of aspergillosis in patients with hematological cancer : clinical and research implications. *Clin Infect Dis.* mai 2008;46(9):1412-22.
84. Martino R, Subirá M, Rovira M, Solano C, Vázquez L, Sanz GF, et al. Invasive fungal infections after allogeneic peripheral blood stem cell transplantation : incidence and risk factors in 395 patients. *Br J Haematol.* févr 2002;116(2):475-82.
85. Ezekowitz RA. Update on chronic granulomatous disease: the concept of the near-normal host. *Curr Clin Top Infect Dis.* 2000;20:325-34.
86. Cornet M, Levy V, Fleury L, Lortholary J, Barquins S, Coureul MH, et al. Efficacy of prevention by high-efficiency particulate air filtration or laminar airflow against *Aspergillus* airborne contamination during hospital renovation. *Infect Control Hosp Epidemiol.* juill 1999;20(7):508-13.
87. Jiang XR, Song A, Bergelson S, Arroll T, Parekh B, May K, et al. Advances in the assessment and control of the effector functions of therapeutic antibodies. *Nat Rev Drug Discov.* févr 2011;10(2):101-11.
88. Stapleton NM, Einarisdóttir HK, Stemerding AM, Vidarsson G. The multiple facets of FcRn in immunity. *Immunol Rev.* nov 2015;268(1):253-68.
89. Frenzel A, Hust M, Schirrmann T. Expression of recombinant antibodies. *Front Immunol.* juil 2013;4(217).
90. Köhler G, Milstein C. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *J Immunol.* mars 2005;174(5):2453-5.
91. Rodgers KR, Chou RC. Therapeutic monoclonal antibodies and derivatives : historical perspectives and future directions. *Biotechnol Adv.* janv 2016;34(6):1149-58.

92. Buss NAPS, Henderson SJ, McFarlane M, Shenton JM, de Haan L. Monoclonal antibody therapeutics: history and future. *Curr Opin Pharmacol.* oct 2012;12(5):615-22.
93. Bird RE, Hardman KD, Jacobson JW, Johnson S, Kaufman BM, Lee SM, et al. Single-chain antigen-binding proteins. *Science.* oct 1988;242(4877):423-6.
94. Holliger P, Hudson PJ. Engineered antibody fragments and the rise of single domains. *Nat Biotechnol.* sept 2005;23(9):1126-36.
95. Nelson AL, Reichert JM. Development trends for therapeutic antibody fragments. *Nat Biotechnol.* avr 2009;27(4):331-7.
96. Alvarenga LM, Zahid M, di Tommaso A, Juste MO, Aubrey N, Billiald P, et al. Engineering venom's toxin-neutralizing antibody fragments and its therapeutic potential. *Toxins.* août 2014;6(8):2541-67.
97. Sandritter T. Palivizumab for respiratory syncytial virus prophylaxis. *J Pediatr Health Care.* juill 1999;13(4):191-5.
98. Markham A. Bezlotoxumab : first global approval. *Drugs.* déc 2016;76(18):1793-8.
99. Migone TS, Subramanian GM, Zhong J, Healey LM, Corey A, Devalaraja M, et al. Raxibacumab for the treatment of inhalational anthrax. *N Engl J Med.* juill 2009;361(2):135-44.
100. Yamamoto BJ, Shadiack AM, Carpenter S, Sanford D, Henning LN, Gonzales N, et al. Obiltoxaximab prevents disseminated bacillus anthracis infection and improves survival during pre- and postexposure prophylaxis in animal models of inhalational anthrax. *Antimicrob Agents Chemother.* janv 2016;60(10):5796-805.
101. Wagner EK, Maynard JA. Engineering therapeutic antibodies to combat infectious diseases. *Curr Opin Chem Eng.* mars 2018;19:131-41.
102. Matthews R, Hodgetts S, Burnie J. Preliminary assessment of a human recombinant antibody fragment to hsp90 in murine invasive candidiasis. *J Infect Dis.* juin 1995;171(6):1668-71.
103. Chaturvedi AK, Kumar R, Kumar A, Shukla PK. A monoclonal IgM directed against immunodominant catalase B of cell wall of *Aspergillus fumigatus* exerts anti-*A. fumigatus* activities. *Mycoses.* nov 2009;52(6):524-33.
104. Karwa R, Wargo KA. Efungumab : a novel agent in the treatment of invasive candidiasis. *Ann Pharmacother.* nov 2009;43(11):1818-23.
105. Mouyna I, Hartl L, Latgé JP. β -1,3-glucan modifying enzymes in *Aspergillus fumigatus*. *Front Microbiol.* avr 2013;4(81).
106. Latgé JP, Beauvais A, Chamilos G. The cell wall of the human fungal pathogen *Aspergillus fumigatus*: biosynthesis, organization, immune response, and virulence. *Annu Rev Microbiol.* sept 2017;71:99-116.

107. Arroyo J, Farkaš V, Sanz AB, Cabib E. Strengthening the fungal cell wall through chitin-glucan cross-links: effects on morphogenesis and cell integrity. *Cell Microbiol.* 2016;18(9):1239-50.
108. Cramer R, Blaser K. Cloning *Aspergillus fumigatus* allergens by the pJuFo filamentous phage display system. *Int Arch Allergy Immunol.* mai 1996;110(1):41-5.
109. Bowyer P, Denning DW. Genomic analysis of allergen genes in *Aspergillus* spp: the relevance of genomics to everyday research. *Med Mycol.* févr 2007;45(1):17-26.
110. Lehar SM, Pillow T, Xu M, Staben L, Kajihara KK, Vandlen R, et al. Novel antibody-antibiotic conjugate eliminates intracellular *S. aureus*. *Nature.* nov 2015;527(7578):323-8.
111. Arendrup M, Meletiadi J, Mouton J, Lagrou K, Hamal P, Guinea J. Method for the determination of broth dilution minimum inhibitory concentrations of antifungal agents for conidia forming moulds. 2017.
112. Arendrup MC, Perkhofer S, Howard SJ, Garcia-Effron G, Vishukumar A, Perlin D, et al. Establishing in vitro-in vivo correlations for *Aspergillus fumigatus*: the challenge of azoles versus echinocandins. *Antimicrob Agents Chemother.* janv 2008;52(10):3504-11.
113. Matsuoka S, Murata M. Cholesterol markedly reduces ion permeability induced by membrane-bound amphotericin B. *Biochim Biophys Acta Biomembr.* août 2002;1564(2):429-34.
114. Tevyashova AN, Olsufyeva EN, Solovieva SE, Printsevskaya SS, Reznikova MI, Trenin AS, et al. Structure-antifungal activity relationships of polyene antibiotics of the amphotericin B group. *Antimicrob Agents Chemother.* janv 2013;57(8):3815-22.
115. Dromer F, Bretagne S, Lortholary O. Rapport annuel d'activité 2015 du Centre national de référence Mycoses Invasives et Antifongiques. 2015.
116. Cordonnier C, Bernaudin JF, Bierling P, Huet Y, Vernant JP. Pulmonary complications occurring after allogeneic bone marrow transplantation. A study of 130 consecutive transplanted patients. *Cancer.* sept 1986;58(5):1047-54.
117. Ribaud P, Chastang C, Latgé JP, Baffroy-Lafitte L, Parquet N, Devergie A, et al. Survival and prognostic factors of invasive aspergillosis after allogeneic bone marrow transplantation. *Clin Infect Dis.* févr 1999;28(2):322-30.
118. Misch EA, Safdar N. Updated guidelines for the diagnosis and management of aspergillosis. *J Thorac Dis.* déc 2016;8(12):1771-6.
119. Gangneux JP, Camus C, Philippe B. Épidémiologie et facteurs de risque de l'aspergillose invasive du sujet non neutropénique. *Rev Mal Respir.* février 2008;25(2):139-54.
120. Azoulay É, Afessa B. Diagnostic criteria for invasive pulmonary aspergillosis in critically ill patients. *Am J Respir Crit Care Med.* juill 2012;186(1):8-10.

121. Borys M, Piwowarczyk P, Sysiak J, Czuczwar M, Prystupa A. Early diagnosis and treatment of invasive aspergillosis as a main determinant of outcome - review of literature according to the presented case report. *Ann Agric Env Med.* mars 2017;24(1):100-3.
122. Jenks J, Hoenigl M, Jenks JD, Hoenigl M. Treatment of aspergillosis. *J Fungi.* août 2018;4(3).
123. Ong V, Hough G, Schlosser M, Bartizal K, Balkovec JM, James KD, et al. Preclinical evaluation of the stability, safety, and efficacy of CD101, a novel echinocandin. *Antimicrob Agents Chemother.* oct 2016;60(11):6872-9.
124. McCarthy MW, Kontoyiannis DP, Cornely OA, Perfect JR, Walsh TJ. Novel agents and drug targets to meet the challenges of resistant fungi. *J Infect Dis.* août 2017;216 Suppl 3:474-83.
125. Mariathasan S, Tan MW. Antibody-antibiotic conjugates : a novel therapeutic platform against bacterial infections. *Trends Mol Med.* 2017;23(2):135-49.
126. McCombs JR, Owen SC. Antibody drug conjugates : design and selection of linker, payload and conjugation chemistry. *AAPS J.* mars 2015;17(2):339-51.
127. Leriche G, Chisholm L, Wagner A. Cleavable linkers in chemical biology. *Bioorg Med Chem.* janv 2012;20(2):571-82.
128. Chandener J, Bernard S, Montharu J, Bailly E, Fetissof F, De Monte M, et al. The utility of a nebulised intra-tracheal rat model of invasive pulmonary aspergillosis. *Mycoses.* mai 2009;52(3):239-45.
129. Desoubeaux G, Chandener J. A nebulized intra-tracheal rat model of invasive pulmonary aspergillosis. *Methods Mol Biol Clifton NJ.* 2012;845:511-8.

Vu, le Président du jury,

Le Professeur Patrice LE PAPE

Vu, le Directeur de thèse,

Le Professeur Guillaume DESOUBEAUX

Vu, le Directeur de l'UFR,

Nom - Prénoms : CHESNAY Adélaïde, Marie, Pauline

Titre de la thèse : L'aspergillose pulmonaire invasive au CHRU de Tours de 2012 à 2017
Perspective thérapeutique par « *antibody drug conjugates* » (ADC)

Résumé de la thèse :

L'aspergillose pulmonaire invasive est une infection fongique opportuniste au pronostic sombre. Sa sévérité et son incidence croissante au sein des services hospitaliers d'onco-hématologie, de réanimation ou de transplantations d'organes nourrissent l'intérêt qui leur est porté.

Afin d'étudier l'aspergillose pulmonaire invasive du point de vue tourangeau, nous avons repris les 27 cas survenus au CHRU de Tours de janvier 2012 à décembre 2017. Cette étude nous a permis de constater une réelle concordance entre l'épidémiologie locale et nationale. Malheureusement, la mortalité de 40 % est restée trop élevée, malgré les recommandations de prise en charge diagnostique et les nouveaux traitements apparus au début du siècle. Devant ce constat, un projet innovant à base d'*antibody drug conjugates* se proposant de réfléchir à une nouvelle stratégie thérapeutique a été débuté au sein de l'équipe 3 de l'unité INSERM U1100. Des anticorps dirigés contre un motif antigénique aspergillaire, Crf2, sont couplés à l'amphotéricine B par un *linker* afin d'agir spécifiquement sur le champignon. Les résultats obtenus *in vitro* à partir de précurseurs d'*antibody drug conjugates* couplant l'amphotéricine B à différents *linkers* ont été prometteurs. Bien que plusieurs optimisations soient nécessaires avant de produire des *antibody drug conjugates* entiers, ces résultats nous permettent d'envisager les ADC comme une opportunité novatrice dans le traitement des patients atteints d'aspergillose pulmonaire invasive.

Mots clés : Aspergillose, Tours, *Antibody drug conjugates* (ADC)

Président :

Mr LE PAPE Patrice, Professeur des Universités-Praticien Hospitalier de Parasitologie - Mycologie (Nantes)

Membres du jury :

Mr DESOUBEAUX Guillaume, Professeur des Universités-Praticien Hospitalier de Parasitologie - Mycologie (Tours)

Mr CHANDENIER Jacques, Professeur des Universités-Praticien Hospitalier de Parasitologie - Mycologie (Tours)

Mr BAILLY Éric, Praticien Hospitalier de Parasitologie - Mycologie (Tours)

Mr JUSTE Matthieu, Maître de Conférences des Universités de Parasitologie (Tours)

Adresse de l'auteur : La Pelluère

53940 Le Genest Saint Isle