
UNIVERSITE DE NANTES

FACULTE DE PHARMACIE

ANNEE 2003

N°14

MEMOIRE

DU DIPLOME D'ETUDES SPECIALISEES DE

BIOLOGIE MEDICALE

Soutenu devant le Jury Interrégional

Le **06 MAI 2003**

Par M. **GENTILHOMME HERVE**

Conformément aux dispositions de l'arrêté

Du 10 Septembre 1990 tient lieu de :

THESE

POUR LE DIPLOME D'ETAT

DE DOCTEUR EN PHARMACIE

LA PENICILLIOSE A *PENICILLIUM MARNEFFEI* :

MISE POINT ET EVALUATION D'UNE

APPROCHE DE DIAGNOSTIC SEROLOGIQUE

JURY

PRESIDENT :	Mme le Professeur	B.M. IMBERT	laboratoire de Virologie – Nantes
DIRECTEUR :	Mr le Docteur	P. LE PAPE	laboratoire de Parasitologie – Nantes
MEMBRES :	Mr le Professeur	D. CHABASSE	laboratoire de Parasitologie – Angers
	Mr le Professeur	F RAFFI	Médecine Interne B – Nantes
	Mr le Docteur	M. MIEGEVILLE	laboratoire de Parasitologie – Nantes

A Sandrine, « compagne de toujours » et récente épouse,
Qui attendait la fin du présent ouvrage avec impatience. Avec tout mon amour.

A Fanny et Adrien, nos petits monstres,
Source de joie quotidienne, à tout le temps que nous allons passer ensemble...

A mes parents,
Je vous doit tout, merci pour votre soutien inconditionnel.

A mes grands parents,
En témoignage de ma profonde reconnaissance.

A Dominique mon frère, et Géraldine sa moitié,
Pour tout ce qui nous unit.

A tous mes collègues et amis biologistes en particulier Franck, Seb, Tonio, Xav et Thomas....
Que notre amitié dure toujours.

Aux « berniques »,
Ils se reconnaîtront, merci pour votre accueil.

A tous mes amis, d'ici ou d'ailleurs, que je ne vois pas assez souvent.
Qu'ils sachent combien leur amitié est précieuse.

A tous ceux qui ont relu cette thèse
Merci pour votre aide.

REMERCIEMENTS
Membres du Jury

A Madame le Professeur Berthe-Marie IMBERT,

Vous me faites l'honneur d'accepter la présidence de cette thèse et de prendre le temps de juger ce travail. Soyez remerciée de l'intérêt que vous lui porterez. Merci également pour votre gentillesse et votre disponibilité.

A Monsieur le Docteur Patrice LE PAPE,

Merci pour vos précieux conseils, votre disponibilité et pour tout le temps que vous avez consacré à ce travail. Merci enfin de m'avoir fait confiance, trouvez ici le témoignage de ma profonde gratitude.

A Monsieur le Professeur CHABASSE,

Je vous remercie de l'honneur que vous me faites en jugeant ce travail. Recevez le témoignage de ma gratitude et de mon profond respect.

A Monsieur le Docteur Michel MIEGEVILLE,

Votre « dévouement » pédagogique, votre patience et votre sérieux resteront pour moi un exemple. Je vous dois l'intérêt que je porte à cette discipline. Recevez le témoignage de mon profond respect.

A Monsieur le Professeur RAFFI,

Je vous remercie de l'honneur que vous me faites en jugeant ce travail. Recevez le témoignage de ma gratitude et de mon profond respect.

A Nidia, son efficacité et ses précieux conseils furent des atouts sérieux pour la réalisation des actes techniques.

Au Dr Odile Morin, pour sa participation gracieuse, sa disponibilité et ses conseils précieux, qu'elle reçoive toute ma considération.

Au Professeur Dupont, Institut Pasteur de Paris,
Pour sa contribution.

Au Professeur Cam, Institut d'Hygiène et d'Epidémiologie de Hanoï ;
Pour l'intérêt qu'il a porté à ce travail et pour sa collaboration.

A tous les Praticiens Hospitaliers qui nous forment quotidiennement « à la pailasse », ils sont nos vrais pères.

A toute l'équipe du laboratoire de Parasitologie,
Pour son accueil « breton » chaleureux, ses conseils de pailasse et ses encouragements. Restez toujours aussi sympathique et disponible.

Au laboratoire de Virologie,
Pour m'avoir donné la possibilité d'utiliser sa sérothèque, rendant possible l'étude de nombreux sérums sélectionnés.

A Monsieur François Maloizel et au laboratoire Pfizer,
Votre participation à l'élaboration du document m'a permis de mettre en valeur ce travail, soyez-en remerciés.

SOMMAIRE.....	5
ABREVIATIONS UTILISEES.....	10
LISTE DES FIGURES...pour voir les figures, demander la thèse papier par Prêt Entre Bibliothèques	11
LISTE DES TABLEAUX.....	13
INTRODUCTION.....	15

1^{ère} PARTIE : RAPPELS BIBLIOGRAPHIQUES.....	18
---	-----------

<u>5I HISTORIQUE.....</u>	21
----------------------------------	-----------

<u>II MYCOLOGIE.....</u>	24
---------------------------------	-----------

<u>II.1 LE GENRE PENICILLIUM.....</u>	24
<u>II.1.1 MODE DE REPRODUCTION ASEXUEE.....</u>	25
<u>II.1.2 MODE DE REPRODUCTION SEXUEE.....</u>	27
<u>II.2 PENICILLIUM ET FLORE FONGIQUE ATMOSPHERIQUE.....</u>	28
<u>II.3 PENICILLIUM D'UTILISATION INDUSTRIELLE.....</u>	29
<u>II.4 PENICILLIUM MARNEFFEI : UN CAS UNIQUE PARMIS LES PENICILLIUM.....</u>	31
<u>II.4.1 PAR SA NICHE ECOLOGIQUE.....</u>	31
<u>II.4.2 PAR SON CARACTERE DIMORPHIQUE.....</u>	31
<u>II.4.3 PAR SON MODE DE REPRODUCTION PARASITAIRE.....</u>	32
<u>II.4.4 PAR SON POUVOIR PATHOGENE.....</u>	33
<u>II.5 LA CULTURE.....</u>	35
<u>II.5.1 LES MILIEUX DE CULTURE.....</u>	35
<u>II.5.1.1 Pour obtenir la forme filamenteuse.....</u>	35
<u>II.5.1.2 Pour obtenir la forme levure.....</u>	35
<u>II.5.2 LES CONDITIONS DE CULTURE.....</u>	35
<u>II.5.3 ASPECT MACROSCOPIQUE DES CULTURES.....</u>	36
<u>II.5.3.1 A température ambiante.....</u>	36
<u>II.5.3.2 A température corporelle.....</u>	37
<u>II.5.4 ASPECT AU MICROSCOPE OPTIQUE.....</u>	37
<u>II.5.4.1 A température ambiante.....</u>	37
<u>II.5.4.2 A température corporelle.....</u>	38
<u>II.5.5 ASPECT AU MICROSCOPE ELECTRONIQUE.....</u>	38

<u>III EPIDEMIOLOGIE.....</u>	39
--------------------------------------	-----------

<u>III.1</u>	<u>REPARTITION GEOGRAPHIQUE</u>	39
<u>III.2</u>	<u>MODE DE CONTAMINATION</u>	42
<u>III.2.1</u>	<u>CONTAMINATION DE L'HOMME</u>	42
<u>III.2.1.1</u>	<u>Inhalation de spores</u>	42
<u>III.2.1.2</u>	<u>Inoculation de spores ou de levures</u>	42
<u>III.2.1.3</u>	<u>Ingestion de spores ou de levures</u>	43
<u>III.2.2</u>	<u>CONTAMINATION DU RAT DU BAMBOU</u>	43
<u>III.3</u>	<u>SOURCE DE CONTAMINATION</u>	44
<u>III.3.1</u>	<u>A PARTIR D'HOMMES EUX-MEMES ATTEINTS</u>	44
<u>III.3.2</u>	<u>A PARTIR DU RAT DU BAMBOU</u>	44
<u>III.3.3</u>	<u>A PARTIR DU SOL</u>	44
<u>III.4</u>	<u>FACTEURS FAVORISANTS</u>	45
<u>III.4.1</u>	<u>TERRAIN</u>	45
<u>III.4.1.1</u>	<u>L'âge</u>	45
<u>III.4.1.2</u>	<u>Le sexe</u>	45
<u>III.4.1.3</u>	<u>Le terrain héroïnomanie</u>	45
<u>III.4.1.4</u>	<u>L'alcoolisme chronique</u>	46
<u>III.4.2</u>	<u>FACTEURS IATROGENES</u>	46
<u>III.4.3</u>	<u>PATHOLOGIES SOUS-JACENTES</u>	47

IV CLINIQUE 49

<u>IV.1</u>	<u>INCUBATION</u>	49
<u>IV.2</u>	<u>MANIFESTATIONS CLINIQUES</u>	49
<u>IV.2.1</u>	<u>MANIFESTATIONS GENERALES</u>	50
<u>IV.2.2</u>	<u>MANIFESTATIONS RESPIRATOIRES</u>	50
<u>IV.2.3</u>	<u>MANIFESTATIONS CUTANEO-MUQUEUSES</u>	51
<u>IV.2.4</u>	<u>AUTRES MANIFESTATIONS</u>	52
<u>IV.3</u>	<u>DIFFERENCE ENTRE SUJETS VIH+ ET « IMMUNOCOMPETENTS »</u>	53
<u>IV.4</u>	<u>EVOLUTION ET PRONOSTIC</u>	53
<u>IV.5</u>	<u>DIAGNOSTIC CLINIQUE DIFFERENTIEL</u>	55
<u>IV.5.1</u>	<u>AVEC LES AUTRES MYCOSES « EXOTIQUES »</u>	55
<u>IV.5.1.1</u>	<u>Histoplasmosse américaine ou Histoplasmosse « à petites formes »</u>	55
<u>IV.5.1.2</u>	<u>Histoplasmosse africaine ou Histoplasmosse « à grandes formes »</u>	56
<u>IV.5.1.3</u>	<u>Coccidioïdomycose</u>	56
<u>IV.5.1.4</u>	<u>Paracoccidioïdomycose</u>	57
<u>IV.5.1.5</u>	<u>Blastomycose</u>	57
<u>IV.5.1.6</u>	<u>Sporotrichose</u>	57
<u>IV.5.1.7</u>	<u>Les nouvelles mycoses d'importation</u>	58
<u>IV.5.2</u>	<u>AVEC LES MYCOSES SYSTEMIQUES COSMOPOLITES</u>	58
<u>IV.5.2.1</u>	<u>La Cryptococcose</u>	59
<u>IV.5.2.2</u>	<u>Les Candidoses profondes</u>	59
<u>IV.5.2.3</u>	<u>Les Aspergilloses</u>	60
<u>IV.5.2.4</u>	<u>Les mycoses viscérales cosmopolites émergentes</u>	62
<u>IV.5.3</u>	<u>AVEC LA TUBERCULOSE</u>	62
<u>IV.5.4</u>	<u>AVEC LA LEISHMANIOSE VISCERALE</u>	63
<u>IV.5.5</u>	<u>AVEC LA SARCOIDOSE</u>	64

V DIAGNOSTIC PARACLINIQUE 65

VI DIAGNOSTIC BIOLOGIQUE 65

<i>VI.1</i>	<i>CONTEXTE BIOLOGIQUE</i>	65
<i>VI.2</i>	<i>DIAGNOSTIC MYCOLOGIQUE</i>	66
<i>VI.2.1</i>	<i>LES PRELEVEMENTS</i>	66
<i>VI.2.2</i>	<i>L'EXAMEN DIRECT:</i>	67
<i>VI.2.3</i>	<i>LA CULTURE</i>	68
<i>VI.2.3.1</i>	<i>Aspect macroscopique</i>	68
<i>VI.2.3.2</i>	<i>Aspect microscopique</i>	68
<i>VI.2.3.3</i>	<i>L'interprétation</i>	69
<i>VI.2.4</i>	<i>L'INOCULATION A L'ANIMAL</i>	70
<i>VI.3</i>	<i>DIAGNOSTIC ANATOMOPATHOLOGIQUE</i>	72
<i>VI.4</i>	<i>DIAGNOSTIC IMMUNOLOGIQUE</i>	74
<i>VI.4.1</i>	<i>LES PRELEVEMENTS</i>	74
<i>VI.4.2</i>	<i>METHODES DIAGNOSTIQUES BASEES SUR LA DETECTION D'ANTICORPS</i>	74
<i>VI.4.2.1</i>	<i>Détection par technique d'immunodiffusion</i>	75
<i>VI.4.2.2</i>	<i>Détection par technique d'immunofluorescence</i>	76
<i>VI.4.2.3</i>	<i>Détection par techniques immunoenzymatiques</i>	76
<i>VI.4.3</i>	<i>METHODES DIAGNOSTIQUES BASEES SUR LA DETECTION D'ANTIGENES CIRCULANTS</i>	77
<i>VI.4.3.1</i>	<i>Détection par des hyperimmunsérums</i>	78
<i>VI.4.3.2</i>	<i>Détection par des anticorps monoclonaux</i>	78
<i>VI.4.3.3</i>	<i>Détection d'antigènes urinaires</i>	78
<i>VI.4.4</i>	<i>COMBINAISON DE LA DETECTION D'ANTIGENES ET D'ANTICORPS</i>	79
<i>VI.5</i>	<i>DIAGNOSTIC PAR BIOLOGIE MOLECULAIRE</i>	81

VII TRAITEMENT 82

2^{ème} PARTIE: MATERIELS ET METHODE

VIII LA TECHNIQUE E.L.I.S.A. 85

<i>VIII.1</i>	<i>PROTOCOLE OPERATOIRE</i>	85
<i>VIII.1.1</i>	<i>PRESENTATION DE LA TROUSSE E.L.I.S.A.</i>	85
<i>VIII.1.2</i>	<i>PREPARATION DES REACTIFS AVANT USAGE</i>	85
<i>VIII.1.3</i>	<i>MODE OPERATOIRE</i>	86
<i>VIII.1.3.1</i>	<i>Etape I : Incubation des sérums échantillons</i>	86
<i>VIII.1.3.2</i>	<i>Etape II : Incubation avec le conjugué</i>	86

VIII.1.3.3	<u>Etape III : Incubation avec le substrat</u>	87
VIII.1.3.4	<u>Etape IV : Mesure de la Densité Optique</u>	87
VIII.1.3.5	<u>Etape IV : Expression des résultats-Interprétation</u>	87
VIII.2	<u>CONTROLE DE QUALITE</u>	87
VIII.2.1	<u>ETUDE DE REPETABILITE</u>	88
VIII.2.2	<u>ETUDE DE REPRODUCTIBILITE</u>	88
VIII.3	<u>ETUDE DE LA SENSIBILITE</u>	88
VIII.4	<u>ETUDE DE LA SPECIFICITE</u>	88
VIII.4.1	<u>SUR SERUMS NEGATIFS</u>	89
VIII.4.2	<u>ETUDE DES REACTIONS CROISEES</u>	89
VIII.4.2.1	<u>Candidoses profondes</u>	90
VIII.4.2.2	<u>Cryptococcoses</u>	90
VIII.4.2.3	<u>Aspergilloses</u>	91
VIII.4.2.4	<u>Histoplasmoses</u>	91
VIII.4.2.5	<u>Fusariose</u>	91

IX HEMAGGLUTINATION ET IMMUNO-ELECTROPHORESE...93

IX.1	<u>L'HEMAGGLUTINATION INDIRECTE</u>	93
IX.1.1	<u>PRINCIPE</u>	93
IX.1.2	<u>MODE OPERATOIRE</u>	94
IX.1.3	<u>INTERPRETATION</u>	94
IX.2	<u>L'IMMUNOELECTROPHORESE</u>	94
IX.2.1	<u>PRINCIPE</u>	94
IX.2.2	<u>MODE OPERATOIRE</u>	95
IX.2.3	<u>INTERPRETATION</u>	95

X L'IMMUNOEMPREINTE OU WESTERN BLOT96

X.1	<u>PRINCIPE DE LA TECHNIQUE</u>	96
X.2	<u>PREPARATION DE L'ANTIGENE METABOLIQUE</u>	96
X.3	<u>PROTOCOLE OPERATOIRE</u>	97
X.3.1	<u>ELECTROPHORESE</u>	97
X.3.2	<u>ELECTROTRANSFERT</u>	98
X.3.3	<u>PREPARATION DES BANDELETTES</u>	98
X.3.4	<u>IMMUNOEMPREINTE</u>	98
X.3.4.1	<u>Etape I : Lavage des bandelettes réactives</u>	99
X.3.4.2	<u>Etape II : Incubation des sérums échantillons</u>	99
X.3.4.3	<u>Etape III : Incubation avec le conjugué</u>	99
X.3.4.4	<u>Etape IV : Incubation avec le substrat et révélation</u>	99
X.3.4.5	<u>Etape V : Calcul des masses moléculaires apparentes</u>	100

XI APPLICATION DES OUTILS DIAGNOSTIQUES A UNE ETUDE SEROEPIDEMIOLOGIQUE À HANOI..... 101

3^{ème} PARTIE:RESULTATS ET DISCUSSIONS

<u>I</u>	<u>RESULTATS DES CULTURES</u>	103
<i>I.1</i>	<i>CULTURE A 22°C</i>	103
<i>I.2</i>	<i>CULTURE A 30°C</i>	104
<i>I.3</i>	<i>CULTURE A 37°C</i>	108
<u>II</u>	<u>EVALUATION DE L' E.L.I.S.A.</u>	112
<i>II.1</i>	<i>ETUDE DES PERFORMANCES</i>	112
<i>II.1.1</i>	<i>ETUDE DE REPETABILITE</i>	112
<i>II.1.2</i>	<i>ETUDE DE REPRODUCTIBILITE</i>	113
<i>II.2</i>	<i>ETUDE DE LA SENSIBILITE</i>	114
<i>II.3</i>	<i>ETUDE DE LA SPECIFICITE</i>	117
<i>II.3.1</i>	<i>SUR SERUMS NEGATIFS</i>	117
<i>II.3.2</i>	<i>ETUDE DES REACTIONS CROISEES</i>	119
<i>II.3.2.1</i>	<i>Etude des réactions croisées avec <i>Candida sp</i></i>	119
<i>II.3.2.2</i>	<i>Etude des réactions croisées avec <i>Cryptococcus neoformans</i></i>	121
<i>II.3.2.3</i>	<i>Etude des réactions croisées avec <i>Histoplasma capsulatum</i></i>	124
<i>II.3.2.4</i>	<i>Etude des réactions croisées avec <i>Aspergillus sp</i></i>	125
<i>II.3.2.5</i>	<i>Etude des réactions croisées avec <i>Fusarium oxysporum</i></i>	128
<i>II.4</i>	<i>CONCLUSIONS</i>	130
<u>III</u>	<u>MISE AU POINT DU WESTERN BLOT</u>	132
<i>III.1</i>	<i>CHOIX DE L'ANTIGENE</i>	132
<i>III.2</i>	<i>ETUDE DE L'ANTIGENE METABOLIQUE</i>	133
<i>III.2.1</i>	<i>CONCENTRATION PROTEIQUE</i>	134
<i>III.2.2</i>	<i>PROFIL ELECTROPHORETIQUE</i>	134
<i>III.3</i>	<i>EVALUATION DES PERFORMANCES</i>	136
<i>III.3.1</i>	<i>ETUDE DE LA SENSIBILITE</i>	136
<i>III.3.2</i>	<i>ETUDE DE LA SPECIFICITE</i>	137
<u>IV</u>	<u>ETUDE SEROEPIDEMIOLOGIQUE EN ZONE D'ENDEMIIE</u>	142
<i>IV.1</i>	<i>RESULTATS DU TEST DE DEPISTAGE</i>	142
<i>IV.2</i>	<i>RESULTAT DU WESTERN BLOT DE CONFIRMATION</i>	146

CONCLUSION

BIBLIOGRAPHIE

ANNEXES

ABREVIATIONS UTILISEES

AAE = Alvéolite Allergique Extrinsèque.

ABPA = Aspergillose Broncho-Pulmonaire Allergique.

AEG = Altération de l'Etat Général.

APCN = Aspergillose Pulmonaire Chronique Nécrosante.

API = Aspergillose Pulmonaire Invasive.

APO = Aspergillome.

BHI = Brain-Heart Infusion

BPCO = Broncho-Pneumopathie Chronique Obstructive

BSA = Sérum Albumine Bovine

CHAI et **AHAI** = Hémmaglutination Indirecte Aspergillaire et Candidosique

CV = Coefficient de Variation

D.O. = Densité Optique

ELISA = Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay.

IEA et **IEC** = ImmunoElectrophorèse Aspergillaire et Candidosique

IgM = Immunoglobuline d'isotype M

INHE = Institut National d'Hygiène et d'Epidémiologie

kDa = kiloDaltons = g/mol

LBA = liquide de Lavage Broncho-Alvéolaire.

LCR = Liquide Céphalo-Rachidien

MGG = May-Grundwald-Giemsa

NC = Non Communiqué

PBS = Phosphate Buffer Saline

PCR = Polymérase Chain Réaction

SDS = Sodium Dodécyl Sulfate

SIDA = Syndrome d'ImmunoDéficiency Acquis

TEMED = N,N,N',N', Tétraméthyl-ÉthylèneDiamine

TRIS = Tris[hydroxyméthyl]aminométhane

VIH = Virus de l'Immunodéficience Humaine

LISTE ET LEGENDE COMPLETES DES FIGURES.

- Figure n°1 : Détail d'un pinceau de *Penicillium sp* (conidiophore triverticillé).....p 24
- Figure n°2 : Cycle de reproduction asexuée des *Penicillium sp*.....p 24
- Figure n°3 : Classification des *Penicillium* en fonction des ramifications du conidiophore..... p 25
- Figure n°4 : Aspect macroscopique et microscopique de quelques *Penicillium* saprophytes.....p 28
- Figure n°5 : Aspect levuriforme de *Penicillium marneffe* en microscopie optique (bleu lactophénol).....p 30
- Figure n°6 : Stade levuriforme avec septation centrale de *Penicillium marneffe* en culture sur milieu BHIp 30
- Figure n°7 : Aspect macroscopique d'une culture de *Penicillium marneffe* à température ambiante (Sabouraud J 15).....p 35
- Figure n°8 : Répartition géographique des zones d'endémies de la pénicilliose à *Penicillium. marneffe*.....p 38
- Figure n°9 : Aspect le plus typique de lésions cutanées de pénicilliose à *Penicillium marneffe*.....p 49
- Figure n°10 : Profil d'immunoélectrophorèse, exemple de deux sérums positif en aspergillose.....p 93
- Figure n°11 : Aspect macroscopique de *Penicillium marneffe* à 22°C.....p104
- Figure n°12 : Aspect macroscopique de *Penicillium marneffe* à 30°C.....p 106
- Figure n°13 : Aspect macroscopique de *Penicillium marneffe* à 37°C.....p 108
- Figure n°14 : Représentation graphique de l'étude de répétabilité.....p 112
- Figure n°15 : Représentation graphique de l'étude de reproductibilité.....p 113.
- Figure n°16 : Représentation graphique des index des 36 sérums négatifs...p 117.
- Figure n°17 : Récapitulatifs des résultats sérologiques des 92 sérumsp129.

Figure n°18 : Immunoempreinte des antigènes **somatiques** de phase levure après réaction avec des sérums de patients atteints de pénicilliose (I) après réaction de sérums de patients atteints de candidose (CAN) et d'aspergillose broncho-pulmonaire allergique (ASP).....p.131

Figure n°19 : Profil électrophorétique de l'antigène métabolique (11^{ème} Jour)....p133

Figure n°20 : : Immunoempreinte des antigènes métaboliques de la phase levure de *Penicillium marneffe* après réaction avec deux sérums de patient atteints de pénicilliose d'importation : (1) patient Rai, (2) patient Pit.....p 135

Figure n°21: Profil d'immunoblot des pools "d'aspergillose" (1) et de "candidose" (2)...p137

Figure n°22 : Profils immunoblot de l'étude de spécificité du Western Blot

(1)= Pool de sérum négatif, (2 et 3)= ABPA 1 et 2, (4)=API 3, (5)=APO 6, (6, 7 et 8)=H 2, H 3 et H 5, (9et 10)=*P.m* positif, (11, 12 et 13)= C 8, C 2 et C10, (14, 15 et 16)=CRC 2, CRC 3 et CRC 4, (17)=CRP.....p 138

Figure n°23: Représentation graphique des index de l'étude séroépidémiologique.....p143.

Figure n°24: Immunoempreinte des sérums vietnamiens positif ou en zone grise pour l'ELISA.....p 144.

Figure n°25: Profil western blot des sérums issus des nouveaux cas de pénicilliose ..p145

LISTE DES TABLEAUX

Tableau I : Infections à <i>P. marneffe</i> i diagnostiquées en dehors de la zone d'endémie (cas d'importation répertoriés).....	22
Tableau II : Aspect macroscopique de <i>Penicillium marneffe</i> i à 22°C.....	103
Tableau III : Aspect macroscopique de <i>Penicillium marneffe</i> i à 30°C.....	105
Tableau IV : Aspect macroscopique de <i>Penicillium marneffe</i> i à 37°C.....	107.
Tableau V : Valeurs index de l'étude de répétabilité.....	111
Tableau VI : Valeurs index de l'étude de reproductibilité.....	112
Tableau VII : Caractéristiques des pénicillioses prouvées et valeurs index des sérums correspondants.....	114
Tableau VIII : Valeurs index des sérums négatifs.....	117
Tableau IX : : Résultats sérologiques de 11 sérums "candidoses profondes"	119.
Tableau X : Caractéristiques de la cryptococcose pulmonaire et des huit cryptococcoses neuroméningées sélectionnées.....	121
Tableau XI : Caractéristiques des quatre cryptococcoses cutanées retenues	121
Tableau XII : Résultats sérologiques des 13 sérums de cryptococcoses.....	122
Tableau XIII : Résultats sérologiques des cinq "sérums d'histoplasmoses.....	123"
Tableau XIV : Résultats sérologiques des sept "aspergilloses invasives.....	124"
Tableau XV : Résultats sérologiques des cinq "aspergilloses chroniques nécrosantes"	125
Tableau XVI : Résultats sérologiques des six aspergillose broncho pulmoba allergique.....	126
Tableau XVII : Résultats sérologiques des six "aspergillomes'	127'
Tableau XVIII : Résultat sérologique de la "fusariose"	127
Tableau XIX : Concentration en protéines en fonction du temps de culture.....	132
Tableau XX : Concentration protéique de trois lots d'antigènes.....	134

Tableau XXI: Constitution de deux pools immunologiquement très positifs.....	136
Tableau XXII : Résultats sérologiques et renseignement cliniques des 59 patients dont la présentation est compatible avec le diagnostic de pénicilliose.....	141

I N T R O D U C T I O N

Chez le patient VIH+ du Sud-est asiatique, la pénicilliose à *Penicillium marneffe* est l'une des plus fréquentes infections opportunistes. Cette mycose exotique, encore rare, connaît une expansion galopante en relation avec le développement de l'épidémie de SIDA. *Penicillium marneffe* est l'unique *Penicillium* dimorphique et n'a actuellement été retrouvé, à l'état parasitaire, que chez un seul autre mammifère, le rat du Bambou. Filamenteux dans sa forme saprophyte mais lévuriforme dans sa forme parasitaire, il possède un pouvoir pathogène sur le système réticulo-histiocytaire principalement des patients à immunité cellulaire déficiente. Quelques cas ont toutefois été décrits chez le patient immunocompétent.

La symptomatologie peu spécifique retarde la prise en charge du patient et explique que la pénicilliose soit trop souvent étiquetée tuberculose ou histoplasmosse. Or c'est une pathologie de très mauvais pronostic où la thérapeutique antifongique, pour être efficace, doit être instaurée de façon précoce. C'est pourquoi l'intérêt d'un diagnostic immunologique présomptif est incontestable. Prenant en compte ces considérations, nous avons réalisé, dans un premier temps une étude succincte portant sur la mise en évidence du caractère dimorphique, élément clé du diagnostic mycologique de ce champignon. Dans un second temps, nous avons participé à la mise en place d'une stratégie de diagnostic immunologique de la pénicilliose, initiée dans le laboratoire de Parasitologie et de Mycologie médicale de l'UFR de Pharmacie de Nantes. Celle-ci comporte une technique ELISA de dépistage et une technique d'immunoempreinte ou western blot de confirmation.

Notre étude concerne l'évaluation des performances du test ELISA en terme de répétabilité, reproductibilité, sensibilité et spécificité. Puis nous présenterons la mise au point d'un western blot utilisant l'antigène métabolique de *P. marneffe*. Nous présenterons enfin l'utilisation de cette stratégie, en zone d'endémie, dans une étude prospective de séroprévalence à l'institut d'hygiène et d'épidémiologie de Hanoi, bénéficiant d'une antériorité de collaboration avec le Dr Miegville.

Après des rappels bibliographiques concernant la pénicilliose à *Penicillium marneffe*, nous présenterons, dans une deuxième partie, la méthodologie utilisée pour réaliser notre étude. Dans une troisième partie, nous présenterons et discuterons les résultats de notre travail.

Première partie : RAPPELS
BIBLIOGRAPHIQUES

I HISTORIQUE

En 1956, *Penicillium marneffe* est isolé, fortuitement, pour la première fois par Capponi chez des rats du bambou (*Rhizomys sinensis*) capturés sur les hauts plateaux du Nord-Vietnam et destinés à l'expérimentation de l'institut Pasteur d'Indochine à Dalat, Sud-Vietnam (Capponi et al., 1956).

Le champignon isolé de ces rats, morts spontanément en captivité de **réticulose** macrophagique diffuse avec splénomégalie et ascite, est inoculé à une souris. Rats et souris sont alors envoyés pour expertise à l'institut Pasteur de Paris où le Pr Segretain **identifie** *Penicillium marneffe* comme une nouvelle espèce. Il la nomme *marneffe* en hommage au Dr Henri Marneffe, alors directeur de l'institut Pasteur d'Indochine.

Les travaux du Pr Segretain mettent en évidence le grand pouvoir pathogène de ce champignon (réticulose semblable à l'histoplasmosse ou à la leishmaniose) chez le rat, la souris, le hamster mais son absence chez le lapin et le cochon de Guinée. C'est également ces travaux qui, **en 1959**, mettent en évidence le **pouvoir pathogène sur l'Homme**, de façon accidentelle, puisque Segretain lui-même se pique le doigt avec une aiguille destinée à inoculer le champignon à des hamsters. Il développe alors un nodule au point de piqûre (au douzième jour) suivi de lymphangite et d'adénopathie axillaire d'où il isole le *Penicillium*. Il se traite avec succès par nystatine (tout premier antifongique *per os* qui venait d'être commercialisé) pendant 30 jours avec 20 millions d'Unités, c'est-à-dire 13 fois la dose recommandée. La guérison est cependant plutôt à mettre sur le compte de l'immunocompétence puisqu'il sera montré plus tard la très faible absorption digestive de la nystatine (Segretain, 1959).

Il faut attendre **1973** pour que la **toute première infection humaine à *Penicillium marneffe*** « naturellement » acquise soit décrite par Di Salvo (DiSalvo et al., 1973). Le diagnostic est posé chez un prêtre de 61 ans vivant en Caroline du Sud,

ayant voyagé au Vietnam et en Asie du Sud-est, dont la maladie de Hodgkin avait été traitée par radiothérapie et splénectomie (splénectomie ayant permis une découverte fortuite de *P. marneffe*).

Onze ans plus tard, **en 1984** est décrit par Pautler (Pautler et al., 1984) le **deuxième cas de pénicilliose importé** aux U.S.A. chez un autre américain de 59 ans revenant du Sud-est asiatique et présentant des hémoptysies récurrentes (pneumectomie avec granulome et mise en culture positive). C'est cette même année que sont publiés les cinq **premiers cas autochtones** à Bangkok (Thaïlande) diagnostiqués en fait entre 1972 et 1982. Ces **cinq Thaïlandais** atteints de pathologies sous-jacentes lourdes (trois tuberculoses, un lupus érythémateux disséminé et un lymphome) présentaient tous une fièvre, des adénopathies et des lésions cutanées à type de nodules, papules ulcérées ou d'abcès sous-cutanés résultant d'embolisation septique (Jayanetra et al., 1984).

La connaissance de ce nouveau pathogène diffusant, c'est **en 1985**, après réexpertise, que sont publiés les **huit premiers cas chinois** initialement étiquetés histoplasmoses entre 1964 et 1983 dans la province du Guangxi, Chine du Sud (où les ruraux consomment du rat de bambou) (Deng and Connor, 1985). Cette année là est aussi déclaré le **premiers cas à Hong-Kong** (So et al., 1985).

En 1986, Deng montre que la plupart des rats du bambou sont infectés par *P. marneffe* au niveau pulmonaire, splénique, hépatique ou ganglionnaires digestifs (100% des individus de l'espèce dominante au Vietnam : *Rhizomys sinensis* contre 66% des *Rhizomys pruinosus* en chine et 10% des *Cannomys badius* en Thaïlande) (Deng et al., 1986).

Les **premières associations PENICILLIUM-INFECTION VIH** après voyage dans une zone d'endémie, sont décrites **en 1988** :

- chez un Américain par Piehl (Piehl et al., 1988).

- chez un 2^{ème} Français, ayant voyagé en Indonésie (Ancelle et al., 1988).
- chez un Anglais ayant voyagé en Chine (Piehl et al., 1988).

Dès l'année suivante, en **1989**, cette association *PENICILLIUM-VIH+* est publiée chez un « autochtone » du Sud-est asiatique puis c'est « l'explosion » :

Plus de 2000 cas de pénicilliose dans le Sud-est asiatique :

► **1173 cas thaïlandais** rien que dans la région de Chiang Mai de 91 à 97, avec une croissance parallèle à celle du SIDA, au point d'atteindre dans les pays les plus endémiques le rang de 3^{ème} maladie opportuniste derrière la pneumocystose et la tuberculose, avec plus de 10% des patients VIH+ concernés (Wong and Lee, 1998).

► L'analyse des **200 premiers cas de Hong Kong** révèle qu'il a fallu 10 ans pour les 100 premiers contre 2 ans pour les 100 suivants (Wong and Lee, 1998). Plus de **quarante cas indiens** en moins de deux ans (Avril 98, Novembre 99) alors que seulement quatre étaient décrits avant 1998 (Ranjana et al., 2002).

► Plus d'une trentaine de cas d'importation (chez des sujets non asiatiques VIH+) sont déjà décrits avec notamment **11 nouveaux cas français**. (A noter que les cas occidentaux rapportés sont surtout européens et plus majoritairement français, bien devant les cas américains, anglais et italiens. Le tableau I répertorie les différentes pénicillioses d'importation, on y retrouve notamment les 13 cas français sur les 37 décrits en dehors des zones d'endémie.

Tableau n°I : Infections à *P. marneffe* diagnostiquées en dehors de la zone d'endémie

Année	Nbre	VILLE/PAYS	ZONE de CONTAMINATION	Référence	VIH
1959	1	Paris/France	Vietnam (Dalat)	(Drouhet, 1993)	-
1973	1	Colombia/USA	Asie du Sud-est	(Drouhet and Dupont, 1995)	-
1984	1	Tampa/USA	Extrême orient		-

1988	1	Londres/GB	Chine du Sud-est	(Peto et al., 1988)	+
	1	Chicago/USA	NC	(Piehl et al., 1988)	+
	1	Paris/France	Indonésie	(Ancelle et al., 1988)	+
1989	1	Milan/Italie	Thaïlande	(Coen et al., 1989)	+
	1	Paris/France	Thaïlande, Inde, Birmanie	(Stern et al., 1989)	+
1990	1	Rotterdam/P.Bas	Thaïlande	(Drouhet, 1993)	+
1991	1	Paris/France	Thaïlande	(Drouhet, 1993)	+
	1	Paris/France	Asie du sud-est, Inde	(Hilmarsdottir et al., 1993)	+
	1	Paris/France	Birmanie, Laos, Thaïlande		+
	1	Alberta/Canada	Thaïlande	(Drouhet and Dupont, 1995)	-
	1	Otawa/Canada	Chine		-
1992	1	Rotterdam/P.Bas	Sumatra (Indonésie)		+
	1	Sidney/Australie	Hong-Kong		+
1993	1	Paris/France	Pas de zone d'endémie		+
	1	Italie	Thaïlande	(Viviani et al., 1993)	+
	1	Australie	Thaïlande, Birmanie	(Heath et al., 1995)	+
1994	2	Canton/USA	NC	(Borradori et al., 1994)	NC
	2	Genève/Suisse	Thaïlande, Chine	(Remadi et al., 1995)	+
1995	1	Elbeuf/France	Sri Lanka, Thaïlande	(Grise et al., 1997)	+
	1	Elbeuf/France	Afrique Tropicale +NC		NC
1997	1	Alès/France	Thaïlande (Chiang mai)	(Lachaud et al., 1998)	+
	1	Huddinge/Suède	Thaïlande	(Julander and Petrini,	+
1998	2	Anvers/Belgique	Thaïlande	(Depraetere et al., 1998)	+
	1	Nantes/France	Thaïlande (Chiang mai)	(Miegeville et al., 1998)	+
	1	Oxford/GB	Hong-Kong	(McShane et al., 1998)	+
1999	1	Heidelberg/Allem	Thaïlande	(Rimek et al., 1999)	+
	1	Paris/France	Thaïlande (Chiang mai)	(Valeyrie et al., 1999)	+
2000	1	Hambourg/Allema	Ghana !!!	(Lo et al., 2000)	+
	1	Nice/France	Asie du Sud-est	(Rosenthal et al., 2000)	+
	1	Manchester/GB	Thaïlande	(Vilar et al., 2000)	+
2001	1	Baltimore/USA	NC	(Nelson and Sirisanthana,	+
2002	1	Southampton/GB	Thaïlande	(Bateman et al., 2002)	+

II MYCOLOGIE

II.1 LE GENRE *PENICILLIUM*

Ce sont des champignons microscopiques (« micromycètes ») communément appelés « moisissures », largement répandus dans la nature à l'état de saprophyte. Leur thalle se développe de façon centrifuge aux dépens des débris organiques, qu'ils contribuent à dégrader. Ces moisissures, véritables agglomérats de filaments mycéliens et d'organes fructifères, sont capables de se développer sur différents substrats organiques (sol, herbe, arbre...) et notamment sur les denrées alimentaires. C'est donc à partir de leurs habitats naturels que ces champignons dispersent une quantité extraordinaire de spores qui, véhiculées par le vent, sont présentes dans l'air de manière permanente.

Il s'agit de champignons filamenteux **cloisonnés** ou « septés » (par opposition aux zygomorphes comme les mucors) et à cytoplasme **hyalin** d'où leur appartenance aux **Hyphomycètes** (par opposition aux hyphes pigmentés des champignons dématiés comme *Cladosporium* ou *Alternaria*).

II.1.1 MODE DE REPRODUCTION ASEEXUEE

Le mode de reproduction asexuée prédomine et les **spores** ou **conidies** sont synthétisées par une cellule conidiogène allongée dont la forme évoque une amphore ou une bouteille renflée au milieu appelée : **phialide** (figure 1), ce qui les fait appartenir aux **phialosporés** comme les *Aspergillus*. A la différence des ceux-ci, les phialides ne sont pas disposées sur une « tête aspergillaire » mais disposées en verticille à l'extrémité de stipes terminaux ou latéraux non renflés évoquant l'aspect d'un pinceau, « penicillium » en latin (figure 2).

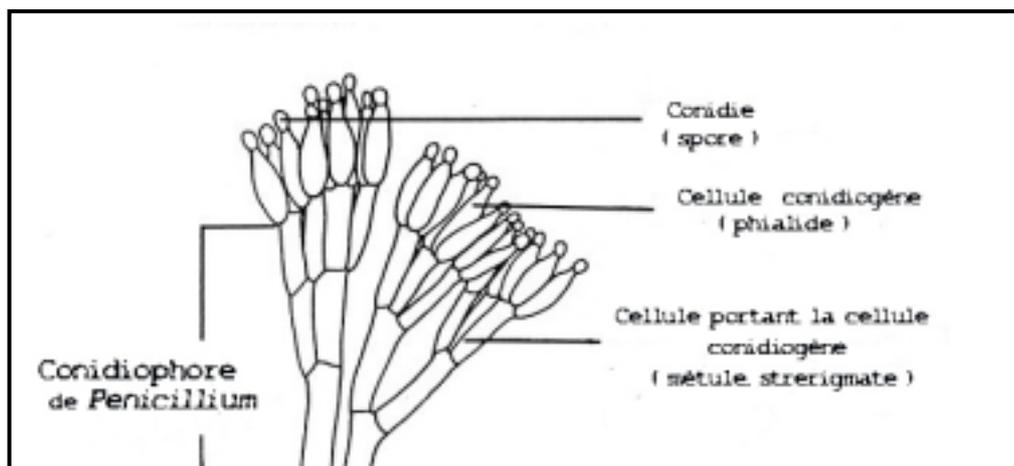


Figure n°1 : Détail d'un "pinceau" de *Penicillium* sp (conidiophore triverticillé).

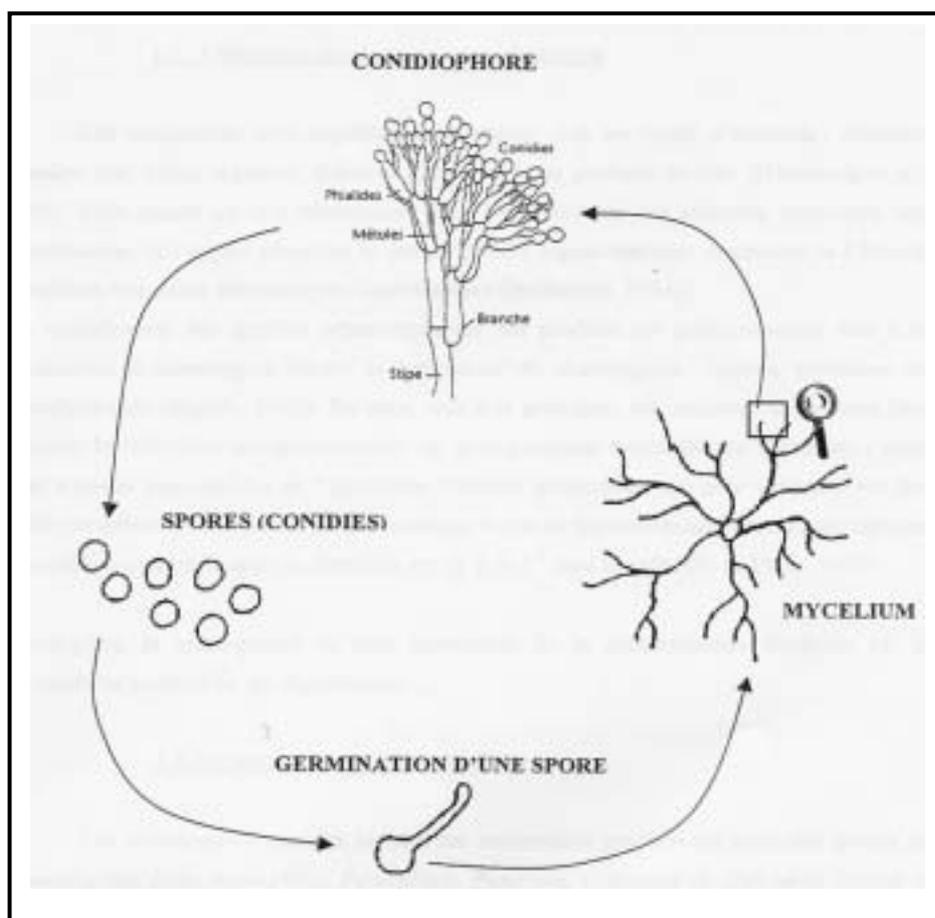


Figure n°2 : Cycle de reproduction asexuée des *Penicillium*.

En fonction des types de pinceaux, on distingue trois groupes de *Penicillium* : Conidiophore simple ou ramifié avec insertion directe des phialides pour les monoverticillés, insertion en verticille par l'intermédiaire d'une rangée de métules, elles-mêmes disposées en verticille, pour les biverticillés. Quant à l'insertion des

phialides par l'intermédiaire de deux rangées successives, elle caractérise les *Penicillium* triverticillés (figure 3).

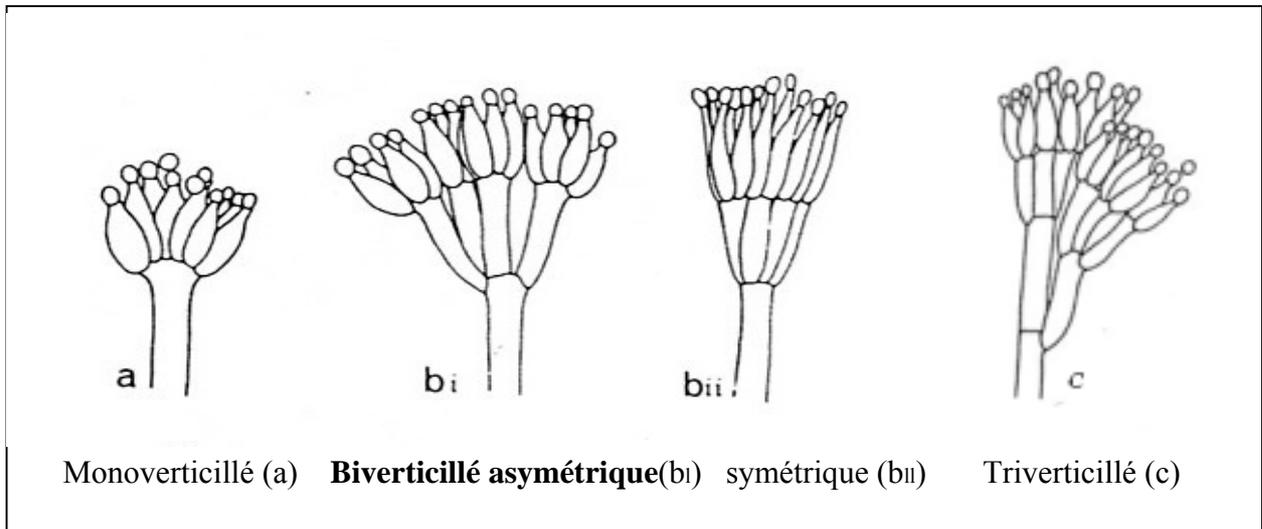


Fig n°3: Classification des *Penicillium* en fonction des ramifications du conidiophore.

II.1.2 MODE DE REPRODUCTION SEXUEE

Pour la plupart des espèces, il n'est pas connu, ce qui les fait appartenir au phylum des **deutéromycètes** (forme sexuée ou « téléomorphe » inconnue). Leur place taxonomique n'est donc pas totalement établie (puisque basée sur la reproduction sexuée) et c'est d'ailleurs pour cela que ce groupe artificiel est également [désigné/appelé] **champignon imparfait** ou « *Fungi imperfecti* ». Pour quelques uns, un cycle sexué avec ascospores a été découvert, ils sont alors classés parmi les *Talaromyces* (ou « *Eupenicillium* »).

Il faut d'ailleurs noter que **presque tous les champignons pathogènes ou opportunistes** en mycologie médicale appartiennent à ces deutéromycètes qui sont divisés en trois classes :

- ▶ Les levures ou **blastomycètes** avec notamment tous les *Candida*, *Cryptococcus* et autres *Trichosporon* et *Blastomyces*...
- ▶ Les champignons filamenteux ou « **hyphomycètes** » avec notamment *Aspergillus*, *Fusarium*, *Acremonium*, *Scedosporium*, *Alternaria* et *Penicillium*...
- ▶ Enfin les **coelomycètes**, thalle filamenteux ou levuriforme où les spores sont formées dans des pycnides comme *Hendersonula toruloida*.

Actuellement **plus de 220 espèces de *Penicillium*** ont été identifiées et sont très répandues. C'est ainsi que nous inhalons régulièrement des spores de *Penicillium* puisque ces derniers appartiennent à la flore fongique atmosphérique. A noter que le taux d'exposition aux spores peut être très élevé dans certains contextes professionnels. Nous ingérons même occasionnellement la forme filamenteuse, très utilisée dans l'industrie agro-alimentaire (fromage, saucisson).

II.2 *PENICILLIUM* ET FLORE FONGIQUE ATMOSPHERIQUE.

De façon **cosmopolite et permanente**, l'air atmosphérique renferme de nombreuses spores fongiques et leur présence peut parfois se manifester par le syndrome des « bâtiments malsains » (« sick-building syndrome »). C'est toujours en **période estivale** que leur **nombre est maximal**. Les différentes enquêtes aéromycologiques révèlent que les spores de *Penicillium* viennent en troisième position derrière celles des champignons « noirs » (dématiés) : *Cladosporium* et *Alternaria* et devant les spores aspergillaires (les plus souvent citées comme « contaminant des étuves »).

En pratique, citons *P. frequentans* (*Penicillium* monoverticillé), *P. italicum*, *P. digitatum*, et *P. expansum* et bien sûr *P. chrysogenum* comme étant les espèces les plus répandues et très souvent responsables de la pourriture des fruits. Quelques

critères de diagnostic mycologique des principaux *Penicillium* sont présentés en annexe 1.

Leur omniprésence dans l'environnement ainsi que leur croissance facile (du moins à température ambiante) en font des contaminants des cultures mais également, en amont, des prélèvements non stériles comme les expectorations, l'écouvillonnage nasal ou auriculaire voire cutané.

II.3 *PENICILLIUM* D'UTILISATION INDUSTRIELLE

► Pour l'affinage des fromages, *P. roquefortii* et *P. camembertii* sont ajoutés aux où leurs capacités métaboliques (production d'exoenzyme) assurent la production de composés aromatiques type méthyl-cétones à partir des acides gras du lait. Moins connu mais encore plus largement utilisé, *P. casei* est le plus immunogène des *Penicillium* du fromage.

► *P. nalviogense* est utilisé dans l'industrie du saucisson. Pulvérisé sur la peau du saucisson, *P. nalviogense* (moisissure blanche) a pour but d'améliorer l'arôme du saucisson mais surtout de limiter le développement de bactéries et des moisissures sauvages, surtout les moisissures vertes dues à *P. chrysogenum*.

► *P. notatum* fut, en 1928, la moisissure qui permit à Fleming de découvrir « accidentellement » la pénicilline et d'en assurer la production pharmaceutique, même si ce contaminant le plus courant est surtout connu sous la terminologie retenue en nomenclature de *P. chrysogenum*.

► Parmi les *Penicillium*, on trouve aussi des espèces capables de produire des substances dirigées contre d'autres champignons, notamment les dermatophytes, puisque la griséofulvine est produite par le *P. griséofulvum*.

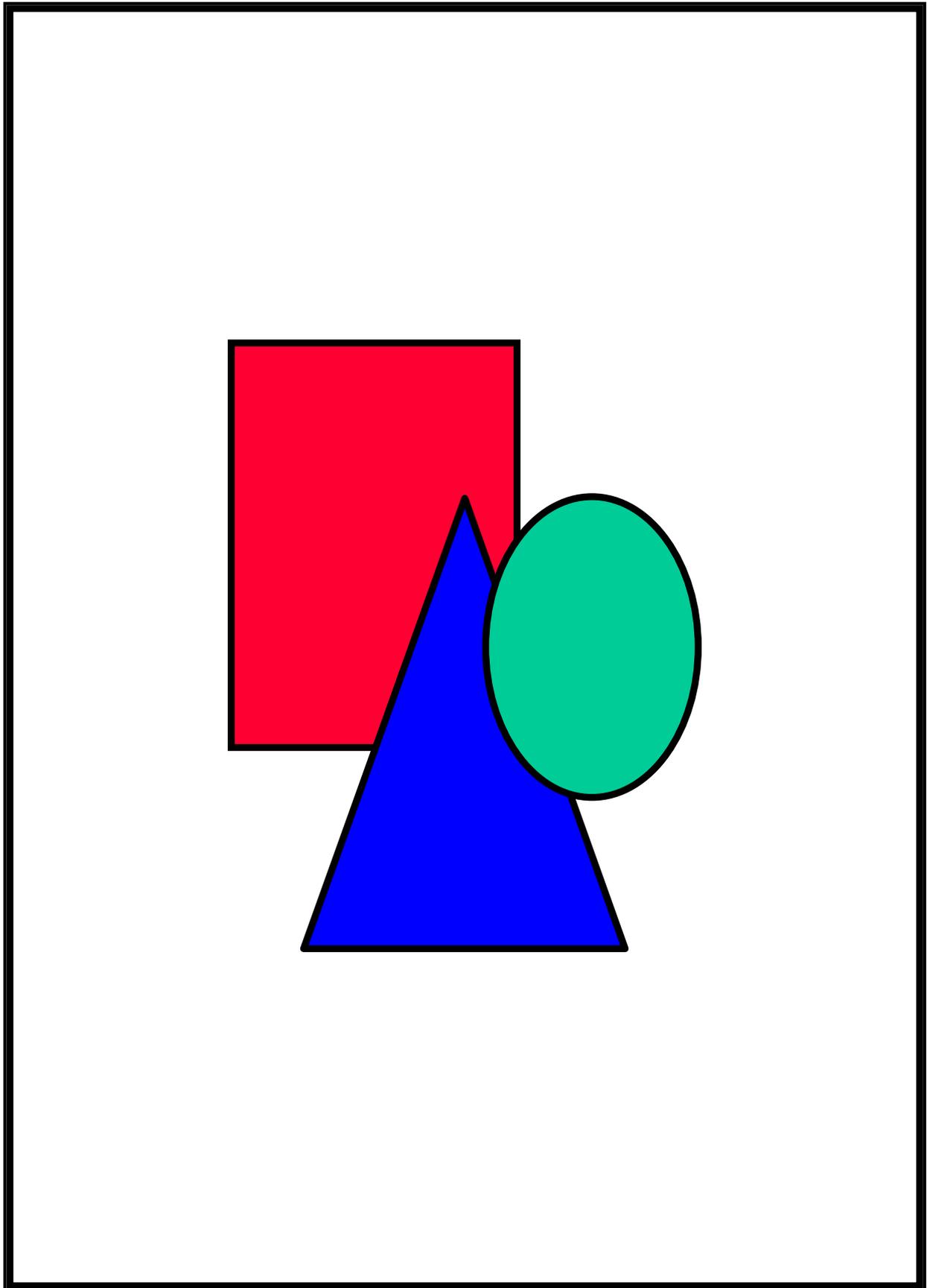


Figure n°4 : Aspect macroscopique (a, b) et microscopique (c, d, e) des formes saprophytes de *Penicillium sp.* **c** (*P. marneffe*) et **d** = conidiophore (bi-verticillé) en microscopie optique. **e** = conidiophore (triverticillé) en microscopie électronique (*P. italicum*).

II.4 PENICILLIUM *MARNEFFEI* : UN CAS UNIQUE PARMIS LES PENICILLIUM

II.4.1 PAR SA NICHE ECOLOGIQUE

La plupart des *Penicillium* sont cosmopolites tandis que *P. marneffeii* est limité au Sud-est Asiatique. Sa niche écologique (actuellement décrite !!!) exclusivement rurale est même restreinte aux zones de proximité des bambous ou des rats vivant proches de ces bambous. Plus précisément, les spores et les filaments mycéliens ont été retrouvés sur les racines et les tiges de bambous, dans les terriers de rats, et plus généralement sur le sol par dissémination fécale (élimination digestive chez le rat) (Chariyalertsak et al., 1997).

II.4.2 PAR SON CARACTERE DIMORPHIQUE

On devrait dire « **thermiquement dimorphique** » puisque *P. marneffeii* est le seul *Penicillium* possédant un **stade lévuriforme** à la température corporelle, similaire à celui observé dans les tissus (figure 5) et un **stade filamenteux** aux autres températures (figure 4-c). En effet, les rares autres *Penicillium* isolés en pathologie humaine se développent uniquement sous forme de filaments mycéliens.

C'est donc le seul *Penicillium* appartenant au cercle restreint des champignons **dimorphiques** constitué par :

- *Histoplasma capsulatum*
- *Blastomyces dermatitidis*
- *Coccidioides immitis*
- *Paracoccidioides brasiliensis*
- *Sporothrix schenkii*
- *Emmonsia crescens*, *E. parva*.
- Certaines souches de *Paecilomyces*

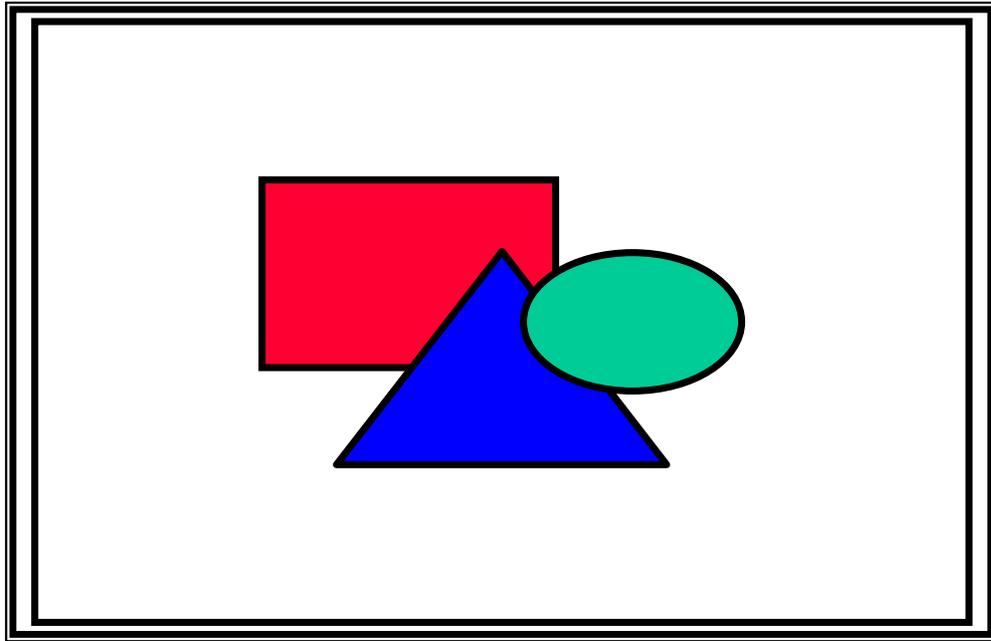


Figure n° 5 : Aspect levuriforme en microscopie optique (bleu de lactophéno).

II.4.3 PAR SON MODE DE REPRODUCTION PARASITAIRE

C'est en plus, le seul dimorphique dont la reproduction asexuée de la forme parasitaire n'est pas le bourgeonnement mais la **fission binaire** ou **scissiparité** qui, en faisant apparaître des *septa*, donne un aspect allongé caractéristique en «saucisse cloisonnée» (figure 6).

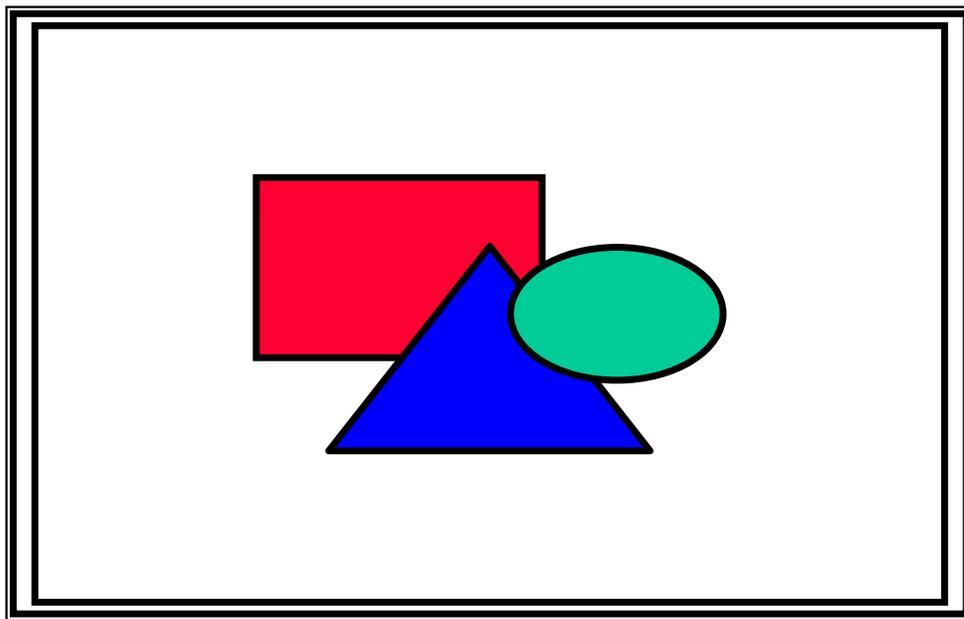


Figure n° 6 : Stade levuriforme avec septation centrale (en culture sur milieu BHI)

II.4.4 PAR SON POUVOIR PATHOGENE

A l'opposé des *Penicillium* cosmopolites, *P. marneffe* est un pathogène incontestable chez l'immunodéprimé mais également chez l'immunocompétent. Il possède un **pouvoir pathogène direct «vrai»**, ciblé sur le **système réticulo-histiocytaire**. Plus encore, c'est l'agent d'une **anthropozoonose** puisque certains rats d'une partie limitée du globe sont eux aussi atteints de réticulose.

C'est d'ailleurs, à cause de ce pouvoir pathogène élevé, combiné avec la notion d'un inoculum infestant très faible et de l'expérience malheureuse de deux cas de contaminations de laboratoire, que les autorités ont considéré la **manipulation** des cultures de *P. marneffe* comme **hautement contagieuse (risque biologique n° 3)**.

Les autres *Penicillium*, quant à eux, ont un pouvoir pathogène direct faible, c'est le pouvoir pathogène indirect (allergie) et la capacité de production de mycotoxine alimentaire qui domine.

Tout au plus, certaines espèces de *Penicillium* sont capables de provoquer des **mycoses superficielles**. Ces pénicillioses localisées, surtout à la sphère O.R.L. (otomycoses) et aux phanères (onychomycoses), sont communes même si des infections oculaires ont également été décrites (ulcères cornéens, endophtalmies, kératites). Dans certains contextes, surtout en cas de neutropénie, le caractère invasif semble indiscutable puisque depuis 1951, 31 pénicillioses **invasives profondes** ont été publiées. Notamment douze cas prouvés de **pénicillioses pulmonaires** avec cinq isollements de *P. crustaceum*, six cas de **péritonites** et quatre **endocardites** sur valves prothétiques ainsi que trois nouveaux cas en 2002 (Lyratsopoulos et al., 2002).

En fait le pouvoir pathogène des *Penicillium* non *P. marneffe* se restreint principalement aux **réactions d'hypersensibilité** qu'ils peuvent induire sur des terrains

atopiques ou chez des personnes intensément exposées aux spores de *Penicillium* (exposition professionnelle). Des phénomènes de sensibilisation (augmentation des taux d'anticorps spécifiques) sans symptomatologie existent chez presque 50% des personnes hyperexposées. Dans quelques cas seulement se déclare une allergie au *Penicillium* avec rhinites ou conjonctivites allergiques et parfois d'authentique « pneumopathies d'hypersensibilité ». La symptomatologie est alors une dyspnée fébrile avec toux non productive et la notion de circonstance déclenchante (4 à 8 heures après l'exposition à l'allergène). Citons la « maladie des brosseurs de saucissons » avec alvéolites allergiques extrinsèques (A.A.E.) décrits pour *P. nalgiovensis* et *P. chrysogenum*, l'asthme à *P. candidum* chez les « laveurs de fromage », la « subérose » à *P. frequentans* chez les ouvriers travaillant le liège.

Le dernier rôle pathogène que l'on peut attribuer aux *Penicillium*, est la production dans les aliments, de toxines à l'origine de mycotoxicose d'implication essentiellement vétérinaire (« contamination » des céréales). Dans l'alimentation humaine, les denrées les plus touchées sont les fruits, jus de fruits, blé, riz et fromage avec production de patuline ou de citrine. Même en cas de respect de la chaîne du froid, cette production de toxine peut poser un problème puisque de nombreuses espèces de *Penicillium* dites « psychrophiles » peuvent se développer à des températures très basses (<4°C) voire négatives.

**P. MARNEFFEI EST LE SEUL *PENICILLIUM* CAPABLE D'INDUIRE
CLASSIQUEMENT UNE MYCOSE PROFONDE
ALORS QUE POUR LES *PENICILLIUM* COSMOPOLITES,
LE POUVOIR PATHOGENE EST FAIBLE ET SURTOUT INDIRECT
(CONTEXTE PARTICULIER D'HYPERSENSIBILISATION AUX *PENICILLIUM*)**

II.5 LA CULTURE

P. marneffei pousse facilement *in vitro*, mais comme souvent en mycologie médicale, et encore plus ici, l'aspect de la culture dépend du **milieu de culture** utilisé et des conditions de **température** et de la **durée d'incubation**.

II.5.1 LES MILIEUX DE CULTURE.

II.5.1.1 Pour obtenir la forme filamenteuse

De nombreux milieux peuvent être utilisés, le plus courant pour obtenir la forme saprophyte filamenteuse est le **milieu de SABOURAUD**. Des milieux plus pauvres, habituellement utilisés pour favoriser le développement de fructification conviennent également, c'est le cas du **milieu P.C.** (Pomme de terre-Carotte), du **milieu au moût de bière** ainsi que le **milieu Czapek**.

Dans le contexte d'un examen bactériologique, il est possible d'isoler *P. marneffei* car la plupart des milieux de bactériologie peuvent assurer son développement, dès lors qu'ils contiennent du sang (géloses au sang de cheval simples, les géloses Müller-Hinton au sang, et les géloses sang-cerveau-cœur).

II.5.1.2 Pour obtenir la forme levure

Par contre, la culture de la forme levure, stade rencontré en clinique, est plus difficile. Il faut utiliser une infusion de cœur et de cerveau, le **milieu B.H.I** que l'on incube à 37°C.

II.5.2 LES CONDITIONS DE CULTURE.

Qu'ils soient coulés en boîte de Pétri ou en tube, les milieux de culture sont incubés en **aérobiose** dans des étuves, classiquement à deux températures : **25°C** (ou

22°C) et 37°C. Pour éviter les contaminations bactériennes, des antibiotiques (chloramphénicol ou gentamicine) sont incorporés aux milieux de mycologie. Par contre, l'**actidione** (cycloheximide), souvent ajoutée au milieu pour éliminer la plupart des contaminants fongiques, est à proscrire puisque les *Penicillium* en font partie. *P. marneffe*, malgré toutes ces particularités, n'échappe pas à la règle.

Le milieu de référence est donc le milieu de **SABOURAUD** glucosé ou dextrosé, avec chloramphénicol, sans actidione.

11.5.3 ASPECT MACROSCOPIQUE DES CULTURES

11.5.3.1 A température ambiante

Tous les milieux permettent un développement rapide du *P. marneffe*. Le développement sur milieu de SABOURAUD dextrosé ou glucosé (milieu de référence) est rapide avec apparition en 24 à 48 heures de colonies reconnaissables en 3 jours (délai rapide pour un filamenteux). La culture de *P. marneffe* se présente comme une culture floconneuse à cause des conidiophores érigés, d'abord lisse puis plissée telles les circonvolutions d'un cerveau au sein desquels peuvent apparaître des gouttelettes d'exsudat. Elle atteint classiquement 4 cm de diamètre en un mois de développement (figure 7).

Cette culture est caractérisée par la présence d'un pigment rouge brique intense, très hydrosoluble donc très diffusible envahissant toute la gélose en 15 jours, et donnant un aspect caractéristique au revers.

Le *recto*, quant à lui, présente un aspect de *Penicillium* classique c'est à dire de duvet épais. Initialement blanc, il évolue du jaune doré au vert devenant parfois coloré en « rose fleur de pêcher » puisqu'il rougit en vieillissant (à cause du pigment rouge produit en dessous) (Drouhet and Dupont, 1995).

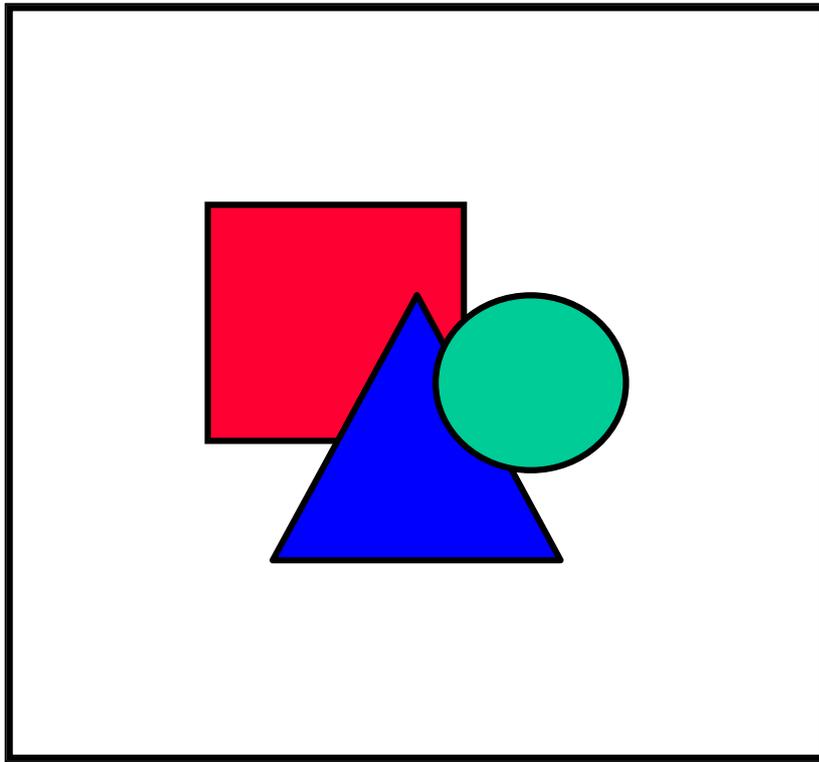


Figure n°7: Aspect macroscopique à température ambiante de *Penicillium marneffeï* sur Sabouraud au 15^{ème} jour.

II.5.3.2 A température corporelle

L'aspect macroscopique est proche des colonies obtenues avec les levures, c'est-à-dire des colonies lisses, muqueuses voire crémeuses très peu pigmentées en général beige clair. Le développement est beaucoup plus lent et ne s'accompagne jamais du pigment rouge caractéristique.

II.5.4 ASPECT AU MICROSCOPE OPTIQUE

II.5.4.1 A température ambiante

L'aspect microscopique est celui d'un enchevêtrement de filaments mycéliens septés mais non pigmentés sur lesquels s'individualisent de nombreux pinceaux, générateurs de nombreuses chaînes de spores. Les spores formées restent en effet plus ou moins accolées, formant des chaînes basipètes non ramifiées où la spore la plus jeune est au contact de la phialide (figure 4-e). Les spores prennent volontiers l'aspect

de citrons séparés par disjoncteur. A noter que sur milieu au moût de bière et sur milieu PC, les filaments mycéliens peuvent prendre la forme d'arc, pouvant donner naissance à de multiples vrilles (Drouhet and Dupont, 1995).

11.5.4.2 A température corporelle

A 37°C, les filaments mycéliens existent mais il y a tendance au raccourcissement par fragmentation avec présence d'arthrospores ou arthroconidies, d'abord rectangulaire puis s'arrondissant en vieillissant correspondant à la transformation en levures. On observe donc un mélange de levure avec présence de cloison centrale sans étranglement et de forme d'hyphe court.

11.5.5 ASPECT AU MICROSCOPE ELECTRONIQUE

Elle permet de visualiser l'ultrastructure des levures et l'évolution dans les phagosomes des macrophages. Les éléments lévuriformes sont entourés d'une paroi épaisse et d'une cloison transversale, témoin du mode de reproduction par scissiparité. En observant les macrophages, on note la présence intracytoplasmique de phagolysosomes avec multiplication intra-vacuolaire des levures jusqu'à rupture expliquant le nombre élevé de levures intracytoplasmiques.

**P. MARNEFFEI A DONC DEUX MORPHOLOGIES ET DEUX MODALITES
DE REPRODUCTION ASEXUEE.:**

► L'une **levuriforme** dans sa **forme parasitaire à 37°C** (donc tissulaire) avec l'aspect caractéristique donné par la reproduction par fission binaire (présence de *septum* central).

► L'autre **mycélienne** dans sa **forme saprophyte**, c'est-à-dire en culture à 22°C ou dans le sol, produisant de **nombreuses spores**.

III EPIDEMIOLOGIE

La pénicilliose à *P. marneffeï* est une **anthropozoonose** puisque *P. marneffeï* infecte une (seule) autre espèce de mammifère: le **rat du bambou** ; qui n'est autre que le rat « commun » du Sud-est asiatique. Deux genres et quatre espèces sont décrits: *Rhizomys sinensis*, le premier signalé comme porteur de *P. marneffeï*, *R. pruinosus*, est le plus répandu, *R. sumatrensis*, le plus gros, pouvant atteindre 50 cm et *Cannomys badius*, est beaucoup plus petit. Globalement, la répartition de ces quatre rats couvre l'ensemble du sud-est asiatique.

L'épidémiologie du *P. marneffeï* est encore **imparfaitement connue**. Le rôle du rat du bambou est difficile à préciser : simple hôte accidentel, réservoir ou disséminateur...? Il a été montré que sa présence n'est pas absolument nécessaire à la contamination (Chariyalertsak et al., 1997).

III.1 REPARTITION GEOGRAPHIQUE

Les infections à *P. marneffeï* sont endémiques dans les **zones rurales** d'Asie du Sud-est, plus précisément au sud de la Chine (**province du Guangxi**), et surtout dans le Nord de la Thaïlande mais également à Hong-Kong, Taiwan (Sirisanthana and Supparatpinyo, 1998) et Indonésie (Deng et al., 1986). Plus récemment, de nouvelles zones d'endémies sont décrites : l'Inde (Singh et al., 1999), le Laos, la Malaisie, le Vietnam et tout dernièrement le Cambodge (figure 8).

La **région de Chaing Maï** (Thaïlande du nord) concentre à elle seule plus de la moitié des cas répertoriés dans la littérature (Breton et al., 1998a). Elle représente déjà la troisième infection opportuniste du stade SIDA après la tuberculose et la pneumocystose avec près de 10% des VIH+ concernés (Wong and Lee, 1998).

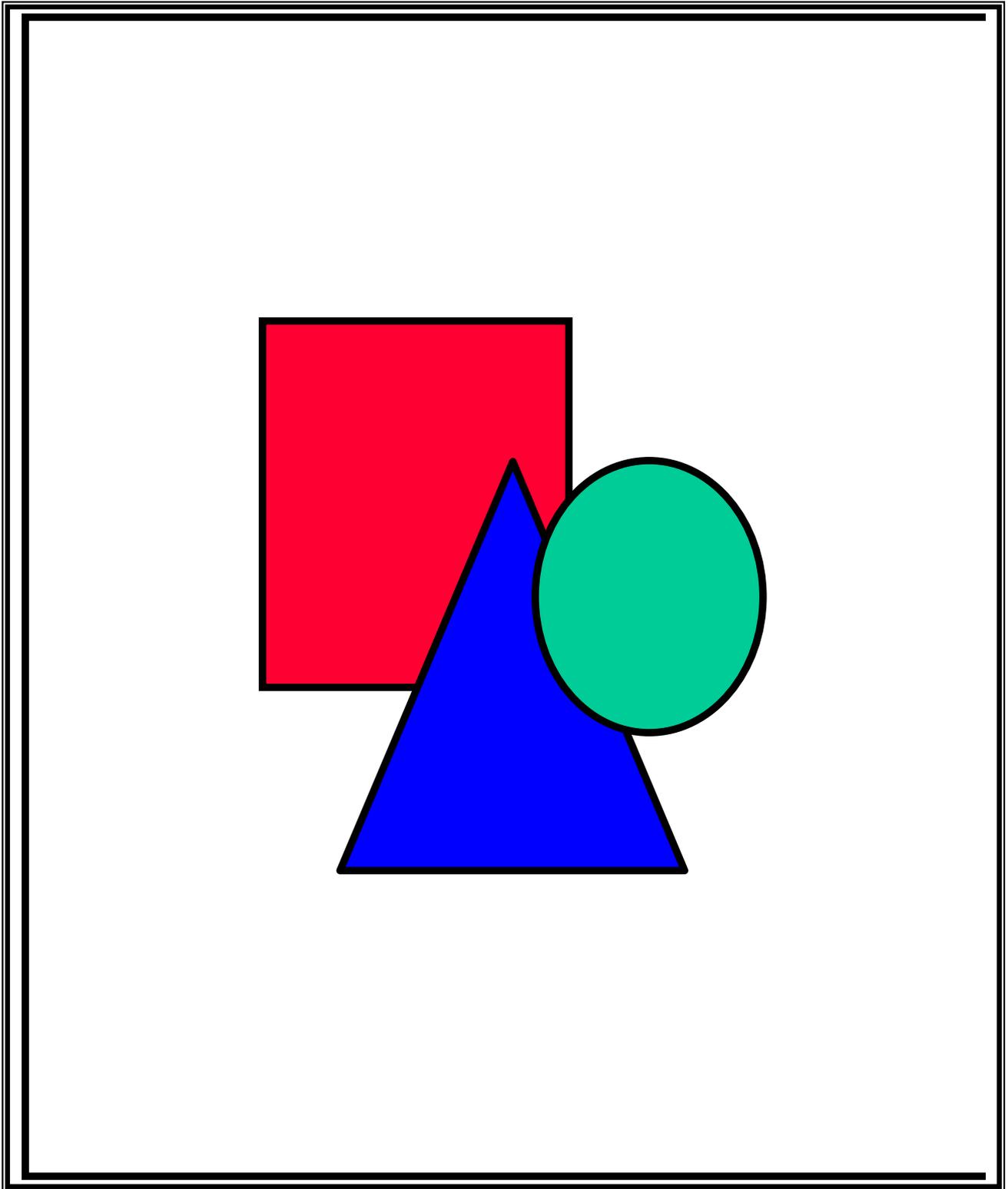


Figure n°8 : Répartition géographique des zones d'endémies de la pénicilliose

Inéluctablement, de nombreux nouveaux pays déclarent leur premier cas de pénicilliose, c'est le cas de Taiwan (Chiang et al., 1998), de la Malaisie avec cinq cas d'importation (Kurup et al., 1999) et un cas autochtone (Saadiah et al., 1999).

En 2000, c'est au tour du Japon avec un cas d'importation (Mohri et al., 2000), puis le Vietnam (Hien et al., 2001);(Le Pape et al., 2002). Enfin, très récemment, au Cambodge, description de deux premiers cas chez des sujets n'ayant jamais voyagé (Bailloud et al., 2002).

Il est vraisemblable qu'à l'avenir, ce champignon sera retrouvé dans d'autres régions du Sud-est asiatique, tels que la Birmanie et le Bangladesh où les conditions écologiques sont très voisines.

Pour contracter une pénicilliose il faut :
-SOIT ETRE ORIGINAIRE D'ASIE du SUD-EST.
-SOIT Y AVOIR SEJOURNE.

Il existe cependant deux exceptions :

Deux cas de pénicilliose chez deux patients **non asiatique n'ayant jamais voyagé en zone d'endémie** et n'ayant pas été en contact avec des personnes originaires ou revenant de cette zone, mais dont le point commun est un contact avec *P. marneffe* au sein d'un laboratoire.

- Le premier cas est la pénicilliose d'inoculation du Pr Segretain.
- Le deuxième cas, avait même été publié comme le premier cas africain de pénicilliose à *P. marneffe*. Il concerne un médecin congolais venu à l'institut Pasteur pour suivre des cours d'immunologie, dans une salle de travaux pratiques du laboratoire où des cultures de *P. marneffe* avaient été préalablement manipulées. Ce médecin qui ignorait sa séropositivité pour le VIH, décèdera de cette pénicilliose (Hilmarsdottir et al., 1994).

III.2 MODE DE CONTAMINATION

Le mode de contamination n'est pas parfaitement établi mais il semble que *P. marneffe* puisse pénétrer de trois manières différentes chez l'Homme et chez le rat.

III.2.1 CONTAMINATION DE L'HOMME

III.2.1.1 Inhalation de spores

La voie de contamination la plus évidente est l' **inhalation de spores** de *P. marneffe*, argumentée par:

- ▶ La contamination du médecin congolais. Cette expérience malheureuse suggère en plus la notion qu'un inoculum très faible peut suffire le médecin n'est resté qu'un temps très court dans cette salle et que les analyses de l'air effectuées, certes *a posteriori*, n'ont pas décelé la présence de spores de *P. marneffe*.

- ▶ Le fait que *P. marneffe* produise une quantité élevée de spores et que ces spores très petites (2 à 3 µm), facilement aéroportées, autorise un passage jusqu'aux alvéoles pulmonaires (< 5 µm).

- ▶ Le fait que le poumon possède un système réticulo-histiocytaire très développé et que l'infection pulmonaire est souvent la première manifestation avant la dissémination (Jayanetra et al., 1984).

- ▶ Le fait que c'est la voie d'entrée des autres mycoses systémiques (cryptococcose, aspergillose, histoplasmosse...) et des autres réticuloses comme la tuberculose.

III.2.1.2 Inoculation de spores ou de levures

La contamination par **inoculation** est possible, prouvée par Segretain mais également par un cas de contamination par un clou (Heath et al., 1995). Elle est accidentelle et donc minoritaire mais elle est sans doute sous estimée puisque le

développement du nombre de toxicomanes Intra-Veineux (IV), population à forte prévalence pour le VIH, augmente le risque potentiel de transmission par échange de seringues souillées. C'est le seul cas où la contamination se ferait à partir de la forme parasitaire lévuriforme.

III.2.1.3 Ingestion de spores ou de levures

Bien qu'inhabituelle pour un champignon filamenteux, la contamination par **ingestion** a ici été envisagée. A noter que dans la série de Deng (Deng et al., 1986), un patient sévèrement atteint était végétarien ce qui semble écarter la **consommation de rat** comme unique voie de contamination. D'ailleurs, l'étude de Chariyalertsak n'a pas pu établir de corrélation statistiquement significative entre cette consommation, par certains indigènes de la province du Guangxi, et l'infection à *P. marneffe* ni même pour la **consommation de pousses de bambou** (Chariyalertsak et al., 1997).

III.2.2 CONTAMINATION DU RAT DU BAMBOU

La prévalence chez le rat est plus élevée que chez l'homme. En effet, Deng montre que la prévalence, observée sur 19 *Rhizomys sinensis* vietnamiens est de 100% (Deng et al., 1986). Plus tard, en Thaïlande cette fois, Ajello montre que c'est 75% des *Rhizomys puinosus* et presque 20% des *Cannomys badius* qui sont atteints avec prédominance de l'atteinte pulmonaire (83% des cas) et pancréato-hépatique (33% des cas) (Ajello et al., 1995).

► L'**ingestion** est très probable, les rats se nourrissant des pousses de bambou, or *P. marneffe* a été retrouvé sur les racines et les tiges de bambou (Deng et al., 1986).

► L'inhalation également puisque les rats construisent leurs terriers dans ces bambous et qu'il a été prouvé l'existence de spores tellurique au niveau des terriers (Drouhet and Dupont, 1995).

► L'inoculation ne peut pas être exclue (morsures, blessures), elle est en effet possible puisque réalisée lors de l'expérimentation animale (injection intrapéritonéale)]

III.3 SOURCE DE CONTAMINATION

III.3.1 A PARTIR D'HOMMES EUX-MEMES ATTEINTS.

Cette source de contamination est très peu probable (faible excrétion parasitaire). Cependant, la transmission directe sanguine lors d'un échange de seringue en cas de toxicomanie IV ne peut être exclue. D'autant que la pénicilliose est caractérisée par des fongémies fréquentes et élevées. Cette voie de contamination n'a cependant pas encore été prouvée pourtant dans la série récente de Ranjana, 31 des 36 patients sont des toxicomanes IV. (La toxicomanie IV constitue de toute façon un **facteur favorisant** l'installation de la pénicilliose) (Ranjana et al., 2002).

III.3.2 A PARTIR DU RAT DU BAMBOU

L'étude de Chariyalertsak n'a pas pu démontrer que le rat pouvait constituer un réservoir pour l'homme. Le contact direct avec le rat et sa consommation semble pouvoir être écartée (Chariyalertsak et al., 1997).

III.3.3 A PARTIR DU SOL

C'est, pour de nombreux auteurs, **la plus probable**. Pour Chariyalertsak, Homme et rat semblent tous deux exposés à une **source de contamination environnementale**

commune vraisemblablement issue du sol (Chariyalertsak et al., 1997). Ces études n'ont cependant pas pu prouver que ce réservoir était le bambou (pourtant fortement évoqué). Quoi qu'il en soit, les cas de pénicillioses sont plus nombreux pendant la saison des pluies ce qui suggère une expansion du réservoir pendant cette saison, argument supplémentaire en faveur d'un réservoir au niveau du sol (Chariyalertsak et al., 1996).

III.4 FACTEURS FAVORISANTS

III.4.1 TERRAIN

III.4.1.1 L'âge

L'âge auquel le risque est le plus élevé est compris entre 16 et 30 ans, mais des cas de pénicillioses ont été décrits à tout âge (de 4 mois à 70 ans). Il ne semble donc pas représenter un facteur de risque particulier.

III.4.1.2 Le sexe

Il y a une nette prédominance du sexe masculin parmi les pénicillioses (sex-ratio à 9). Elle semble due au fait que c'est la population exposée qui est à prédominance masculine (prédominance masculine des VIH+, travail essentiellement masculin du bambou...). Une femme pourrait avoir autant de risques de la contracter si elle était aussi exposée ; d'ailleurs, sur les 28 premiers cas décrits, il n'y a « que » 53 % d'hommes.

III.4.1.3 Le terrain héroïnomanie

Le développement rapide de la toxicomanie IV est, avec celui du VIH, un problème de santé publique dans le Sud-est asiatique. L'étude de Ranjana expose, dans

sa série de pénicilliose, une « troublante » morbidité chez les héroïnomanes : 31 sur 36 soit 83% (Ranjana et al., 2002). Ce terrain ne doit pas être négligé puisqu'il apporte de nouvelles possibilités épidémiologiques, à l'instar de ce qui a été retenu pour expliquer le premier cas de leishmaniose viscérale au Vietnam.

III.4.1.4 L'alcoolisme chronique

Rappelons que l'alcoolisme chronique au stade de cirrhose hépatique est une des causes majeures d'immunodéficience acquise ; Louthrenoo en fait un facteur favorisant du développement de formes ostéo-articulaires de pénicilliose (Louthrenoo et al., 1994).

III.4.2 FACTEURS IATROGENES

Les médicaments pouvant favoriser la survenue d'une pénicilliose sont des médicaments qui interfèrent avec le système immunitaire.

- La **corticothérapie** au long cours mais également de façon ponctuelle, pouvant en plus constituer un **facteur de dissémination**. Il a été constaté que les corticoïdes provoquent une extension des lésions initiales et l'apparition de nouvelles atteintes viscérales. Jayanetra a en effet signalé, lors d'une corticothérapie, l'apparition de lésions cutanées, témoins d'embols septiques (Jayanetra et al., 1984).

- Les **autres immunosuppresseurs**, surtout s'ils sont donnés dans des contextes dysimmunitaires comme les maladies auto-immunes ou s'ils sont associés aux corticoïdes. Citons l'azathioprine IMUREL® et le cyclophosphamide ENDOXAN® utilisés couramment comme traitement des maladies auto-immunes sévères. Par analogie, les traitements utilisés pour les greffes, surtout de rein et de moelle

osseuse, dont on sait qu'ils provoquent des immunodépressions cellulaires profondes seront sans doute cités comme facteurs favorisant à l'avenir.

III.4.3 PATHOLOGIES SOUS-JACENTES

Elles sont **fortement favorisantes** puisque dans tous les cas d'importations actuellement décrits, une pathologie sous-jacente génératrice d'immunodépression est présente. Il existerait cependant quelques cas autochtones pour lesquels aucune pathologie sous-jacente n'explique l'immunodépression observée (So et al., 1985) et de rares cas sans pathologie sous-jacente, ni immunodépression où la pénicilliose est alors plus localisée (adénite suppurée par exemple).

► **Le principal facteur favorisant est l'immunodépression liée au VIH.**

En effet, l'immunodéficience générée par le VIH, portant principalement sur l'immunité cellulaire, est présente dans **plus de 90% des cas décrits**. Il existe une réelle corrélation entre l'expansion du SIDA et la pénicilliose en Thaïlande (Supparatpinyo and Sirisanthana, 1994). La pénicilliose à *P. marneffeii* se déclare quand les sujets VIH+ ont une immunodépression profonde avec des taux de lymphocytes CD₄ inférieur à 50 CD₄/mm³. Dans les 80 cas étudiés par Supparatpinyo, les CD₄+ variaient entre 1 et 44/mm³ avec une moyenne à 9 CD₄+ / mm³, pour un rapport CD₄/CD₈ effondré, en moyenne à 0,06 (Supparatpinyo et al., 1993).

► En dehors de l'immunodépression liée au VIH, les circonstances les plus souvent décrites sont :

- Les **syndromes lymphoprolifératifs**, surtout la maladie de Hodgkin et les autres lymphomes sans oublier la macroglobulinémie de Waldenström. En revanche, les leucoses aiguës et les pathologies myéloïdes sont beaucoup moins décrites.

- Les **maladies auto-immunes** et notamment le lupus érythémateux disséminé (Lam et al., 1997; Lo et al., 1995), le syndrome de Gougerot-Sjögren et la dermatomyosite.

- La **tuberculose** (Louthrenoo et al., 1994).

- Les **cancers** et les infections.

L'ARCHETYPE STATISTIQUE du candidat à la pénicilliose est donc :
Un **homme**, de préférence **jeune**, **séropositif pour le VIH**, qui vit en **zone rurale du Sud-est asiatique** ou qui y voyage pendant la **saison des pluies**.

Le nombre de cas de pénicilliose reste **faible**, mais l'augmentation du nombre de terrain immunocompromis d'un côté (essentiellement due à l'explosion galopante du SIDA et à l'utilisation de thérapeutique de plus en plus agressive pour le système immunitaire) et l'attrait grandissant du tourisme asiatique de l'autre (encore abordable), risquent de faire **augmenter sa morbidité**.

Le « pénicillium rouge » est considéré comme un « nouveau géant réveillé » et suggère que **tout immunodéprimé voyageant en zone d'endémie devrait être informé du risque qu'il encourt** (Drouhet, 1993).

IV CLINIQUE

P. marneffei est caractérisé par son **affinité pour le système réticulo-endothélial** (réticulo-histiocytaire) et sa capacité à proliférer à l'intérieur des histiocytes (Segretain, 1959). Comme la localisation de ce système est diffuse, l'**atteinte** est donc **polyviscérale** avec envahissement des poumons, de la rate, des ganglions, du foie, de la moelle osseuse mais également de la peau, du tube digestif, des os...

Rappelons qu'à l'initiative du ministre de la Santé Thaï, la pénicilliose appartient aux pathologies définissant le stade clinique de S.I.D.A depuis 1992.

IV.1 INCUBATION

La durée d'incubation pour une **primo-infection** est de **4 à 8 semaines**, mais peut être **beaucoup plus longue** puisqu'il existe des formes asymptomatiques d'infection à *P. marneffei*, dites latentes, pouvant devenir symptomatiques à la faveur d'une diminution de l'immunité (Cooper and McGinnis, 1997).

IV.2 MANIFESTATIONS CLINIQUES

Elles sont très variables et ne sont **pas spécifiques**. Ainsi, la pénicilliose à *P. marneffei* peut rester d'expression localisée ou se généraliser, réalisant alors un tableau de syndrome septicémique avec souffrance multi-viscérale.

► Les formes localisées existent mais sont très rares. C'est dans ce groupe que l'on retrouve les patients sans immunodépression apparente ou une immunodépression non liée au V.I.H.

► Les formes disséminées représentent la quasi-totalité des cas et sont en général associées aux infections par le V.I.H.

Quoi qu'il en soit, il existe un **tropisme cutanéomuqueux** et **pulmonaire** de *P. marneffei* associé à un **syndrome général** ; Les signes les plus constants étant la **fièvre**, l'altération de l'état général avec **amaigrissement** puis des **signes cutanés** et une **toux persistante**. Les différentes manifestations cliniques sont classées par ordre décroissant :

IV.2.1 MANIFESTATIONS GENERALES

Un syndrome général est toujours présent avec, avec quasiment dans tous les cas, une **fièvre**, parfois élevée, persistante ou intermittente, pouvant s'accompagner de frissons ou de sueurs nocturnes et une **altération de l'état général**. Celle-ci, est souvent au premier plan et s'exprime par:

- ▶ Un **amaigrissement** (72% chez le VIH+) souvent secondaire à l'anorexie et/ou à la dysphagie (Duong, 1996; Hilmarsdottir et al., 1993).

- ▶ Une **pâleur** et une **asthénie** dues à l'**anémie** (74% des cas) (Duong, 1996; Hilmarsdottir et al., 1993).

S'y associe souvent une **poly-adénopathie généralisée** superficielle ainsi qu'une **hépatosplénomégalie** due à des micro-abcès. Les adénopathies sont le plus souvent indolores, mobiles, fermes généralement bilatérales, avec localisation cervicale très fréquente.

IV.2.2 MANIFESTATIONS RESPIRATOIRES

Elles sont très fréquentes chez le sujet V.I.H.+ et la symptomatologie est proche de la tuberculose pulmonaire avec une **toux persistante**, maître symptôme, généralement non productrice mais pouvant être dyspnéisante, oppressive et même s'accompagner d'hémoptysie (Sekhon et al., 1994).

IV.2.3 MANIFESTATIONS CUTANEO-MUQUEUSES

➤ Les signes cutanés sont importants à connaître car très évocateurs s'ils sont associés à des manifestations respiratoires. Ils traduisent la dissémination hémotogène de *P. marneffeï*.

L'atteinte cutanée type est une **éruption papuleuse érythémateuse avec ombilication nécrotique centrale** (figure 9) pouvant être confondue avec celle du molluscum contagiosum, des mycobactérioses, mais surtout de l'histoplasmose à *Histoplasma capsulatum*, et de la cryptococcose cutanée. (Supparatpinyo et al., 1992a). L'éruption peut être **pustuleuse, acnéiforme, maculo-papuleuse voire papuleuse mais sans ombilication** centrale. L'ulcération de ces lésions est possible, surtout chez l'immunocompétent, aboutissant à la formation d'abcès ou de granulomes septiques. Enfin, des érythèmes palmo-plantaires et des purpura pétéchial des paupières ont été signalés (Jayanetra et al., 1984). Toutes ces lésions diffuses siègent principalement au niveau de la face, du tronc et des extrémités.

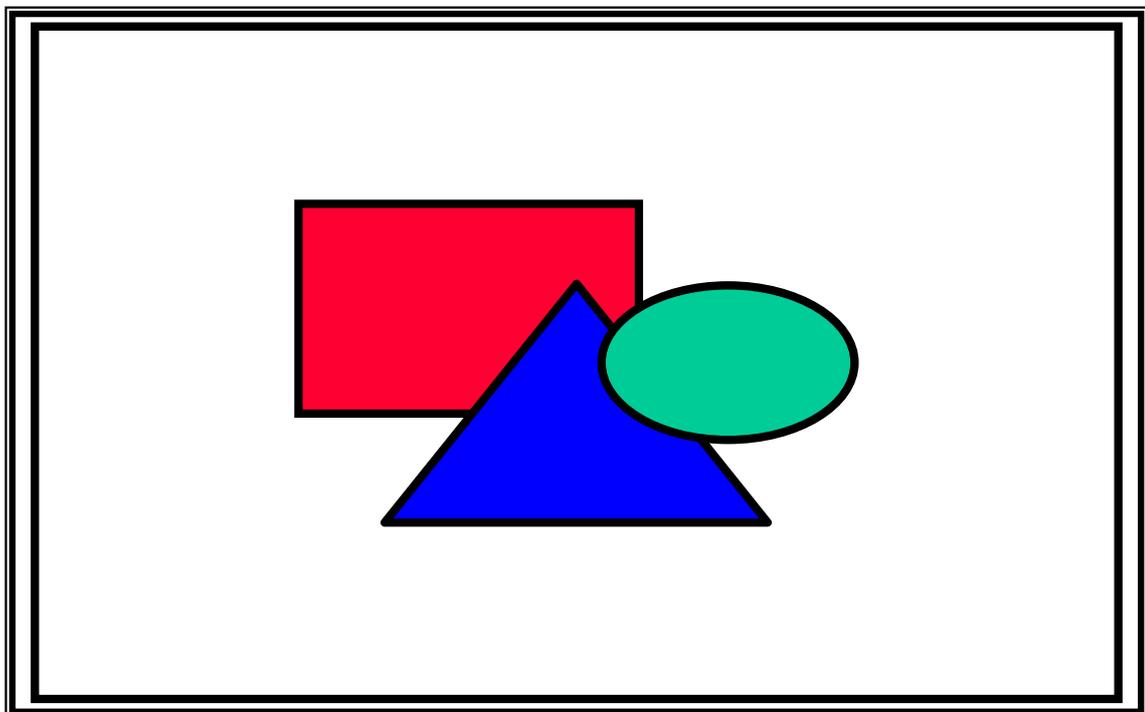


Figure n°9 : Aspect typique de lésions cutanées ulcérées de pénicilliose.

➤ Les atteintes muqueuses, regroupe essentiellement des **lésions bucco-pharyngées**, provoquant des ulcérations, des éruptions buccales, des angines pustuleuses et souvent des pharyngites à l'origine d'une dysphagie expliquant aisément l'anorexie souvent décrite (Vanittanakom and Sirisanthana, 1997). L'atteinte des **muqueuses génitales** est parfois décrite.

IV.2.4 AUTRES MANIFESTATIONS.

➤ Digestives : Quand la pénicilliose est disséminée, la manifestation digestive majeure est une **diarrhée liquide** plus ou moins **sanglante** due aux ulcérations diffuses de la muqueuse intestinale (Supparatpinyo et al., 1992b).

➤ Osseuses : A l'instar de la tuberculose, de l'histoplasmosse africaine, de la blastomycose systémique et de la cryptococcose, des **abcès osseux** avec ostéolyse sont décrits (Drouhet, 1993).

➤ Articulaires : *P. marneffe* peut être responsable d'**arthrite** siégeant essentiellement aux poignets et aux chevilles, soit primitive, soit secondaire à l'extension d'un abcès osseux. A noter que ces arthralgies semblent épargner le squelette axial.

➤ Cardiaques : D'authentiques **péricardites** à *P. marneffe* ont été décrites (So et al., 1985).

En conclusion, la pénicilliose à *P. marneffe* se traduit par une **altération de l'état général** dans un **contexte fébrile** avec **polyadénopathies** associée à un ou plusieurs tableaux suivants : **Pneumopathie avec toux** (avec ou sans atteinte pleurale), **affection cutanéomuqueuse**, **atteinte ostéo-articulaire**, et plus rarement, **abcès hépatique**, **péricardite**.

IV.3 DIFFERENCE ENTRE SUJETS VIH+ ET « IMMUNOCOMPETENTS »

Globalement, le type de symptomatologie est identique, même pourcentage de fièvre, d'éruptions cutanées.... Par contre, c'est l'intensité des symptômes et l'évolution vers la dissémination qui font toute la différence : l'immunodépression engendrée par l'infection à VIH favorise la survenue d'une **pénicilliose disséminée grave**, avec une fièvre volontiers plus élevée, une éruption plus intense, mais rarement abcédée. Wong montre en effet que l'incidence de la fongémie est significativement plus fréquente chez le VIH+ (Wong et al., 2001).

Quelques différences sont à noter tout de même : l'atteinte des muqueuses génitales se rencontre électivement chez le patient VIH+, celle du pharynx et du palais préférentiellement chez ces mêmes patients. A l'inverse, c'est chez « l'immunocompétent » que les lésions cutanées peuvent évoluer en abcès cutanés et que les lésions osseuses (ostéolyse avec abcès à polynucléaires) sont fréquentes.

IV.4 EVOLUTION ET PRONOSTIC

Cette mycose disséminée du système réticulo-histiocytaire est une pathologie plutôt **chronique** avec une moyenne d'évolution à 10 mois (2 à 36 mois). (Jones and See, 1992);(Sobottka et al., 1996)

Le **pronostic** est globalement **très mauvais** puisqu'en l'absence de traitement, la mort est inévitable chez un patient VIH+ et quasi-inévitable (91,3% des cas) chez le patient non-VIH+ (Deng and Connor, 1985);(Drouhet and Dupont, 1995).

Il dépend essentiellement de deux facteurs :

► Le degré d'immunodépression : Le pronostic dépend donc surtout du **terrain** et l'immunodépression liée au VIH est le plus défavorable. Suivent ceux associés aux hémopathies malignes ou aux maladies auto-immunes.

► Du stade évolutif au moment du diagnostic et de la rapidité de prise en charge thérapeutique : Elle apporte un bénéfice d'autant plus grand qu'elle est précoce.

UNE THERAPEUTIQUE ANTIFONGIQUE PRECOCE ASSOCIEE A
UNE RESTAURATION IMMUNITAIRE PEUT REVOLUTIONNER
UN PRONOSTIC A PRIORI TRES SOMBRE

IV.5 DIAGNOSTIC CLINIQUE DIFFERENTIEL

De par sa **symptomatologie peu spécifique**, le diagnostic différentiel peut se poser avec de **nombreuses autres pathologies mycosiques** (histoplasmosse, cryptococcose surtout cutanée, candidose profonde) mais aussi **bactériennes** (tuberculose) ou **parasitaires** (leishmaniose viscérale)

IV.5.1 AVEC LES AUTRES MYCOSES « EXOTIQUES »

La pénicilliose à *P. marneffe* appartient au groupe des **mycoses systémiques** ou **viscérales** dites « **exotiques** ». Ces différentes **mycoses d'importation**, cliniquement très proches, rendent le diagnostic différentiel difficile. Elles ont toutes en commun d'être provoquées par l'inhalation de spores d'un champignon dimorphique responsable d'une **granulomatose** aux symptômes peu spécifiques : la **primo-infection** en général **pulmonaire** est le plus souvent **asymptomatique** (tout au plus un syndrome pseudo-grippal) pouvant secondairement disséminer, en fonction du degré d'immunocompétence, par voie hématogène pour atteindre la peau, les os et/ou le cerveau.

IV.5.1.1 Histoplasmosse américaine ou Histoplasmosse « à petites formes »

Principal diagnostic différentiel, la maladie de Darling (due à *Histoplasma capsulatum* var. *capsulatum*) est la **mycose opportuniste d'importation la plus fréquente**. Même si elle existe en Asie du Sud-Est, elle se contracte essentiellement aux Antilles, en Guyane française et dans une moindre mesure au centre et à l'Est des Etats-Unis, en Amérique du Sud, en Afrique du Sud et Tropicale et en Océanie (notamment en Nouvelle-Calédonie).

Fréquente, la primo-infection est en général asymptomatique et de toute façon résolutive, ce n'est donc qu'en cas d'immunodépression de l'immunité cellulaire (SIDA, immunosuppresseurs) qu'elle peut évoluer en forme secondaire disséminée avec fièvre, altération de l'état général, adénopathies volumineuses, hépato-splénomégalie, cytopénies, lésions cutanées plus ou moins ombiliquées et ulcérées ainsi que des ulcérations buccales assez évocatrices.

IV.5.1.2 Histoplasmosse africaine ou Histoplasmosse « à grandes formes ».

L'histoplasmosse africaine, due à *Histoplasma capsulatum* var. *duboisii* pose beaucoup moins de problème de diagnostic différentiel car :

- ▶ Elle est limitée à une zone d'endémie restreinte à l'Afrique de l'Ouest et centrale (surtout Madagascar), la notion de double voyage est alors nécessaire pour que le diagnostic différentiel puisse se poser.

- ▶ Elle évolue souvent **sans fièvre** avec des lésions cutanées ou osseuses plus localisées, voire uniques, d'évolution suppurative chronique: on parle volontiers d'abcès froid avec adénopathies intenses.

- ▶ L'immunodépression est rarement présente, l'histoplasmosse africaine n'est d'ailleurs pas considérée comme une pathologie « opportuniste ».

N'existant que sur le continent américain, **Coccidioïdomycose** (Amérique du nord) et **Paracoccidioïdomycose** (Amérique du Sud) ne seront évoquées que s'il y a la notion, même ancienne, d'un voyage en Asie et sur le continent américain.

IV.5.1.3 Coccidioïdomycose

Elle est due à *Coccidioides immitis*, autre dimorphique dont la forme parasitaire n'est pas une levure mais des **sphérules**, qui, inhalées après les pluies d'orage des régions désertiques américaines, provoquent une mycose essentiellement respiratoire

le plus souvent asymptomatique et en général spontanément résolutive. Elle peut devenir chronique avec notamment des atteintes articulaires (« **rhumatisme du désert** ») et même disséminer chez les sujets VIH+, les femmes enceintes et certaines ethnies comme les noirs et les **asiatiques** déterminant alors des atteintes cutanées, osseuses ou méningées.

IV.5.1.4 Paracoccidioidomycose

Provoquée par *Paracoccidioides brasiliensis*, la primo-infection est respiratoire et asymptomatique mais devient presque toujours chronique unifocale. Ce n'est qu'en cas de déficit immunitaire cellulaire qu'elle devient multifocale avec fièvre, A.E.G, adénopathies, hépato-splénomégalie, manifestations oro-cutanéopulmonaires avec des atteintes buccopharyngées fréquentes (stomatite ulcéreuse).

IV.5.1.5 Blastomycose

Due à *Blastomyces dermatitidis*, c'est une **anthropozoonose** (chat, chien, cheval...) **chronique granulomateuse** américaine et africaine, essentiellement pulmonaire, d'abord aiguë lors de primo-infection puis d'évolution volontiers chronique avec lésions cutanées, ostéo-articulaires mais rarement neurologiques. L'immunodépression engendrée par le VIH accentue la dissémination, la rendant plus diffuse et plus profonde avec atteintes multi-viscérales et neurologiques.

IV.5.1.6 Sporotrichose.

Provoquée par *Sporothrix schenckii*, la sporotrichose pose peu de problème de diagnostic différentiel car c'est avant tout une **pathologie d'inoculation** avec un nodule primaire très symptomatique qui s'étend le long du trajet lymphatique.

IV.5.1.7 Les nouvelles mycoses d'importation.

Un **nouveau dimorphique** dont la phase parasitaire est constituée de levures polymorphes (les petites évoquant *Histoplasma* et les grosses *Blastomyces*) a été isolé (en 1995) à partir de lésions cutanées généralisées érythémateuses et ulcérées d'une malade en phase terminale de SIDA, et nommé ***Emmonsia pasteuriana*** (en hommage à Louis Pasteur puisque isolé l'année de commémoration du centenaire de sa mort).

Enfin, en 2001, un nouveau *Penicillium* pathogène à 37°C a été isolé d'une fongémie mortelle, ***Penicillium piceum*** qui appartient aux *Penicillium* biverticillés semble partager les mêmes facteurs de virulence que *P. marneffeii* (Horre et al., 2001).

Le diagnostic de mycoses viscérales exotiques doit être envisagé chez tout immunodéprimé (ou non !!) ayant déjà voyagé en zone d'endémie et qui présente un syndrome pseudo-grippal avec lésions cutanées ou un tableau évocateur de tuberculose.

IV.5.2 AVEC LES MYCOSES SYSTEMIQUES COSMOPOLITES

La pénicilliose est en effet très proche des **mycoses systémiques** ou **viscérales cosmopolites** qui surviennent également sur des terrains particuliers:

- ▶ Immunodépression liée au VIH pour la cryptococcose
- ▶ Immunodépression liée aux thérapeutiques récentes (corticothérapie au long cours, sujet neutropénique et *a fortiori* aplasique) ou aux hémopathies malignes pour les aspergilloses, candidoses et autres **mycoses viscérales cosmopolites** « émergentes » comme la Scedosporiose, la Fusariose, et autres Trichosporose...

IV.5.2.1 La Cryptococcose

Avec la tuberculose et l'histoplasmosse, c'est la pathologie qui peut poser le plus de problème de diagnostic différentiel : c'est également une infection à levures à point de départ pulmonaire et à tropisme cutané par dissémination, mais c'est malheureusement le **tropisme neurologique** (fréquent) qui l'a rendue aussi célèbre que grave. *Cryptococcus neoformans* variété *neoformans* possède une **capsule** quasi pathognomonique qui confère un caractère muqueux aux colonies. Elle est particulièrement **sphérique**, de taille hétérogène et se multiplie par un mode de bourgeonnement particulier : la **blastosporulation multiple**.

Cette infection **opportuniste cosmopolite** touche tout particulièrement les patients infectés par le VIH. La symptomatologie classique est dominée par les manifestations de **méningo-encéphalites** où coexiste un syndrome méningé souvent incomplet (fièvre inconstante et peu élevée) associée à des signes neurologiques. Les **manifestations cutanées**, quand elles existent, (5% des cas) sont le plus souvent secondaires à une dissémination hématogène à partir du foyer pulmonaire provoquant des lésions multiples papulo-pustuleuses, acnéiformes, papuleuses ou nodulaires plus ou moins ulcérées siégeant surtout sur la face et aux extrémités. Parfois, la lésion cutanée est « primaire », unique et correspond à une inoculation.

IV.5.2.2 Les Candidoses profondes

Globalement, les candidoses sont les infections fongiques les plus fréquentes mais restent le plus souvent superficielles. La survenue d'une candidose dite « **profonde** » ou « **viscérale** », qui ne se développe que sur des terrains fragilisés (surtout chez les patients en soins intensifs), est une complication redoutable en raison d'une mortalité élevée, comparable à celle du choc septique (40-60%). Les facteurs de risques de candidose profonde sont dominés par la **neutropénie**, l'**antibiothérapie à large spectre**, l'existence d'une **voie veineuse centrale** et la **colonisation de plusieurs sites** par *Candida sp.*

L'expression la plus commune est la **candidémie**, avec simple état fébrile intermittent (décharges à partir d'un cathéter) allant jusqu'au syndrome septique grave avec dissémination multiviscérale rapidement fatale s'accompagnant d'éruption papulo-érythémateuse ou de myalgies diffuses. Les cibles viscérales sont essentiellement le foie (abcès hépatique), la rate, le poumon, l'endocarde et surtout l'œil (endophtalmies dans 10 à 40% des candidémies). Cliniquement, les candidoses profondes ne posent donc pas vraiment de problème de diagnostic différentiel avec la pénicilliose : la primo-infection est rarement pulmonaire et la contamination ne se fait pas par inhalation mais est généralement endogène à partir d'une colonisation. Pittet a d'ailleurs proposé un **indice de colonisation** permettant la discrimination précoce des patients à haut risque candidémique : c'est le rapport du nombre de sites colonisés sur le nombre de sites explorés (Pittet et al., 1994).

IV.5.2.3 Les Aspergilloses

Les aspergilloses (Germaud et al., 2001) sont un ensemble de pathologies diverses et variées, **essentiellement respiratoires** et provoquées par diverses espèces d' *Aspergillus* (surtout *A. fumigatus*). Ce sont des moisissures très répandues, **cosmopolites** et **ubiquistes** aussi bien en milieu rural qu'urbain, à l'extérieur qu'à l'intérieur avec des spores très petites (2 à 5µm). Les spores sont normalement éliminées par le tapis muco-ciliaire, les macrophages et les polynucléaires neutrophiles. Pour s'implanter et se développer, ces **pathogènes opportunistes** nécessitent donc des conditions favorables locales (cavité broncho-pulmonaire ou pleurale pré-existante, dilatation des bronches, mucoviscidose, BPCO) ou générales (surtout la neutropénie prolongée, hémopathies, corticothérapie, granulomatose septique chronique).

A partir d'une implantation pulmonaire, l'aspergillose reste localisée chez l'immunocompétent mais devient d'autant plus invasive et redoutable que l'immunodépression est profonde. On distingue schématiquement :

☞ **Chez l'immunocompétent :**

► L'**aspergillome**, véritable boule fongique (« truffe aspergillaire ») bien délimitée dans une caverne pré-existante (séquelle de tuberculose) qui provoque une toux plus ou moins associée à des hémoptysies. Les signes paracliniques majeurs sont l'image radiologique « du grelot » et une sérologie aspergillaire très positive. Le traitement est essentiellement chirurgicale complété ou non par l'injection intracavitaire de pâte d'amphotéricine B.

► L'inhalation et la persistance des spores aspergillaires chez les asthmatiques et les BPCO peuvent entraîner une réaction d'hypersensibilité avec asthme réaginique ou alvéolite allergique extrinsèque : c'est l'**aspergillose broncho-pulmonaire allergique (ABPA)**. Au niveau paraclinique, on retrouve des « bronchectasies proximales » à la radiologie et une sérologie fortement positive (IgG mais également IgE). Le traitement associe les corticoïdes et l'itraconazole.

☞ **Chez l'immunodéprimé :**

► L'aspergillose peut devenir invasive, déterminant l'**aspergillose pulmonaire invasive (API)** qui est devenue en deux décennies l'infection la plus redoutée en d'Hématologie clinique par son grand risque de dissémination vasculaire (hémocultures restant négatives) avec tropisme cutané, cérébral et défaillance multiviscérale rapidement fatale. Elle est facilement suspectée (pneumopathie infectieuse résistante aux antibiotiques chez un patient à haut risque d'API) mais difficile à confirmer (nécrose objectivée par un halo de densité atténué périlésionnel puis par l'aspect en croissant gazeux, sérologie faiblement positive mais antigénémie positive).

► Elle peut devenir semi-invasive, déterminant l'**aspergillose pulmonaire chronique nécrosante (APCN)** caractérisée par un envahissement plus lent avec inflammation chronique sans invasion vasculaire ni dissémination. L'extension pleurale ou pariétale se fait par contiguïté. Elle nécessite un traitement antifongique prolongé par amphotéricine B ou itraconazole.

IV.5.2.4 Les mycoses viscérales cosmopolites émergentes

Les nouveaux pathogènes opportunistes, qu'ils soient filamenteux (*Scedosporium*, *Fusarium*) avec présence de spores dans l'air ou levuriformes (*Trichosporon* qui colonise volontiers la peau), peuvent provoquer des mycoses profondes, de pronostic redoutable, avec des symptômes peu spécifiques mais des localisations cutanées fréquentes. Même s'ils sont encore exceptionnels, leur caractère cosmopolite doit les faire évoquer devant toute infection profonde de l'immunodéprimé d'autant que la prise en charge thérapeutique est différente du fait d'une résistance fréquente à l'amphotéricine B.

IV.5.3 AVEC LA TUBERCULOSE

La tuberculose évolue en deux phases : d'abord une primo-infection pulmonaire (la « **tuberculose infection** ») asymptomatique avec développement d'une réaction immunitaire de type hypersensibilité retardée, expliquant la réactivité aux tests cutanés (intradermo-réaction à la tuberculine). S'installe ensuite une phase de **latence** définitive, sauf dans 10% des cas où elle se transforme en « **tuberculose maladie** » de localisation essentiellement pulmonaire et parfois extra-pulmonaire par dissémination hémotogène. Bien que provoquée par une bactérie, **la tuberculose est très proche de la pénicilliose**. En effet :

- ▶ Elle associe des **signes respiratoires**, comme une toux prolongée, sèche ou productive, accompagnée parfois d'hémoptysies et de douleurs thoraciques, à des **signes généraux non spécifiques** comme une asthénie, un amaigrissement, l'anorexie et une fièvre avec sueur nocturne.

- ▶ Le **développement** de *Mycobacterium tuberculosis* est **intra-macrophagique** sous forme granulomateuse avec micro-abcès et possibilité de dissémination hémotogène.

► Alors qu'elle ne faisait que diminuer depuis 1952 (apparition de l'isoniazide), depuis 1991, son niveau le plus bas, la tuberculose connaît une recrudescence corrélée à l'extension de la pandémie de SIDA.

► C'est ici aussi **l'infection par le VIH qui constitue le facteur prédisposant majeur de développement** mais également de **dissémination**, augmentant les localisations extra-pulmonaires et la mortalité (plus du tiers des tuberculeux sont VIH+).

Par contre, **l'évolution caséuse** avec nécrose et **calcification** n'a pas été décrite dans la pénicilliose. De même, les signes radiologiques sont différents puisque pour la tuberculose, outre les éventuels adénopathies médiastinales, la radiographie objective l'existence de **nodules** et de **cavernes** siégeant volontiers dans les apex pulmonaires supérieurs. Enfin, l'évolution sans traitement est moins grave pour la tuberculose qui n'est fatale « que » dans 50% des cas.

IV.5.4 AVEC LA LEISHMANIOSE VISCERALE

La leishmaniose viscérale ou « kala-azar » est une maladie parasitaire généralisée des organes hématopoïétiques endémique dans le Sud de la France (foyer méditerranéen). Elle est due à l'envahissement des monocytes/macrophages et des polynucléaires par un protozoaire *Leishmania infantum*, transmis par la piqûre d'un diptère, le phlébotome. Classiquement, *Leishmania infantum* touche essentiellement l'enfant et provoque un tableau de **pancytopénie** ou tricytopénie **fébrile** avec **hypersplénisme** mais s'exprime de plus en plus chez l'adulte comme **opportuniste** dans deux circonstances d'immunodépression : l'infection VIH ou une corticothérapie, rejoignant ainsi le contexte de pénicilliose.

Elle constitue donc un **véritable diagnostic différentiel** d'autant que:

► d'authentiques pénicillioses se présentent comme des pancytopénies fébriles avec hépto-splénomégalie, sans lésions pulmonaire ni cutanée, comme c'est le cas pour le dernier cas français décrit à Nice (Rosenthal et al., 2000).

► la leishmaniose viscérale s'associe très fréquemment à une hépatomégalie, des poly-adénopathies et un amaigrissement intense.

IV.5.5 AVEC LA SARCOÏDOSE

La sarcoïdose, par son retentissement ganglionnaire, fait partie du diagnostic clinique différentiel de la pénicilliose mais, n'étant pas une pathologie infectieuse, elle ne sera pas traitée dans ce travail.

Le diagnostic différentiel est donc très difficile, de nombreuses confusions sont possibles : en cas d'atteinte viscérale, les pénicillioses sont **trop souvent étiquetées tuberculose** (Tsang et al., 1988) ou **histoplasmoses** (Drouhet, 1993). En cas de symptomatologie cutanée prédominante, c'est la **cryptococcose cutanée** ou un *molluscum contagiosum* qui peuvent être évoqués.

LE CARACTERE PEU SPECIFIQUE DES SIGNES CLINIQUES :
« LESIONS CUTANÉES AVEC FIEVRE ET TOUX PERSISTANTE_»
EXPLIQUE LA DIFFICULTE DU DIAGNOSTIC DIFFERENTIEL.

LA NOTION DE VOYAGE DANS LE SUD-EST ASIATIQUE RESTE UN ELEMENT CLEF

V DIAGNOSTIC PARACLINIQUE

L'imagerie médicale n'a qu'une valeur d'orientation, la radiographie pulmonaire est souvent normale, c'est le cas pour plus de 60 % des 80 pénicillioses rapportées par Supparatpinyo (Supparatpinyo and Sirisanthana, 1994). C'est plutôt le scanner qui permet d'objectiver des lésions pulmonaires le plus souvent **interstitielles**, des lésions ostéolytiques multiples bien délimitées, les adénopathies, et l'éventuelle hépatosplénomégalie.

VI DIAGNOSTIC BIOLOGIQUE

Le **diagnostic présomptif** de pénicilliose peut être évoqué rapidement grâce à l'examen direct ou aux réactions sérologiques. Ce n'est qu'en isolant *P. marneffe* par culture ou après inoculation à un animal sensible, que le **diagnostic de certitude** sera établi.

VI.1 CONTEXTE BIOLOGIQUE

Sur le plan hématologique, la pénicilliose s'accompagne classiquement d'une **anémie volontiers sévère**, mais **thrombopénie**, **neutropénie** et **lymphopénie CD4+** sont souvent associées, en particulier chez le VIH+ (Wortman, 1996;Bailloud et al., 2002). Cette **pancytopénie** souvent décrite peut s'expliquer par l'envahissement médullaire mais également par un syndrome d'hémophagocytose (Chim et al., 1998) qu'il est important de rechercher puisqu'il faut alors compléter le traitement antifongique par des immunoglobulines (Chokephaibulkit et al., 2001). L'**hyperleucocytose** avec **polynucléose** est également possible.

De nombreuses anomalies biochimiques sont décrites, citons :

► un **bilan hépatique** très souvent **perturbé** avec notamment une cholestase portant essentiellement sur l'**augmentation marquée des phosphatases alcalines** (Kantipong et al., 1998) plus ou moins accompagnée de transaminases augmentées avec ASAT>ALAT (profil habituellement retrouvé dans les atteintes hépatiques sévères).

► Un **syndrome inflammatoire chronique** avec une vitesse de sédimentation élevée et une hypergammaglobulinémie polyclonale à IgG, qui existe cependant chez la plupart des patients VIH+ même en l'absence de pénicilliose.

► Une **atteinte rénale** est également possible.

Le fait que le **contexte d'infection par le VIH** soit classique d'une part, et que la pénicilliose définisse le stade SIDA d'autre part, impose de rechercher une séropositivité pour le VIH si ce statut sérologique n'est pas connu.

VI.2 DIAGNOSTIC MYCOLOGIQUE

VI.2.1 LES PRELEVEMENTS

P. marneffeii peut être isolé de **nombreux liquides biologiques**, témoins du caractère disséminé des pénicillioses: la moelle osseuse (MO), le liquide broncho-alvéolaire (LBA), les ganglions lymphatiques, mais de façon moins invasive, la recherche peut être effectuée dans le sang, les selles ou les urines. Les hémocultures sont en effet positives dans 44 % des pénicillioses (Drouhet and Dupont, 1995).

Quand les lésions cutanées existent, un simple grattage puis étalement du matériel sur lame permet d'obtenir un frottis qui, après coloration objectivera la présence de levures d'aspect caractéristique. En fait, tout écoulement purulent (cutané, osseux ou muqueux), tout épanchement (pleural, synovial) et toute pièce opératoire (biopsie oesophagienne, hépatique...) peut contribuer à l'isolement et donc

au diagnostic de certitude d'infection à *P. marneffeï*. Les prélèvements doivent être adaptés à la clinique ; ainsi une pancytopénie ou une hépato-splénomégalie évoquent une atteinte hématopoïétique devant faire privilégier l'hémoculture et la myéloculture.

PONCTION DE MOELLE OSSEUSE, LIQUIDE DE LAVAGE BRONCHO-ALVEOLAIRE, CYTOPONCTION GANGLIONNAIRE SONT LES PRELEVEMENTS LES PLUS CONTRIBUTIFS MAIS DE NOMBREUX AUTRES ECHANTILLONS MOINS INVASIFS PEUVENT FACILEMENT PERMETTRE D'ISOLER *P. marneffeï* : (HEMOCULTURES, URINES, FROTTIS DE LÉSIONS CUTANÉES)

VI.2.2 L'EXAMEN DIRECT:

Cet examen est essentiel puisqu'à lui seul, il peut très vite orienter le clinicien vers un diagnostic présomptif de pénicilliose, devançant de quelques jours une culture positive qui reste l'élément clef du diagnostic de certitude.

L'examen direct de frottis, biopsies ou de coupes histologiques après coloration à l'acide périodique de Schiff (P.A.S.), au Giemsa, au Musto ou à l'imprégnation argentique de Gomori-Grocott est donc le moyen le plus simple et le plus rapide pour évoquer le diagnostic de pénicilliose. Les éléments fongiques sont le plus souvent intracellulaires, « libres » (par rupture des phogolysosomes) dans le cytoplasme des macrophages. Il s'agit d'éléments levuriformes non bourgeonnants. Ce qui « frappe », c'est l'aspect très polymorphe de ces cellules fongiques, surtout quand elles sont extracellulaires. Majoritairement ronde (2 à 3 µm), elles peuvent s'ovaliser, s'allonger et s'incurver jusqu'à devenir de vraies « saucisses cloisonnées » (5 à 10 µm). Ces dernières formes sont cloisonnées par des *septa* prenant bien la coloration.

Le diagnostic différentiel peut se poser avec *Histoplasma capsulatum var capsulatum* mais ces levures sont de taille légèrement inférieure, restent toujours ovale et se multiplient par bourgonnement. Il peut aussi se poser avec *Cryptococcus sp*, la différence se fait sur l'absence de capsule à l'encre de chine et sur le mode de

reproduction (fission contre bourgeonnement multiple). Il peut enfin se poser avec *Leishmania sp*, sur le myélogramme ou sur une ponction ganglionnaire, la coloration au MGG permet de visualiser des formes ovalaires le plus souvent intracellulaire de 2,5 sur 5 µm qui présentent un noyau et un kinétoplaste très réfringent les différenciant de *P. marneffe*.

VI.2.3 LA CULTURE

► Si la pénicilliose est suspectée, un milieu gélosé, glucosé de Sabouraud sera ensemencé à deux températures, 25°C (ou « température ambiante ») et à 37°C.

► Sinon, le *Penicillium*, pourra de toute façon se développer à 37°C même sur les milieux de bactériologie comme une gélose Muller-Hinton ou d'autres géloses au sang, il faut alors penser à mettre les milieux à température ambiante et la colonie blanc beige reprendra très vite un développement macroscopique caractéristique (surélévement du centre et apparition du pigment rouge)

VI.2.3.1 Aspect macroscopique

► A 22°C, apparition en 48 à 72h d'une colonie duveteuse, floconneuse, initialement jaune d'or virant au vert puis au rose, avec parallèlement diffusion d'un pigment rouge « groseille » dans toute la gélose. Sur le recto peut apparaître un exsudat condensé en fines gouttelettes.

► A 37°C, apparition, en 72h, d'une colonie beige muqueuse ou crémeuse d'abord lisse d'aspect très particulier, membraneux et glabre, ressemblant à certaines cultures bactériennes ou à des cultures de *Geotrichum*. La colonie se plisse secondairement avec apparition de circonvolutions cérébriformes.

VI.2.3.2 Aspect microscopique

► A 22°C, présence d'innombrables spores lisses et ovales, prenant volontiers la forme de citron (2 à 3µm) produites par des pinceaux biverticillés disposés sur des

filaments mycéliens. En effet, les conidiophores lisses portent 3 à 5 métules disposées en verticilles portant elles mêmes 3 à 5 phialides produisant les chaînes de spores. D'après Segretain, en observant attentivement le pinceau de *P. marneffe*, on distingue une dissymétrie dans l'implantation des métules, ce qui permet de subdiviser le groupe des biverticillés en **asymétriques** et **symétriques** (figure 3, page 22). *P. marneffe* appartient donc au groupe des **biverticillés asymétriques** (Segretain, 1959).

► A 37°C, présence de filaments mycéliens coexistant avec des formes de raccourcissement aboutissant à des articles séparés type arthrospore (arthroconidie) correspondant à la transformation en levure. A noter qu'il n'y a aucune fructification (absence de spore) puisque la **scissiparité remplace la conidiogénèse**. Ceci explique le caractère moins dangereux de cette culture. Au début la forme est celle de bâtonnets à bouts rectangulaires mais en vieillissant, les bouts s'arrondissent et les formes deviennent sphériques. Avec l'apparition de cloison sans rétrécissement, elles s'allongent et s'incurvent en « saucisse ».

L'aspect macroscopique des cultures, déjà très évocateur peut être complété si besoin par un examen microscopique.

Si l'on dispose en plus de la différence de croissance entre 22° et 37° C le diagnostic de ce champignon thermiquement dimorphique devient sans équivoque

VI.2.3.3 L'interprétation

L'isolement d'un *P. marneffe* en dehors de sa zone d'endémie suffit, pour affirmer son caractère pathogène. Par contre, la présence d'une espèce de *Penicillium* autre que *P. marneffe* et son interprétation biologique comme agent pathogène est

très délicate et devrait tenir compte de la présence ou non de filaments mycéliens à l'examen direct, de la rapidité de la culture et de la présence ou non d'autres contaminants. Si en plus le type de prélèvement est potentiellement contaminable, c'est l'isolement multiple d'un même *Penicillium* sur plusieurs prélèvements qui signe son caractère infectieux.

► L'isolement d'un *Penicillium* autre que *P. marneffe* en mycologie médicale est habituellement **considéré comme une contamination** car leur pouvoir pathogène est faible et leurs spores très petites sont aéroportées.

► L'isolement d'un *Penicillium marneffe* doit toujours être **considéré comme un agent infectieux**, ne serait-ce que parce qu'il est isolé en dehors de sa zone d'endémie, limitée à l'Asie du sud-est et parce qu'il est responsable de **mycose disséminée** grave chez l'homme.

VI.2.4 L'INOCULATION A L'ANIMAL

L'approche est plus lourde à mettre en œuvre puisqu'il faut disposer d'une animalerie ; cependant elle présente un avantage de taille : son **caractère moins dangereux** puisqu'il s'agit du stade parasitaire levuriforme et qu'il n'y a donc pas de production de spores.

Le diagnostic est posé lorsque l'animal développe une réticulose, objectivée par une grosse rate, un gros foie, des ganglions inguinaux hypertrophiés, un abcès du péritoine et/ou un abcès au point d'injection intra-péritonéal. Les éléments fongiques intra-histiocytaires caractéristiques sont mis en évidence par l'examen direct de ces différents prélèvements. En cas de difficultés, des « rétrocultures » de foie, rate ou de nodules peuvent être effectuées mais elles retardent encore le rendu du résultat, déjà très long par cette méthode.

Les animaux les plus sensibles à la pénicilliose sont les rats et les hamsters dorés, les souris et les cobayes ont une sensibilité intermédiaire alors que les lapins sont résistants.

VI.3 DIAGNOSTIC ANATOMOPATHOLOGIQUE

Les examens anatomopathologiques sont réalisés sur des coupes histologiques réalisées à partir de biopsies fixées dans du formol à 10%. Elles sont colorées par la coloration de **Gomori-Grocott** ou de PAS (acide périodique de Schiff).

Les aspects observés dépendent de l'état immunitaire de l'hôte puisque les anatomopathologistes observeront certes l'agent pathogène mais surtout la réaction histologique qu'il induit. Rappelons qu'en matière de réticulose, **l'immunité principalement cellulaire** se traduit essentiellement par la formation de granulome ayant pour but de circonscrire l'infection pour prévenir sa dissémination (Duong, 1996). Mais ici, les histiocytes grossissent et prolifèrent pour s'adapter au développement intracellulaire (rupture des vacuoles) du champignon puis se nécrosent libérant les levures qui provoquent l'accumulation des polynucléaires et la formation d'un abcès central. En 1996, Kudiken (Kudiken et al., 1996) montre en effet que la réaction cellulaire est capitale contre *P. marneffei* et en 1997 (sur un modèle animal), que cette granulomatose cellulaire peut même avoir des effets délétères en cas de forte inoculation il parle de réaction « hyperinflammatoire » (Kudiken et al., 1997).

En fait, il y a trois types possibles de réactions inflammatoires: Le **granulome** ou la **suppuration** chez l'immunocompétent et la réaction **anergique** chez l'immunodéprimé.

► La **granulomatose** qui caractérise l'immunocompétent est observée à la phase précoce de la pénicilliose surtout dans les organes riches en système réticulo-histiocytaire (poumon, foie, rate, moelle osseuse, ganglions lymphatiques...). C'est le résultat de la formation d'un amas d'histiocytes épithélioïdes entouré d'une couronne lymphocytaire.

► La réaction **suppurative ou purulente** est moins fréquente, elle concerne également surtout l'immunocompétent. Il y a formation d'abcès multiples

surtout pulmonaires ou cutanés constitués de polynucléaires et de fibrine avec présence de nombreuses levures de *P. marneffe*.

► La réaction anergique et nécrotique est le reflet d'une réaction immune totalement inadaptée avec tout au plus un infiltrat de macrophages distendus où prolifère *P. marneffe*. Essentiellement retrouvée dans le poumon, le foie ou la peau, elle est de mauvais pronostic puisque l'infection est alors rapidement progressive. Cet aspect est identique à la réaction anergique rencontrée dans l'histoplasmosse, la leishmaniose viscérale et la lèpre lépromateuse (Deng and Connor, 1985).

VI.4 DIAGNOSTIC IMMUNOLOGIQUE

Compte tenu de la confusion possible avec l'histoplasmosse et la cryptococcose, mais également de l'absence possible des manifestations cutanées évocatrices, **l'apport de l'immunologie dans le diagnostic de la pénicilliose est incontestable.** Cependant, à ce jour, aucune méthodologie n'est unanimement admise. Il n'y a en effet aucune standardisation et les quelques techniques publiées sont des techniques « maisons » qui utilisent des sources antigéniques diverses. Malgré la multiplication des publications récentes concernant le diagnostic sérologique et antigénique, **aucune trousse n'est encore disponible** sur le marché mondial du Dispositif Médical de Diagnostic In Vitro (D.M.D.I.V.) pour le dépistage sérologique de la pénicilliose.

Rappelons que le diagnostic immunologique reste surtout **présomptif** avec comme avantage majeur sa rapidité permettant d'initialiser la thérapeutique antifongique dans l'attente du résultat des cultures et ainsi de gagner quelques jours précieux en matière de prise en charge (Supparatpinyo and Sirisanthana, 1994).

VI.4.1 LES PRELEVEMENTS

Un autre avantage du diagnostic immunologique est le caractère non invasif de ces prélèvements (simple prise de sang). La recherche d'antigène, peut même s'effectuer sur simple échantillon urinaire permettant d'envisager le **dépistage de masse**, notamment pour déterminer la prévalence.

VI.4.2 METHODES DIAGNOSTIQUES BASEES SUR LA DETECTION D'ANTICORPS

Le diagnostic sérologique de *P. marneffe* est basé sur la **détection des anticorps anti-*P. marneffe*** présents de façon précoce, lors du contact profond avec le champignon. Vanittanakom décrit en effet un cas avec une réponse anticorps nette plus de deux mois avant que le diagnostic mycologique soit confirmé (Vanittanakom et al., 1997).

VI.4.2.1 Détection par technique d'immunodiffusion

Après les premiers travaux réalisés sur l'immunodiffusion (Sekhon et al., 1982), des anticorps précipitants spécifiques ou « **précipitines** » sont également détectés par immunodiffusion, dans deux cas importés de pénicilliose (Viviani et al., 1993) (Sekhon et al., 1994). Plus tard, les travaux de Kaufman mettent en évidence deux profils d'immunoprécipitation différents selon que l'on utilise des **antigènes solubles** ou **métaboliques**, obtenus par filtration de surnageant de culture de levures ou des **antigènes somatiques**, obtenus par broyat des levures (Kaufman et al., 1996).

En terme de spécificité, les anticorps ne sont détectés qu'en utilisant des antigènes des formes levures de *P. marneffe* puisque aucune réactivité n'est obtenue avec les antigènes issus du stade filamenteux. Les sérums de patient atteints de pénicilliose à *P. marneffe*, restent négatifs vis-à-vis des antigènes de plusieurs autres espèces de *Penicillium*. Il n'y a pas non plus de réactivité croisée avec l'antigène de *Candida*. Par contre, les anticorps de patients atteints de pénicilliose reconnaissent des antigènes du stade levure d'*H. capsulatum*. Ces réactions croisées peuvent être éliminées par adsorption sur des histoplasmes avant réalisation du test.

Le manque de sensibilité des techniques d'immunoprécipitation pour la recherche d'anticorps anti-*P. marneffe* chez le VIH+, rappelé par Kaufman est confirmé plus tard. En effet, seulement deux sur dix sept (Kaufman et al., 1996) et deux sur huit (Imwidthaya et al., 1997) sérums de patients VIH+ atteints de pénicilliose présentent de telles précipitines.

VI.4.2.2 Détection par technique d'immunofluorescence

Par une technique d' immunofluorescence indirecte, Yuen met en évidence, chez huit patients, pour la plupart immunocompétents puisqu'un seul était VIH+, des anticorps de classe IgG à un titre supérieur au 1/160^{ème} tandis que 78 sérums « contrôles » et 95 sérums de patients présentant des fièvres d'étiologies diverses ne dépassent pas le 1/40^{ème} (Yuen et al., 1994).

VI.4.2.3 Détection par techniques immunoenzymatiques

Afin de développer des techniques plus sensibles répondant au contexte d'immunodépression, presque toujours présent au cours de la pénicilliose, certains auteurs ont, dans un premier temps, tenté de caractériser plus précisément la réponse humorale aux antigènes de *P. marneffe*. Ainsi, l' immunoempreinte (Western Blot), après séparation électrophorétique et transfert d'un antigène métabolique de *P. marneffe*, a pu mettre en évidence l'existence de protéines de 61, 54 et 50 kDa qui sont reconnues respectivement chez 86%, 66% et 53% de patients sidéens atteints de pénicilliose prouvée. Il a été montré que la protéine de 61 kDa possède une homologie de séquence (80%) avec les catalases fongiques d'*A. fumigatus* et d'*H. capsulatum* tout en étant antigéniquement différente. Elle serait en outre un marqueur précoce d'infection (Jeavons et al., 1998).

Les auteurs signalent également une bande de 38 kDa qui semble beaucoup plus spécifique de ce dimorphique puisque aucun antigène de 38 kDa n'est mis en évidence par ces mêmes sérums dans les antigènes d'*Aspergillus sp.*, de *Cryptococcus neoformans*, d'*H. capsulatum*, de *Candida albicans* ni de deux autres espèces de *Penicillium* (Chongtrakool et al., 1997; Jeavons et al., 1998; Vanittanakom et al., 1997). Chongtrakool montre par ailleurs que la bande de 38 kDa est présente chez un nombre significatif de patient VIH+ atteint de pénicilliose confirmée (30 sur 65) mais qu'elle

est également retrouvée, chez plus de 10% des patients VIH+ complètement asymptomatique (46 sur 430) ce qui suggère l'existence de **pénicilliose infraclinique**. Toutefois, l'antigène de 38 kDa étant très immunogène, l'absence de réponse humorale contre celui-ci dans certains cas pourrait s'expliquer par un degré d'immunodépression plus avancé. A noter qu'il existe également dans le surnageant des cultures d'*H. capsulatum* une bande légèrement inférieure à 38 kDa. Celle-ci n'est pas détectée par les sérums de patients atteints d'Histoplasmosse disséminée....D'autres auteurs ont tenté de caractériser les protéines antigéniques présentes dans l'antigène somatique de la phase levure : la plupart des constituants de cette phase sont des **glycoprotéines**. Ces antigènes somatiques affichent en outre des réactions croisées avec les anticorps dirigés contre *Candida* sp alors qu'il n'y a pas d'interférence avec les anticorps anti-*Aspergillus*.

Les stratégies de diagnostic immunologique se sont ensuite portées sur l'utilisation d'antigènes purifiés (voire recombinants) dans des **systèmes immunoenzymatiques E.L.I.S.A.** associant ainsi respectivement spécificité et sensibilité. Ainsi, Cao et al isolent une **protéine spécifique de *P. marneffei*** appartenant aux **galactomannoprotéines**, protéines structurales majeures des membranes fongiques. Nommée **Mp1p**, son clonage en protéine recombinante (Cao et al., 1998a) permet la mise en évidence d'anticorps de manière spécifique dans 42% (Cao et al., 1998b) et 80% (Cao et al., 1999) des patients VIH+ avec pénicilliose.

VI.4.3 METHODES DIAGNOSTIQUES BASEES SUR LA DETECTION D'ANTIGENES CIRCULANTS

La recherche d'antigènes sériques circulants est théoriquement **plus prédictive d'une infection active** que la recherche d'anticorps qui ne permet pas de différencier, du moins sur un prélèvement isolé, une infection ancienne d'une infection en cours.

VI.4.3.1 Détection par des hyperimmunsérums

Les premières techniques rapportées par Kaufman sont basées sur l'utilisation d'**hyperimmunsérum** de lapin, produit par immunisation à l'aide d'un antigène métabolique obtenu à partir d'arthroconidies de *P. marneffe*. La recherche d'antigène est alors réalisée par **immunodiffusion** et par **agglutination** de particules de latex sensibilisées. Ces travaux, portant exclusivement sur des pénicillioses associées au VIH, montrent la supériorité de la détection d'antigènes par rapport à celle d'anticorps en immunoprécipitation. L'agglutination est la plus sensible (76,5% contre 59% pour l'immunodiffusion). Elle est en outre plus simple d'utilisation et semi-quantitative. Quant à la spécificité, elle est, pour les deux techniques, excellente, avec absence totale de réactions croisées vis-à-vis de six cryptococcoses et douze histoplasmoses (Kaufman et al., 1996).

VI.4.3.2 Détection par des anticorps monoclonaux

Compte tenu de la grande variabilité inter-lot d'un hyperimmunsérum et afin de définir le ou les antigènes détectés, certains travaux se sont portés vers les **anticorps monoclonaux**. L'utilisation d'un anticorps monoclonal anti-Mp1p dans une technique **E.L.I.S.A** permet d'obtenir une sensibilité de 65% sur 26 sérums de pénicilliose (Cao et al., 1999). Plus récemment, Panichakul et al ont développé un anticorps de nature IgM utilisé dans un test E.L.I.S.A où la capture antigénique est révélée par des anticorps polyclonaux biotinylés. Les résultats sont très satisfaisants avec une sensibilité de 90%, une spécificité de 100% ainsi qu'une valeur prédictive positive de 100% et négative de 97% (Panichakul et al., 2002).

VI.4.3.3 Détection d'antigènes urinaires

Parallèlement à ces travaux visant à poser un diagnostic de pénicilliose à partir d'un prélèvement de sang, d'autres auteurs ont explorés l'intérêt des urines. Ainsi

Wheat et al montrent qu'il est possible de détecter, à l'aide d'un test normalement utilisé pour la recherche d'antigène polysaccharidique d'*Histoplasma*, des antigènes similaires au cours de la pénicilliose (17 sur 18 patients). Plus tard, Desakorn montre que des antigènes de *P. marneffeii* peuvent être spécifiquement détectés, à des titres élevés, **dans les prélèvements urinaires** de 97% des patients atteints de pénicilliose par E.L.I.S.A. utilisant des IgG polyclonales de lapin (Desakorn et al., 1999). Puis, à l'aide de ce même hyperimmunsérum, un **Dot Blot** et un test d'**agglutination** au latex ont été développés et comparés à l'E.L.I.S.A. en zone d'endémie. L'agglutination présente une fois de plus des performances supérieures avec une sensibilité de 100% sur 37 patients, une spécificité de 99,3% et une valeur prédictive positive de 96,9%. Conjugué à une simplicité d'utilisation, la recherche d'antigènes par agglutination au latex pourrait s'avérer un atout majeur dans le diagnostic d'une pénicilliose surtout dans les zones d'endémie où la présence d'antigènes urinaires signe le caractère évolutif de la pathologie (Desakorn et al., 2002).

VI.4.4 COMBINAISON DE LA DETECTION D'ANTIGENES ET D'ANTICORPS

A l'instar de ce qui existe pour le diagnostic de l'aspergillose, **la recherche d'antigènes et d'anticorps** est tout à fait complémentaire. C'est ainsi que Kaufman obtient une sensibilité de 82,5% (versus 76,5% pour l'antigène seul) en associant les deux techniques (Kaufman et al., 1996) et que Cao fait passer la sensibilité du diagnostic de 65% à 88% en y associant la recherche d'anticorps anti-Mp1p, permettant surtout d'atteindre une valeur prédictive négative de 97% et une positive de 100% (Cao et al., 1999). Toujours par la recherche couplée d'antigène Mp1p et d'anticorps anti-Mp1p avec un E.L.I.S.A. « sandwich », Wong et al rappellent la précocité de la réponse immunologique par rapport au diagnostic mycologique puisque les anticorps mais surtout les **antigènes** sont constamment détectables avant la

fongémie, dans certains cas, au moins trente jours avant toute culture positive (Wong et al., 2001).

Dans l'aspergillose invasive, la détection de l'antigène aspergillaire est utilisée pour suivre la réponse thérapeutique. Cette utilisation reste en cours d'évaluation pour les antigènes de *Penicillium* mais Wong a d'ores et déjà démontré qu'une thérapeutique antifongique adaptée, négative puis maintient négatif, à la fois les antigènes et les anticorps (Wong et al., 2001). Viviani rapporte également une diminution des précipitines au cours d'une thérapeutique efficace chez le premier cas italien (Viviani et al., 1993)

Même si la réponse sérologique a **peu de rôle** dans les mécanismes de défense, elle est **présente de façon précoce** et peut donc être considérée comme le **témoin d'un contact profond avec *P. marneffe***. L'association avec une recherche d'antigène, augmente considérablement les performances et constitue une démarche diagnostique plus cohérente en zone d'endémie

VI.5 DIAGNOSTIC PAR BIOLOGIE MOLECULAIRE

La biologie moléculaire prend une place de plus en plus importante dans la recherche concernant le diagnostic de la pénicilliose mais manque encore de standardisation.

Initialement, le génome de *P. marneffe* a été détecté à partir d'échantillon de sang par **hybridation moléculaire**. Puis le récent séquençage de l'ARN ribosomal 18 S (Vanittanakom et al., 1998) a permis l'utilisation de nouvelles amorces spécifiques de *P. marneffe* utilisées seules dans des **PCR** simples ou associées à une deuxième paire cette fois universelle (amorce externe panfongique) dans une **Nested PCR** (Vanittanakom et al., 2002). Ces techniques de biologies moléculaires peuvent être utilisées pour la mise en évidence directe du génome de *P. marneffe* dans les prélèvements biologiques. Elles ont également été développées pour identifier rapidement une culture fongique. L'identification d'une culture mesurant à peine 2 mm de diamètre prend moins de 12 heures en Nested PCR et moins de 9 heures en PCR simple, accélérant ainsi le diagnostic mycologique conventionnel (Vanittanakom et al., 2002).

Actuellement aucune étude n'a validé l'apport de la biologie moléculaire dans le diagnostic de routine de la pénicilliose à *P. marneffe*...

VII TRAITEMENT

Le traitement d'une pénicilliose doit être **instauré rapidement** et ne doit pas être uniquement antifongique, en effet l'état immunitaire du patient est essentiel pour l'efficacité, il faut donc assurer parallèlement une **restauration immune** (traitement de la cause de l'immunodépression).

Les différentes souches de *P. marneffe* isolées sont, *in vitro*, hautement sensibles aux principaux antifongiques d'usage systémique, à savoir : la 5 fluorocytosine (ANCOTIL[®]), l'itraconazole (SPORANOX[®]) et même le kétoconazole (NI ZORAL[®]) et le miconazole (DAKTARIN[®]). Par contre la sensibilité à l'amphotéricine B (FUNGI ZONE[®], AMBISOME[®], ABELSET[®]) est un peu moins grande et une résistance est souvent décrite pour le fluconazole (TRIFLUCAN[®]) (Drouhet and Dupont, 1995).

En pratique, différents choix sont possibles pour traiter une pénicilliose puisque l'amphotéricine B (0,3 à 0,6 mg/kg/jour pendant 6 à 8 semaines) et l'itraconazole (400 mg/jour pendant 8 à 12 semaines) ont montré une efficacité clinique identique. Malgré les résultats, *in vitro*, moins probants pour l'amphotéricine B, elle reste pourtant recommandée pour traiter les formes sévères (0,6mg/kg/jour pendant 2 semaines) relayée secondairement par de l'itraconazole (400mg/jour pendant 10 semaines); Ce schéma a donné un taux de réponse clinique de 97% dans la série de Sirisanthana portant sur 74 patients VIH+ ayant une infection disséminée. (Sirisanthana et al., 1998) L'itraconazole en première intention représente une alternative intéressante pour les infections modérées ou bénignes (focales) (Nittayananta, 1999) ou en cas de contre-indication à l'amphotéricine B.

Devant l'existence, chez le VIH+, de **rechutes fréquentes** à l'arrêt du traitement antifongique (25% (Sirisanthana, 1997) à 50% des cas (Supparatpinyo et al., 1993)), une **prophylaxie secondaire à vie** a montré son efficacité.

La durée minimale du traitement d'une pénicilliose est donc de deux mois auquel s'ajoute, chez l'immunodéprimé, un traitement d'entretien (ou « chimioprophylaxie secondaire ») à vie par voie orale de 200mg/jour d'itraconazole permettant d'éviter les rechutes (Supparatpinyo et al., 1998)

Les nouveaux antifongiques comme le voriconazole (Kappe, 1999) et même les échinocandines (capsosungine) possèdent une très bonne activité sur *P. marneffe*. Cependant les outils actuellement disponibles ne manquent pas d'efficacité et les perspectives thérapeutiques devraient plutôt se tourner vers d'autres stratégies de prise en charge (plus rapide) ou même prophylactique chez certains patients à hauts risques.

Le traitement doit être **précoce**, de préférence initié par de **l'amphotéricine B** et maintenu pendant au moins deux semaines puis relayé par **l'itraconazole (400mg per os)** pendant dix semaines suivi, chez l'immunodéprimé, d'une chimioprophylaxie secondaire à vie par itraconazole (200mg per os) afin d'éviter les rechutes

Deuxième partie : MATERIELS
ET METHODES

VIII LA TECHNIQUE E.L.I.S.A.

VIII.1 PROTOCOLE OPERATOIRE

VIII.1.1 PRESENTATION DE LA TROUSSE E.L.I.S.A.

L'E.L.I.S.A. a été standardisée au laboratoire de Parasitologie et de Mycologie médicale de la Faculté de Pharmacie de Nantes (Dr Le Pape). Il s'agit d'une méthode en **phase hétérogène**. La phase solide est constituée de polystyrène présenté sous forme de microplaque « immunosorb » Nunc[®] permettant une lecture photométrique directe. L'antigène fixé est un antigène métabolique de *P. marneffei*. Chaque trousse contient le matériel nécessaire pour réaliser 96 tests immunoenzymatiques. Les réactifs nécessaires à la sérologie sont fournis dans la trousse : Douze barrettes sécables de huit puits sensibilisés par de l'antigène métabolique de *P. marneffei*, un conjugué polyclonal de lapin anti-IgG humaines marqué à la peroxydase et un substrat TMB (3, 3', 5, 5' tétraméthylbenzidine). Tous les réactifs de la trousse sont conservés entre 2 et 8°C.

Un témoin négatif, un témoin positif, ainsi qu'un seuil sont testés dans chaque série. Ce « seuil » ou cut off a été préalablement défini à partir des valeurs de Densités Optiques (D.O.) obtenues pour les sérums de 30 femmes enceintes suivies pour leur sérologie toxoplasmique par le laboratoire de parasitologie du CHU de Nantes. Sa valeur est définie comme la moyenne des D.O. à laquelle sont ajoutées trois déviations standard (Voller et al). La préparation des microplaques est détaillée en annexe 2.

VIII.1.2 PREPARATION DES REACTIFS AVANT USAGE

Tous les réactifs doivent être sortis de la chambre froide une demi-heure avant utilisation.

► Barrettes sensibilisées : Ne sortir du sachet que le nombre de barrettes nécessaire, refermer le sachet aluminium en vérifiant la présence d'un dessiccateur type silicagel.

► Diluant PBS-Tween : Le diluant concentré est à 10X, le diluer au 10^{ème} avec de l'eau distillée.

► Solution de lavage PBS : Diluer 50mg de poudre pour 1 litre d'eau distillée.

► Conjugué anti IgG humaines marqué à la peroxydase : préparer la quantité nécessaire à la manipulation en diluant au 1/100ème dans du TBS-Tween.

► Témoins négatif, positif et cut off : Diluer 10µl de chaque échantillon dans 190µl de TBS-Tween. Ils sont alors prêts à être déposés dans les puits.

► Solution de substrat et d'arrêt sont prêtes à l'emploi, veiller cependant à ce que le substrat soit ramené à température ambiante.

VIII.1.3 MODE OPERATOIRE

VIII.1.3.1 Etape I : Incubation des sérums échantillons

Remplir le premier puit de la barrette avec 100µl de diluant échantillon (blanc) et les trois puits suivants avec 100µl des sérums témoins (négatif et positif) et de cut off. Les autres puits sont remplis par 100µl des sérums à tester, préalablement dilués au 20^{ème} (10µl de sérum dans 2ml de diluant). Recouvrir la barrette d'un film protecteur adhésif et placer dans une étuve à 37°C pendant 1 heure. Vider ensuite les barrettes par retournement puis effectuer 4 lavages successifs par du tampon de lavage.

VIII.1.3.2 Etape II : Incubation avec le conjugué

Dans chacun des puits, distribuer 100 µl de conjugué anti-IgG humaine préalablement dilué, couvrir et incuber 1 heure à 37°C. Les puits sont vidés et lavés par 4 lavages successifs à l'aide du tampon de lavage.

VIII.1.3.3 Etape III : Incubation avec le substrat

Dans chacun des puits, distribuer 100µl de la solution de substrat chromogène de TMB, couvrir et incuber 30 minutes à 37°C. Cette solution, initialement incolore, permet le développement d'une coloration jaune stoppée par ajout de 50µl de solution d'arrêt (acide sulfurique molaire).

VIII.1.3.4 Etape IV : Mesure de la Densité Optique

L'absorbance obtenue à 450nm (contre 620nm) est directement proportionnelle à la quantité d'anticorps spécifiques fixés, est mesurée dans l'heure qui suit à l'aide d'un photomètre après avoir fait le zéro sur le puit « blanc ».

VIII.1.3.5 Etape IV : Expression des résultats-

Interprétation

Pour simplifier l'interprétation et pallier les variations entre chaque essai, les résultats sont exprimés en index par rapport à la valeur du seuil (« de positivité ») La valeur **index** est égale au rapport de la différence de D.O. du **sérum à tester** moins celle du blanc sur la différence DO du **seuil** moins celle du blanc. Un index supérieur ou égal à 1,2 définit une réaction positive. Une valeur entre 0,8 et 1,2 est en zone dite grise correspondant à une réaction douteuse qui impose normalement un nouveau prélèvement (impossible dans notre étude du fait du caractère rétrospectif). Dans ce cas, nous avons choisi de réévaluer le même prélèvement et de retenir la moyenne des deux index. Une série ELISA est validée si la D.O. du seuil est comprise entre 0,5 et 0,8.

VIII.2 CONTROLE DE QUALITE

Une étude des performances à été réalisée en terme de répétabilité et reproductibilité.

VIII.2.1 ETUDE DE REPETABILITE

La répétabilité (reproductibilité intra-essai) peut être définie comme la « **précision dans la série** » d'une méthode. Le même opérateur applique la technique sur le même échantillon, dans le même laboratoire, avec les mêmes appareils et les mêmes réactifs au cours d'une même série d'analyses. A partir des résultats, on objective le manque de précision ou « imprécision » par le coefficient de variation intra-série.

Notre étude de répétabilité du test ELISA, est effectuée à partir d'un sérum positif en ELISA (index proche de 1) déposé quinze fois dans la même série.

VIII.2.2 ETUDE DE REPRODUCTIBILITE

La reproductibilité (inter-essai) caractérise la « **précision entre plusieurs séries** » qui est obtenue à partir d'un aliquot du même échantillon distribué au hasard dans différentes séries d'analyses par des opérateurs différents.

L'étude a été effectuée sur le même sérum dont l'index en E.L.I.S.A. est proche de 1. Il est testé dans neuf séries différentes réalisées sur plus d'un mois, par deux opérateurs différents.

VIII.3 ETUDE DE LA SENSIBILITE

Dans le cadre de cette pathologie émergente, sévissant exclusivement en Asie du Sud-est, l'obtention de sérum de patient dont le diagnostic est confirmé par la mycologie est difficile. C'est pourquoi l'étude de la sensibilité a été réalisée uniquement sur les sérums de quatre cas français de pénicilliose importée diagnostiquée respectivement à Rouen, Alès, Nantes et Paris.

VIII.4 ETUDE DE LA SPECIFICITE

La spécificité d'un test est l'aptitude à mesurer l' « analyte » désiré et seulement celui-ci, même si des substances de structure proche se trouvent en quantité importante dans le spécimen. Différents niveaux de spécificité doivent être analysés. Pour ce faire, nous avons choisi deux populations : une population de sérums à très faible risque d'interférence (« sérums négatifs ») et une population à fort risque de réactions croisées. Ces derniers, ayant été sélectionnés en fonction de **critère de diagnostic clinique différentiel** (sérums de patients cliniquement compatibles avec une pénicilliose) mais également en fonction de **pathologies causées par des organismes taxonomiquement proches**.

VIII.4.1 SUR SERUMS NEGATIFS

Ce premier niveau d'étude de la spécificité de la trousse a été évalué de façon rétrospective, sur 36 sérums issus de patients immunocompétents *a priori* indemnes de toutes mycoses profondes (sérologie candidosique et aspergillaire négative) et dont le risque statistique de contact avec *P. marneffe* est quasi nul. Ces patients sont essentiellement des femmes jeunes, enceintes, ayant une sérologie toxoplasmique négative (6 Hommes et 30 Femmes). Ces sérums sont issus de la sérothèque du laboratoire de Parasitologie, mycologie médicale et immunologie parasitaire (Pr Marjolet) du CHU de Nantes.

VIII.4.2 ETUDE DES REACTIONS CROISEES

Dans un premier temps, une recherche de sérums immunologiquement positifs pour les sérologies aspergillaire et candidosique a été réalisée à partir d'une exploitation des résultats de laboratoire de 1997 à 2001 inclus. Les premiers critères de positivité étaient, une hémagglutination supérieure ou égale à 1/320 et/ou 2 arcs d'immunoélectrophorèse. A partir d'une centaine de dossiers, une deuxième sélection a été réalisée par confrontation des données cliniques. Les 33 patients retenus ont

été classés selon que leur pathologie est « prouvée », « hautement probable » ou « fortement suspectée ». Selon le même principe, à partir d'antigène cryptococcique positif, 13 cryptococcoses prouvées ont été sélectionnées.

Les sérums étudiés sont issus du CHU de Nantes ou de ces périphériques, la Roche/Yon et St Nazaire et sont conservés congelés à -20°C dans les sérothèques du laboratoire de Mycologie médicale et immunologie parasitaire (Pr Marjolet) mais également de Virologie, Hygiène et bactériologie (Pr Drugeon). Ils ont tous été aliquotés et conservés au congélateur à -20°C.

VIII.4.2.1 Candidoses profondes

Nous avons choisi des candidoses prouvées par une culture positive de *Candida sp* sur des sites profonds comme des abcès hépatiques, des liquides d'ascite, des hémocultures... Devant le faible nombre de candidoses prouvées, le recrutement est élargi à des candidoses « hautement probables » avec colonisation de sites périphériques multiples ou suspicion immunologique par l'hémagglutination (CHAI) et l'immunoélectrophorèse (IEC). Les 11 candidoses profondes retenues sont présentées en annexe 3.

VIII.4.2.2 Cryptococcoses

Tous les sérums retenus possèdent une confirmation mycologique de la présence de cryptocoques par une culture positive dans au moins un des sites suivants, LCR et/ou hémoculture pour le groupe des cryptococcoses neuroméningées (n=9) et biopsie cutanée pour les cryptococcoses cutanées (n=4). Les cryptococcoses cutanées sont présentées en annexe 4

VIII.4.2.3 Aspergilloses

Cinq sérums d'aspergillose chronique nécrosante ont été retenus parmi des patients possédant tous au moins trois des cinq critères suivants : Isolement pulmonaire d'*Aspergillus sp*, augmentation de la sérologie aspergillaire, majoration relativement rapide de la symptomatologie ou des opacités radiologiques, caractère semi-invasif prouvé par l'anatomopathologie.

Sept sérums d'aspergillose invasive, avec au moins deux des quatre critères suivants : terrain d'immunodépression cellulaire, apparition ou augmentation du titre d'antigène aspergillaire circulant, présence au scanner d'un aspect de nodules diffus ou d'une image en croissant gazeux.

Quatre sérums d'aspergillose broncho-pulmonaire allergique dont les critères de sélection sont : sérologie aspergillaire très positive, présence d'un taux élevé d'IgE non spécifiques et d'IgE spécifiques.

Six sérums d'aspergillome avec comme critères de sélection : image radiologique du grelot, truffe aspergillaire, cavité pré-existante pulmonaire, sérologie fortement positive.

Au total, 22 pathologies aspergillaires seront testées, leurs caractéristiques sont résumées dans l'annexe 5, 6, 7 et 8.

VIII.4.2.4 Histoplasmoses

Cinq sérums issus de patients atteints d'histoplasmoses prouvées nous ont été gracieusement confiés par le Pr Dupont, service de mycologie médicale de l'institut Pasteur de Paris.

VIII.4.2.5 Fusariose

Il nous a semblé intéressant de tester un sérum, obtenu chez une patiente d'hématologie clinique présentant une fusariose confirmée par une biopsie cutanée et trois hémocultures positives à *Fusarium oxysporum*.

IX HEMAGGLUTINATION ET IMMUNO-ELECTROPHORESE

Pour rechercher les anticorps anti-*Aspergillus* et anti-*Candida*, nous avons fait appel aux deux techniques utilisées en routine au laboratoire de parasitologie du CHU de Nantes. L' **hémagglutination** comme méthode quantitative pour le dépistage et l' **immunoélectrophorèse** comme méthode de confirmation.

IX.1 L'HEMAGGLUTINATION INDIRECTE

Cette méthode, commercialisée par Fumouze® (Paris, France) présente l'avantage de donner une réponse **quantitative** sous forme de titre d'anticorps : inverse de la dernière dilution donnant une hémagglutination positive. Son caractère simple et rapide couplé à une grande sensibilité explique son utilisation en **dépistage**. On parlera d'hémagglutination aspergillaire (AHAI) et candidosique (CHAI).

IX.1.1 PRINCIPE

Les hématies de mouton recouvertes d'antigènes métaboliques jouent le rôle de particules inertes sensibilisées. Elles sédimentent s'il n'y a pas d'anticorps spécifiques formant un bouton au fond du puits. Elles s'agglutinent entre elles formant un voile uniforme si les anticorps sont présents.

IX.1.2 MODE OPERATOIRE

Des dilutions du sérum à tester sont mises en contact avec la suspension d'hématies sensibilisées pendant deux heures. Un témoin positif de titre connu ainsi qu'un témoin « réactif » (sans sérum) sont testés dans les mêmes conditions pour apprécier la qualité de l'hémagglutination et s'affranchir des phénomènes d'auto-agglutinations. Dans chaque série est également testé un témoin « sérum » (sérum/hématies non sensibilisées) pour vérifier l'absence d'agglutinines naturelles anti-mouton. Le mode opératoire détaillé est présenté en annexe 9.

IX.1.3 INTERPRETATION

L'hémagglutination est considérée comme positive lorsque le voile s'étend sur plus de la moitié du diamètre du puit. Un sérum est considéré comme positif pour un titre supérieur ou égal au 1/320.

IX.2 L'IMMUNOELECTROPHORESE

L'immunoélectrophorèse (IEF) aspergillaire (IEA) ou candidosique (IEC) est la méthode de référence de détection des anticorps précipitants mais elle est longue et consommatrice de sérum et d'antigène.

IX.2.1 PRINCIPE

L'IEF s'opère en deux temps, une étape de migration et de séparation électrophorétique des différents composés protéiques de l'antigène suivie d'une diffusion perpendiculaire des immunoglobulines sériques pour que leur rencontre provoque un arc de précipitation. Pour *Aspergillus sp*, l'activité catalasique (et/ou chymotrypsique) est ensuite mise en évidence.

IX.2.2 MODE OPERATOIRE

Le système utilisé au laboratoire de parasitologie est une méthode adaptée par Beckman sur gel Paragon®, réalisée en 48h avec dépôt d'antigène métabolique et somatique directement sur le gel. Les différents arcs de précipitation sont mis en évidence par du bleu de Coomassie et l'activité catalasique est recherchée (figure 10). Le protocole détaillé est présenté en annexe 10.

Un contrôle positif est passé en parallèle (sérum de lapin sensibilisé par des antigènes mixtes d'*A. fumigatus*).

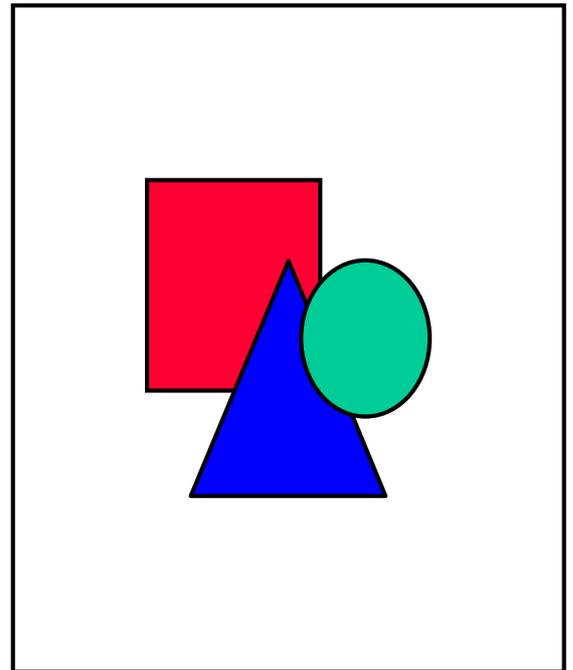


Figure n°10: Exemple de deux sérums très positif en immunoelectrophorèse.

IX.2.3 INTERPRETATION

Un sérum est considéré comme positif à partir de trois arcs de précipitation. Deux arcs peuvent suffire si l'un des arcs possède une activité catalasique (arc J) considérée comme spécifique d'*A. fumigatus*.

X L'IMMUNOEMPREINTE OU WESTERN BLOT

X.1 PRINCIPE DE LA TECHNIQUE

Le but de l'immunoempreinte (Western Blot) est de fractionner l'antigène en fonction du poids moléculaire des protéines qui le composent par électrophorèse en condition dénaturante (gel de polyacrylamide à 10% en présence de SDS), puis de les transférer ("Blotting") sur une membrane de nitrocellulose. La membrane est séchée puis découpée en bandelette. Chaque bandelette est alors mise en contact avec un sérum et la fixation des anticorps sur un site antigénique sera révélée par un conjugué marqué et se matérialisera alors par une bande colorée lors de l'ajout du substrat. En comparant la position de chaque bande obtenue avec celle d'un témoin constitué de protéines de masses moléculaires connues placé en parallèle dans chaque série de Western Blot, on déterminera le poids moléculaire de la protéine reconnue. La description des bandes (nombre et masse moléculaire apparente) caractérise un profil particulier.

X.2 PREPARATION DE L'ANTIGENE METABOLIQUE

La solution antigénique est obtenue par culture du stade levuriforme à 37°C sur milieu liquide BHI d'une souche de *P. marneffeii*, entretenue sur milieu gélosé au Malt. Cette souche (PM NAN01) provient d'une patiente Nantaise VIH+ d'origine thaïlandaise (Miegeville et al., 1998). Le milieu de culture contenant les protéines métaboliques est récupéré par centrifugation (3000g pendant 30min) puis concentré lors d'une dialyse contre du polyvinylpyrrolidone. Afin de conserver l'antigène, une lyophilisation est finalement réalisée.

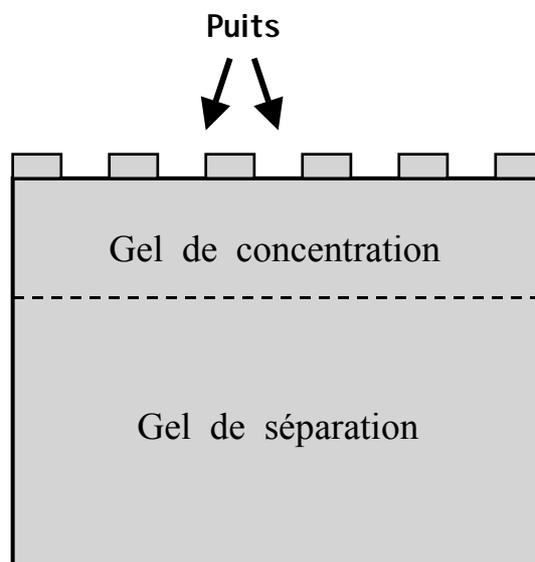
Les antigènes de 4, 6 et 11 jours de culture ont été contrôlés, afin de définir l'antigène à utiliser pour le Western Blot. Ce contrôle a porté sur la concentration protéique déterminée par la méthode colorimétrique de Bradford (1976) utilisant le bleu de Coomassie (annexe 11). Elle est exprimée en μg de protéines par milligramme de lyophilisat. Parallèlement, les profils électrophorétiques après SDS-PAGE à 10% et coloration au nitrate d'argent (annexe 11 bis) ont été comparés.

X.3 PROTOCOLE OPERATOIRE

X.3.1 ELECTROPHORESE

La première étape consiste en une **séparation électrophorétique** de la solution antigénique en **système discontinu** (pour concentrer les protéines juste avant la séparation), en **SDS** et en **condition dénaturante** (2 mercaptoéthanol) pour que la séparation se fasse selon le poids moléculaire indépendamment de la charge et de la forme initiale.

Elle est réalisée sur gel de **polyacrylamide** qui se polymérise extemporanément par ajout successif, d'un initiateur : du **persulfate d'ammonium** et d'un activateur de polymérisation : du **T.E.M.E.D.**



En présence d'un détergent, le **SDS**, tous les résidus aminés se chargent négativement et par action de **2 mercaptoéthanol**, qui coupe les ponts disulfures, les structures tridimensionnelles sont perdues. C'est pour ces deux raisons que la migration en **SDS PAGE** se fait de façon inversement proportionnelle à la **masse moléculaire des protéines**. Elle est d'ailleurs déterminée par comparaison avec un

marqueur de taille placé aux deux extrémités du gel. L'ensemble est alors soumis à un champ électrique continu généré par une différence de potentiel de 100 V pendant 90 min. La référence de poids moléculaires ainsi que la préparation et la composition des gels sont détaillés dans l'annexe 12.

X.3.2 ELECTROTRANSFERT

La deuxième étape est une **méthode de transfert** des protéines présentes au sein du gel à la surface d'un support que l'on pourra conserver et découper: une **membrane de nitrocellulose**. Ce « blotting » se fait en milieu liquide comme indiqué en annexe 13.

X.3.3 PREPARATION DES BANDETTES

La troisième étape consiste à bloquer les sites non-réactifs avec du tampon PBS 1% BSA. Sécher ensuite la membrane, puis, la découper en bandelettes (5mm x 10cm) qui sont numérotées et conservées dans un tube. Les deux pistes correspondant aux marqueurs de poids moléculaires sont conservées et colorées au bleu de méthylène. La visualisation des différentes bandes permettra de valider l'étape de migration et de transfert mais surtout de calculer les masses moléculaires apparentes des protéines reconnues par le sérum.

X.3.4 IMMUNOEMPREINTE

Tous les réactifs sont amenés à température ambiante avant emploi

► Ne sortir que les bandelettes qui seront utilisées, refermer immédiatement le tube et le replacer à 2-8°C.

► Déposer individuellement les bandelettes dans les rigoles d'un plateau d'incubation.

X.3.4.1 Etape I : Lavage des bandelettes réactives

Laver les bandelettes pendant environ 5 minutes avec 2 ml de **solution tampon de lavage** (annexe 14) sur une plate-forme à bascule ou sur un agitateur horizontal, le tampon devant se déplacer librement sur toute la longueur de chaque bandelette. Aspirer le tampon de lavage hors de chaque puits.

X.3.4.2 Etape II : Incubation des sérums échantillons

Distribuer l'échantillon dilué au $101^{\text{ème}}$ (20 μl de sérum à tester dans 2 ml de **tampon échantillon** = tampon de saturation). Incuber une heure à température ambiante (toujours sur la plate forme à bascule) avant d'aspirer la solution. Laver à trois reprises pendant trois minutes chaque bandelette avec la solution de lavage.

X.3.4.3 Etape III : Incubation avec le conjugué

Immédiatement après avoir aspiré la dernière solution de lavage, ajouter 2ml de conjugué IgG anti-humaine marqué à la peroxydase et incuber pendant 30 mn. Aspirer la solution et laver trois fois avec la solution de lavage puis laver trois fois trois minutes en eau déionisée

X.3.4.4 Etape IV : Incubation avec le substrat et révélation

Ajouter 2 ml de substrat (diaminobenzidine-méthanol) sur chaque bandelette et incuber jusqu'à ce que les bandelettes soient clairement révélées sans qu'il y ait de coloration significative sur le contrôle négatif (bruit de fond). La révélation qui dure environ 8 à 10 minutes est arrêtée en aspirant la solution de substrat et en rinçant les bandelettes au moins trois fois avec de l'eau déionisée.

X.3.4.5 Etape V : Calcul des masses moléculaires apparentes

La masse moléculaire apparente des bandes révélées est calculée grâce à la droite obtenue avec le contrôle de poids moléculaire sur papier logarithmique en plaçant en abscisse la valeur de Rf ou **mobilité relative** et en ordonné la masse moléculaire apparente. La valeur de Rf n'est autre que la distance de migration de la protéine divisé par la distance du front de migration.

XI APPLICATION DES OUTILS DIAGNOSTIQUES A UNE ETUDE SEROEPIDEMIOLOGIQUE À HANOI

Des kits ELISA ont été confiés à l'Institut National d'Hygiène et d'Epidémiologie de Hanoï (INHE) du Professeur Phung Dac Cam, chef de la section entéropathologies. L'étude séro-épidémiologique **prospective** est réalisée dans une population de patient VIH+ (issus de provinces du Nord du Vietnam) admis dans les hopitaux de Bach Mai et de St Paul de Hanoï. Les critères d'inclusion sont les suivants : patients VIH+ présentant une symptomatologie compatible avec une pénicilliose à savoir une fièvre et/ou des lésions cutanées et/ou une perte de poids significative.

Troisième partie : RESULTATS ET DISCUSSION

I RESULTATS DES CULTURES

La littérature présente l'aspect de *P. marneffe* généralement sur **milieu de Sabouraud** et plus exceptionnellement sur BHI (Brain Heart Infusion). Il nous a donc semblé intéressant de comparer l'aspect obtenu sur ce milieu de référence à celui obtenu sur trois autres milieux utilisés en mycologie médicale : le **milieu de Malt** (milieu considéré comme riche tout comme le Sabouraud) et deux milieux dits "pauvres" qui favorisent la fructification, le **milieu PC** (Pomme de terre, Carotte) et le **milieu PDA** (Potatoes Dextrose Agar). La composition des milieux est présentée en annexe 15. Les milieux ont étéensemencés à partir d'une culture de *P. marneffe* entretenue, à température ambiante, sur gélose au Malt. Aux deux températures classiquement décrites dans la littérature **22°C** et **37°C**, nous avons ajouté une température d'incubation intermédiaire de **30°C**.

I.1 CULTURE A 22°C

Sur milieu de Sabouraud, nous avons observé, comme décrit dans la littérature (Drouhet and Dupont, 1995) le développement relativement rapide (2cm en 7 jours) d'un duvet d'abord jaune intense évoluant successivement du vert pâle, au brun devenant rose en vieillissant, avec apparition d'une couronne brune de gouttelettes d'exsudat après quinze jours d'incubation (figure 11-5). Un **pigment rouge** est présent dès 48h à la périphérie de la colonie, puis il diffuse s'étendant à l'ensemble de la boîte de pétri en 20 jours (figure 11-1).

Les aspects macroscopiques obtenus sur les autres milieux sont résumés dans le tableau II. Les caractéristiques intéressantes sont mises en valeur (cases grisées).

Tableau II : Aspect macroscopique de *Penicillium marneffe* à 22°C.

	Malt	PC	PDA
Délai d'apparition	48h	48h	48h
Développement	Lent (1cm au 7 ^{ème} jour)	Lent (1,5cm au 7 ^{ème} jour)	Rapide (2,5cm au 7 ^{ème} jour)
Aspect et coloration du recto	Duvet jaune intense	Duvet jaune/vert	Duvet jaune puis vert pâle
Pigment rouge	Pigment rouge intense diffusible recouvrant la boîte en 20 jours		
Particularités	Duvet blanc au centre de la colonie	Cercle concentrique de croissance	Duvet surélevé avec gouttelettes d'exsudat
Figure 11	Image 2	Image 3	Image 4

Le développement est aussi rapide sur milieu PDA que sur Sabouraud. C'est également le seul milieu permettant l'expression des gouttelettes d'exsudat (figure 11-6). Les deux autres milieux n'autorisent qu'un développement lent. A noter que tous les milieux permettent l'expression du pigment rouge caractéristique et que les colonies duveteuses évoquent un développement sous forme de filaments mycéliens.

I.2 CULTURE A 30° C

Sur milieu Sabouraud, nous observons le développement plus rapide (2,5 cm en 7 jours) d'une colonie **poudreuse non colorée au recto**, légèrement surélevée, avec présence de plis radiés. A noter que le pigment rouge, intense et diffusible est encore présent. L'aspect sur les autres milieux est présenté dans le tableau III.



Figure n° 11 : Aspect macroscopique de *Penicillium marneffe* à 22°C, culture de 18 jours sur Sabouraud (1), culture de 13 jours sur Malt (2), culture de 29 jours sur PC (3) culture de 18 jours sur PDA (4). Détail des gouttelettes d'exsudat, 29^{ème} jours sur Sabouraud (5), 9^{ème} jour sur PDA (6)

Tableau III : Aspect macroscopique de *Penicillium marneffe* à 30°C.

	Malt	PC	PDA
Délai d'apparition	48h	48h	48h
Développement	Rapide (2,5cm au 7 ^{ème} jour)	Rapide (2,5cm au 7 ^{ème} jour)	Rapide (3cm au 7 ^{ème} jour)
Aspect et coloration du recto	Poudreux jaune-orange/vert	Duvet jaune-orange qui devient rose	Duvet rapidement jaune-vert puis brun
Pigment rouge	Pigment rouge très faible	Pas de pigment rouge	Pigment rouge diffusible
Particularités		Pleiomorphisme	Centre surélevé avec circonvolution cérébriforme
Figure 12	Image 2	Image 3	Image 4

L'incubation à 30°C s'est avérée intéressante car elle permet d'obtenir une **croissance plus rapide qu'à 22°C**. Ici encore, le milieu PDA montre sa supériorité puisque c'est le seul qui permet un développement macroscopique évocateur d'un *Penicillium* (plis radiés, duvet surélevé) et, où le pigment diffusible est intense. L'aspect est même plus proche (figure 12-6) de celui qui fait référence (celui à 22°C sur Sabouraud) que celui obtenu sur Sabouraud à 30°C où le recto de la colonie n'est pas colorée (figure 12-5). On remarque, qu'à cette température, l'aspect macroscopique est encore compatible avec un développement mycélien.

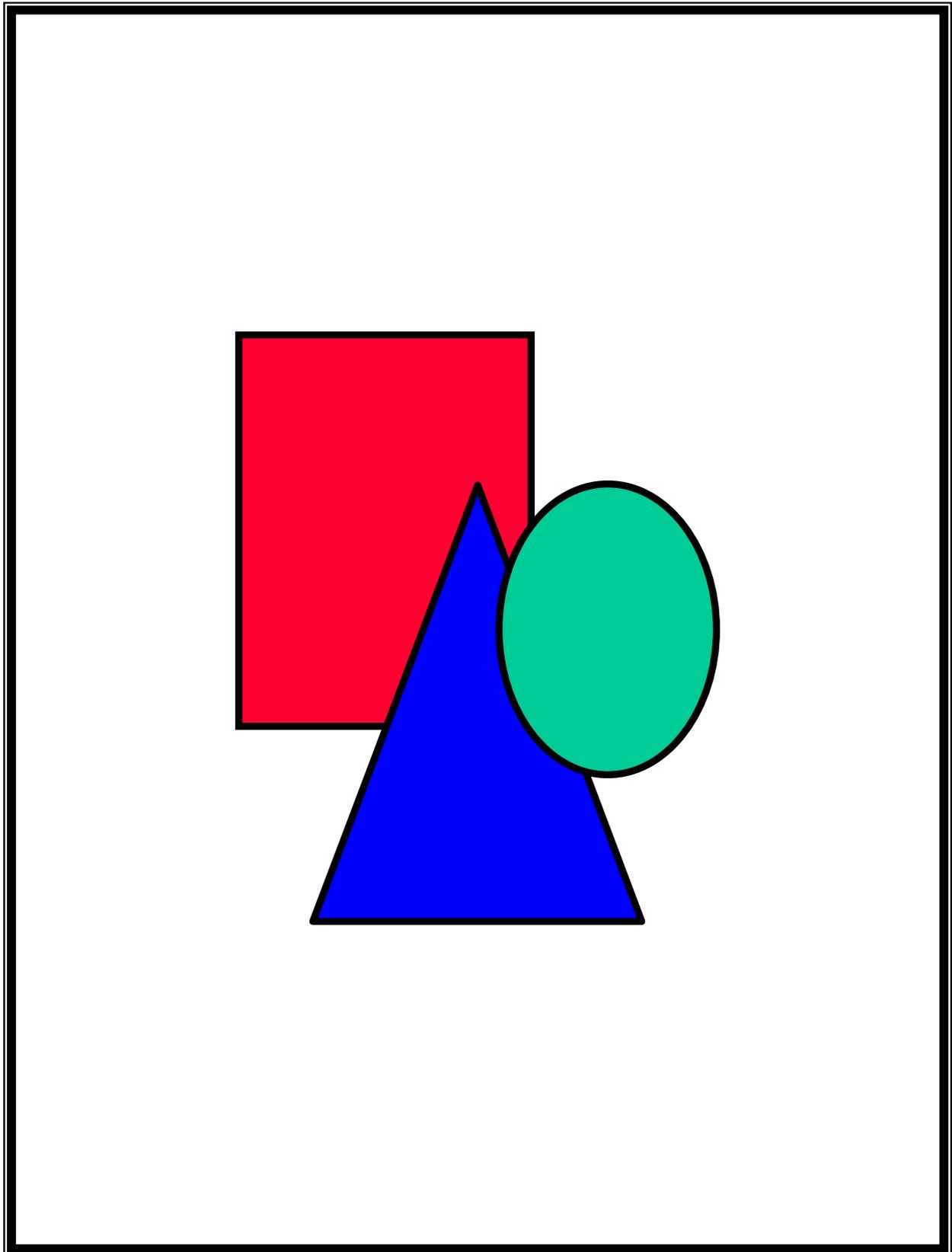


Figure n° 12 : Aspect macroscopique de *Penicillium marneffe* à 30°C, culture de 9 jours sur Sabouraud (1), culture de 19 jours sur Malt (2), culture de 18 jours sur PC (3), culture de 9 jours sur PDA (4), détail du recto au 9^{ème} jour sur Sabouraud (5), au 9^{ème} jour sur PDA (6).

I.3 CULTURE A 37°C

Sur Sabouraud, il existe un développement lent (4 jours) d'une colonie blanc beige, lisse et crémeuse (proche de l'aspect d'une colonie de *Candida*) avec apparition d'excroissances centrales surélevées. La colonie est **totalemtent dépourvue de pigment rouge** (figure 13, image 1). L'aspect sur les autres milieux est présenté dans le tableau IV.

Tableau IV : Aspect macroscopique à 37°C de *Penicillium marneffe*

	Malt	PC	PDA
Délai d'apparition	4 ^{ème} jour	4 ^{ème} jour	3 ^{ème} jour
Développement	Lent (1cm au 7 ^{ème} jour)	Lent (1cm au 7 ^{ème} jour)	Lent (1,5cm au 7 ^{ème} jour)
Aspect et coloration du recto	Colonie sèche très rasante, beige puis violet	Colonie sèche, Poudreuse, non pigmentée	Colonie grise d'emblée surélevée, périphérie rouge/violet
Pigment rouge	Pas de pigment rouge diffusible		Pigment rouge faible
Particularités	Au 6 ^{ème} jour, la colonie devient violet/brun	La colonie reste toujours beige	Circonvolution cérébriforme + plis radiés
Figure 13	Image 2	Image 3	Image 4

C'est à cette température que les plus **grandes différences** sont observées mais dans tous les cas, le développement est lent. Il n'y a que sur Sabouraud que la colonie prend un aspect lisse muqueux fortement évocateur d'un développement levuriforme. Sur milieu PC et Malt, les colonies sont sèches et peu surélevées. Par contre, sur milieu PDA, la colonie garde un aspect duveteux surélevé avec plis radiés et une périphérie qui se colore en rouge, tout à fait évocateur d'un *Penicillium* "filamenteux" (figure13, image 4a et 4b). Par ailleurs, c'est le seul milieu sur lequel la pigmentation rouge

diffusible est présente (pigmentation rouge relativement faible, surtout visible en début de croissance).

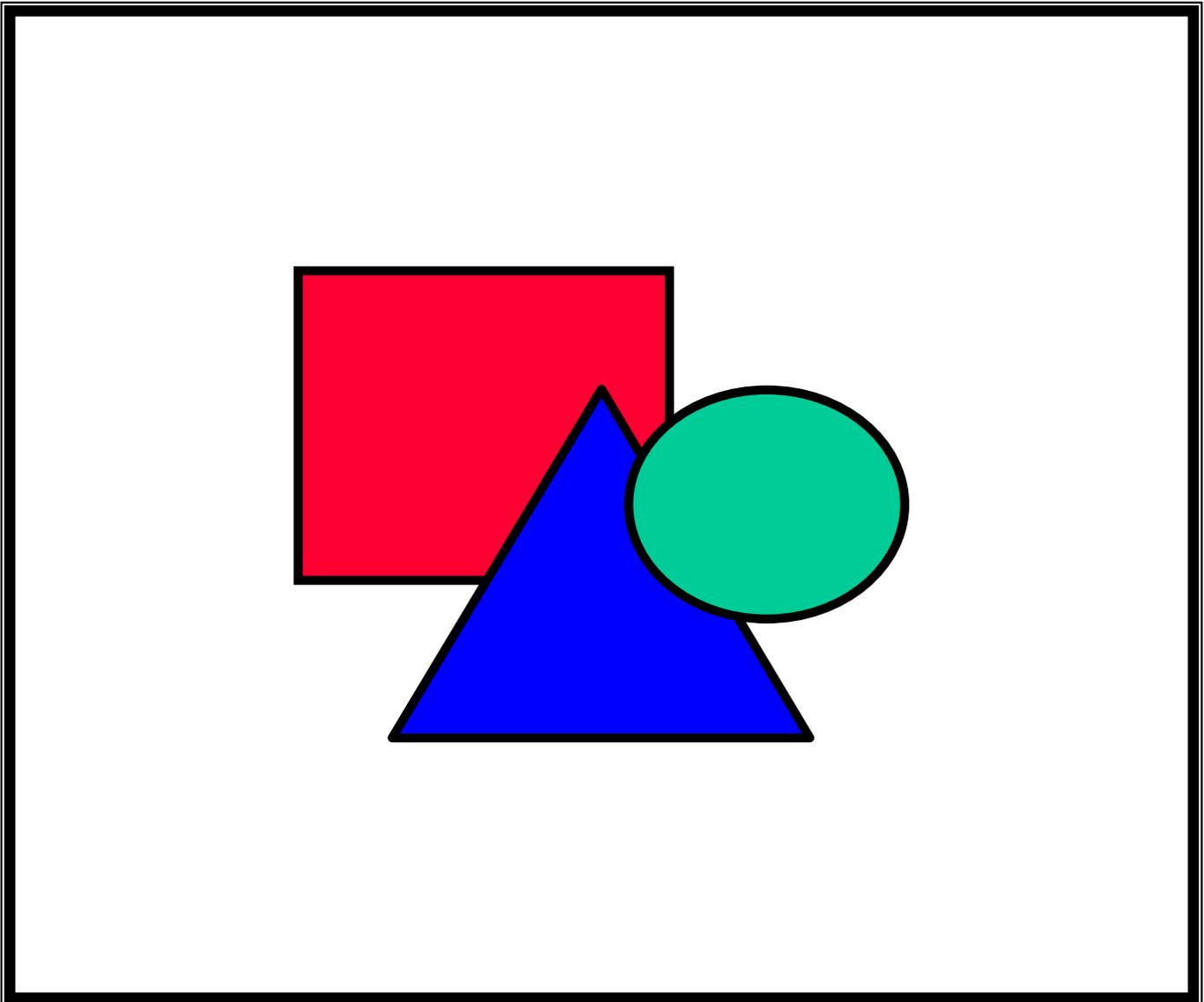


Figure n°13 : Aspect macroscopique de *Penicillium marneffeï* à 37°C, culture de 11 jours sur Sabouraud (1), culture de 29 jours sur Malt (2), culture de 18 jours sur PC (3), culture de 5 jours (4a) et de 7 jours sur PDA (4b).

En conclusion, tous les milieux ensemencés permettent le développement de *P. marneffeï*, confirmant les données de la littérature sur les **faibles exigences** de ce champignon. Bien que ralenti à 37°C, le développement macroscopique des colonies reste globalement rapide pour un champignon filamenteux puisque en quatre jours, tous les milieux présentent une colonie d'au moins trois millimètres de diamètre.

L'expression macroscopique du dimorphisme thermique, bien que constatée sur tous les milieux, est remarquable sur Sabouraud. L'augmentation de température provoque la **perte de la capacité d'excrétion** du pigment caractéristique et la **perte de l'aspect duveteux** ou poudreux de la culture au profit d'un développement d'aspect lisse, crémeux ou sec. Le milieu PDA fait exception : il garde non seulement un aspect surélevé avec circonvolution cérébriforme mais également la capacité de **production du pigment caractéristique**.

Le milieu PDA peut s'avérer très intéressant pour le diagnostic mycologique de *P. marneffe*. Il fait jeu égal avec le milieu de référence pour les caractéristiques macroscopiques classiques des *Penicillium* (circonvolution cérébriforme, plis radiés, gouttelettes d'exsudat) mais il est plus contributif à 37°C. En effet, en dehors de l'aspect typique de *Penicillium*, il existe une coloration rouge de la périphérie mais c'est surtout le seul qui permette la diffusion (en début de croissance) du fameux pigment rouge (figure 13-4). Cette observation souligne la grande influence (outre de la température), de la composition du milieu de culture sur le métabolisme du *P. marneffe*.

Parmi les nombreuses espèces de *Penicillium* contaminants, il y en a deux qui constituent encore plus que les autres un diagnostic différentiel car elles synthétisent également un pigment rouge intense et diffusible : il s'agit de *P. purpurogenum* et *P. rubrum* qui, selon certains auteurs, appartiennent à la même espèce avec des conidies rugueuses, ornementées pour *purpurogenum* et lisses pour *rubrum*. Appartenant tous deux au groupe des biverticillés, le diagnostic différentiel est surtout macroscopique. En effet même s'ils ont parfois la capacité de pousser à 37°C (Breton et al., 1998b), ils ne sont alors jamais thermiquement dimorphiques et restent filamenteux sur la culture à 37°C.

Par ailleurs, les caractéristiques macroscopiques ne doivent pas faire oublier que d'autres espèces de champignons dimorphiques peuvent produire à 25°C un pigment diffusible de couleur similaire à celui de *P. marneffe*. En effet, certaines souches de *Paecilomyces lilacinus* et *Paecilomyces viridis*, qui ressemblent morphologiquement à *P. marneffe* sont également responsables d'infections chez le patient immunodéprimé (Drouhet, 1993). Toutefois, à 37°C, le stade levuriforme est une blastoconidie (Cooper and McGinnis, 1997).

Ainsi, dans le cadre d'une mycose profonde, où le prélèvement peut n'être incubé qu'à 37°C, le milieu PDA associé au Sabouraud permet un diagnostic aisé de ce *Penicillium* dimorphique puisque levuriforme sur Sabouraud et filamenteux rouge sur PDA.

En parallèle au diagnostic mycologique, le diagnostic sérologique de cette penicilliose doit être développé, c'est le sujet de la seconde partie de notre travail.

II EVALUATION DE L' E.L.I.S.A.

La souche de *P. marneffe* utilisée comme source d'antigène, entretenue sur gélose au Malt, a été isolée d'une patiente nantaise HIV+ d'origine thaïlandaise. Le stade levuriforme est obtenu par culture dans du milieu BHI à 37°C. L'antigène métabolique est récupéré par filtration de cette culture, dialyse puis concentration.

II.1 ETUDE DES PERFORMANCES

II.1.1 ETUDE DE REPETABILITE

Une étude de répétabilité du test est effectuée à partir d'un sérum, dont l'index en ELISA est proche de 1. Il est déposé quinze fois dans la même série. Les résultats de cette série figurent dans le tableau V.

Tableau V : Valeurs index de l'étude de répétabilité.

N°	Valeur Index	N°	Valeur Index
1	1,18	9	1,04
2	1,14	10	1,23
3	1,19	11	1,18
4	1,11	12	1,14
5	1,13	13	1,14
6	1,10	14	1,16
7	1,20	15	1,14
8	1,20		

La moyenne obtenue est de 1,15 avec un écart-type de 0,046. Ces deux valeurs permettent de calculer le **Coefficient de Variation (CV) intrasérie**.

Avec un CV de **4,0%**, la **répétabilité** du test est **très satisfaisante**. Elle montre l'homogénéité des différents puits en terme d'adsorption et de présentation de l'antigène.

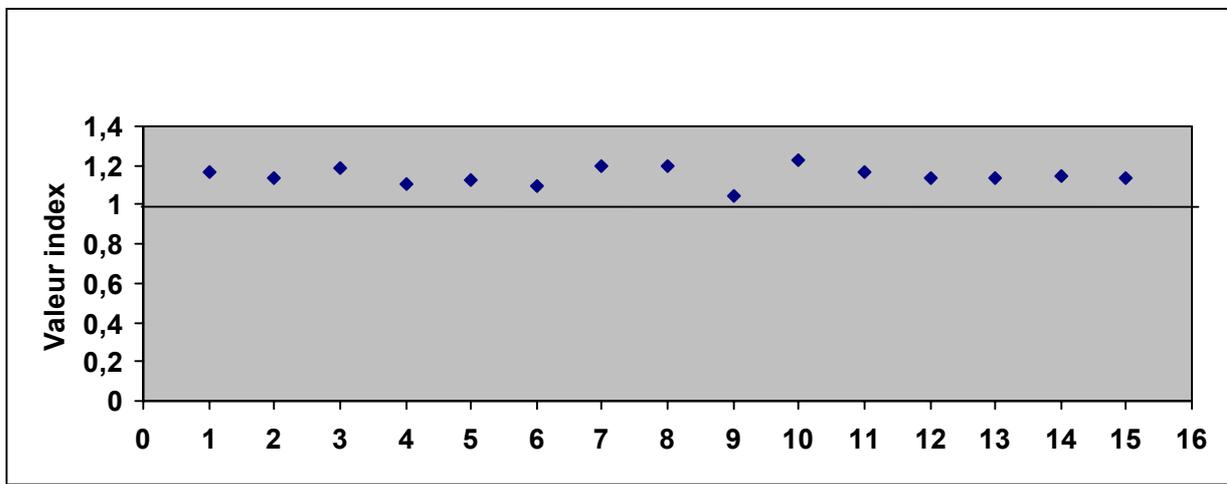


Figure n°14 : Représentation graphique de l'étude de répétabilité

II.1.2 ETUDE DE REPRODUCTIBILITE

L'étude de reproductibilité est effectuée à partir du même sérum, testé dans neuf séries d'analyses différentes, par deux opérateurs différents sur une période d'environ 1 mois (tableau VI).

Tableau VI : Valeurs index de l'étude de reproductibilité.

Série N°	Valeur Index	Série N°	Valeur Index
1	1,15	6	0,75
2	1,14	7	0,69
3	1,18	8	0,96
4	0,71	9	0,94
5	0,99		

Une représentation graphique des valeurs obtenues est présentée dans la figure 24. La moyenne est de 0,945, la variance de 0,0329 ce qui fait un écart-type de 0,1812 soit un CV inter-série de 19,0%. La reproductibilité entre plusieurs séries est bien moins satisfaisante mais reste cependant acceptable.

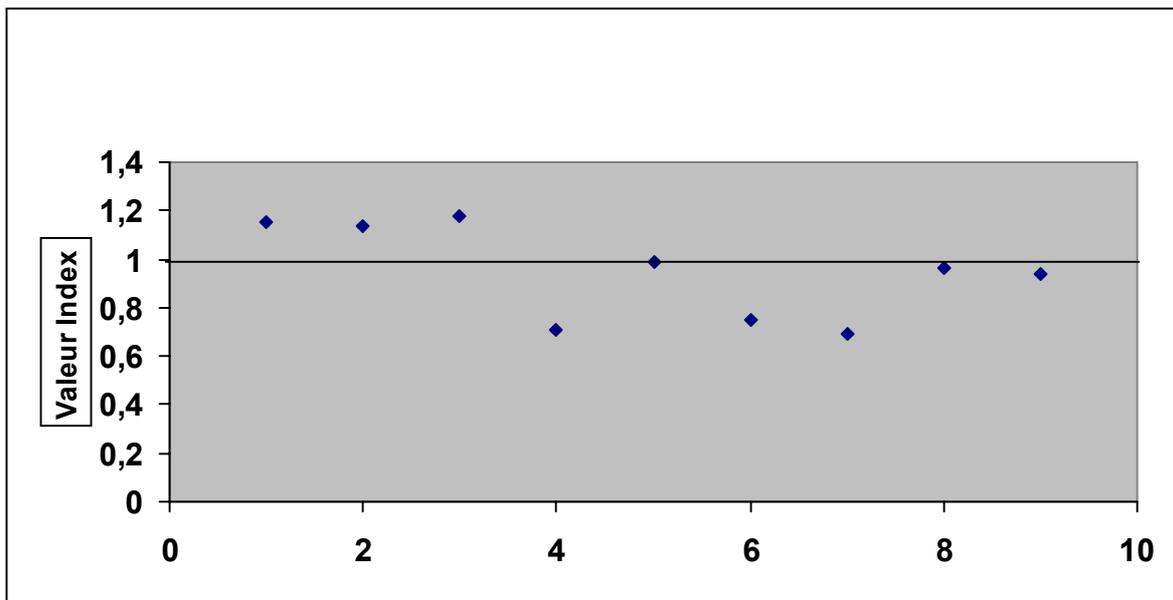


Figure n°15 : Représentation graphique de l'étude de reproductibilité.

II.2 ETUDE DE LA SENSIBILITE

L'étude de la sensibilité de l'ELISA vise principalement à valider l'outil dans un but épidémiologique. La pénicilliose étant un évènement rare en maladie d'importation, l'étude est limitée à quatre cas importés en France (tableau VII). Ces cas sont tous confirmés par l'isolement de *P. marneffe* dans un ou plusieurs prélèvements profonds chez des patients VIH+ susceptibles de présenter une faible réponse humorale.

La sérologie est positive pour les quatre patients avec des index très élevés pour les patients Pit., Lav. et Ber. La moyenne des index est de $2 \pm 0,35$

Tableau VII : Caractéristiques des pénicillioses prouvées et valeurs index des sérums correspondants.

Patient	Réf	Pays	Isolement	Date de prélèvement	ELISA index
Rai.	(Lachaud et al., 1998)	Thaïlande	LBA puis hémoculture et BOM	25/09/1997	1,46
Lav.	(Miegeville et al., 1998)	Thaïlande	LBA et Hémoculture	04/1997	2,14
Ber.	(Valeyrie et al., 1999)	Thaïlande	BOM, Ganglion, biopsie hépatique et hémoculture	24/09/1997	2,42
Pit.	(Grise et al., 1997)	NC	LBA	25/09/1996	1,95

Pour la patiente Rai., le diagnostic mycologique est posé en Septembre 1997 au retour d'un séjour en Thaïlande. A cette date, seul le LBA est positif à l'examen direct et en culture, le taux de CD₄ est à 110 éléments/mm³. Alors qu'elle refuse tout traitement antifongique, la patiente est revue en consultation en Mai 1998 : les expectorations, le sang et la moelle osseuse sont alors positifs.

Mme Lav., d'origine Thaïlandaise, est hospitalisée en avril 1997 dans un contexte d'altération de l'état général (AEG), fébrile avec toux et expectorations blanchâtres. Une séropositivité pour le VIH est découverte avec un taux de 8 CD₄/mm³. Cette pneumopathie à *P. marneffe* sans manifestation cutanée est diagnostiquée sur un LBA et 48h après sur une hémoculture.

Le patient Ber., séropositif, vit en zone rurale dans la région de Chang Mai où il travaille de façon artisanale le bambou. Il est hospitalisé en août 1997 pour des signes non spécifiques (fièvre à 39°C et AEG avec perte de poids depuis un mois) sans manifestation cutanée, adénopathie périphérique ni symptomatologie pulmonaire. Il possède alors 40 CD₄/mm³. *P. marneffe* est isolé de la biopsie ostéo-médullaire, d'un

ganglion mésentérique et du sang. Il est traité efficacement par amphotéricine B auquel est ajoutée de l'itraconazole et une trithérapie antivirale.

Mr Pit., séropositif pour le VIH, est hospitalisé en juin 1996 pour une diarrhée fébrile (38,5°C), des lombalgies et des myalgies au retour d'un séjour en Afrique tropicale. Sa radiologie pulmonaire montre un syndrome interstitiel prédominant aux bases. Un LBA permet d'isoler de nombreuses colonies de *P. marneffeï*. Ce patient, peu coopératif, ne recevra qu'un traitement antirétroviral. Son taux de CD₄ est à 193 CD₄/mm³.

A noter qu'aucune des quatre pénicillioses ne présente de symptomatologie cutanée, deux d'entre elles (Pit, Rim) sont des formes relativement peu disséminées avec des taux de CD₄/mm³ supérieurs à ceux décrits dans la littérature. Même si le nombre de sérums étudiés est faible, il est à noter que la sérologie est fortement positive dans tous les cas (y compris pour le patient à 8 CD₄/mm³), ce qui confirme la haute sensibilité des systèmes ELISA malgré le contexte d'immunodépression accompagnant l'infection VIH. Notons que la réponse humorale est d'ailleurs conservée en début d'infection VIH qui s'accompagne même volontiers d'une hypergammaglobulinémie polyclonale. Ce n'est qu'en cas d'infection terminale qu'elle est profondément déficiente pouvant alors expliquer des résultats sérologiques faussement négatifs (Chongtrakool et al., 1997)

La sensibilité de l'ELISA utilisée dans ce travail, est supérieure à celle de l'immunoprécipitation puisque les précipitines sont absentes chez 15 des 17 patients VIH+ atteints de pénicilliose rapportés par Kaufman (Kaufman et al., 1996) et chez 6 des 8 patients étudiés par Inwidthaya (Inwidthaya et al., 1997). Quant à l'immunofluorescence indirecte, parmi les 4 patients VIH+ de la série de Singh, un seul possède une sérologie positive (Singh et al., 1999). En parallèle à l'utilisation d'antigène brut ou semi purifié, le choix de certains auteurs s'est porté sur l'utilisation

d'antigènes recombinants. Si cette approche apporte plus de spécificité, elle est parfois pénalisée en terme de sensibilité lorsque les réponses humorales des patients sont très « polymorphes », ce qui est le cas de la pénicilliose (Vanittanakom et al., 1997). Les résultats concernant l'utilisation en ELISA de la mannoprotéine Mp1p illustrent ce propos puisque 14 des 18 patients VIH+ soit 80% (Cao et al., 1998b) puis seulement 42% (Cao et al., 1999) des patients atteints de pénicilliose à *P. marneffe* ont des anticorps dirigés contre cette protéine recombinante. Toutefois, l'influence du degré d'immunodépression de la population étudiée sur les résultats ne doit pas être négligée.

II.3 ETUDE DE LA SPECIFICITE

II.3.1 SUR SERUMS NEGATIFS

Ce premier niveau d'étude de la spécificité est réalisé sur 36 sérums issus de patient VIH-, immunocompétents, a priori indemnes de toute pathologie fongique profonde. Les résultats sont répertoriés dans le tableau VII.

Tous les sérums testés ont des valeurs index nettement inférieures au seuil de positivité (figure 25). La moyenne des index est de $0,16 \pm 0,083$. Pour les deux valeurs les plus élevées, l'absence de voyage en zone d'endémie a pu être vérifiée et les sérologies aspergillaires et candidosiques se sont avérées négatives (<80). Le calcul de la spécificité de l'ELISA est de 100% pour ces 36 sérums

Tableau VIII : Valeurs index des sérums négatifs.

Sérum	Index
-------	-------

1	0,09
2	0,09
3	0,08
4	0,08
5	0,00
6	0,16
7	0,37
8	0,23
9	0,18
10	0,27
11	0,26
12	0,00
13	0,14
14	0,15
15	0,22
16	0,19
17	0,00
18	0,20

Sérum	Index
19	0,23
20	0,15
21	0,12
22	0,13
23	0,17
24	0,18
25	0,14
26	0,17
27	0,15
28	0,45
29	0,13
30	0,00
31	0,18
32	0,14
33	0,15
34	0,21
35	0,18
36	0,18

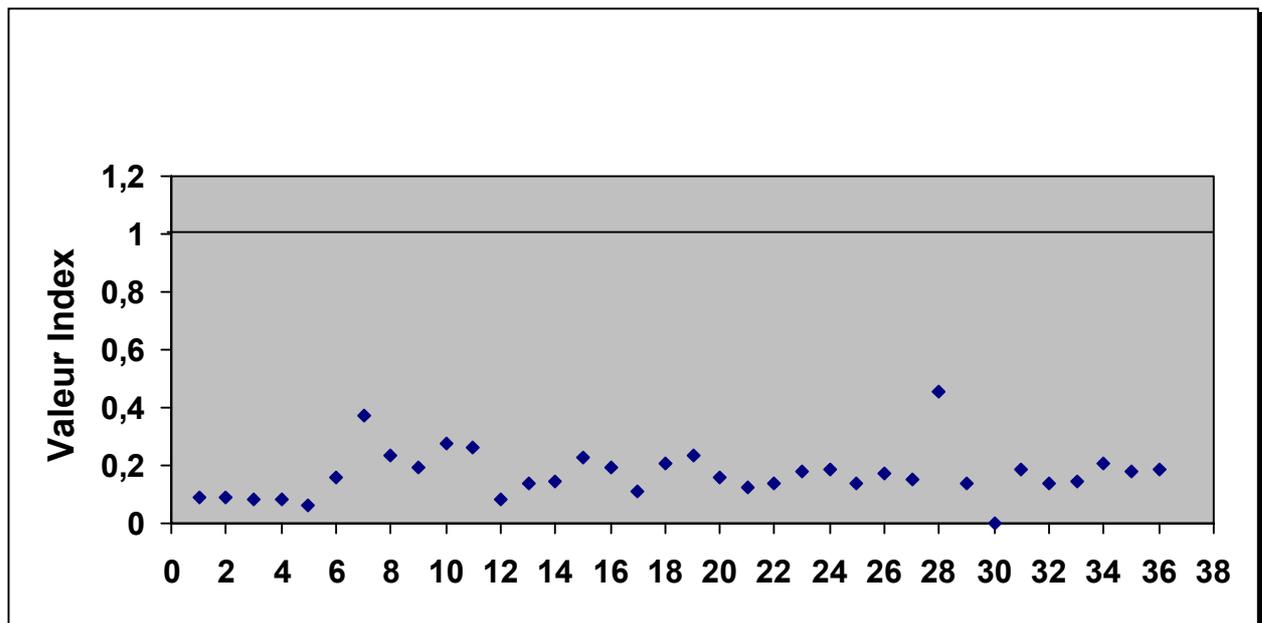


Figure n°16 : Représentation graphique des index des 36 sérums négatifs.

L'étude de spécificité pourrait être élargie, dans le futur, à des sérums tout-venant de patients vivant en zone d'endémie et donc supposés être en contact avec le champignon. Dans ce cas et à l'instar d'autres agents pathogènes, l'existence d'un taux

résiduel d'anticorps dirigés contre *P. marneffe* n'est pas à exclure. Vanittanakom a d'ailleurs mis en évidence des sérologies positives chez des patients totalement asymptomatiques (Vanittanakom et al., 1997) C'est sur cette notion que le seuil de l'ELISA avait antérieurement été fixé à trois déviations standard au dessus de la moyenne afin de pallier cette éventualité.

II.3.2 ETUDE DES REACTIONS CROISEES

Cette étude a essentiellement pour but de déterminer les performances de la trousse vis-à-vis de sérums sélectionnés, provenant de sujets atteints d'infections fongiques autres que la pénicilliose et donc susceptibles de provoquer des réactions croisées. En effet, les champignons filamenteux (*Aspergillus*, *Fusarium*) proches taxonomiquement mais également les levures ou les stades levuriformes (*Candida*, *Cryptococcus*, *Histoplasma*), dans le cadre de ce dimorphisme pourraient partager des antigènes communs comme décrit antérieurement dans les rappels bibliographiques (Chongtrakool et al., 1997). Par ailleurs, certaines de ces mycoses constituent un diagnostic clinique différentiel de la pénicilliose.

II.3.2.1 Etude des réactions croisées avec *Candida sp*

La sélection des sérums de patients atteints de candidoses a permis de retenir **11 candidoses profondes**. Trois d'entre elles sont prouvées (C1, C2 et C3), six sont classées, par ordre de présomption décroissant, comme hautement probables (C4, C5, C6, C7, C8, C9) et deux fortement suspectées (C10 et C11). Les résultats obtenus sont répertoriés dans le tableau VIII. Un descriptif nosologique succinct de chaque patient est présenté en annexe 3.

Tableau IX : Résultats sérologiques de 11 sérums "candidoses profondes".

Réf	Valeur Index ELISA <i>P. m</i>	CHAI Titre	CIE Nbre d'arc	AHAI et IEA Titre
C 1	0,34	640	2	<80
C 2	1,18 puis 0,82	1280	3	80, et 1 arc
C 3	0,31	320	3	<80
C 4	0,25	640	2	160
C 5	0,45	160	2	<80
C 6	0,09	320	2	<80
C 7	0,74	320	3	160 et 0 arc
C 8	1,07 puis 0,76	640	6	<80
C 9	0,64	640	1	<80
C 10	0,35	320	3	80
C 11	0,73	640	3	<80

La moyenne des Index est de $0,52 \pm 0,29$. Aucun sérum n'est positif, toutefois, deux sérums (C2 et C8) possèdent un index dans la zone grise. Testés une deuxième fois, le sérum C8 est conclu négatif tandis que C2 reste une sérologie douteuse. Il est à noter que ces deux sérums présentent le taux d'anticorps anti-*candida* le plus élevé, respectivement en CHAI (C2) et en nombre d'arcs de précipitation (C8). L'existence de taux d'anticorps significatifs pour quelques sérums confirme certaines études de la littérature (Chongtrakool et al., 1997)

II.3.2.2 Etude des réactions croisées avec *Cryptococcus neoformans*

Dans un premier temps **huit sérums** de patients atteints de **cryptococcoses neuroméningées (CR)** et **un de cryptococcoses pulmonaire (CRP)** ont été retenus. Six d'entre eux sont VIH+, deux sont VIH- et une seule sérologie VIH n'est pas documentée.

Nous avons également retenus **quatre sérums** de patients atteints de **cryptococcoses cutanées**. Aucun de ces patients n'étaient atteints par le VIH (tableau X) mais deux d'entre eux avaient d'autres facteurs d'**immunodépression** et présentaient des cryptococcoses cutanées **disséminées (CRC1 et CRC2)**, les opposant aux deux autres patients considérés comme **immunocompétents (CRC3 et CRC4)** pour lesquels l'atteinte cutanée était secondaire à une **inoculation** (cage de pigeon et morceau de bois). Les principales caractéristiques sont rapportées dans les tableaux IX et X. Un descriptif plus complet se trouve en annexe 4.

Globalement les valeurs d'index obtenues avec toutes les cryptococcoses sont faibles avec une moyenne de **0,32 ±0,25**. Ces résultats sont en partie expliqués par le fait que les infections cryptococciques sont connues pour provoquer de faibles réponses humorales dues, principalement au masquage antigénique par la capsule. Aucune réaction croisée n'est observée, cependant un sérum de cryptococcoses cutanée (CRC 2) possède un index en zone grise. Il est à noter que ce patient ne présente pas d'antigénémie malgré une infection disséminée (culture positive de l'urine, du LBA, des biopsies cutanées). Pour ce patient, l'absence de voyage en Asie du Sud-est n'a pas pu être vérifiée.

Tableau X : Caractéristiques des cryptococcoses neuroméningées et pulmonaire

Réf	N° Sérum	Sérotype/VIH	Arguments biologique et/ou cliniques
CR 1	20117886	A/+	LCR, hémocultures, et LBA donnent une culture très positive, l'antigénémie est aussi très positive. Le patient décèdera d'une septicémie à <i>P. aeruginosa</i>
CR 2	17113064	A/-	VIH - mais lymphome en aplasie et lymphopénie à 400 CD ₄ /mm ³ . Les cultures de l'urine et du LCR restent négative mais, hémoculture et antigénémie positives
CR 3	17111995	D/NC	Cultures de LCR et urines positives Antigénémie positive
CR 4	17079987	A/+	74 CD ₄ /mm ³ , Culture positive du LCR, Antigénémie positive dans le LCR et dans le sérum
CR 5	17079414	A/+	Fièvre, céphalée, culture positive dans le sang et urine, antigène urinaire très positif+++ 18 CD ₄ /mm ³
CR 6	17079184	A/+	Culture et antigène positifs dans LCR, sang et urine. I inaugure l'infection VIH, 7 CD ₄ /mm ³
CR 7	17035624	NC/+	Culture du LCR et antigénémie Positives
CR 8	17047651	A/+	Culture positive dans du LCR, hémoculture et LBA positives. Antigène positif dans le sang et dans le LBA.
CRP	09950806	NC/-	VIH - mais cancer (mélanome avec métastases pulmonaires et hépatiques). Culture positive dans le LBA mais antigénémie négative ⇒ cryptococcose pulmonaire

Tableau XI : Caractéristiques des quatre cryptococcoses cutanées retenues

Réf Sérum	N° Sérum	VIH/Statut immunitaire/sérotype	Arguments cliniques et/ou biologiques
CRC 1	17097369	VIH- / Immuno- déprimé / D	Corticothérapie depuis 15 ans, infection pulmonaire à M.A.C. Antigène Cryptococcique + à 160
CRC 2	07075830	VIH- / Immuno- déprimé / NC	Lésion temporale et pulmonaire révélant une lymphopénie idiopatique à 55 CD4
CRC 3	17114444	VIH- / Immuno- compétent / NC	Phlegmon auriculaire (main droite) après nettoyage d'une cage de pigeon
CRC 4	09764220	VIH- / Immuno- compétent / A	Cellulite de l'index, antigène Cryptococcique positif à 8

A noter que les index les plus élevés (CRC 4, CRC 2 et CRP) sont obtenus chez les patients ayant les trois antigénémies les plus basses. En effet, lorsque la réponse existe, les anticorps formés sont complexés par les antigènes circulants, ce qui pourrait expliquer qu'en cas d'antigénémie négative ou faible, le niveau d'anticorps détectable soit plus élevé. Il faut remarquer que la moyenne des index des cryptococcoses cutanées est plus élevée que celle obtenue avec les cryptococcoses neuroméningée et pulmonaire (0,56 ±0,38 contre 0,216 ±0,10)

Tableau XII : Résultats sérologiques des 13 sérums de cryptococcoses.

Réf	Valeur Index ELISA <i>P. m</i>	Antigènes cryptococciques	CHAI (et IEC)	AHAI (et IEA)
CR 1	0,35	1280	<80	<80
CR 2	0,24	64	<80	<80
CR 3	0,14	80	<80	<80
CR 4	0,19	16	<80	<80
CR 5	0,13	2560	<80	<80
CR 6	0,07	640	<80	<80
CR 7	0,21	160	<80	80
CR 8	0,22	1280	80	<80
CRP	0,40	0	80	80
CRC 1	0,15	160	<80	<80
CRC 2	1,04 puis 0,90	0	80 (0 arc)	80 (0 arc)
CRC 3	0,38	16	<80	<80
CRC 4	0,74	8	<80	<80

II.3.2.3 Etude des réactions croisées avec *Histoplasma capsulatum*

Elle porte sur cinq sérums de patients atteints d'histoplasmoses, issus de la sérothèque de l'institut Pasteur (Pr Dupont).

Tableau XIII : Résultats sérologiques des cinq "sérums d'histoplasmoses"

Réf	Valeur Index ELISA <i>P. m</i>	AHAI Titre	CHAI Titre
H 1	0,25	<80	<80
H 2	0,36	<80	80
H 3	0,85 puis 0,60	80	80
H 4	0,18	<80	<80
H 5	0,42	<80	160

La moyenne des index est de $0,387 \pm 0,19$. Ces résultats sont importants, car aucun des cinq sérums issus de patients atteints d'histoplasmoses prouvée, diagnostic différentiel clé de la pénicilliose, ne présente de réactions croisées. Pourtant des communautés antigéniques ont été mises en évidence entre *P. marneffe* et *Histoplasma*. Elles portent sur les composés de nature protéique comme l'ont montré les travaux en immunoprécipitation mais également sur un antigène polysaccharidique puisque le test au latex utilisé pour la recherche des exoantigènes urinaires d'*Histoplasma capsulatum* a permis de détecter un antigène commun dans 17 des 18 cas de pénicilliose (Wheat et al., 1997) ... Malgré ces considérations, aucune étude n'explore les éventuelles réactions croisées vis-à-vis de *Penicillium marneffe* en utilisant des sérums de patients atteints d'histoplasmoses.

Après avoir testé les réactions croisées dans un contexte d'agents fongiques levuriformes, nous avons étudié la spécificité de l'ELISA vis-à-vis de pathologies causées par des champignons filamenteux taxonomiquement plus proches et ce, d'autant que des antigènes communs ont été décrits.

II.3.2.4 Etude des réactions croisées avec *Aspergillus sp*

Nous avons testé sept sérums de patients atteints d'aspergilloses invasives, Trois sont prouvées : API 1, API 2, API 3 et quatre hautement probables API 4, API 5, API 6 et API 7. Deux survienne sur terrain *a priori* immunocompétent (API 3 et API 7) Descriptif en annexe 5 et résultats dans le tableau XIII

Tableau XIV : Résultats sérologiques des sept "aspergilloses invasives".

Référence Sérum	Valeur Index ELISA <i>P. m</i>	IEA	AHAI	CHAI	Antigène aspergillaire
API 1	0,12	1 arc	<80	<80	Sérum, LBA
API 2	0,71	0 arc	80	<80	Sérum, LCR
API 3	1,11 puis 1,18	0 arc	320	<80	Nég
API 4	0,26	0 arc	<80	<80	Nég
API 5	0,12	0 arc	160	<80	Sérum
API 6	0,29	0 arcs	<80	80	Sérum
API 7	0,56	3 arcs	640	<80	Nég

Les valeurs d'index obtenues avec les aspergilloses invasives sont relativement faibles (moyenne de $0,45 \pm 0,34$) mais compte tenu du degré d'immunosuppression cellulaire et humorale important de ces patients, elles ne doivent pas être négligées. Les cinq premiers patients possèdent, en effet, tous une lymphopénie et une hypogammaglobulinémie. D'ailleurs les index obtenus avec les deux aspergilloses

invasives des deux patients apparemment non immunodéprimés (API 3 et API 7) dont la sérologie aspergillaire est positive, sont tous les deux supérieurs à la moyenne. Un des deux sérums (API 3) présente même une réaction en zone grise confirmée. Ce jeune patient apparemment immunocompétent, décédé brutalement, n'avait jamais voyagé en zone d'endémie. Cette série évoquerait la possibilité de réactions croisées avec *Aspergillus sp* dans le cadre d'entités cliniques de patients immunocompétents.

C'est pourquoi nous avons également testé cinq sérums issus d'aspergilloses pulmonaires chroniques nécrosantes (APCN) ou aspergilloses semi-invasives. Trois sont prouvées (APCN 1 et APCN 2 et APCN 3), une autre est hautement probable (APCN 4) et une fortement suspectée (APCN 5) (annexe 6)

Tableau XV : Résultats sérologiques des cinq "aspergilloses chroniques nécrosantes".

Réf	Valeur Index ELISA <i>P. m</i>	IEA Nbre d'arc	AHAI Titre	CHAI Titre
APCN 1	0,67	4 arcs	160	<80
APCN 2	0,24	1 arc	80	<80
APCN 3	0,14	0 arc	320	<80
APCN 4	0,38	4 arcs	80	80
APCN 5	0,38	2 arcs	320	<80

Aucune réaction croisée n'est observée avec les aspergilloses semi-invasives, le niveau de réactivité de ses sérums est même plus faible que pour les API avec une moyenne de l'index à **0,36 ±0,18**.

Nous avons sélectionné et testé des formes d'aspergilloses rencontrées chez l'immunocompétent et notamment **six aspergillomes** tous prouvés :

Tableau XVI : Résultats sérologiques des six "aspergillomes".

Réf	Valeur Index ELISA <i>P. m</i>	IEA Nbre d'arc	AHAI Titre	CHAI Titre
APO 1	0,67	6 arcs +J	640	<80
APO 2	0,46	5 arcs + J	1280	80
APO 3	0,38	10 arcs + J	160	<80
APO 4	0,79	7 arcs	640	80
APO 5	0,44	6 arcs	320	<80
APO 6	0,90 puis 0,78	5 arcs +J	1280	<80

A noter qu'il n'y a pas de réelles réactions faussement positives puisque APO 6 est en zone grise la première fois puis en dessous la seconde. En revanche, il est important de noter que tous les index sont relativement forts avec une moyenne à **0,60 ±0,18**. Ils sont en relation avec des taux d'anticorps anti-*Aspergillus* plus élevés que dans les autres formes d'aspergilloses, ce qui suggère que ce type de sérums serait capable de réagir faiblement, ou pour une faible partie, avec l'antigène métabolique de *P. marneffe*.

Enfin, nous avons testé **quatre sérums d'aspergillose broncho-pulmonaire allergique (ABPA)** prouvée parce qu'elle s'accompagne régulièrement d'un taux élevé d'anticorps anti-*Aspergillus* lors des poussées (IgE mais également IgG).

Un des quatre sérums croise avec l'antigène métabolique de *P. marneffe* puisque la moyenne des deux index obtenus s'élève à 1,4. Un autre possède un index en zone grise. Avec un **index moyen de 0,87 ±0,37**, c'est dans ce groupe que les niveaux réactionnels sont les plus importants.

Tableau XVII : Résultats sérologiques des quatre "ABPA".

Réf	Valeur Index ELISA <i>P. m</i>	IEA Nbre d'arc	AHAI Titre	CHAI Titre
ABPA 1	1,16 puis 1,64	2 arcs	1280	<80
ABPA 2	0,95 puis 1,15	3 arcs + J	1280	80
ABPA 3	0,56	2 arc	640	<80
ABPA 4	0,49	0 arc	640	<80

A ce sujet, la prépondérance des glycoprotéines à radicaux mannose ou glucose a été mise en évidence chez *Aspergillus fumigatus* (Le Pape and Morin, 1986) et plus récemment chez *Penicillium marneffeii* (Le Pape et al., 2003). Certaines de ces glycoprotéines sont communes aux antigènes somatiques et métaboliques. Par ailleurs, certains auteurs (Van Cutsem et al., 1990) ont montré qu'il était possible de détecter *Penicillium marneffeii* à l'aide de l'anticorps monoclonal (EB2) dirigé contre le galactomannane d'*Aspergillus fumigatus*. Cette réaction croisée pourrait être supportée par la mannoprotéine Mp1p de 75 kDa décrite par Cao (Cao et al., 1998b).

II.3.2.5 Etude des réactions croisées avec *Fusarium oxysporum*

Par sa position taxonomique proche et le caractère disséminé de la fusariose chez ce patient, ce sérum aurait pu croiser. Toutefois la valeur obtenue est très basse (tableau XVIII).

Tableau XVIII : Résultat sérologique de la "fusariose".

Réf	Valeur Index ELISA <i>P. m</i>	CHAI AHAI
F	0,10	<80

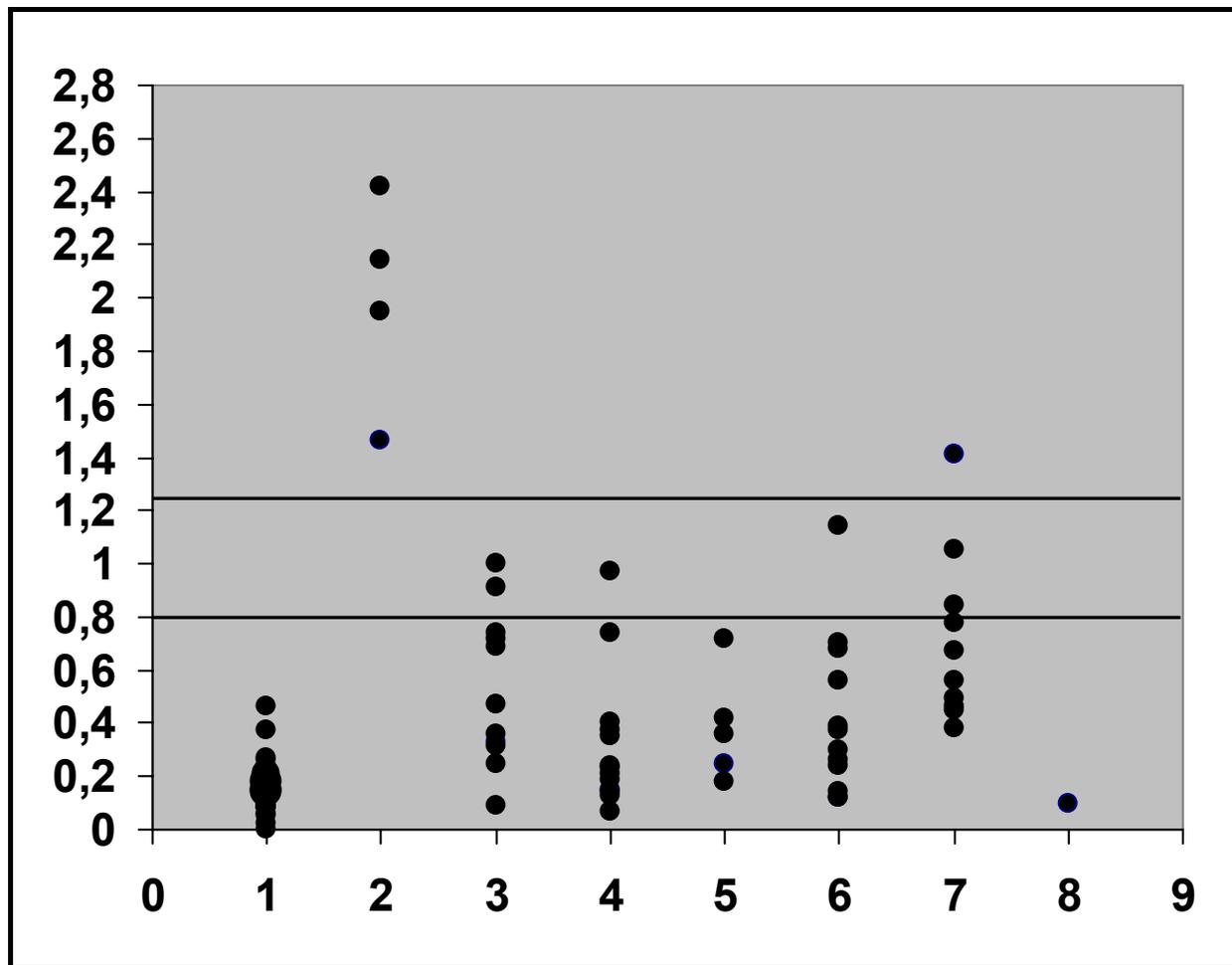
On ne peut bien sûr pas exclure de réactions croisées sur un seul sérum d'autant que la patiente était immunodéprimée avec une hypogammaglobulinémie majeure.

La spécificité relative, calculée à partir de notre cohorte à haut risque de réactions croisées, est de **98%**. Sur les **52 sérums sélectionnés**, il n'a pas été constaté de réactions très positives c'est-à-dire à la hauteur des index rencontrés chez trois des quatre patients atteints de pénicilliose mycologiquement confirmée. Seule une aspergillose broncho-pulmonaire allergique donne une réaction faussement positive (index à 1,41). Toutefois, une réaction douteuse est observée dans 6 cas : deux candidoses (index à 1,0 et 0,91), une cryptococcose cutanée (index à 0,97), une aspergillose invasive (index à 1,14), une autre aspergillose broncho-pulmonaire allergique (index à 1,05), et un aspergillome (index à 0,84). En matière de diagnostic clinique différentiel, aucune des pathologies testées ne donne de réactions croisées. Compte tenu des communautés antigéniques mentionnées dans la littérature, on peut s'étonner qu'aucune étude concernant l'évaluation d'une approche diagnostique de la pénicilliose n'ait inclus une évaluation approfondie de la spécificité.

A titre d'exemple, l'ELISA, utilisant la mannoprotéine Mp1p, n'est évaluée que vis-à-vis de patients atteints de fièvres typhoïdes ou de tuberculose (Cao et al., 1998b). Une étude portant sur le diagnostic de la pénicilliose par immunofluorescence indirect s'intéresse à la spécificité vis-à-vis de sérums de patients présentant des fièvres d'étiologies diverses mais peu d'infections fongiques sont prises en compte (Yuen et al., 1994).

II.4 CONCLUSIONS

La figure 26 présente l'ensemble des résultats de l'étude menée avec la technique ELISA. Elle concerne un total de 92 sérums.



Figure

re n° 17 : Récapitulatifs des résultats sérologiques des 92 sérums :

- | | |
|---|---|
| 1) Des sérums négatifs n=36 | 2) Des sérums de pénicillioses confirmées n=4 |
| 3) De candidoses profondes n=11 | 4) De cryptococcoses n=13 |
| 5) D'histoplasmose n=5 | 6) D'aspergilloses chez l'immunodéprimé n=12: API + APCN. |
| 7) D'aspergilloses chez l'immunocompétent n=10: ABPA+APO. | 8) De fusariose |

La sensibilité de la technique ELISA permet de détecter un taux significatif d'anticorps chez les 4 patients atteints de pénicilliose à *P. marneffe*. La spécificité sur l'ensemble de l'étude est de 98,9%. Malgré ces résultats encourageants, l'utilisation de cette technique lors d'enquêtes séroépidémiologiques en zone d'endémie pourrait nécessiter une technique de confirmation, telle que l'immunoempreinte ou western blot.

III MISE AU POINT DU WESTERN BLOT

Compte tenu de l'existence de six sérums en zone grise (6,5%) il semblait opportun d'associer à la technique ELISA, une technique de confirmation telle que l'immunoempreinte. Ceci nécessitait donc une sélection de l'antigène à utiliser.

III.1 CHOIX DE L'ANTIGENE

Les premiers essais de western blot, réalisés au laboratoire de Parasitologie et Biologie animale, Faculté de Pharmacie de Nantes, utilisaient des antigènes **somatiques** du stade filamenteux, puis du stade levuriforme de *P. marneffe*. Nous commenterons brièvement une partie des résultats de l'étude concernant l'antigène de la forme levure (Le Pape et al., 2003) afin de présenter clairement notre démarche.

L'analyse de la réactivité de l'antigène somatique du stade levuriforme vis-à-vis de trois sérums de patients atteints de pénicilliose confirmée (Rai., Pit., Lav.) montre une grande diversité des profils d'immunoempreinte (figure 27-I). Seules trois bandes sont communes aux trois patients, il s'agit des bandes de 75, 66 et de 62 kDa. Les bandes de 88, 54, 50 et de 31 kDa sont présentes pour deux des trois sérums.

Alors que cet antigène somatique **ne croise pas** avec un pool de sérums d'**aspergillose**, neuf bandes (24, 29, 35, 48, 52, 56, 90, 100 et 125 kDa) sont obtenues avec un pool "Candidose" (figure 27-II). Parmi ces bandes, six sont communes à celles obtenues pour les sérums de patients atteints de pénicilliose (24, 29, 35, 50, 90, 125 kDa) elles perdent donc leur spécificité pour *P. marneffe*. Ces raisons expliquent que notre choix se soit porté sur l'utilisation des **antigènes métaboliques** de la forme levure.



Figure 18 : Immunoempreinte des antigènes **somatiques** de phase levure après réaction avec des sérums de patients atteints de pénicilliose (I) après réaction de sérums de patients atteints de candidose (CAN) et d'aspergillose broncho-pulmonaire allergique (ASP)

III.2 ETUDE DE L'ANTIGENE METABOLIQUE

La qualité du western Blot dépend essentiellement de la composition de l'antigène. Afin de faciliter l'interprétation, il faut disposer d'un antigène présentant une diversité antigénique suffisante pour réagir avec le plus grand nombre de sérums, tout en gardant une bonne spécificité c'est à-dire peu de bandes supportant des réactions croisées.

L'antigène produit a été évalué à différents temps de culture (J4, J6 et J11) de manière quantitative (concentration de protéines par la méthode de Bradford) et qualitative (profil électrophorétique en SDS-PAGE).

III.2.1 CONCENTRATION PROTEIQUE

Le dosage des protéines de l'antigène métabolique, réalisé par la méthode de Bradford sur trois filtrats est présenté dans le tableau XIX:

Tableau XIX : Concentration en protéines en fonction du temps de culture.

Temps de culture	4 ^{ème} Jour	6 ^{ème} Jour	11 ^{ème} Jour
Concentration protéique ($\mu\text{g}/10\mu\text{l}$)	1,8	0,8	11,6

L'antigène de 11 jours est plus riche en protéines.

III.2.2 PROFIL ELECTROPHORETIQUE

Le filtrat de culture est analysé par électrophorèse SDS-PAGE à 10% au quatrième, sixième et onzième jour de culture. Les fractions protéiques sont révélées par une coloration à l'argent.

L'analyse électrophorétique montre l'apparition au 6^{ème} jour d'une bande de 66kDa, tandis que l'antigène de 11 jours est constitué de 10 protéines de poids moléculaire apparent compris entre 27 et 88 kDa (88, 80, 62, 54, 45, 41, 38, 35, 31 et 27 kDa)

Ces résultats sont en accord avec les travaux de Vanittanakon et al (Vanittanakom et al., 1997) qui montrent qu'en milieu BHI, *P. marneffe*i entre en phase stationnaire à partir du 7^{ème} jour, s'accompagnant alors d'une sécrétion-excrétion des constituants les plus importants dans le milieu de culture. L'antigène métabolique obtenu par Vanittanakom possède plus de 10 fractions antigéniques.

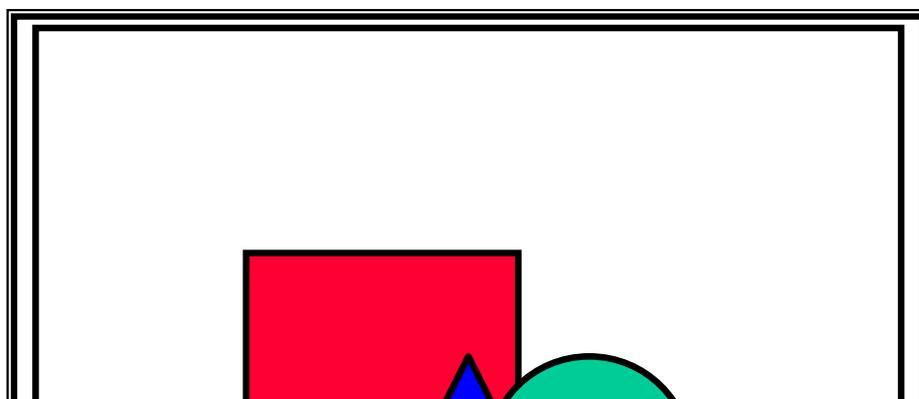


Figure n° 19 : Profil électrophorétique de l'antigène métabolique (11^{ème} Jour)

L'antigène métabolique ne présente pas de fractions majoritaires. Il comporte moins de fractions protéiques que l'antigène somatique qui est constitué de plus de 15 fractions de poids moléculaires compris entre 24 et 150 kDa. Il est à noter que les deux types d'antigènes partagent sept bandes de poids moléculaire communs : 27, 31, 38, 41, 54, 62 et la 80 kDa.

Une étude de reproductibilité inter-lot a été réalisée sur trois lots d'antigènes produits au onzième jour. Elle révèle une **bonne homogénéité de production entre les différents lots** tant qualitative (profil protéique identique) que quantitative (concentration protéique présentée dans le tableau XIX).

En conclusion, l'analyse qualitative et quantitative au cours de la culture a révélé des variations importantes de concentration et de profil protéique. **C'est le onzième jour de culture qui allie le meilleur rendement protéique et le profil le plus complet.** Au-delà de 11 jours, l'antigène se "contamine" par des fractions antigéniques d'origine somatique et perd ainsi sa spécificité métabolique.

Tableau XX : Concentration protéique pour les trois lots d'antigènes.

	Densité optique	µg de prot/mg de lyophilisat
Lot 1	0,431	13,3
Lot 2	0,329	9,1
Lot 3	0,268	8,4

Il est possible à présent d'évaluer l'intérêt de cet antigène dans la mise au point d'une technique de western blot.

III.3 EVALUATION DES PERFORMANCES

III.3.1 ETUDE DE LA SENSIBILITE

Afin de démontrer la capacité de notre test à détecter des « vrais positifs », nous avons testé deux des sérums de patients (Pit et Rai), atteints de pénicilliose prouvée par culture mycologique (figure 25).

Les deux sérums présentent une réaction positive en immunoempreinte avec présence de deux bandes. Le patient Rai possède une bande principale de 80 kDa et une bande très faible de 54 kDa. Le patient Pit possède la bande de 54 kDa comme bande majoritaire et une bande très faible de 31 kDa. Les bandes 31 et 54 kDa sont également retrouvées avec l'antigène somatique.

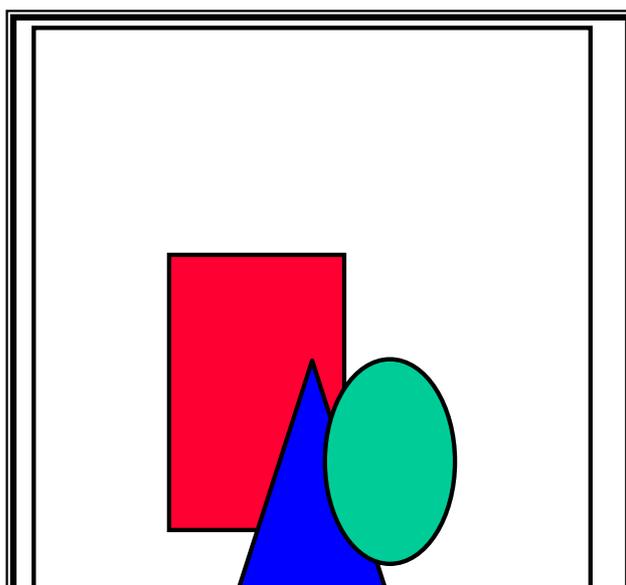


Figure n°20 : Immunoempreinte des antigènes métaboliques de la phase levure de *Penicillium marneffe* après réaction avec deux sérums de patient atteints de pénicilliose d'importation : (1) patient Rai, (2) patient Pit.

La bande commune de 54 kDa est décrite par Vanittanakom comme l'une des bandes immunoréactive principale. En effet, elle est reconnue par 20 des 33 patients sidéens atteints de pénicilliose à *P. marneffe* (Vanittanakom et al., 1997). Deux autres protéines, non détectées dans notre étude, 200 et 88 kDa sont reconnues respectivement par 72 et **94%** de ces patients. Toutefois, il faut souligner la plus grande valeur prédictive de la bande de 54 kDa puisque dans un groupe de patients sidéens vivant en zone non endémique pour *P. marneffe*, aucune réactivité n'est retrouvée vis-à-vis de la protéine de 54 kDa tandis que 22 et 56% des sérums reconnaissent la bande de 200 et 88 kDa. Vanittanakom décrit d'autres bandes mineures mais aucune de 31kDa puisque la plus petite bande qu'il met en évidence est de 39 kDa.

III.3.2 ETUDE DE LA SPECIFICITE

La première étude de spécificité est réalisée sur deux pools de sérums. Chacun ayant été constitué de 5 sérums choisis parmi les sérologies candidosiques et

aspergillaires les plus positives d'une nouvelle exploitation de la sérothèque (tableau XXI).

Ces deux pools ont été testés en western blot, les bandelettes d'immunoempreinte sont présentées dans la figure 21. Les anticorps anti-*Aspergillus* reconnaissent une fine bande de 27 kDa alors que les anticorps anti-*Candida* reconnaissent une bande de 62 kDa et une autre de 33 kDa. Aucune des bandes révélées par les sérums positifs de pénicilliose ne sont reconnue par ces pools.

Tableau XXI: Constitution de deux pools immunologiquement très positifs

Pool de candidoses immunologiquement suspectées		Pool d'aspergilloses immunologiquement suspectées	
N° Sérum	CHAI / IEC	N° Sérum	AHAI / IEA
17060942	1280/4 arcs	17110168	2560/8 arcs/J
17090980	320/6 arcs	17111500	2560/8 arcs/J
17059618	>2560/2 arcs	17113803	1280/7 arcs/J
17048098	>2560/4 arcs	17123766	1280/4 arcs/J
17036099	2560/3 arcs	17112934	1280/8 arcs/J

Notons que cette bande de 33 kDa, faible et mal délimitée, n'est pas révélée par la coloration à l'argent, il s'agit donc d'une bande minoritaire de l'antigène métabolique.

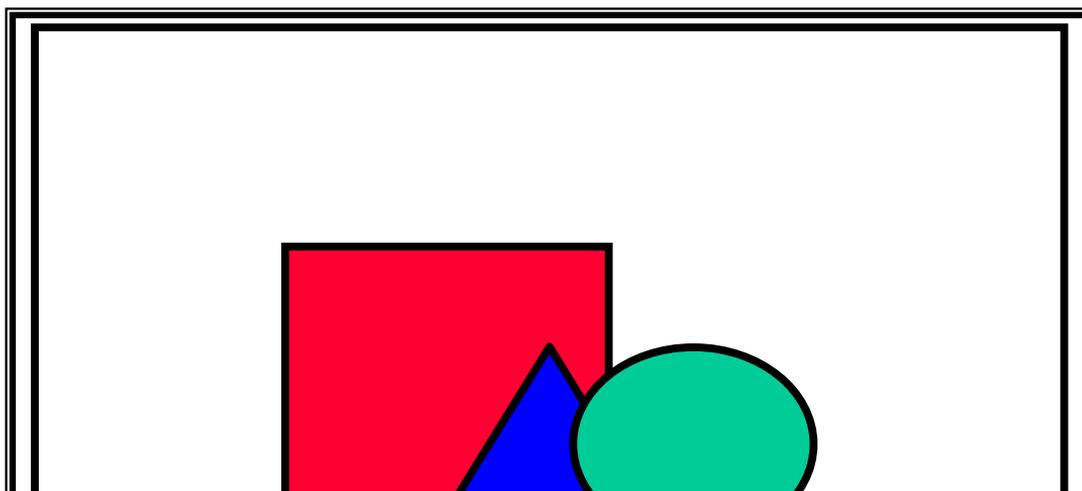


Figure n°21 : Profil d'immunoblot des pools "d'aspergillose" (1) et de "candidose" (2).

Une deuxième étude de spécificité, a été réalisée dans des conditions de stratégie diagnostique c'est à dire sur **les profils individuels** de tous les sérums sélectionnés ayant donné des index positifs ou en zone grise en ELISA. (n=7 : ABPA 1, ABPA 2, APO 6, API 3, CRC 4, C 2, C 8). Nous avons volontairement ajouté différents sérums parmi ceux constituant plus le diagnostic clinique différentiel et ayant une valeur non négligeable en ELISA : n= 7, H 2, H 3, H 5, C 11, CRC 3, CRC 4 et CRP.

Le panel de sérums retenus pour l'étude des profils de spécificité du western blot est répertorié dans la figure 22, un pool des sérums négatifs ainsi que deux sérums de pénicilliose confirmée ont été testé en parallèle.

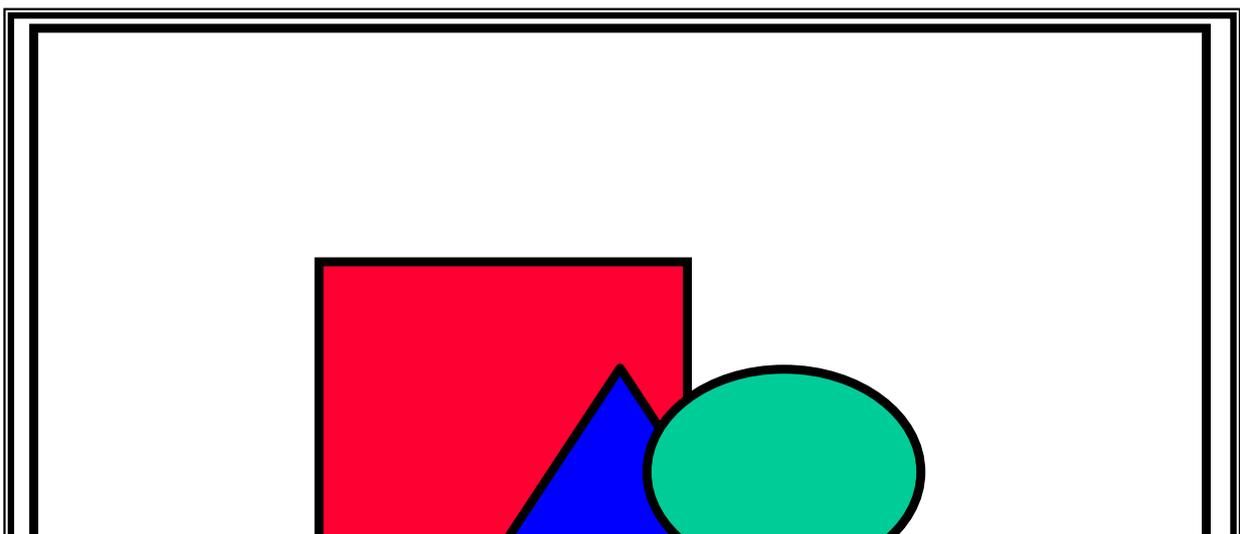


Figure n°22: Profils immunoblot de l'étude de spécificité du Western Blot
(1)= Pool de sérum négatif, (2 et 3)= ABPA 1 et 2, (4)=API 3, (5)=APO 6, (6, 7 et 8)=H 2, H 3 et H 5, (9et 10)=*P.m* positif, (11, 12 et 13)= C 8, C 2 et C10, (14, 15 et 16)=CRC 2, CRC 3 et CRC 4, (17)=CRP

Aucune bande n'est observée avec les sérums d'histoplasme, confirmant les résultats de l'ELISA sur l'absence de réaction croisée.

Aucun sérum issu de patients atteints d'aspergillose ne montre de bande, tout au plus une zone floue dans les hauts poids moléculaires pour les sérums qui avaient des index les plus élevés (ABPA 1, ABPA 2 et API 3)

Sur les trois sérums de candidose testés, seul celui qui avait l'index le plus élevé (C 2) présente une bande large mais de faible intensité de 62 kDa. Cette bande est également retrouvée pour les deux cryptococcoses cutanées qui ont les index les plus élevés. Enfin, il n'existe aucune réaction avec la cryptococcosse pulmonaire. Il s'agirait donc d'un antigène commun aux levures cosmopolites et au stade levure de *P. marneffe*. Cette protéine de 62 kDa pourrait correspondre à celle de 61 kDa décrite par Jeavons (Jeavons et al., 1998).

Au total, seuls trois sérums ont montré une bande immunoréactive avec l'antigène métabolique de *P. marneffe*, une candidose profonde prouvée et deux cryptococcoses cutanées qui avaient toutes un index ELISA en zone grise.

Cette étude confirme donc l'existence de réactions croisées avec *Candida* mais, à la différence de ce que l'on peut observer avec les blot de l'antigène cellulaire, ici le profil obtenu ne correspond à aucune bande spécifique de *Penicillium*. Le western blot permet donc de différencier la positivité de l'ELISA due aux réactions faussement positive. Elle apporte également la preuve de l'existence de réactions croisées avec cryptococcus (surtout de localisation cutanée).

L'étude de la spécificité étant réalisée, les outils diagnostiques peuvent être appliqués sur le terrain.

IV ETUDE SEROEPIDEMIOLOGIQUE EN ZONE D'ENDEMI E

Cette étude prospective est la première enquête de séroprévalence de l'infection à *P. marneffe* dans les provinces du Nord-Vietnam.

IV.1 RESULTATS DU TEST DE DEPISTAGE.

Elle concerne 59 patients VIH+ dont 5 stades SIDA. Les renseignements cliniques sont présentés dans le tableau XXII. Sur l'ensemble des 56 patients renseignés, 39 présentent une fièvre, associée dans 19 cas à des lésions cutanées et dans 10 cas se surajoute une perte de poids. L'étude séroépidémiologique montre que parmi les 59 sérums testés, 4 soit 6,8% possèdent une sérologie positive, dont le 43 avec un index à 2,6. Sur ces 4 patients, deux (sérums n° 1 et 43) possèdent une symptomatologie évocatrice avec lésions cutanées et fièvre mais des sérologies aspergillaires et candidosiques négatives. Par contre pour le sérum n° 3, qui présente en outre une sérologie candidosique nettement positive, confirmée par la présence de 3 arcs de précipitation, nous n'avons pas pu vérifier la présence de fièvres et/ou de perte de poids mais nous savons qu'il ne présentait pas de signes cutanés. Enfin pour le sérum n°339, qui présente de la fièvre sans signes cutanés ni perte de poids, la faible quantité de sérum ne nous a pas permis de réaliser l'étude des sérologies aspergillaires et candidosiques.

La moyenne des index est de $0,73. \pm 0,37$. A noter que la moyenne des index est élevée, proche du début de la zone grise avec 25% des patients qui sont en zone grise (14 sur 56).

Une attention toute particulière doit être portée au sérum n° 43 puisque c'est devant cette valeur élevée de l'index, que des examens mycologiques ont été pratiqués. Une hémoculture s'est avérée positive à *P. marneffe*. Le kit ELISA a donc permis le diagnostic du premier cas vietnamien de pénicilliose confirmée mycologiquement.

Tableau XXII : Résultats sérologiques et renseignement cliniques des 59 patients dont le diagnostic est compatible avec une pénicilliose.

Réf	FIEVRE	PERTE DE POIDS	SIDA / LESIONS CUTANEEES	ELISA Index	CHAI	AHAI
1	OUI	NON	SIDA/Pigmentée, pustule	1,40	1/160	<1/160
2	NC	NC	NC	0,52	<1/160	<1/160
3	NC	NC	NON	1,28	1/640	1/160
4	NC	NC	NC	0,62	1/160	<1/160
5	NON	OUI	Pigmentée, macule, papule	0,56	<1/160	<1/160
6	OUI	OUI	SIDA/Pigmentée, macule, papul	0,77	<1/160	<1/160
7	OUI	OUI	SIDA/Papule, macule	1,00	<1/160	<1/160
8	OUI	NON	Pigmentée, papule	0,56	<1/160	<1/160
9	OUI	OUI	Papule	0,99	<1/160	<1/160
10	OUI	NON	Ulcérée, pustule	0,41	<1/160	<1/160
11	NON	NON	Pigmentée, papule	0,50	<1/160	<1/160
12	OUI	OUI	Pigmentée, papule	0,54	<1/160	1/160
13	OUI	OUI	Pigmentée, macule, papule	0,99	<1/160	1/160
14	OUI	OUI	Pigmentée, macule, papule	1,19	<1/160	1/160
15	OUI	NON	Pigmentée, macule, papule	1,04	<1/160	<1/160
16	OUI	NON	Papule	0,48	<1/160	<1/160
17	OUI	NON	Pigmentée, papule	0,69	<1/160	<1/160
30	OUI	NON	NON	0,81		
43	OUI	OUI	SIDA / Verruqueuse, pustule	2,66	<1/160	<1/160
53	NON	NON	NON	0,32	1/160	<1/160
54	NON	NON	NON	0,43		
55	OUI	NON	NON	0,66		
112	NON	NON	NON	0,35	<1/160	<1/160
113	OUI	NON	NON	0,54	<1/160	<1/160

115	OUI	NON	NON	1,07	<1/160	<1/160
Réf	FI EVRE	PERTE DE POIDS	LESIONS CUTANEEES	ELI SA Index	CHAI	AHAI
124	OUI	NON	NON	0,286	<1/160	<1/160
188	NON	NON	NON	0,595		
239	OUI	NON	Pustule	0,97		
279	OUI	NON	NON	0,243	<1/160	<1/160
336	OUI	OUI	Pigmentée	0,328		
339	OUI	NON	NON	1,545		
396	NON	NON	NON	0,592		
397	NON	NON	Pigmentée, papule	1,075		
398	NON	NON	NON	0,332	<1/160	<1/160
399	OUI	OUI	NON	0,903	<1/160	<1/160
400	OUI	OUI	NON	1,157	1/160	1/320
401	OUI	NON	SIDA / Pigmentée, ulcérée,	0,286	<1/160	<1/160
402	OUI	NON	NON	0,712	<1/160	<1/160
403	OUI	NON	Papule	0,839	<1/160	<1/160
404	OUI	NON	Pustule	0,628	<1/160	<1/160
405	OUI	NON	Papule	0,777	<1/160	<1/160
406	OUI	NON	Papule	0,589	<1/160	<1/160
407	NON	NON	Papule, ulcérée	0,655	<1/160	<1/160
408	OUI	NON	Papule, ulcérée	0,765	<1/160	<1/160
409	OUI	NON	Verruqueuse, papule	0,719	<1/160	<1/160
410	NON	NON	Verruqueuse, papule, pustule	0,550	<1/160	1/160
411	OUI	NON	Ulcérée, pustule	0,640	<1/160	1/160
412	NON	NON	NON	0,236	<1/160	<1/160
413	OUI	OUI	Ulcérée	0,757	1/160	<1/160
414	NON	NON	Papule	0,665	<1/160	<1/160

Réf	FIEVRE	PERTE DE POIDS	LESIONS CUTANÉES	ELISA Index	CHAI	AHAI
415	OUI	NON	Papule	0,864	<1/160	<1/160
416	NON	NON	Papule, pustule, ulcérée	0,798	<1/160	1/160
417	OUI	NON	Papule	0,64	<1/160	<1/160
418	NON	NON	Papule	0,879	<1/160	1/320
419	NON	NON	Papule, pustule, ulcérée	0,765	<1/160	<1/160
420	OUI	NON	Papule, pustule, ulcérée	0,807	<1/160	<1/160
421	OUI	NON	Papule	0,761	<1/160	<1/160
422	NON	NON	Papule, pustule, pigmentée	0,426	<1/160	<1/160
423	OUI	OUI	Ulcérée, pustule	0,308	1/160	<1/160

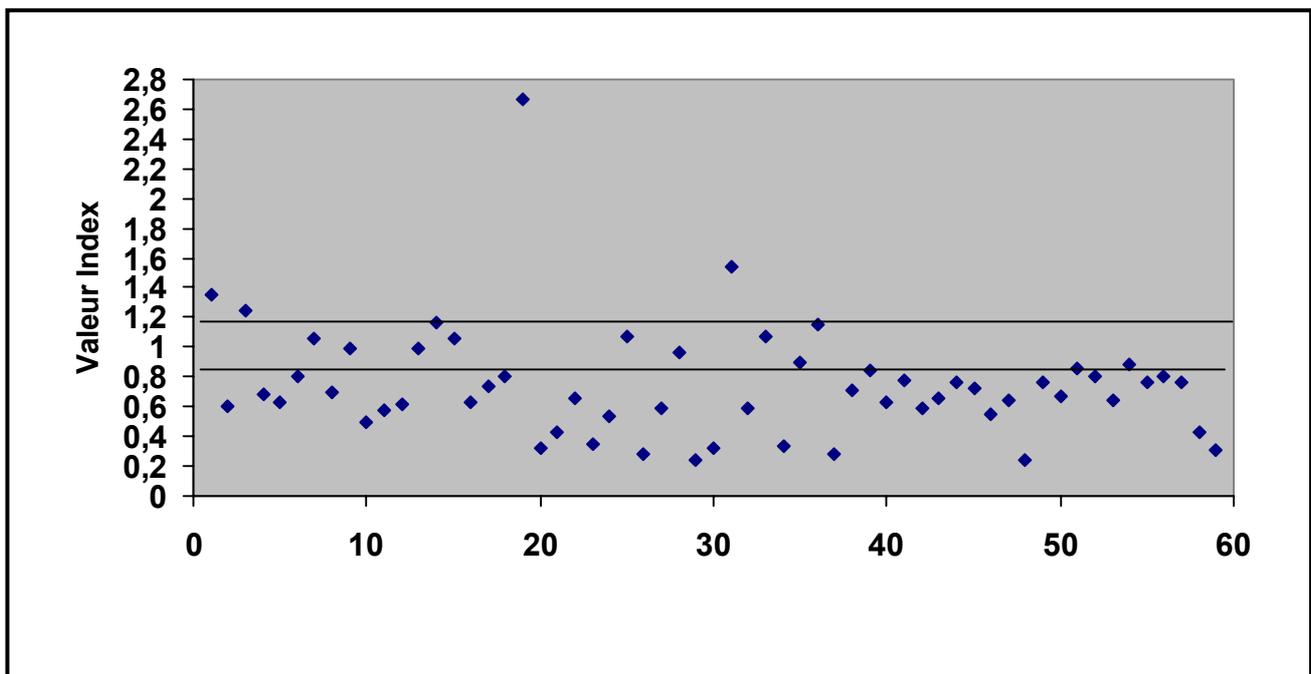


Figure n°23 :Représentation graphique des index de l'étude séroépidémiologique.

Aucun cas de pénicilliose n'avait été publié au Vietnam ou en provenance de celui-ci avant 2001 (Hien et al., 2001) contre 1984 pour les cinq premiers cas

thaïlandais (Jayanetra et al., 1984) Or le Vietnam est situé entre l'épicentre historique de la pénicilliose, la région du Guangxi (Chine du Sud) et la province de Chang Maï (Thaïlande) où l'on recense le plus grand nombre de cas de pénicilliose. Ceci laissait présager que le Vietnam pouvait être une zone d'endémie stable ; d'ailleurs le champignon n'a-t-il pas été isolé pour la première fois chez des rats vietnamiens ?

IV.2 RESULTAT DU WESTERN BLOT DE CONFIRMATION.

Parmi les 18 sérums vietnamiens possédant un index positif ou en zone grise, les quantités de sérums restantes après analyses (ELI SA, CHAI , AHAI), nous ont permis de tester, en western blot, seulement 6 sérums vietnamiens (3, 7, 9, 15, 43, 403). Les résultats de ces immunoempreintes sont exposés dans la figure 24

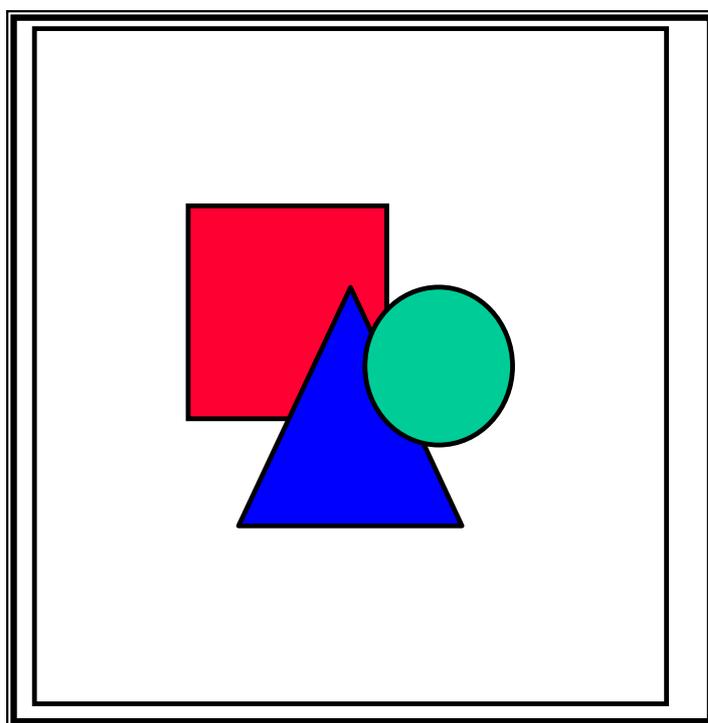


Figure n°24 : Immunoempreinte des sérums vietnamiens positif ou en zone grise pour l'ELI SA.

Les patients 3 et 9 possèdent tous les deux le même profil : deux bandes intenses de 54 et 66 kDa. Le patient 7 présente une bande intense de 31 kDa et une plus faible de 35 kDa, le patient 43 possède la même bande de 35 kDa mais d'intensité faible. Quant au patient 403, il présente deux bandes d'intensité très faible de 25 et 35 kDa. Seul le patient 15 ne présente aucune bande.

Nous ne discuterons pas ces résultats à ce niveau puisqu'une nouvelle enquête réalisée sur une autre cohorte, de 26 patients vietnamiens VIH+ hospitalisés, a permis de confirmer mycologiquement trois nouveaux cas de pénicilliose à *P. marneffei*. L'analyse en western blot (figure 25) des sérums de ces trois patients (800, 801 et 803) complète l'étude des sérums français de pénicillioses prouvées et permet de préciser de nouveaux profils de bandes spécifiques et donc d'affiner les critères diagnostiques.

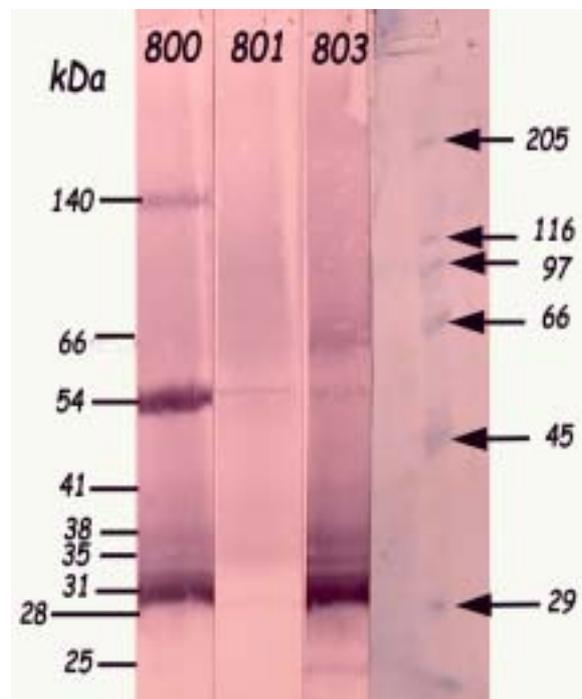


Figure n°25 : Profil western blot des sérums issus des nouveaux cas de pénicilliose.

Le sérum n° 800 présente 5 bandes (31, 35, 38, 54, et 140) dont deux de forte intensité (31 et 54 kDa). Le sérum n°801 possède un profil beaucoup plus discret sans bande de forte intensité, néanmoins, 2 faibles bandes sont identifiables (29 et 54 kDa). Quant au sérum n°803 il possède sept bandes (25, 31, 35, 38, 41, 54 et 66 kDa) dont la 31 de forte intensité.

Les trois nouveaux cas de pénicilliose possèdent donc tous la bande 54 kDa et au total, cinq des six patients atteints de pénicilliose prouvée (deux français et quatre vietnamiens) possèdent des anticorps dirigés contre cet antigène de 54 kDa. Vanattanakom la retrouve chez 20 des 33 patients de sa série (Vanittanakom et al., 1997). La bande de 31 kDa est retrouvée chez 3 des 6 patients atteints de pénicilliose. La bande de 80 kDa, présente chez un patient français, n'est retrouvée chez aucun des sérums de patients vietnamiens.

Par contre de nouvelles bandes sont mises en évidence. Elles sont à considérer comme spécifiques de pénicilliose puisque non retrouvées avec les sérums correspondant aux autres pathologies fongiques. En premier lieu, mentionnons la bande très fine de 35kDa que l'on ne décrit que dans les sérums vietnamiens, dans trois des quatre cas. C'est d'ailleurs l'unique bande retrouvée pour le premier cas (43) de pénicilliose au Vietnam. Parmi ces nouvelles bandes figurent également la bande de 38kDa considérée comme très spécifique par certains auteurs (Chongtrakool et al., 1997) mais qui n'est retrouvée que chez deux des six cas de pénicilliose prouvée. Notons enfin que la bande de 62 kDa qui constitue une bande non spécifique n'est retrouvée chez aucun des sérums vietnamiens.

Les bandes les plus contributives au diagnostic de pénicilliose sont donc la 54 kDa pour sa large distribution, la 31 kDa pour son intensité et la 35 kDa.

Tenant compte de ces nouvelles considérations, l'analyse des westerns blots de l'étude séroépidémiologique indique que **tous les sérums** testés, à l'exception du 15, **sont considérés comme immunologiquement suspect de pénicilliose**. Aucun prélèvement n'ayant été réalisé chez ces patients, la confirmation mycologique n'a pu être apportée.

CONCLUSION

Dans ce travail, nous avons mis en évidence l'influence, certes de la température, mais également de la composition du milieu sur le développement microscopique et macroscopique de ce champignon dimorphique. Le milieu PDA pourrait, à ce titre, s'avérer utile au diagnostic puisque, associé au milieu de Sabouraud, il permet d'évoquer le caractère dimorphique à la seule température de 37°C. On obtient, en effet, simultanément des colonies de développement levuriforme sur Sabouraud contre un développement de *Penicillium* classique filamenteux sur PDA, présentant de surcroît une pigmentation rouge tout à fait évocatrice.

En ce qui concerne le diagnostic sérologique notre étude a permis de révéler la supériorité de l'antigène métabolique sur l'antigène somatique en terme de spécificité, ainsi que d'autres performances justifiant son utilisation dans un test ELISA de dépistage. L'ELISA affiche une spécificité et une sensibilité élevée, même sur une population cible essentiellement immunodéprimée par le VIH. Son fractionnement au sein d'un western blot lui confère un pouvoir discriminant très grand. Cette stratégie de diagnostic sérologique trouvera sans doute toute sa place dans le diagnostic présomptif de cette mycose exotique émergente.

Les qualités de cet antigène ont pu s'exprimer en pratique clinique puisque l'application de cette stratégie lors d'une enquête séroépidémiologique prospective, réalisée dans le Nord-Vietnam (Hanoi), a permis de suspecter puis de confirmer mycologiquement les premiers cas de pénicilliose à *P. marneffe* dans ce pays. Une enquête similaire devrait être mise en place prochainement dans le Sud-Vietnam.

- Ajello, L., Padhye, A.A., Sukroongreung, S., Nilakul, C.H. and Tantimavanic, S. (1995) Occurrence of *Penicillium marneffe* infections among wild bamboo rats in Thailand. *Mycopathologia* 131(1), 1-8.
- Ancelle, T., Dupouy-Camet, J., Pujol, F., Nassif, X., Ferradini, L., Choudat, L., de Bievre, C., Dupont, B., Drouhet, E. and Lapiere, J. (1988) [A case of disseminated *Penicillium marneffe* penicilliosis in a patient with acquired immunodeficiency syndrome]. *Presse Med* 17(21), 1095-6.
- Bailloud, R., Sumanak, M., Sar, B., Sreng, C. and Ellman, T. (2002) Premiers cas d'infection à *Penicillium marneffe* identifiés chez l'immunodéprimé au Cambodge. *J Mycol Med* 12, 138-142.
- Bateman, A.C., Jones, G.R., O'Connell, S., Clark, F.J. and Plummeridge, M. (2002) Massive hepatosplenomegaly caused by *Penicillium marneffe* associated with human immunodeficiency virus infection in a Thai patient. *J Clin Pathol* 55(2), 143-4.
- Borradori, L., Schmit, J.C., Stetzkowski, M., Dussoix, P., Saurat, J.H. and Filthuth, I. (1994) *Penicilliosis marneffe* infection in AIDS. *J Am Acad Dermatol* 31(5 Pt 2), 843-6.
- Breton, P., Bani Sadr, F., Germaud, P., Leautez, S., Morin, O. and Raffi, F. (1998a) [Unusual lung mycosis: *Penicillium++ marneffe* infection]. *Rev Pneumol Clin* 54(2), 85-7.
- Breton, P., Germaud, P., Morin, O., Audouin, A., Milpied, N. and Harrousseau, J. (1998b) Rare pulmonary mycoses in patients with hematologic diseases. *Rev Pneumol Clin* 54, 253-7.
- Cao, L., Chan, C.M., Lee, C., Wong, S.S. and Yuen, K.Y. (1998a) MP1 encodes an abundant and highly antigenic cell wall mannoprotein in the pathogenic fungus *Penicillium marneffe*. *Infect Immun* 66(3), 966-73.
- Cao, L., Chan, K.M., Chen, D., Vanittanakom, N., Lee, C., Chan, C.M., Sirisanthana, T., Tsang, D.N. and Yuen, K.Y. (1999) Detection of cell wall mannoprotein Mp1p in culture supernatants of *Penicillium marneffe* and in sera of penicilliosis patients. *J Clin Microbiol* 37(4), 981-6.
- Cao, L., Chen, D.L., Lee, C., Chan, C.M., Chan, K.M., Vanittanakom, N., Tsang, D.N. and Yuen, K.Y. (1998b) Detection of specific antibodies to an antigenic mannoprotein for diagnosis of *Penicillium marneffe* penicilliosis. *J Clin Microbiol* 36(10), 3028-31.
- Capponi, M., Sureau, P. and Segretain, G. (1956) *Penicilliose de Rhizomys sinensis*. *Bull Soc Pathol Exot* 49, 418-21.
- Chariyalertsak, S., Sirisanthana, T., Supparatpinyo, K. and Nelson, K.E. (1996) Seasonal variation of disseminated *Penicillium marneffe* infections in northern Thailand: a clue to the reservoir? *J Infect Dis* 173(6), 1490-3.
- Chariyalertsak, S., Sirisanthana, T., Supparatpinyo, K., Praparattanapan, J. and Nelson, K.E. (1997) Case-control study of risk factors for *Penicillium marneffe* infection in human immunodeficiency virus-infected patients in northern Thailand. *Clin Infect Dis* 24(6), 1080-6.
- Chiang, C.T., Leu, H.S., Wu, T.L. and Chan, H.L. (1998) *Penicillium marneffe* fungemia in an AIDS patient: the first case report in Taiwan. *Changcheng Yi Xue Za Zhi* 21(2), 206-10.

- Chim, C.S., Fong, C.Y., Ma, S.K., Wong, S.S. and Yuen, K.Y. (1998) Reactive hemophagocytic syndrome associated with *Penicillium marneffei* infection. *Am J Med* 104(2), 196-7.
- Chokephaibulkit, K., Veerakul, G., Vanprapar, N., Chaiprasert, A., Tanphaichitr, V. and Chearskul, S. (2001) Penicilliosis-associated hemophagocytic syndrome in a human immunodeficiency virus-infected child: the first case report in children. *J Med Assoc Thai* 84(3), 426-9.
- Chongtrakool, P., Chaiyaroj, S.C., Vithayasai, V., Trawatcharegon, S., Teanpaisan, R., Kalnawakul, S. and Sirisinha, S. (1997) Immunoreactivity of a 38-kilodalton *Penicillium marneffei* antigen with human immunodeficiency virus-positive sera. *J Clin Microbiol* 35(9), 2220-3.
- Coen, M., Viviani, M.A. and Rizzardini, G. (1989) Disseminated infection due to *Penicillium marneffei* in a HIV positive patient. *Int Conf AIDS* 5, 237.
- Cooper, C.R., Jr. and McGinnis, M.R. (1997) Pathology of *Penicillium marneffei*. An emerging acquired immunodeficiency syndrome-related pathogen. *Arch Pathol Lab Med* 121(8), 798-804.
- Deng, Z.L. and Connor, D.H. (1985) Progressive disseminated penicilliosis caused by *Penicillium marneffei*. Report of eight cases and differentiation of the causative organism from *Histoplasma capsulatum*. *Am J Clin Pathol* 84(3), 323-7.
- Deng, Z.L., Yun, M. and Ajello, L. (1986) Human penicilliosis *marneffei* and its relation to the bamboo rat (*Rhizomys pruinosus*). *J Med Vet Mycol* 24(5), 383-9.
- Depraetere, K., Colebunders, R., Ieven, M., De Droogh, E., Pelgrom, Y., Hauben, E., Van Marck, E. and Devroey, C. (1998) Two imported cases of *Penicillium marneffei* infection in Belgium. *Acta Clin Belg* 53(4), 255-8.
- Desakorn, V., Simpson, A.J., Wuthiekanun, V., Sahassananda, D., Rajanuwong, A., Pitisuttithum, P., Howe, P.A., Smith, M.D. and White, N.J. (2002) Development and evaluation of rapid urinary antigen detection tests for diagnosis of penicilliosis *marneffei*. *J Clin Microbiol* 40(9), 3179-83.
- Desakorn, V., Smith, M.D., Walsh, A.L., Simpson, A.J., Sahassananda, D., Rajanuwong, A., Wuthiekanun, V., Howe, P., Angus, B.J., Suntharasamai, P. and White, N.J. (1999) Diagnosis of *Penicillium marneffei* infection by quantitation of urinary antigen by using an enzyme immunoassay. *J Clin Microbiol* 37(1), 117-21.
- DiSalvo, A.F., Fickling, A.M. and Ajello, L. (1973) Infection caused by *Penicillium marneffei*: description of first natural infection in man. *Am J Clin Pathol* 60(2), 259-63.
- Drouhet, E. (1993) Penicilliosis due to *Penicillium marneffei*: a new emerging systemic mycosis in AIDS patients travelling or living in Southeast Asia. *J Mycol Med* 4, 195-224.
- Drouhet, E. and Dupont, B. (1995) Infection à *Penicillium marneffei*: mycose systémique à manifestations cutanées associée au SIDA. *J Mycol Med* 5(suppl I), 21-34.
- Duong, T.A. (1996) Infection due to *Penicillium marneffei*, an emerging pathogen: review of 155 reported cases. *Clin Infect Dis* 23(1), 125-30.
- Germaud, P., Renaudin, K., Danner, I. and Morin, O. (2001) Aspergilloses broncho-pulmonaires: les nouveaux enjeux. *Rev Mal Respir* 18, 257-266.

- Grise, G., Aouar, M., Brasseur, P. and Humbert, G. (1997) [Penicillium marneffei infection: a pathology to be known]. *Ann Biol Clin (Paris)* 55(3), 241-2.
- Heath, T.C., Patel, A., Fisher, D., Bowden, F.J. and Currie, B. (1995) Disseminated *Penicillium marneffei*: presenting illness of advanced HIV infection; a clinicopathological review, illustrated by a case report. *Pathology* 27(1), 101-5.
- Hien, T.V., Loc, P.P., Hoa, N.T., Duong, N.M., Quang, V.M., McNeil, M.M., Dung, N.T. and Ashford, D.A. (2001) First cases of disseminated penicilliosis marneffei infection among patients with acquired immunodeficiency syndrome in Vietnam. *Clin Infect Dis* 32(4), e78-80.
- Hilmarsdottir, I., Coutellier, A., Elbaz, J., Klein, J.M., Datry, A., Gueho, E. and Herson, S. (1994) A French case of laboratory-acquired disseminated *Penicillium marneffei* infection in a patient with AIDS. *Clin Infect Dis* 19(2), 357-8.
- Hilmarsdottir, I., Meynard, J.L., Rogeaux, O., Guermontprez, G., Datry, A., Katlama, C., Brucker, G., Coutellier, A., Danis, M. and Gentilini, M. (1993) Disseminated *Penicillium marneffei* infection associated with human immunodeficiency virus: a report of two cases and a review of 35 published cases. *J Acquir Immune Defic Syndr* 6(5), 466-71.
- Horre, R., Gilges, S., Breig, P., Kupfer, B., de Hoog, G.S., Hoekstra, E., Poonwan, N. and Schaal, K.P. (2001) Case report. Fungaemia due to *Penicillium piceum*, a member of the *Penicillium marneffei* complex. *Mycoses* 44(11-12), 502-4.
- Imwidthaya, P., Sekhon, A.S., Mastro, T.D., Garg, A.K. and Ambrosie, E. (1997) Usefulness of a microimmunodiffusion test for the detection of *Penicillium marneffei* antigenemia, antibodies, and exoantigens. *Mycopathologia* 138(2), 51-5.
- Jayanetra, P., Nitiyanant, P., Ajello, L., Padhye, A.A., Lolekha, S., Atichartakarn, V., Vathesatogit, P., Sathaphatayavongs, B. and Prajaktam, R. (1984) *Penicilliosis marneffei* in Thailand: report of five human cases. *Am J Trop Med Hyg* 33(4), 637-44.
- Jeavons, L., Hamilton, A.J., Vanittanakom, N., Ungpakorn, R., Evans, E.G., Sirisanthana, T. and Hay, R.J. (1998) Identification and purification of specific *Penicillium marneffei* antigens and their recognition by human immune sera. *J Clin Microbiol* 36(4), 949-54.
- Jones, P.D. and See, J. (1992) *Penicillium marneffei* infection in patients infected with human immunodeficiency virus: late presentation in an area of nonendemicity. *Clin Infect Dis* 15(4), 744.
- Julander, I. and Petrini, B. (1997) *Penicillium marneffei* infection in a Swedish HIV-infected immunodeficient narcotic addict. *Scand J Infect Dis* 29(3), 320-2.
- Kantipong, P., Panich, V., Pongsurachet, V. and Watt, G. (1998) Hepatic penicilliosis in patients without skin lesions. *Clin Infect Dis* 26(5), 1215-7.
- Kappe, R. (1999) Antifungal activity of the new azole UK-109, 496 (voriconazole). *Mycoses* 42 Suppl 2, 83-6.
- Kaufman, L., Standard, P.G., Jalbert, M., Kantipong, P., Limpakarnjanarat, K. and Mastro, T.D. (1996) Diagnostic antigenemia tests for penicilliosis marneffei. *J Clin Microbiol* 34(10), 2503-5.

- Kudeken, N., Kawakami, K., Kusano, N. and Saito, A. (1996) Cell-mediated immunity in host resistance against infection caused by *Penicillium marneffei*. *J Med Vet Mycol* 34(6), 371-8.
- Kudeken, N., Kawakami, K. and Saito, A. (1997) CD4+ T cell-mediated fatal hyperinflammatory reactions in mice infected with *Penicillium marneffei*. *Clin Exp Immunol* 107(3), 468-73.
- Kurup, A., Leo, Y.S., Tan, A.L. and Wong, S.Y. (1999) Disseminated *Penicillium marneffei* infection: a report of five cases in Singapore. *Ann Acad Med Singapore* 28(4), 605-9.
- Lachaud, L., Gayvallet-Montredon, N., Lagier, A. and Basset, D. (1998) Nouveau cas de pénicilliose à *Penicillium marneffei* chez une patiente sidéenne. *J Mycol Med* 8, 211-212.
- Lam, K.Y., Cheung, F., Yam, L.Y., Lee, C.H. and Fung, K.H. (1997) Atypical manifestations in a patient with systemic lupus erythematosus. *J Clin Pathol* 50(2), 174-6.
- Le Pape, P., Cam, M.D., Miegerville, M., Alvarez, N., Gentilhomme, H. and Blenet, M. (2002) Evaluation de l'antigène métabolique de *Penicillium marneffei* pour le suivi de patient HIV+ par ELISA. Congrès de la société française de Mycologie médicale- Cayenne.
- Le Pape, P., Miegerville, M. and Blenet, M. (2003) Immunobiochemistry of antigens from the yeast phase of *Penicillium marneffei*. *J Mycol Med* (accepté).
- Le Pape, P. and Morin, O. (1986) Electrophorèse en gel de polyacrylamide et immunoempreinte dans l'étude des *aspergillus*. *Bull Soc Fr Myc Med* XV(2), 485-490.
- Lo, C.Y., Chan, D.T., Yuen, K.Y., Li, F.K. and Cheng, K.P. (1995) *Penicillium marneffei* infection in a patient with SLE. *Lupus* 4(3), 229-31.
- Lo, Y., Tintelnot, K., Lippert, U. and Hoppe, T. (2000) Disseminated *Penicillium marneffei* infection in an African AIDS patient. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 94(2), 187.
- Louthrenoo, W., Thamprasert, K. and Sirisanthana, T. (1994) Osteoarticular penicilliosis *marneffei*. A report of eight cases and review of the literature. *Br J Rheumatol* 33(12), 1145-50.
- Lyratsopoulos, G., Ellis, M., Nerringer, R. and Denning, D.W. (2002) Invasive infection due to penicillium species other than *P. marneffei*. *J Infect* 45(3), 184-95.
- McShane, H., Tang, C.M. and Conlon, C.P. (1998) Disseminated *Penicillium marneffei* infection presenting as a right upper lobe mass in an HIV positive patient. *Thorax* 53(10), 905-6.
- Miegerville, M., Leautez, S., Le Pape, P. and Raffi, F. (1998) Pneumopathie à *Penicillium marneffei* chez une patiente VIH positive d'origine thaïlandaise. Premier cas Nantais. *J Mycol Med* 8, 159-162.
- Mohri, S., Yoshikawa, K., Sagara, H. and Nakajima, H. (2000) A case of *Penicillium marneffei* infection in an AIDS patient: the first case in Japan. *Nippon Ishinkin Gakkai Zasshi* 41(1), 23-6.
- Nelson, K.E. and Sirisanthana, T. (2001) Images in clinical medicine. Disseminated penicillium *marneffei* infection in a patient with AIDS. *N Engl J Med* 344(23), 1763.
- Nittayananta, W. (1999) Penicilliosis *marneffei*: another AIDS defining illness in Southeast Asia. *Oral Dis* 5(4), 286-93.

- Panichakul, T., Chawengkirttikul, R., Chaiyaroj, S.C. and Sirisinha, S. (2002) Development of a monoclonal antibody-based enzyme-linked immunosorbent assay for the diagnosis of *Penicillium marneffei* infection. *Am J Trop Med Hyg* 67(4), 443-7.
- Pautler, K.B., Padhye, A.A. and Ajello, L. (1984) Imported penicilliosis *marneffei* in the United States: report of a second human infection. *Sabouraudia* 22(5), 433-8.
- Peto, T.E., Bull, R., Millard, P.R., Mackenzie, D.W., Campbell, C.K., Haines, M.E. and Mitchell, R.G. (1988) Systemic mycosis due to *Penicillium marneffei* in a patient with antibody to human immunodeficiency virus. *J Infect* 16(3), 285-90.
- Piehl, M.R., Kaplan, R.L. and Haber, M.H. (1988) Disseminated penicilliosis in a patient with acquired immunodeficiency syndrome. *Arch Pathol Lab Med* 112(12), 1262-4.
- Pittet, D., Monod, M., Suter, P. and Frenck, E. (1994) *Candida* colonization and subsequent infections in critically ill surgical patients. *Ann Surg* 220, 751-8.
- Ranjana, K.H., Priyokumar, K., Singh, T.J., Gupta Ch, C., Sharmila, L., Singh, P.N. and Chakrabarti, A. (2002) Disseminated *Penicillium marneffei* Infection among HIV-Infected Patients in Manipur State, India. *J Infect* 45(4), 268-71.
- Remadi, S., Lotfi, C., Finci, V., Ismail, A., Rogiano, D., Vassilakos, P. and Seemayer, T.A. (1995) *Penicillium marneffei* infection in patients infected with the human immunodeficiency virus. A report of two cases. *Acta Cytol* 39(4), 798-802.
- Rimek, D., Zimmermann, T., Hartmann, M., Prariyachatigul, C. and Kappe, R. (1999) Disseminated *Penicillium marneffei* infection in an HIV-positive female from Thailand in Germany. *Mycoses* 42 Suppl 2, 25-8.
- Rosenthal, E., Marty, P., Ferrero, C., Le Fichoux, Y. and Cassuto, J.P. (2000) [Disseminated *Penicillium marneffei* infection suggesting visceral leishmaniasis in an HIV infected patient]. *Presse Med* 29(7), 363-4.
- Saadiah, S., Jeffrey, A.H. and Mohamed, A.L. (1999) *Penicillium marneffei* infection in a non aids patient: first case report from Malaysia. *Med J Malaysia* 54(2), 264-6.
- Segretain, G. (1959) *Penicillium marneffei* n. sp., agent d'une mycose du système réticulo-endothéliale. *Mycopathol Mycol Appl.* 11, 327-53.
- Sekhon, A.S., Li, J.S. and Garg, A.K. (1982) *Penicilliosis marneffei*: serological and exoantigen studies. *Mycopathologia* 77(1), 51-7.
- Sekhon, A.S., Stein, L., Garg, A.K., Black, W.A., Glezos, J.D. and Wong, C. (1994) Pulmonary penicilliosis *marneffei*: report of the first imported case in Canada. *Mycopathologia* 128(1), 3-7.
- Singh, P.N., Ranjana, K., Singh, Y.I., Singh, K.P., Sharma, S.S., Kulachandra, M., Nabakumar, Y., Chakrabarti, A., Padhye, A.A., Kaufman, L. and Ajello, L. (1999) Indigenous disseminated *Penicillium marneffei* infection in the state of Manipur, India: report of four autochthonous cases. *J Clin Microbiol* 37(8), 2699-702.
- Sirisanthana, T. (1997) Infection due to *Penicillium marneffei*. *Ann Acad Med Singapore* 26(5), 701-4.

- Sirisanthana, T. and Supparatpinyo, K. (1998) Epidemiology and management of penicilliosis in human immunodeficiency virus-infected patients. *Int J Infect Dis* 3(1), 48-53.
- Sirisanthana, T., Supparatpinyo, K., Perriens, J. and Nelson, K.E. (1998) Amphotericin B and itraconazole for treatment of disseminated *Penicillium marneffei* infection in human immunodeficiency virus-infected patients. *Clin Infect Dis* 26(5), 1107-10.
- So, S.Y., Chau, P.Y., Jones, B.M., Wu, P.C., Pun, K.K., Lam, W.K. and Lawton, J.W. (1985) A case of invasive penicilliosis in Hong Kong with immunologic evaluation. *Am Rev Respir Dis* 131(4), 662-5.
- Sobottka, I., Albrecht, H., Mack, D., Stellbrink, H.J., van Lunzen, J., Tintelnot, K. and Laufs, R. (1996) Systemic *Penicillium marneffei* infection in a German AIDS patient. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 15(3), 256-9.
- Stern, M., Romana, C.A., Chovin, S., Drouhet, E., Danel, C. and Pays, J.F. (1989) [Pulmonary *Penicillium marneffei* penicilliosis in a patient with acquired immunodeficiency syndrome]. *Presse Med* 18(42), 2067.
- Supparatpinyo, K., Chiewchanvit, S., Hirunsri, P., Baosoung, V., Uthammachai, C., Chaimongkol, B. and Sirisanthana, T. (1992a) An efficacy study of itraconazole in the treatment of *Penicillium marneffei* infection. *J Med Assoc Thai* 75(12), 688-91.
- Supparatpinyo, K., Chiewchanvit, S., Hirunsri, P., Uthammachai, C., Nelson, K.E. and Sirisanthana, T. (1992b) *Penicillium marneffei* infection in patients infected with human immunodeficiency virus. *Clin Infect Dis* 14(4), 871-4.
- Supparatpinyo, K., Nelson, K.E., Merz, W.G., Breslin, B.J., Cooper, C.R., Jr., Kamwan, C. and Sirisanthana, T. (1993) Response to antifungal therapy by human immunodeficiency virus-infected patients with disseminated *Penicillium marneffei* infections and in vitro susceptibilities of isolates from clinical specimens. *Antimicrob Agents Chemother* 37(11), 2407-11.
- Supparatpinyo, K., Perriens, J., Nelson, K.E. and Sirisanthana, T. (1998) A controlled trial of itraconazole to prevent relapse of *Penicillium marneffei* infection in patients infected with the human immunodeficiency virus. *N Engl J Med* 339(24), 1739-43.
- Supparatpinyo, K. and Sirisanthana, T. (1994) Disseminated *Penicillium marneffei* infection diagnosed on examination of a peripheral blood smear of a patient with human immunodeficiency virus infection. *Clin Infect Dis* 18(2), 246-7.
- Tsang, D.N., Chan, J.K., Lau, Y.T., Lim, W., Tse, C.H. and Chan, N.K. (1988) *Penicillium marneffei* infection: an underdiagnosed disease? *Histopathology* 13(3), 311-8.
- Valeyrie, L., Botterel, F., Minozzi, C., Roger, P., Bourree, P. and Vittecoq, D. (1999) Prolonged fever revealing disseminated infection due to *Penicillium marneffei* in a French HIV-seropositive patient. *Aids* 13(6), 731-2.
- Van Cutsem, J., Meulemans, L., Van Gerven, F. and Stynen, D. (1990) Detection of circulating galactomannan by *Pastorex Aspergillus* in experimental invasive aspergillosis. *Mycoses* 33(2), 61-9.

- Vanittanakom, N., Mekaprateep, M., Sittisombut, N., Supparatpinyo, K., Kanjanasthiti, P., Nelson, K.E. and Sirisanthana, T. (1997) Western immunoblot analysis of protein antigens of *Penicillium marneffei*. *J Med Vet Mycol* 35(2), 123-31.
- Vanittanakom, N., Merz, W.G., Sittisombut, N., Khamwan, C., Nelson, K.E. and Sirisanthana, T. (1998) Specific identification of *Penicillium marneffei* by a polymerase chain reaction/hybridization technique. *Med Mycol* 36(3), 169-75.
- Vanittanakom, N. and Sirisanthana, T. (1997) *Penicillium marneffei* infection in patients infected with human immunodeficiency virus. *Curr Top Med Mycol* 8(1-2), 35-42.
- Vanittanakom, N., Vanittanakom, P. and Hay, R.J. (2002) Rapid identification of *Penicillium marneffei* by PCR-based detection of specific sequences on the rRNA gene. *J Clin Microbiol* 40(5), 1739-42.
- Vilar, F.J., Hunt, R., Wilkins, E.G., Wilson, G. and Jones, N.P. (2000) Disseminated *Penicillium marneffei* in a patient infected with human immunodeficiency virus. *Int J STD AIDS* 11(2), 126-8.
- Viviani, M.A., Tortorano, A.M., Rizzardini, G., Quirino, T., Kaufman, L., Padhye, A.A. and Ajello, L. (1993) Treatment and serological studies of an Italian case of penicilliosis *marneffei* contracted in Thailand by a drug addict infected with the human immunodeficiency virus. *Eur J Epidemiol* 9(1), 79-85.
- Wheat, J., Wheat, H., Connolly, P., Kleiman, M., Supparatpinyo, K., Nelson, K., Bradsher, R. and Restrepo, A. (1997) Cross-reactivity in *Histoplasma capsulatum* variety *capsulatum* antigen assays of urine samples from patients with endemic mycoses. *Clin Infect Dis* 24(6), 1169-71.
- Wong, K.H. and Lee, S.S. (1998) Comparing the first and second hundred AIDS cases in Hong Kong. *Singapore Med J* 39(6), 236-40.
- Wong, S.S., Wong, K.H., Hui, W.T., Lee, S.S., Lo, J.Y., Cao, L. and Yuen, K.Y. (2001) Differences in clinical and laboratory diagnostic characteristics of penicilliosis *marneffei* in human immunodeficiency virus (HIV)- and non-HIV-infected patients. *J Clin Microbiol* 39(12), 4535-40.
- Yuen, K.Y., Wong, S.S., Tsang, D.N. and Chau, P.Y. (1994) Serodiagnosis of *Penicillium marneffei* infection. *Lancet* 344(8920), 444-5.

ANNEXE n° I : Quelques éléments d'identification des principaux *Penicillium* 15

- Conidiogénèse faible ou absente à 25°C. Mycélium, exsudat et/ou milieu de culture pigmenté en orange, rouge ou brun.*P. nalgiovense*.

- Bonne croissance sur milieu Czapek.....*P. oxalicum*.

- Thalle sur milieu n'excédant pas 25 mm de diamètre en 7 jours à 25°C. Revers jaune vif. Métules d'égale longueur.....*P. citrinum*.

- Thalle pigmenté en rouge sur milieu CYA à 25°C.....*P. purpurogenum*.

- Thalle à croissance rapide à 25°C. Pénicille lâche, pigment jaune diffusible, exsudat jaune plus ou moins foncé.....*P. chrysogenum*.

- Phialides courtes, moins de 6,5 µm de long.....*P. griseofulvum*.

- Conidies cylindriques. Odeur aromatique.....*P. italicum*.

- Conidies subglobuleuses à elliptiques, odeur de pomme.....*P. expansum*.

- Thalle floconneux. Conidies blanches ou vert pâle.....*P. camembertii*.

- Conidiophores grossièrement granuleux. Conidies de 4 à 5 µm. Pas d'odeur forte. Sclérotés parfois présents dans les vieilles cultures.....*P. roquefortii*.

ANNEXE 2 : PREPARATION DES MICROPLAQUES - ELISA -

Objectif :

Sensibilisation des plaques par l'antigène métabolique à l'aide d'une adsorption passive dans les puits.

Protocole :

- **Préparation de la solution antigénique** : 16 mg de lyophilisat d'antigène sont dilués dans 30 ml de tampon bicarbonaté.

- **Sensibilisation des microplaques** : 100 µl de la solution d'antigène précédente sont introduit dans chacun des puits. Incuber 1 heure à 37°C puis 1 nuit à 4-8°C. Vider les puits et sécher la plaque.

- **Blocage par l'albumine** : Une solution d'albumine de sérum bovin (BSA) à 3% est utilisée pour effectuer le blocage. Préparé par 1,1 g de BSA dilués dans 30 ml du tampon de lavage PBS à pH=7,2, 150 µl sont déposés dans chaque puits et incubés 1 heure à 37°C. Les plaques sont ensuite conservées en sachet Aluminium* avec dessiccateur.

Réactifs de l'ELISA:

Tampon de lavage

Tampon bicarbonaté :

Albumine bovine fraction V A9056 lot 91 H03325 de SIGMA*

ANNEXE 3 : SERUMS DE PATIENTS ATTEINTS DE CANDIDOSES PROFONDES

1) Candidoses prouvées :

C 1, dans le cadre d'une tumeur pancréatique et devant un choc septique est découvert au scanner un abcès hépatique volumineux qui, ponctionné ramène un liquide d'aspect bilio-hémorragique où est isolé un *Candida glabrata* ainsi qu'un staphylocoque blanc et un entérocoque. Plus tard, trois hémocultures s'avèreront positive à *Candida glabrata* ainsi qu'une sérologie candidosique. Au total, il s'agit d'une **septicémie candidosique à point de départ hépatique**. [sérum n° 17126270, 5 jours après première hémoculture positive]

C 2, dans le cadre d'une toxicomanie IV, avec injection IV de son traitement substitutif per os, monsieur S. développe un abcès à *Candida albicans* au site d'injection (pli du coude) puis une chorioretinite candidosique (abcès para-maculaire) post-sépticémique. La culture est positive sur le prélèvement de vitrée ainsi que sur l'abcès du coude, elle est complétée par une sérologie très positive. Au total, il s'agit d'une **candidose systémique d'inoculation par toxicomanie IV**. [sérum n° 17145421]

C 3, dans le cadre d'une cirrhose alcoolique, décompensation œdémato-ascitique avec encéphalopathie compliquée d'une candidose profonde (asciculture positive) à *Candida albicans* immunologiquement confirmée par une sérologie candidosique positive. [sérum n° 17048098, J8 après l'asciculture positive]

2) Candidoses hautement probables

C 4, ex C11 un patient sans déficit immunitaire apparent présente un choc septique (frissons, pics fébriles, douleurs abdominales) à *Candida albicans* résolutif après traitement par TRI FLUCAN* mais avec candidémie récidivante J8 après chaque arrêt du traitement. La sérologie candidosique est positive (2 arcs et 640 en CHAI) et six hémocultures sont revenues positives. Au total, il s'agit d'une **sépticémie communautaire à Candida albicans**. [sérum n° 17125563, J4 après 1^{ère} hémoculture positive]

C 5, chez un patient tabagique atteint d'artériopathie et opéré d'un pontage aorto-bifémoral se développe une **sépticémie à Candida tropicalis** (nombreuses hémocultures positives) à partir d'une thrombophlébite septique jugulaire sur cathéter sous clavier. Le patient est en outre colonisé par *Candida* (indice de Pittet = 1 sur trois sites : urine, bouche et liquide gastrique) et présente une sérologie candidosique légèrement positive (2 arcs et 160 en CHAI). [sérum n° 17138609, J5 après 1^{ère} hémoculture positive]

C 6, chez un patient gastrostomisé, se développe un volumineux abcès de paroi abdominal à *Candida albicans* à partir d'une fuite de la sonde de gastrostomie puis un

tableau de *sepsis* étiqueté **péritonite à *Candida***. (pas de cause bactérienne retrouvée)
En effet, outre les prélèvements per-opératoire (pus d'abdomen) qui sont positifs à *Candida albicans*, le patient est colonisé (urine, orifice de trachéotomie) et la sérologie est positive. [sérum n° 20136042, J13 après le prélèvement per-opératoire]

C 7, un greffé bipulmonaire pour mucoviscidose conditionné par cyclosporine puis PROGRAF* et corticoïdes, développe une **septicémie à partir d'un site implantable infecté par *Candida glabrata***. La sérologie est positive et s'associe à de nombreuses cultures positives à *C. glabrata* comme le cathéter fémoral, de nombreux pièges bronchiques, le site implantable bien sûr, ainsi que six hémocultures positives. [sérum n° 17138686, J12 après 1^{ère} hémoculture positive]

C 8, un autre patient atteint de mucoviscidose, greffé cœur-bipulmonaire, initialement colonisé sur son poumon natif par *Candida* (indice de Pittet à 1 sur quatre prélèvements) mais aussi à *Aspergillus*, présente, après sa greffe, une sérologie très positive (6 arcs et 640 en CHAI) et développe malgré un traitement par TRI FLUCAN*, une sépticémie à *Candida albicans* (cinq hémocultures positives et deux cathéters). Le point de départ est vraisemblablement une thrombose septique sur cathéter central jugulaire (car non résorbé après 11 jours d'anticoagulation efficace). [sérum n° 17143223, J7 après 1^{ère} hémoculture positive]

C 9, un brûlé à 35%, préalablement colonisé à *Candida sp* (indice de Pittet > 0,5) avec une sérologie candidosique très positive développe une fièvre qui est traitée de façon empirique, avec succès par TRI FLUCAN* 400mg/jour. [sérum n° 17090980]

3) Candidoses fortement suspectées

C 10, un patient ayant un mélanome stade III avec métastases hépatiques et ganglionnaires ; traité par chimiothérapie lourde, développe une fièvre inexpliquée dans un contexte de colonisation par *Candida albicans* (indice de Pittet > 0,5) accompagné d'une sérologie candidosique très positive. [sérum n° 17036099, J10 après début de fièvre]

C 11, il s'agit d'un patient ayant présenté une infection sans étiologie bactérienne retrouvée à partir d'un site implantable infecté qui, retiré, c'est avéré positif à *Candida albicans*. La sérologie candidosique réalisée *a posteriori* c'est révélée très positive. [sérum n° 17114539, J12 après le début de l'infection]

ANNEXE 4 : SERUMS DE PATIENTS ATTEINTS DE CRYPTOCOCCOSES CUTANÉES
--

CRC 1, patient sous corticothérapie au long court (depuis 15 ans, 30 mg de CORTANCYL*) pour un asthme consécutif à l'inhalation de gasoil. Considéré comme immunodéprimé (188 CD₄/mm³, hypo-gammaglobulinémie G à 3g/l, antécédents

d'infections opportunistes notamment une pneumopathie à *mycobactérium avium*), il développe une cryptococcose du membre supérieur avec isolement de levures dans la peau et l'urine ainsi que la présence d'antigènes dans le sang (2 à 164) et les urines. Il sera traité avec succès par un traitement prolongé associant amphotéricine B + ANCOTIL* relayé par du TRI FLUCAN*.

CRC 2, patient VIH- présentant un syndrome d'immunodéficience acquise non lié au VIH avec une **lymphopénie idiopathique à CD₄** (55 CD₄/mm³ sans hypogammaglobulinémie) révélé par une cryptococcose cutanée (temporale gauche) mais aussi pulmonaire (nodule pulmonaire). Les urines et la biopsie cutanée seront positives à *cryptococcus*, alors que l'antigène restera négatif.

CRC 3 et **CRC 4**, sont des cryptococcoses d'**inoculation** survenant sur des patients *a priori* immunocompétents

ANNEXE 5 : SERUMS DE PATIENTS ATTEINTS D' ASPERGILLOSE PULMONAIRE INVASIVE

1) Aspergillose pulmonaire invasive prouvée :

API 1, sur un terrain d'hémopathie maligne (LAM 1) deux fois allogreffés et traité par cyclosporine et méthotrexate, apparition d'antigène aspergillaire dans le sérum mais également dans le LBA. Ce dernier s'avèrera positif en *Aspergillus fumigatus*. Au scanner, présence de nombreux nodules dans le parenchyme pulmonaire dont un avec une image en croissant gazeux évoquant fortement une nécrose aspergillaire. [sérum n° 17129084, J9 après début API]

API 2, également sur un terrain d'hémopathie maligne (LAM 2) mais autogreffé, apparition d'une otite (dont le pus est positif en *Aspergillus nidulans*) qui progresse très rapidement au niveau cérébral établissant une **aspergillose neuro-méningée avec abcès bilatéral au niveau temporal** rapidement mortelle malgré un traitement par voriconazole. Sur le plan biologique, l'antigène aspergillaire est positif dans le sérum mais également dans le LCR. [sérum n° 17097116, J15 après début de l'API]

API 3, Mr M. tabagique mais apparemment immunocompétent (aucun facteur d'immunodépression retrouvé) présente une **aspergillose pulmonaire fulminante** aboutissant, très rapidement, à son décès en réanimation médicale. Une biopsie *post-mortem* révélera une réaction granulomateuse avec aspect de miliaire aspergillaire invasive et une culture positive d'*A. fumigatus*. Un piège bronchique et un LBA avaient déjà été positifs à *A. fumigatus*, par contre la sérologie aspergillaire est faiblement positive (AHAI=320 et absence d'arc). Le diagnostic de granulomatose septique [familiale] sera évoquée. [sérum n° 09637641 J4 après le début de son hospitalisation]

2) Aspergillose pulmonaire invasive hautement probable

API 4, Mr M., allogreffé pour une hémopathie maligne (LAL) présente des hémorragies intra-alvéolaires avec présence au scanner de micronodules et d'*Aspergillus fumigatus* dans un piège bronchique sans que l'antigénémie ne se positive. [sérum n° 17097836]

API 5, une patiente VIH+ profondément immunodéprimée ($CD_4 = 0/mm^3$) décède très probablement d'une API. Elle était en effet connue pour avoir des antécédents d' ABPA avec une colonisation aspergillaire persistante, et a présenté un syndrome interstitiel s'aggravant de jour en jour associé à une antigénémie

aspergillaire très positive. [sérum n° 17124248, J7 après début du syndrome intersticiel]

API 6, traité pour une leucémie aigüe (LAL 2 préB) chimio-résistante par allogreffe, Mr E. développe deux GVH malgré l'utilisation de nombreux immunosuppresseurs justifiant l'utilisation de sérum antilymphocytaire. Il décèdera peu de temps après dans un tableau de défaillance multiviscérale infectieuse malgré un traitement par amphotéricine B et itraconazole relayé par SCH 56592. Une antigénémie aspergillaire positive, la présence de micronodule au scanner et l'isolement d'*A. fumigatus* dans ces crachats et sa gorge sont autant d'arguments qui permettent de suspecter une API. [sérum n° 09960220, J30 après début API]

API 7, sur un terrain de BPCO post tabagique, une pneumopathie à pneumocoque se complique d'un syndrome intersticiel pulmonaire gauche rapidement progressif associé à une sérologie aspergillaire fortement positive. Après traitement, il sera mis en évidence une truffe aspergillaire dans le sinus maxillaire droit, vraisemblablement due à une localisation secondaire par dissémination. [sérum n° 17124472, J5 de la pneumopathie]

**ANNEXE 6 : SERUMS DE PATIENTS ATTEINTS
D' ASPERGILLOSE PULMONAIRE CHRONIQUE NECROSANTE**

1) Aspergillose pulmonaire chronique nécrosante prouvée :

APCN 1, APCN apicale gauche sur séquelle de pleurectomie avec majoration relativement rapide des opacités radiologiques et des crachats hémoptoïdiques, contrôlé par itraconazole puis voriconazole. Le caractère invasif étant prouvée par l'anatomopathologie. [sérum n° 17091896 J8 après crachats]

APCN 2, sur un terrain de BPCO post-tabagique avec emphysème, développement d'un aspergillome du lobe supérieur gauche (image radiologique en grelot) aggravé par une pneumopathie nécrotique excavée du lobe supérieur droit accompagnée d'une augmentation de la sérologie aspergillaire. Malgré un traitement par itraconazole puis amphotéricine B, le patient décédera rapidement. [sérum n° 17121744]

APCN 3, sur terrain d'hémapathie maligne (LAL 1) chimiorésistante doublement allogreffée, se développe une aspergillose semi invasive évoquée au scanner (foyer initialement unique puis micro-abcès pulmonaires) malgré un traitement par itraconazole puis voriconazole. Devant cette évolution non satisfaisante, une lobectomie sera décidée et le caractère invasif de l'atteinte aspergillaire sera montré par l'anatomopathologie sur la pièce opératoire. [sérum n° 07071701 à J12 du scanner]

2) Aspergillose pulmonaire chronique nécrosante hautement probable :

APCN 4, pneumopathie excavée sur BPCO post-tabagique avec augmentation de la dyspnée et des hémoptysies jusqu'à formation, malgré un traitement par amphotéricine B et itraconazole, d'un abcès pulmonaire imposant un drainage chirurgical. [sérum n° 09923006 à J4 après le drainage]

3) Aspergillose pulmonaire chronique nécrosante fortement suspectée :

APCN 5, aspergillose évoluant rapidement mais qui sera contrôlée par un traitement antifongique, avec négativation de la sérologie et des images radiologiques. A noter que la sérologie aspergillaire du sérum disponible est négative (1 arc et 160 en AHAI). [sérum n° 17057599].

**ANNEXE 7 : SERUMS DE PATIENTS ATTEINTS
D' ASPERGILLOME**

APO 6, aspergillome pulmonaire apical droit sur séquelles de tuberculose traité par pneumothorax, avec toux, hémoptysie, aspect radiologique en grelot, sérologie très positive. Il est traité par chirurgie avec ablation d'une truffe aspergillaire de 4,5 cm de diamètre. [sérum n°17123766 à J 4 après opération, antigène aspergillaire absent]

APO 2, Mme L. présente une toux importante avec expectoration d'où est isolé *Aspergillus fumigatus*. L'aspect typique de truffe aspergillaire au scanner fait découvrir un aspergillome sur une cavité séquellaire de pneumothorax extra-pleurale. [sérum n°17124091]

APO 1, **APO 4**, **APO 5** et **APO 6** possèdent tous une image d'épaississement pleural à la radio ou de grelot au scanner, un isolement pulmonaire d'*Aspergillus* sp et une sérologie aspergillaire très positive. [sérum n°17139362, 17111500, 17114288, et 17057369]

ANNEXE 8 SERUMS DE PATIENTS ATTEINTS D'ASPERGILLOSE BRONCHO-PULMONAIRE ALLERGIQUE

ABPA 1, sur un terrain atopique (IgE globales augmentées), développement d'un asthme avec expectorations bronchiques riche en mycélium aspergillaire et en éosinophile. A la radiologie sont découverts des infiltrats labiles associés à une hyperéosinophilie sanguine et une sérologie aspergillaire très positive. [sérum n°17118275]

ABPA 2, sur un terrain asthmatique et tabagique se développe une ABPA sévère (IgE globales et spécifiques augmentées (>100 kU/l), hyper-éosinophilie, sérologie aspergillaire très positive, bronchospasmes) qui se complique secondairement d'un aspergillome pleuropulmonaire.

ABPA 3, patient hospitalisé pour l'exacerbation de son asthme (dyspnée continue avec fébricule et bronchospasme). A la radiologie pulmonaire, découverte de bronchectasies proximales associées à une hyperéosinophilie, une sérologie aspergillaire très positive et un taux d'IgE spécifiques très élevé. [A noter que le seul sérum disponible n'est pas très positif car obtenu 2 mois après l'épisode aigu d'évolution favorable]

ABPA 4, patient atteint de mucoviscidose, qui développe un asthme inquiétant avec isolement multiple d'*A. fumigatus* dans ces expectorations, une réaction cutanée immédiate positive aux antigènes aspergillaires et une élévation du taux d'IgE spécifiques.

ANNEXE 9 : SERODIAGNOSTIC DE L'ASPERGILLOSE PAR HEMAGGLUTINATION INDIRECTE FUMOUCZE*

MODE OPERATOIRE :

Les réactifs et les sérums à examiner doivent être à température ambiante.

1/ Dilution mère au 1/40 de tous les sérums à examiner : 0,05 ml du sérum à examiner dans 1,95 ml de solution tampon phosphate pH 7,2.

2/ Réaction en microplaque :

- a) ❖ A l'aide d'une micropipette automatique, distribuer 50µl de solution tampon dans 8 cupules en utilisant la plaque dans le sens de la largeur.
- b) ❖ Distribuer 50µl de la dilution mère du sérum dans la première cupule, mélanger avec le tampon et reporter, de préférence à l'aide d'un micro-diluteur (« tulipe »), 50µl de la 1^{ère} cupule dans la 2^{ème}, de la 2^{ème} dans la 3^{ème}, et ainsi de suite jusqu'à la 6^{ème} cupule, en rejetant 50µl de cette dernière cupule. On obtient donc des dilutions au 1/80 jusqu'au 1/2560.
❖ Distribuer 50µl de la dilution mère du sérum dans la 7^{ème} cupule, mélanger avec le tampon et rejeter 50µl. Cette dilution au 1/80 constitue le témoin « sérum » pour détecter les agglutinines naturelles anti-mouton de certains sérums.
- c) ❖ Agiter soigneusement les suspensions d'hématies avant utilisation. Déposer une goutte (16,66µl) d'hématies sensibilisées dans les 6 premières cupules.
❖ Déposer une goutte (16,66µl) d'hématies non sensibilisées dans la 7^{ème} cupule (témoin « sérum »).
❖ Déposer une goutte (16,66µl) d'hématies sensibilisées dans la 8^{ème} cupule (témoin « réactif »), dont le rôle est contrôler la validité du tampon et des hématies.
- d) ❖ Homogénéiser très soigneusement le contenu des cupules par tapotements latéraux sur les cotés de la plaque, posée à plat (pas d'agitateur orbital). Laisser ensuite la plaque immobile, à l'abri des vibrations pendant deux heures puis lire l'éventuelle hémagglutination.
- e) ❖ Sérums de contrôle : Un sérum positif de titre connu et un témoin négatif doit être traité comme deux sérums à examiner.

**ANNEXE 10 : TECHNIQUE D'IMMUNOELECTROPHORESE ADAPTE
SUR GEL PARAGON (Beckman*) SANS ANTISERUM REFERENCE
446070.**

1/ PROCEDURE D'ELECTROPHORESE :

- a) Préparer les échantillons et les contrôles.
- b) Remplir chaque compartiment de la cuve d'électrophorèse Paragon avec 45ml de tampon B-2 Barbitol.
- c) Retirer le gel IEP de son emballage et le placer sur une feuille de papier, le sécher délicatement avec un buvard pour gel puis jeter le buvard.
- d) Appliquer la matrice échantillon sur le gel suivant les points de positionnement sur les côtés du gel.
- e) Déposer 3 à 5µl des différents sérums et contrôles, laisser diffuser 10 minutes.
- f) Sécher délicatement la matrice de dépôt et jeter le buvard et matrice utilisée.
- g) Placer le gel sur son support et le support dans la cuve et fermer le couvercle.
- h) Sélectionner la tension de 100 volts, laisser migrer 20 minutes.
- i) Retirer le gel de la cuve, buvarder délicatement et jeter le buvard.

2/ PROCEDURE D'IMMUNODIFFUSION :

- j) Appliquer la matrice antisérum sur le gel.
- k) **Déposer 20 µl d'antigène (Bio Rad*) métabolique** (filtrats de cultures après 10 jours à 30°C) **et somatique** (broyats mycéliens de cultures jeunes à 30°C sans spores), laisser diffuser 10 minutes puis retirer la matrice.
- l) Placer le gel dans une boîte d'incubation sur un buvard imprégné d'eau désionisée. Fermer le couvercle et **laisser diffuser entre 18 et 24 heures** à température ambiante.

3/ PROCEDURE DE LAVAGE ET DE COLORATION :

- m) Retirer le gel de la boîte, le placer dans un cadre.

- n) Plonger l'ensemble dans la solution saline I pendant 10 minutes.
- o) Placer ensuite successivement sur le socle de la presse buvard, gel, buvard, buvard imbibé de solution saline et de 2 buvards secs et presser pendant 10 minutes.
- p) Mettre le gel dans un cadre et le placer dans la solution saline II pendant 10 minutes.
- q) Répéter l'étape de séchage sous presse pendant 10 minutes.
- r) Placer le gel dans l'étuve jusqu'au séchage complet.
- s) Coloration par du Bleu Paragon puis décoloration par de l'acide acétique à 5%, séchage final du gel.
- t) Interprétation du gel à l'œil nu en observant la forme et la position des arcs de précipitation.

4/ REVELATION DE L'ACTIVITE CATALASIQUE :

Pour mettre en évidence l'activité catalasique des arcs, recouvrir le gel d'une solution d'eau oxygénée à 1 V préparée extemporanément (à partir d'une solution 10 V). La présence d'arc est visualisée immédiatement par dégagement de bulles emprisonnées dans le gel au niveau de l'arc lui-même.

Laver et colorer immédiatement.

ANNEXE 11 :..ETUDE DE LA CONCENTRATION EN ANTIGENE : METHODE DE BRADFORD

PRINCIPE ET UTILISATION :

Méthode colorimétrique **simple** et **sensible** couramment utilisé pour quantifier des concentrations faibles de protéines. Ce dosage repose sur la mesure de l'absorbance à 595 nm d'une solution de bleu de Coomassie qui passe du brun-vert au bleu en se fixant aux protéines. La confrontation de la densité optique obtenue avec une gamme d'étalonnage réalisée par dilution successive d'une solution d'Albumine bovine (BSA), permet de déduire la concentration protéique.

MODE OPERATOIRE :

a) ➤ Pour préparer la gamme d'étalonnage, diluer respectivement, 2,5, 5, 10, 15 et 20 µl d'une solution mère de BSA à 1mg/l dans 50 µl de soude molaire. Réaliser en parallèle un blanc de lecture en remplaçant la BSA par 20 µl d'eau distillée.

➤ Pour préparer l'échantillon, reprendre la totalité du lyophilisat d'un flacon par 500µl d'eau distillée, puis diluer de la même façon 20 µl de cette solution d'antigène dans 50 µl de soude molaire.

b) Ajouter ensuite à chaque tube la quantité suffisante pour 1 ml de bleu de Coomassie, on agite et on laisse au moins cinq minutes.

c) L'absorbance à 595 nm doit alors être lue dans l'heure.

ANNEXE 11 bis .COLORATION AU NITRATE D'ARGENT DES PROTEINES DANS UN GEL

Le but de cette coloration, très sensible, est de révéler les bandes protéiques après migration dans un gel. Elle est réalisée à l'aide du kit SILVER STAIN TRIAL PACK AG-5.

REACTIFS ET SOLUTIONS :

- Nitrate d'argent et nitrate d'ammonium (Sigma, réf S-6028)
- Acide tungstosilique (Sigma, réf T-4791)
- Formaldéhyde (Sigma, réf F-5775)
- Carbonate de sodium (Sigma, réf S-5903)
- Solution fixatrice d'argent (Sigma, réf G-6153)
 - Méthanol.....100 ml
 - Acide acétique pur..... 20 ml
 - H₂O.....qsp 200 ml

- Solution de coloration :
 - Nitrate d'argent.....5 ml
 - Acide tungstosilique.....5 ml
 - Formaldéhyde.....5 ml
 - Carbonate de sodium..... 50 ml
 - H₂O.....35 ml

- Solution d'arrêt :
 - H₂O.....190 ml
 - Acide acétique pur10 ml

MODE OPERATOIRE :

- Placer le gel de polyacrylamide dans une cuve en plastique et le recouvrir de solution fixatrice.
- Agiter doucement pendant 30 minutes à température ambiante.
- Jeter la solution de fixation, ajouter de l'eau ultrat-pure et agiter doucement pendant 10 minutes. Recommencer cette étape une deuxième fois.
- Placer le gel dans la solution de coloration pendant 20 à 30 minutes d'incubation ou jusqu'à obtention de bande nette (grise) sans trop de bruit de fond.
- Arrêter la coloration en transférant le gel dans la solution d'arrêt et conserver ce gel dans de l'eau.

ANNEXE 12 :.MODE OPERATOIRE DE LA SEPARATION DES PROTEINES PAR ELECTROPHORESE EN CONDITION DENATURANTE

REACTIFS :

- Acrylamide (Sigma, ref A-3553)
- bis-acrylamide (N-N'-méthylène-bis-acrylamide) (Sigma, ref M-7279)
- TRIS (Sigma, ref T-6066)
- SDS (Dodécyl Sulfate de Sodium) (Serva, ref 20760)
- Persulfate d'ammonium (Sigma, ref A-3678)
- TEMED (Serva, ref 35925)
- Glycérol (Merck, ref 4094)
- Béta-mercaptoéthanol (Prolabo, ref 25 350 188)
- Bleu de bromophénol (Sigma, ref B-8026)
- Marqueur de poids moléculaire

MODE OPERATOIRE :

- Assembler le dispositif pour couler les gels (kit moni Protéane III-Biorad) en utilisant les espaceurs de 1,5 mm.
- Préparer dans un erlenmeyer le gel de séparation (selon le tableau ci-dessous). Après avoir ajouté le catalyseur et le TEMED, remuer doucement pour homogénéiser. Avec une pipette, couler immédiatement le gel entre les deux plaques, attendre 15 à 20 minutes pour que la polymérisation (gélification) soit complète.
- Préparer ensuite le gel de concentration (tableau ci-dessous), ajouter le catalyseur et le TEMED, agiter puis couler le gel entre les deux plaques au contact du premier gel. Insérer le peigne au sommet du gel de concentration et attendre 15 à 20 minutes que ce gel se polymérise, puis retirer délicatement le peigne.
- Placer le gel dans la cuve à électrophorèse puis la remplir avec du tampon d'électrophorèse 1 X SDS (Solution 8) jusqu'à immersion complète.
- Préparer des dilutions d'échantillons avec le tampon échantillon 2 X SDS (Solution 7) afin de déposer ultérieurement **20 à 40 µg de protéines dans chaque puit**. Porter ces dilutions d'échantillon à 100°C pendant 3 à 5 minutes puis déposer avec précaution

15 µl d'extrait protéique dans chacun des puits échantillons alors que les deux puits d'extrémités sont destinés à recevoir 5µl de marqueur de poids moléculaire.

- Faire migrer les échantillons sous un courant continu de 60 volts jusqu'à la fin du gel de concentration (la migration étant visualisée en suivant l'avancement du marqueur de taille colorée en bleue) puis passer à 100 volts jusqu'à la fin du gel de séparation (environ 1 à 2 heures).

COMPOSITION DES SOLUTIONS :

➤ Solution 1 : Solution d'acrylamide : 30% acrylamide/ 0,8% bisacrylamide qui doit être conservée à 4°C et à l'obscurité.

Acrylamide.....58,4 g
Bisacrylamide.....1,6 g
H₂O.....qsp 200 ml

➤ Solution 2 : Solution pour gel de séparation : Tris-HCl 4X, pH=8,8
(1,5 M Tris-HCl)

Tris36,3 g
H₂O.....qsp 200 ml
Ajuster le pH à 8,8 avec du HCl

➤ Solution 3 : Solution pour gel de concentration : Tris-HCl 4X, pH=6,8 (0,5 M Tris-HCl)

Tris.....3,0 g
H₂O.....qsp 50 ml
Ajuster le pH à 8,8 avec du HCl

➤ Solution 4 Solution à 10% en SDS

SDS.....50 g
H₂O.....qsp 500 ml

➤ Solution 5 : Solution catalyseur

Persulfate d'ammonium.....0,5 g
H₂O.....qsp 5 ml

➤ Solution 6 : Solution de bleu de bromophénol à 0,5%

Bleu de bromophénol.....50 mg
H₂O.....qsp 10 ml

➤ **Solution 7** : Tampon de traitement échantillon SDS concentré 2X (0,125 M Tris-HCl pH 6,8, 4% SDS, 10% glycérol, 10% 2-mercaptoéthanol, 0,5% bleu de bromophénol)

Trisma base pH 6,8.....2,5 ml
 SDS 10%4 ml
 Glycérol.....1 ml
 2-mercaptoéthanol.....1 ml
 Bleu de bromophénol 0,5%1 ml
 H₂O.....qsp 10 ml

➤ **Solution 8** : Tampon d'électrophorèse

Trisma base.....3 g
 Glycine.....14,4 g
 SDS 10%10 ml
 H₂O.....qsp 10 ml

PREPARATION ET COMPOSITION DES GELS :

Si gel à 10% ?:

	Gel à 10% d'acrylamide	
Solutions	Gel de séparation	Gel de concentration
Solution 1	10 ml	1,33 ml
Solution 2	7,5 ml	X
Solution 3	X	2,5 ml
Solution 4	0,3 ml	0,1 ml
H ₂ O	12 ml	6 ml
	A g i t e r	
Solution 5	330 µl	100 µL
TEMED	30 µl	10 µl

COMPOSITION DU MARQUEUR DE POIDS MOLECULAIRE, (Sigma Chemical Co) II est constitué de six protéines :

L'anhydrase carbonique (29 kDa), l'ovalbumine (45 kDa), l'albumine bovine (66 kDa), une phosphorylase (97 kDa), une bêta galactosidase d'E. coli (116 kDa) et enfin, de la myosine de lapin (205kDa).

ANNEXE 13 : ELECTRO-TRANSFERT DE PROTEINES

Le but de cette manipulation, encore appelée « blotting » ?, est de transférer les protéines ayant migrées dans un gel sur une membrane de nitrocellulose qui pourra être incubée avec des sérums puis conservée.

REACTIFS ET SOLUTIONS :

- TRI ZMA Base (TRI S) (Sigma, réf T-6066)
- Glycine (Sigma, réf G-8898)
- Méthanol

- Tampon de transfert :

TRI S.....	5,8 g
Glycine.....	2,9 g
Méthanol.....	200 ml
H ₂ O.....	qsp 1 litre

⇒ Ajouter 7,5 ml de SDS 10% à 1,5 ml de tampon de transfert juste avant utilisation.

MODE OPERATOIRE :

- Lorsque l'électrophorèse des protéines est terminée, récupérer le gel prisonnier dans les deux plaques de verre et l'immerger dans du tampon de transfert pendant 15 minutes.
- Monter le gel en sandwich dans une cassette et remplir la cuve de tampon de transfert de manière à recouvrir celle-ci. Placer la cassette dans l'appareil à électrotransfert en orientant le gel face à la cathode.
- Laisser transférer pendant 45 minutes à 100 volts.

ANNEXE 14 : REVELATION DES BANDELETTES DE NITROCELLULOSE PAR IMMUNO-EMPREINTE = WESTERN BLOT

Cette manipulation permet d'identifier (et de semi-quantifier) différentes protéines immunogènes pour lequel il existe des anticorps spécifiques in vivo. La révélation de ces anticorps se fait par l'utilisation d'anticorps (anti-anticorps) conjugués à une enzyme.

REACTIFS ET SOLUTIONS :

- Tampon Tris-HCl à pH=7,5
- Tampon TS (Tris 10 mM, NaCl 0,9%) ajusté à pH=7,5 par de l'HCl.
 - Tris.....1,2 g
 - NaCl.....9,0 g
 - H₂O.....qsp 1 litre

- Tampon TST (tampon Tris-HCl, 0,05% Tween, pH=7,5) = tampon de lavage????
 - Tween 20.....500 ml
 - Tampon TS.....1000 ml

- Tampon de saturation (TST-lait 5%) = tampon échantillon.
 - Lait déshydraté écrémé.....5 g
 - Tampon TST.....100 ml

MODE OPERATOIRE :

- A la fin de l'électrotransfert, immerger les membranes dans le tampon de saturation et incuber toute une nuit à 4°C.
- Laver les membranes par du tampon Tris-HCl
- Diluer l'anticorps primaire dans du tampon TST-lait 5%, incuber toute la nuit (18 heures) à 4°C.
- Réaliser trois lavages successifs de 5 minutes chacun dans du tampon TST puis diluer l'anticorps secondaire au 2000^{ème} et incuber 2 heures à température ambiante.

ANNEXE 15 : COMPOSITION DES MILIEUX DE CULTURE.

MILIEU PC (Pomme de terre - Carotte) :

Réactifs :

- Pulpe de carotte.....	20 g
- Pulpe de pomme de terre.....	20 g
- Agar.....	20 g
- Eau distillée.....	1000 ml

Technique :

- Eplucher et râper carottes et pommes de terre en spirale, faire macérer 20 g de chaque pulpe dans 750 ml d'eau distillée pendant 1 heure puis porter à ébullition pendant 5 minutes.
- Après avoir filtré sur une gaze, ajouter l'agar à ce filtrat, porter à ébullition pour solubiliser l'agar et compléter avec la quantité suffisante pour 1000 ml d'eau distillée. Ajuster le pH après autoclave à 5,6 (+ ou - 0,2)

MILIEU AU MALT ou A L'EXTRAIT DE MALT :

Réactifs :

- Extrait de malt.....	20 g
- Agar.....	20 g
- Eau distillée.....	1000 ml

Technique :

- Additionner les différents réactifs à l'eau distillée, mélanger et porter à ébullition 1 à 2 minutes puis diminuer la température à 50-55°C et ajuster la pH, après autoclave, à 7 (+ou - 0,2) qui est l'optimum des filamenteux (contre 6,2 à 6,5 pour les levures)..

MILIEU PDA :

Réactifs :

- Potatoes Dextrose Agar (Difco 0013-15-8).....	39 g
- Eau distillée.....	1000ml

Technique :

- Additionner les différents réactifs à l'eau distillée, mélanger et porter à ébullition 1 à 2 minutes puis diminuer la température à 50-55°C et ajuster la pH, après autoclave, à 5,6 (+ou - 0,2).

Mode opératoire : Commun aux trois milieux.

- Le **conditionnement** et la **stérilisation** sont identique à savoir : répartition de 80 ml dans des flacons de 125 ml, puis autoclaver 20 minutes à 120°C, identifier et dater les milieux (date de péremption de 2 ans après la fabrication) puis les stocker au congélateur à -20°C.

- De même, à partir des milieux congelés, la **répartition** en tube ou en boîte de pétri est identique pour les trois milieux: placer un flacon de milieu dans une casserole d'eau et faire bouillir. Lorsque le milieu est bien régénéré, le mettre au bain marie à 50°C puis répartir stérilement 6 ml par tube à bouchon à vis, (incliner immédiatement pour obtenir une pente) ou 10 ml ? par boîte de pétri. Identifier et dater (date de péremption 3 mois après la répartition) puis stocker à +4°C. Enfin contrôler la stérilité en plaçant ces milieux 48 heures à 37°C.

NB : Le milieu de Sabouraud que l'on a utilisé est un milieu commercialisé.

Nom – Prénom : GENTILHOMME Hervé

Titre de la Thèse : La pénicilliose à *Penicillium marneffe* : Mise au point et évaluation d'une approche de diagnostic sérologique.

Résumé de la Thèse : La pénicilliose à *P. marneffe* est une mycose émergente chez le VIH+ dans le Sud-est asiatique. Quelques cas importés ont été décrits. Notre travail expose la mise au point d'une stratégie de diagnostic comportant une technique ELISA de dépistage et un western blot de confirmation. L'utilisation d'un antigène métabolique de *P. marneffe* confère au test ELISA, une sensibilité et une spécificité élevée ainsi qu'un pouvoir discriminant au western blot. Ce dernier montre que certaines bandes ont une valeur prédictive importante. L'ELISA a été évaluée de façon prospective à l'Institut d'Hygiène et d'Epidémiologie de Hanoï. Un cas immunologiquement suspecté a été confirmé secondairement par une culture positive, permettant le diagnostic du premier cas de pénicilliose au Vietnam.

MOTS CLES :

Sérodiagnostic/ pénicilliose / *Penicillium marneffe* / ELISA / Western Blot / spécificité / diagnostic mycologique.

JURY

PRESIDENT :

Mme le professeur B.M. IMBERT, Laboratoire de Virologie- Nantes.

ASSESEURS :

Mr le Docteur P. LE PAPE, Laboratoire de Parasitologie-Nantes.

Mr le Professeur D. CHABASSE, Laboratoire de Parasitologie-Angers.

Mr le Professeur F. RAFFI, Médecine Interne B-Nantes.

Mr le Docteur M. MIEGEVILLE, Laboratoire de Parasitologie-Nantes

Adresse de l'auteur :

6 bis Cité Kerloët 56500 LOCMINE

