

UTILISATION DU MICROSPRAYER IA-1B® DANS LE MODÈLE MURIN D'ASPERGILLOSE PULMONAIRE INVASIVE

Les Aspergilloses sont des affections opportunistes, atteignant l'homme et parfois les animaux et provoquées par des *Aspergillus*, champignons filamenteux cosmopolites, fréquents dans le milieu extérieur (air, sol, fruits et légumes moisissés, et les matières organiques en décomposition). Le genre *Aspergillus*, comprend environ trois cent espèces dont *Aspergillus fumigatus*, espèce responsable de 80 à 90% des infections humaines, parmi lesquelles l'Aspergilliose Pulmonaire Invasive (API). En effet, la dissémination du champignon est assurée par des spores produites en grande abondance par les têtes aspergillaires, et dont la taille suffisamment petite (2 à 3 µm de diamètre) fait de la voie aérienne la principale voie de pénétration chez l'homme. L'appareil respiratoire est donc le plus fréquemment concerné. Toutefois, lorsque les voies respiratoires sont intactes, l'action de l'épithélium cilié, la sécrétion de mucus, la phagocytose par les macrophages alvéolaires et les polynucléaires neutrophiles rendent les affections aspergillaires rares, même si l'inhalation des spores est régulière. Les *Aspergillus* ne provoquent des lésions chez l'homme que s'ils rencontrent des conditions favorables à leur implantation, locales : cavités préformées, abcès pulmonaires détergés, muqueuse altérée, etc.; ou générales : immunosuppression liée aux techniques médicochirurgicales lourdes, greffe, immunosuppresseur, corticoïdes, antibiotiques, etc.). Le terrain joue donc un rôle essentiel dans le déterminisme des infections aspergillaires et caractérise leur gravité. Les formes les plus graves surviennent chez les patients les plus immunodéprimés (Chabasse et al., 1999 ; Deming, 1996).

L'aspergilliose pulmonaire invasive est donc une affection essentiellement opportuniste rencontrée chez les patients immunodéprimés. Encore actuellement, le retard et les difficultés de diagnostic sont en grande partie responsables du pronostic péjoratif de l'aspergilliose pulmonaire invasive chez l'immunodéprimé. Les moyens de diagnostic les plus récents (imagerie tomodensitométrique, antigène aspergillaire ou polymérase chain reaction) ont certes grandement amélioré la démarche diagnostique mais restent encore insuffisants, principalement en terme de spécificité (Caillot et al., 2001). C'est donc essentiellement dans le but non seulement d'explorer de nouvelles méthodes efficaces et rapides de diagnostic mais surtout d'améliorer le pronostic de cette redoutable affection que nous sommes associés au

travail déjà amorcé dans le Service de Parasitologie Mycologie – Médecine Tropicale de la Faculté de Médecine de l'Université de Tours.

Au cours de ces dernières années, a en effet été mis en place dans cette unité un modèle API utilisant le rat Sprague-Dawley immunodéprimé visant à développer par la suite des techniques d'imagerie appliquées à ce modèle (Becker et al., 2002). Des résultats intéressants reproduisant les caractéristiques de la maladie humaine ont été obtenus avec des infestations par inhalation passive de spores ou des trachéotomies (Marques, 2004). L'absence de reproductibilité pour la première méthode et la lourdeur de la seconde ont conduit le responsable du programme à se tourner vers un nouveau mode d'infestation : la réalisation en intra pulmonaire, d'un aérosol de spores d' *Aspergillus fumigatus*.

L'objectif de notre travail a donc été de tester la possibilité de provoquer une aspergillose pulmonaire invasive chez le rat immunodéprimé à l'aide du Microsprayer IA-1B[®], appareil capable de réaliser cet aérosol. Ce protocole a reçu l'agrément du comité régional d'éthique pour l'expérimentation animale Centre-Limousin (UNI 37-005).

les deux dernière décennies ont vu la croissance de l'incidence de l'infection invasive due aux espèces *Aspergillus*, particulièrement *Aspergillus fumigatus* (Groll et al., 1996). Malgré le développement de nouveaux antifongiques, le taux de mortalité due à l'aspergillose pulmonaire invasive reste d'au moins 50%, d'où la nécessité urgente d'effectuer des recherches poussées au sujet de cette maladie et la mise au point de nouvelles méthodes diagnostic pour réduire la mortalité due à l'aspergillose. Un modèle reproduisant cette pathologie humaine serait un outil majeur pour l'exploration de nouvelles méthodes de prévention, de diagnostic et de traitement de cette maladie (Latge, 1999).

Plusieurs initiatives ont été entreprises à Tours ces dernières années en vue de mettre au point un modèle par différentes manières d'infestation, surtout en se basant sur le modèle de Leenders et al., (1999), mais en apportant quelques modifications (Marques, 2004).

Le protocole qui a fait l'objet de notre travail suggère les commentaires suivants :

Comme les précédents, la mise en condition des rats avant l'infestation utilise une alimentation hypoprotéinée à 8% de protéine (la ration est habituellement de 15 à 20%), afin d'augmenter l'immunosuppression des animaux comme recommandé par Schmitt et al., (1998). La courbe des résultats, montre combien cette alimentation amaigrit les animaux des groupes 3 et 4, les rendant probablement plus sensibles à l'infection comme cela est à présent bien connu en médecine humaine (Viard et Zylberberg, 1996). Nous voyons cependant que tout ceci reste insuffisant pour que les rats se contaminent spontanément par l'*Aspergillus* contenu dans l'air puisque même après l'injection intratrachéale de spores, un seul rat du groupe 3 n'a en fin de compte développé l'affection. Pour ce qui est de l'antibiotique contenu dans l'eau de boisson afin de prévenir des infections bactériennes chez les animaux immunodéprimés, le Ciflox[®] est utilisé, non seulement parce qu'il s'agit d'un antibiotique à large spectre d'activité, efficace contre les germes pulmonaires, mais également parce que, contrairement à certaines pénicillines comme le Clamoxyl[®], il n'entraîne pas de réactions croisées avec la recherche d'antigènes circulants aspergillaires (Sulahian et al., 2001). Ceci est confirmé par nos résultats puisque cette recherche est restée négative chez les rats dont les poumons n'ont pas été trouvés infestés. Enfin, l'utilisation tout au long de notre manipulation d'un analgésique pour les animaux afin de limiter les éventuelles douleurs dues au traumatisme que ces derniers pourraient subir lors des expérimentations est fortement recommandée par le Comité Régional d'Éthique pour l'Expérimentation Animale auprès de qui a été obtenu l'autorisation de mettre en route un tel protocole.

Pour la première fois par rapport aux autres expériences, nous avons utilisé des spores filtrées dans la préparation de l'inoculum. Cette technique est certes un peu plus laborieuse que la technique classique, mais elle permet d'une part de purifier l'inoculum, et d'autre part de ne pas risquer de boucher l'orifice du microsyringe avec des amas de filaments ou des petits morceaux de gélose Sabouraud qui auraient pu se détacher de la culture. Toutes les infestations par ce mode opératoire se sont bien déroulées, sans aucun problème d'obstruction de l'appareil. Cette technique d'infestation des animaux par aérosol que nous avons testé également ici pour la première fois nous a donné toute satisfaction. Avec la technique chirurgicale classique utilisée dans le groupe 3, nous avons eu à déplorer la mort d'un animal lors de l'opération chirurgicale, et un seul des quatre animaux restant n'a développé une aspergillose pulmonaire. Au contraire, en utilisant pour tout le groupe 4 le Microsyringe IA-1B et le plan mobile en plexiglas, le temps d'anesthésie est raccourci et la manipulation est moins traumatique, conduisant de plus à 100% de réussite d'infestation à J9.

Nous pouvons affirmer ce taux de réussite des infestations par aérosol en nous basant sur les deux moyens de diagnostic disponible actuellement pour le diagnostic de l'aspergillose pulmonaire invasive, et que nous avons utilisé en parallèle : la recherche d'antigène circulant et l'histologie (Caillot et al., 2001). Aucune discordance n'est trouvée entre ces deux techniques : tous les rats positifs en recherche d'antigènes circulants sont positifs à l'histologie et l'inverse est également vrai. Par contre, différents éléments de l'évolution chronologique des dosages d'antigènes conduisent à se poser des questions / il est en effet étonnant de constater que des résultats positifs soient observés chez les rats E11 et E12 dès le lendemain de l'inoculation, ce qui paraît tôt pour un contact entre le champignon et le sang. Cependant, ceux deux animaux sont ceux qui ont développé la maladie clinique et histologique la plus importante. Il ne s'agit donc pas d'un faux positif et l'on peut penser que, soit ils étaient dans un état immunodéprimé que les autres, soit une effraction des tissus lors des manipulations a pu favoriser la diffusion et l'installation du champignon. L'évolution des antigènes chez le rat E13 est également particulière : faiblement positif jusqu'à J6, il devient très positif entre J6 et J9, signant l'infection, mais les lésions histologiques restent très minimes. Même si cela reste difficilement explicable dans l'état actuel de nos connaissances, ceci confirme que ces lésions minimes, probablement difficilement visibles à la radiographie pulmonaire, peuvent déjà être suspectées par la recherche d'antigènes circulants. La précocité connue de cet examen biologique souffre encore cependant, rappelons-le d'un défaut de spécificité (Sulahian et al., 2001).