



الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
RÉPUBLIQUE ALGÉRIENNE DÉMOCRATIQUE ET POPULAIRE

وزارة التعليم العالي و البحث العلمي
MINISTÈRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPÉRIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE



Université des Frères Mentouri Constantine 1
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie

جامعة الإخوة منتوري قسنطينة
كلية علوم الطبيعة و الحياة

Département: Microbiologie

قسم الميكروبيولوجيا

Mémoire présenté en vue de l'obtention du Diplôme de Master

Domaine: Sciences de la Nature et de la Vie

Filière : Biotechnologie

Spécialité : Mycologie et Biotechnologie Fongique

Intitulé :

Revue bibliographique sur les techniques diagnostiques des aspergilloses invasives

Présenté et soutenu par :

Le : 09/09/2021

TENAH Amira et HAYOUN Aicha

Jury d'évaluation:

Président du jury : M^{me} ALATOU Radia (Professeure - UFM Constantine 1).
Rapporteur : M^{me} MIHOUBI Ilhem (Professeure - UFM Constantine 1).
Examinatrice : M^{me} GHORRI Sana (MCB - UFM Constantine 1).

***Année universitaire
2020 – 2021***



Remerciements



Tout d'abord nous remercions le bon **DIEU**
tout puissant pour nous avoir accordé santé, la patience, la force, le
courage, la volonté pour achever et compléter ce modeste travail de fin d'études
de master malgré toutes les difficultés.

Nous remercions énormément notre encadreur Professeur **MIHOUBI Ilhem**
pour la confiance qu'elle nous a témoignée, pour votre disponibilité permanente
avec nous et votre soutien, ainsi que pour votre aide vos précieux conseils et vos
orientations et remarques qui nous a permis de réussir notre travail. Nous
sommes très honorés de travailler avec vous.

Nous tenons à remercier Docteur **ALATOU Radia** qui nous a fait l'honneur de
présider le jury de cette soutenance.

Nous tenons à remercier Docteur **GHORRI Sana** qui a généreusement accepté
d'examiner notre travail.

Nous remercions tous ceux qui ont consacré une grande partie de leur temps
pour nous aider et nous encourager.

Enfin, nous adressons nos remerciements à tous nos proches et particulièrement
nos **chers parents** pour leur contribution, leur soutien, leur amour et leur
patience, durant toutes nos années d'étude.

A tout nous disons Merci.

Dédicaces



C'est avec un grand plaisir et une immense fierté et joie que

Je dédie ce mémoire à...

Mes chers parents " MOUHAMED et SAMIA " je tiens à vous remercier pour vos prières m'ont été d'un grand soutien au cours de ce long parcours. J'espère de tout mon cœur qu'en ce jour vous êtes fières de moi, et que je réalise l'un de vos rêves.

💖 Ma chère mère,

Nul mot ne parviendra jamais à exprimer l'amour que je te porte. Ton amour, ta patience, ton encouragement ont été pour moi le gage de la réussite. J'espère que ce travail soit à tes yeux le fruit de tes efforts et un témoignage de ma profonde affection. Qu'ALLAH te bénisse et t'alloue bonne santé, bonheur et longue vie afin que je puisse à mon tour te combler. Quoi que je fasse, je ne pourrais te rendre ce que tu as fait pour moi. Maman je t'aime.

❤️ Mon cher père,

Qui est toujours disponible pour nous, et prêt à nous aider, je lui confirme mon attachement et mon profond respect Vous êtes pour moi un sujet de fierté. Papa je t'aime.

Ma sœur unique " MALAK", 💖

qui est toujours là pour me soutenir, Je te souhaite toute la réussite et le bonheur que tu mérites. Bon courage pour ces années à venir.

💙 Mes frères "SOFIAN, HOUSSEM, RAID" que Dieu les protègent et les préservent.

💚 Mes cousines, en particulier à Dounia, Khadidja, Ikram pour vos encouragements.

Mes oncles, mes tantes et toutes paternels et maternels et leurs enfants.

A tout la famille, TENAH et CHOUFI. 💜

💜 Ma chère amie, mon binôme AICHA Avec qui j'ai passé 5 superbes années, nous avons été très soudées, j'espère que cette entente perdure, Et a tout que j'aime de ma promotion master Mycologie et Biotechnologie Fongique 2020-2021.

Mes chères amies. En particulier à Halla et Chahinez , Bouchra, Hana merci pour les plus beaux moments qu'on a vécu ensemble, je vous aime très fort. 💙

Et toute personne qui me connaît de près ou de loin.

AMIRA 💜



Dédicaces

Quels que soient les termes embrassés, je n'arriverais jamais à leur exprimer
mon amour et la gratitude sincère

Je dédie ce modeste travail à :

Ma chère maman que j'adore **Chafia**

qui m'a soutenu et encouragé durant ces années d'études. la lumière de mes
jours, la source de mes efforts, Qui n'a épargné aucun effort pour me rendre
heureuse . Ma vie ne serait pas pareille sans toi et j'espère que tu continueras à
guider mes pas pour longtemps mon adorable mère.

Mon chère père **Mohamed Salah**

Mon précieux offre du dieu, qui doit ma vie, ma réussite et tout mon respect
vous avez toujours été mon école de patience, de confiance et surtout d'espoir et
d'amour. J'implore Dieu, tout puissant, de vous accorder une bonne santé, une
longue vie et beaucoup de bonheur

Ma grand-mère **Zoubeida** pour toute l'affection qu'elle m'a donnée et pour son
précieux encouragement.

Ma chère soeur **Fatima Zohra** et mes chers frères **Nassredine** et **mohamed
Cherif** qui n'ont pas cessés de me conseiller, encourager et soutenir tout au
long de mes études. que Dieu les protèges et leurs offre la chance et le bonheur.

Mon adorable petite sœur **Rayane** qui sait toujours comment procurer la joie
et le bonheur pour toute la famille.

Toute ma famille. Que Dieu leur donne une longue et joyeuse vie.
mes amis que j'ai connu jusqu'à maintenant. Merci pour leurs amours et leurs
encouragements.

Sans oublier ma copine ,ma collègue , mon binôme **Amira** pour son soutien
moral, sa patience et sa compréhension tout au long de ce travail.

Aicha

Liste des abréviations

ABPA	: Aspergillose broncho-pulmonaire allergique.
AC	: Anticorps.
ADN	: acide désoxyribonucléique.
Ag	: Antigène.
AI	: Aspergillose invasive.
AP	: Aspergillose pulmonaire.
API	: Aspergillose pulmonaire invasive.
Aw	: Activity Water.
BCPO	: Broncho-pneumopathie chronique obstructive.
BG	: β -(1,3)-D-glucane.
DMSO	: Diméthylsulfoxyde.
dNTP	: Désoxyribonucléoside triphosphate .
EDTA	: Ethylenediaminetetraacetic acid.
ELISA	: Enzyme linked immunosorbent assay .
ELS	: Eléctrosynérèse.
EPA	: Eau pure pour analyse .
GM	: Galactomannane.
HES	: Hématéine-éosine-safran.
IDD	: Immunodiffusion double.
IEP	: Immunoélectrophorèse.
LBA	: Lavage broncho-alvéolaire.
LCR	: Liquide céphalo-rachidien.
MGG	: May-Grünwald-Giemsa.
ng	: Nanogramme
PAS	: Acide périodique de Schiff.

pb : Paire de base.

PCR : Polymerase Chain Reaction.

pg : Picogramme.

SIDA : Syndrome de l'immunodéficience acquise.

VIH : Virus de l'immunodéficience humaine.

Liste des Figures

Figure 1 :	Représentation de l'appareil reproducteur des <i>Aspergillus</i> spp.....	3
Figure 2 :	Cycle sexué et asexué du genre <i>Aspergillus</i>	6
Figure 3 :	Aspects macroscopiques de colonies d' <i>Aspergillus fumigatus</i>	10
Figure 4 :	Tête aspergillaire d' <i>Aspergillus fumigatus</i>	11
Figure 5 :	contamination aérienne par les spores aspergillaires	14
Figure 6 :	Mode de contamination (inhalation des spores)	14
Figure 7 :	Représentation des affections attribuées aux espèces du genre <i>Aspergillus</i> en fonction de la réponse immunitaire de l'hôte.....	17
Figure 8 :	Truffe aspergillaire dans une cavité séquelle de tuberculose.....	18
Figure 9 :	Truffe aspergillaire observée après exérèse de la lésion.....	19
Figure 10 :	Aspect macroscopique d'une aspergillose oculaire.....	20
Figure 11 :	Aspect macroscopique d'une otomycose aspergillaire.....	20
Figure 12 :	Atteinte sous unguéale distale aspergillaire	21
Figure 13 :	lésion cutanée d'une aspergillose disséminée.....	22
Figure 14 :	Répartition régionale des Infections fongiques invasives en France Métropolitaine, 2001-2010.....	24
Figure 15 :	Aspergillose Invasive disséminée : tomodensitométrie cérébrale montrant plusieurs abcès	27
Figure 16 :	Aspergillose invasive disséminée : nombreuses lésions macroscopiques rénales sous forme de plages hémorragiques et nécrotique.....	28
Figure 17 :	Endocardite aspergillaire	29
Figure 18 :	<i>Aspergillus fumigatus</i> grandissant et sporulant dans une brûlure sur un garçon de 7 ans avec 50% de brûlures sur toute l'épaisseur	29
Figure 19:	Aspects mycologiques d'un examen direct positif	33
Figure 20 :	(a) : <i>A.fumigatus</i> sur milieu au Malt ;(b) Tête aspergillaire d' <i>A.fumigatus</i> à l'examen microscopique	36
Figure 21 :	Principe de la méthode d'IDD.....	37
Figure 22 :	Résultat positif se manifestant par un arc de précipitation.....	39

Figure 23 :	Principe d'électrosynérèse.....	39
Figure 24 :	Principe de l'IEP.....	41
Figure 25 :	Contenu du kit Fungitell®	43
Figure 26 :	Structure du galactomannane (GM)	45
Figure 27 :	Principe du test au latex et test ELISA	46
Figure 28 :	principe de la PCR	48
Figure 29 :	Aspect de l'Aspergillus dans des sections de tissus: coloration de Gomori -grocott en haut et à l'HES en bas	52

Liste des Tableaux

Tableau 1 :	Aspects macroscopiques et microscopiques des principales espèces d' <i>Aspergillus</i>	09
Tableau 2 :	Infections fongiques invasives en France métropolitaine ,2001-2010 : cas et décès par type d'infection.....	25
Tableau 3 :	Différents Types des prélèvements profonds selon la localisation des mycoses.....	31
Tableau 4 :	Principaux caractères macroscopiques et microscopiques des <i>Aspergillus</i> responsables des aspergilloses invasives	35

TABLE DES MATIERES

Liste des tableaux

Liste des figures

Liste des abréviations

INTRODUCTION 1

Première partie : Etude bibliographique

Chapitre 1 : Aspergillus

I.1. Généralités	3
I.2. Taxonomie du genre <i>Aspergillus</i>	4
I.3. Description morphologique	5
I.3.1. Morphologie macroscopique	5
I.3.2. Morphologie microscopique.....	5
I.4. Croissance et cycle fongique	5
I.5. Les principales espèces retrouvées en pathologie humaine.....	6
I.5.1. Caractéristiques des espèces responsables des aspergilloses invasives	8
I.5.2. Cas de l'espèce <i>Aspergillus fumigatus</i>	10
I.5.2.1. Caractéristiques macroscopiques	10
I.5.2.2. Caractéristiques microscopiques.....	11
I.5.2.3. Ecologie	11

Chapitre 2 : Physiopathologies

II.1. Réservoirs.....	13
II.2. Mode de contamination	13
II.3. Facteurs de virulence d' <i>Aspergillus fumigatus</i>	15

Chapitre 3: Aspergillose Invasives

III. 1. Les aspergilloses	16
III.1.1. Définition	16
III.1.2. Différent Types d'aspergilloses	16
III.1.2.1. Aspergilloses profondes	17
III.1.2.1.1. L'aspergillose broncho-pulmonaire allergique	17
III.1.2.1.2. Aspergillome	18
III.1.2.1.3. La sinusite aspergillaire	19

III.1.2.2. Aspergilloses superficielles	19
III.1.2.2.1. L'aspergillose oculaire	19
III.1.2.2.2 L'aspergillose de l'oreille ou otomycose	20
III.1.2.2.3. Onyxis aspergillaire	21
III.1.2.2.4. L'aspergillose cutanée	21
III.2. Aspergilloses invasives	23
III.2.1. Définition	23
III.2.2. Epidémiologie	23
III.2.3. Formes cliniques des aspergilloses invasives	25
III.2.3.1. Aspergillose invasive pulmonaire	25
III.2.3.2. Trachéobronchite	26
III.2.3.3. Sinusite aspergillaire invasive	26
III.2.3.4. L'aspergillose disséminée	26
III.2.3.4.1. L'atteinte cérébrales	27
III. 2.3.4.2. L'atteinte rénale	27
III. 2.3.4.3. Le tube digestif	28
III. 2.3.4.4. L'atteinte cardiaque	28
III.2.3.4.5. L'atteinte cutanée	29

Deuxième partie: Etude expérimentale


VI. 1. Diagnostic mycologique direct	31
VI.1.1. Prélèvements	31
VI.1.2 Examen direct	32
VI.1.3. Culture	33
VI.1.4. Identification de l'espèce	34
VI.1.4.1. Aspect macroscopique	34
VI.1.4.2. Aspect microscopique	35
VI.2. Diagnostic indirect	36
VI.2.1. Détection des anticorps circulants	36
VI.2.1.1. Technique d'Ouchterlony	37
VI.2.1.1.1 Protocole expérimental	37
VI.2.1.2. L'électrosynérèse	39
VI.2.1.2.1. Protocole expérimental	39
VI.2.1.3 Immunoélectrophorèse	40

VI.2.1.3.1. Protocole expérimental	41
VI.2.2. Détection d'antigènes circulants	42
VI.2.2.1. β -(1,3)-D-glucane	42
VI.2.2.1.1. Protocole expérimental	43
VI.2.2.2. Galactomannane	45
VI.2.2.2.1. Protocole expérimental d'ELISA Platelia® Aspergillus	46
VI.3. Diagnostic moléculaire	47
VI.3.1. Protocole expérimental.....	49
VI.3.1.1. Mise en culture de la souche	49
VI.3.1.2. Extraction de l'ADN fongique	49
VI.3.1.2.1. Lyse du mycélium.....	49
VI.3.1.3. Polymerase Chain Reaction.....	50
VI.3.1.3.1. Conditions d'amplification	50
VI.3.1.3.2. Préparation du milieu réactionnel.....	50
VI.3.1.3.3. Le cycle thermique	50
VI.3.1.3.4. Révélation sur gel d'agarose.....	50
VI.4. Diagnostic anatomo-pathologique.....	51
CONCLUSION.....	53
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	54

Résumé



Introduction



Les mycoses sont des infections causées par des champignons microscopiques (levures, dermatophytes et moisissures) appelés aussi micromycètes. Parmi quelques 100.000 espèces connues aujourd'hui, plusieurs centaines sont potentiellement pathogènes pour l'homme (Dokkari et Rekhoun ,2018). Elles peuvent être de localisations superficielles (peau et phanères) ou toucher certains organes après dissémination hémotogène et envahissement de tissus plus profonds (Sadoudi et Saidi, 2018) ; on parle alors d'Infections Fongiques Invasives (mycoses profondes).

Dans les mycoses profondes, différents genres sont impliqués parmi lesquels le genre *Aspergillus*, concerné par notre étude. Les champignons de ce genre se développent par un système de filaments appelé aussi hyphes ; ils forment ensuite des spores qui sont disséminés dans l'environnement.

L'espèce la plus fréquemment incriminée dans les infections aspergillaires humaines est *Aspergillus fumigatus* (80 à 90 % des cas). Les autres espèces : *A. flavus* est identifié dans environ 10 % des cas et *A. nidulans*, *A. niger*, *A. terreus* sont assez fréquemment retrouvés, ils regroupent à eux trois environ 10 % des cas. Ces champignons sont à l'origine d'aspergilloses (Raynard, 2018).

L'aspergillose est une infection fongique, souvent non contagieuse, cosmopolites essentiellement opportunistes, pouvant se présenter sous différentes formes. Parmi elles nous pouvons citer l'aspergillome qui est une colonisation des cavités pulmonaires préexistantes, L'aspergillose invasive qui est la forme la plus grave des aspergilloses car souvent mortelle, l'aspergillose broncho-pulmonaire allergique induisant des réactions d'hypersensibilité et affectant principalement des patients asthmatiques ou porteurs d'une mucoviscidose, les sinusites aspergillaires qui sont des atteintes des sinus par les espèces du genre *Aspergillus* et les maladies superficielles touchants les ongles (onychomycose), la peau (aspergillose cutanée), les yeux (aspergillose oculaire) et les oreilles (otomycose). Contrairement aux autres formes citées, ces dernières sont non dangereuses pour l'être humain et se soignent facilement par administration des antifongiques (Abdelhadi et Boukhroufa, 2011).

Aspergillus fumigatus, est un champignon filamenteux ubiquitaire dans l'environnement (Dominique ,1999). La porte d'entrée est essentiellement aérienne, plus rarement cutanée ou digestive. L'inhalation des spores peut entraîner des réactions d'hypersensibilité responsables d'asthme, d'alvéolites allergiques, etc... (Germaud et *al.*, 2001) Les spores inhalées sont habituellement éliminées, d'une part, par l'action du tapis

mucociliaire et d'autre part par les macrophages, les filaments mycéliens et les polynucléaires neutrophiles (Ketfi et *al.* 2015). Ce micromycète qui pénètre par les voies respiratoires capables de provoquer sévèrement chez les immunodéprimés et chez des patients souffrant d'hémopathies malignes (Loeffert et *al.*, 2016) une infection gravissime : l'aspergillose invasive (AI) qui envahit le parenchyme pulmonaire dans 70 à 80% des cas conduisant à l'aspergillose pulmonaire invasive (API). Puis, il est susceptible de se propager par voie hématogène dans tout l'organisme et de provoquer une atteinte cérébrale, cardiaque ou cutanée (Dominique ,1999).

Dans cette étude prospective, nous allons surtout aborder le diagnostic des aspergilloses invasives qui repose sur des différentes méthodes classiques de diagnostic histologique, mycologique et sérologique complétées par la mise en évidence d'antigènes circulants , d'anticorps circulants et par des techniques de biologie moléculaire (PCR) .

Ce travail s'articule selon 2 axes principaux :

- Le premier volet de cette étude consacré à une revue bibliographique sur la description de genre *Aspergillus* et les principales espèces responsables des pathologies humaines puis les différentes aspergilloses causées par ces espèces, la physiopathologie et en dernier représentations des aspergilloses invasives.
- Le deuxième volet permet de relater les différentes techniques utilisées pour le diagnostic direct et indirect des aspergilloses invasives.

The image features a decorative frame for the chapter title. It consists of four ornate, symmetrical floral corner ornaments, each with intricate scrollwork and leaf patterns. These ornaments are positioned at the corners of a rectangular frame, with short horizontal lines extending from the top and bottom corners towards the center.

Chapitre I

I.1. Généralités

Les *Aspergillus* sont considérés comme des champignons saprophytes de l'environnement. Ces moisissures se développent sur la matière organique en décomposition, dans le sol, le compost, les denrées alimentaires et les céréales (Gugnani, 2003). Au contact de l'air, le mycélium (thalle végétatif formé de filaments mycéliens hyalins, de diamètre fin et régulier, septés et ramifiés à 45°) est capable de former des conidiophores produisant une grande quantité de conidies (Figure 1).

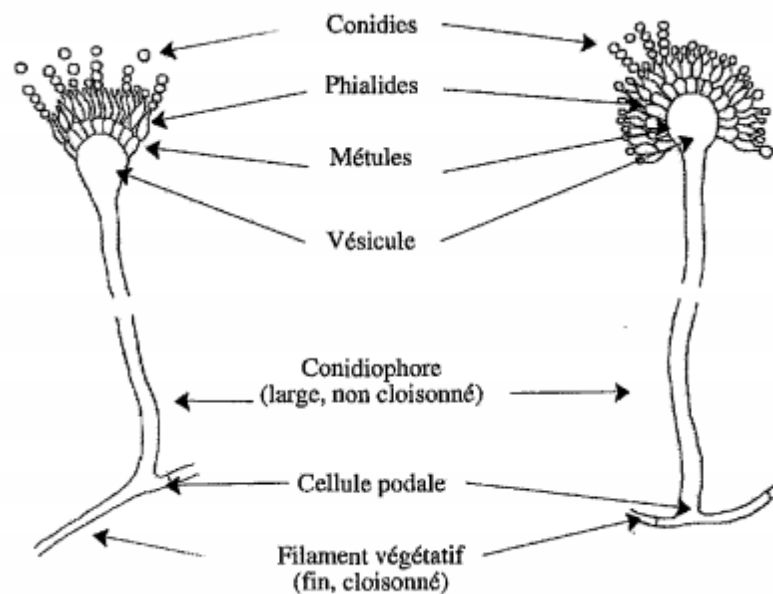


Figure 1: Représentation de l'appareil reproducteur des *Aspergillus* spp
(Chabasse *et al.*, 2002).

Ces dernières sont efficacement dispersées par voie aérienne grâce à leur petite taille et leur paroi hydrophobe. Les spores aspergillaires se situent au 4ème rang des spores fongiques de l'air, après les spores d'*Alternaria* sp, de *Cladosporium* sp. et de *Penicillium* sp. (Rossignol, 2013) .

Ce genre comprend plusieurs espèces réparties en 18 groupes morphologiquement, génétiquement et physiologiquement proches (Raper et Fennell, 1965 ; Botton *et al.*, 1990). Une vingtaine d'espèces est impliquée dans des pathologies animales et humaines (Roquebert, 1998).

La répartition géographique des *Aspergillus* est assez vaste. Ils sont les plus souvent présents dans les zones tropicales et subtropicales, donc adaptés à des climats chauds et à des milieux pauvres en eau (Makhlouf, 2019). Fréquentes espèces d'*Aspergillus* sont présentes dans l'environnement humain, notamment dans la poussière et l'air. Certaines espèces peuvent être directement pathogènes pour l'homme et les animaux en étant capables d'envahir les tissus vivants et provoquer des aspergilloses (par exemple *Aspergillus fumigatus* responsable de mycoses pulmonaires) (Morin, 1994).

I.2. Taxonomie du genre *Aspergillus*

Les *Aspergillus* spp, peuvent présenter à la fois des formes sexuées et des formes asexuées. Il existe plusieurs espèces d'*Aspergillus* mais seulement une vingtaine qui sont impliquées en pathologie humaine. Selon les stades sexués ou asexués la classification est différente. La nomenclature nous impose d'utiliser le nom d'espèce de la forme sexuée lorsqu'elle existe mais en pratique clinique il est plus facile d'utiliser le nom de la forme asexuée (Chabasse *et al.*, 2002). La classification des formes asexuées est la suivante :

- **Règne** : Fungi,
- **Phylum** : Deuteromycotina (Fungi Imperfecti),
- **Classe** : Hyphomycètes,
- **Ordre** : Moniliales,
- **Famille** : Monoliliaceae,
- **Genre** : *Aspergillus*,
- **Sous-genre** : *Aspergillus*, *Ornati*, *Fumigati*, *Clavati*, *Circumdati*, *Nidulantes*,
- **Section** : *Aspergillus*, *Restricti*, *Clavati*, *Fumigati*.

I.3. Description morphologique

I.3.1. Morphologie macroscopique

Les *Aspergillus* spp. Présentent une croissance rapide sur milieu de Sabouraud additionné d'antibiotiques. la plupart des *aspergillus* inhibés par le cycloheximide. Après 24 à 48 heures de culture, on peut observer des colonies plates formées de courts filaments aériens blancs. C'est en effet avec la maturation des structures conidiogènes (48 à 96 heures selon les espèces) que les colonies vont prendre leur teinte caractéristique : brune, verte, jaune, ou même noire selon les espèces. La couleur de la colonie permet une orientation rapide du diagnostic d'espèce (Chabasse *et al.*, 2002). Le milieu de référence pour les *Aspergillus*. est le milieu de Czapek, il stimule l'apparition de fructifications. La température optimale de culture est 22 à 25°C selon les espèces sauf pour *A. fumigatus* qui est une espèce thermotolérante, poussant mieux à 37°C (Morin, 1994).

I.3.2. Morphologie microscopique

Sur le mycélium d'*Aspergillus* spp. prennent naissance des filaments dressés non cloisonnés, appelés conidiophores. Ils se terminent par une vésicule de forme variable sur laquelle s'accrochent des cellules conidiogènes appelées phialides. Ces derniers peuvent être portés par des petits articles appelés métules.

La conidiogenèse correspondant à une reproduction asexuée qui s'effectue sur le mode blastique phialidique, par bourgeonnement à l'apex des phialides. Les conidies restent accolées les unes aux autres en chaîne ramifiée, la plus jeune étant à la base de la chaîne, à côté de la phialide. L'ensemble conidiophore – vésicule – (métules) – phialides – conidies est appelé tête aspergillaire (voir la figure 1). Sans métule, ces têtes sont dites unisériées alors qu'elles sont dites bisériées en présence de métules (Chabasse *et al.*, 2002).

I.4. Croissance et cycle fongique

La reproduction des champignons peut être de type asexué ou sexué (Figure 2). Seulement 1/5^{ème} des espèces de champignons ont eu un cycle sexué connu (Dyer et Paoletti, 2005). La reproduction asexuée se conclue par la production de conidies haploïdes (avec une seule copie de chaque chromosome). La reproduction sexuée, quant à elle, nécessite la fusion

nucléaire de deux cellules appartenant à des types reproductifs distincts (Delorme, 1997), soit MAT1-1 et MAT1-2 (O'Gorman *et al.*, 2009), produisant ainsi un téléomorphe diploïde. Les ascospores, produites par méiose de la cellule fusionnée, sont contenues à l'intérieur de structures spécialisées nommées asques, elles-mêmes regroupées dans des cléistothèces, qui sont des corps de fructification sexuels (Sugui *et al.*, 2014a). La reproduction sexuée est souvent favorisée dans les milieux faibles en nutriments.

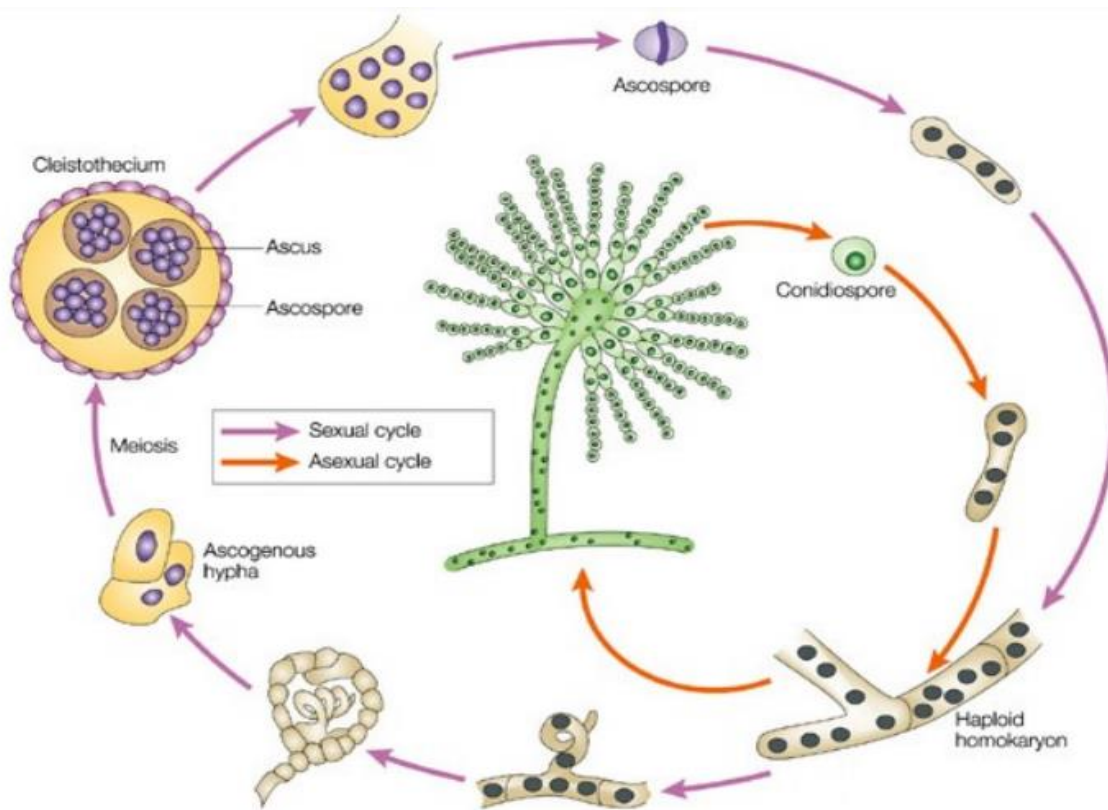


Figure 2 : Cycle sexué et asexué du genre *Aspergillus* (Casselton et Zolan2002).

I.5. Les principales espèces retrouvées en pathologie humaine

Plus de 339 espèces appartiennent au genre *Aspergillus*, mais cinq seulement sont impliquées couramment en pathologie humaine et vétérinaire. *A. fumigatus* est la plus fréquemment isolée, suivie par *Aspergillus flavus* et *Aspergillus niger*. Les autres espèces étant beaucoup plus rarement en cause (Cornet *et al.*, 2002).

➤ *Aspergillus fumigatus*

considéré comme le principal agent d'aspergillose invasive (représentant 80-90% des aspergilloses humaines) (Morin, 1994), l'aspergillose broncho-pulmonaire allergique (ABPA), la sinusite aspergillaire et l'aspergillome (Latgé, 1999). *A. fumigatus* n'est pas la seule à avoir un effet pathogène sur l'homme.

Elle est retrouvée aussi bien dans les régions chaudes que froides du globe. Sa bonne tolérance aux températures élevées explique son abondance dans les composts et autres matières organiques (Badillet *et al.*, 1987). Il est aussi connu pour sa capacité à se développer sous la forme de masses fongiques localisées (fungus balls) sans invasion réelle des tissus (Desoubeaux et Chandénier, 2010).

➤ *Aspergillus flavus*

C'est la deuxième espèce la plus fréquente au sein des aspergilloses invasives (AI). Cette espèce est plus fréquente dans les zones tropicales où elle se développe sur le fruit de l'arachide sur lequel il peut produire des aflatoxines considérées comme carcinogènes. *A. flavus* se trouve dans les sols cultivés, sur les graines de céréales telles que le maïs ou l'avoine (Badillet *et al.*, 1987). Les différents types d'aflatoxines sont les aflatoxines B1, B2, M1, G1 et G2. L'aflatoxine B1, potentiellement carcinogène (Mori, 1998).

➤ *Aspergillus niger*

Espèce très commune dans le monde entier, elle se développe sur substrats variés. Elle présente un pic de distribution estival en rapport avec son affinité pour les plantes herbacées (Badillet *et al.*, 1987). *A. niger* est fréquemment retrouvé comme contaminant des cultures. Il représente 5 % des isolats aspergillaires en laboratoire. Il s'agit du principal agent des otomycoses. Il est également responsable d'aspergillome et est la troisième espèce retrouvée dans l'aspergillose invasive (Desoubeaux et Chandénier, 2010).

➤ *Aspergillus nidulans*

Espèce très répandue, elle est isolée du sol, de l'air et de substrats végétaux (Badillet *et al.*, 1987). Il est isolé dans un faible pourcentage des infections cliniques aspergillaires (Balajee *et al.*, 2007).

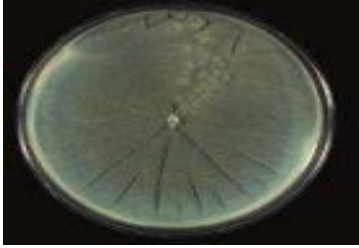
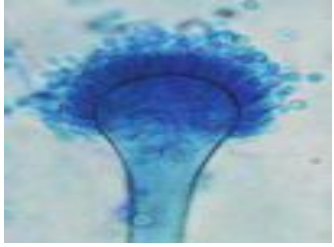
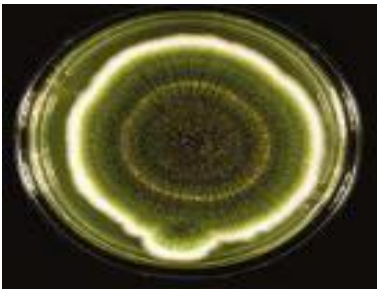
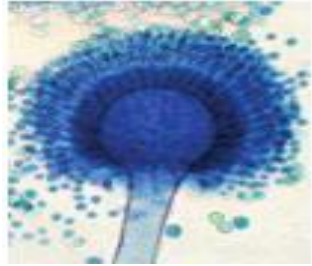

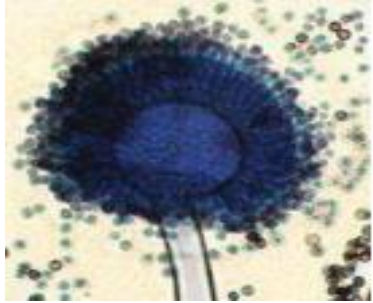

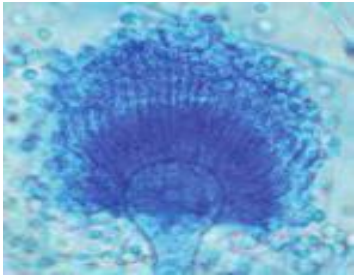
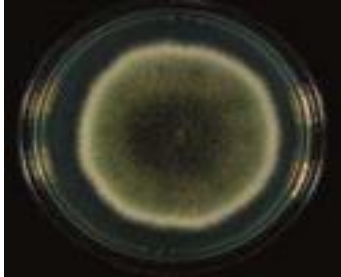
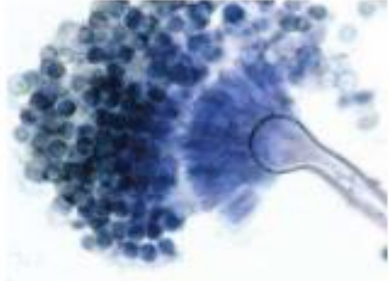
➤ *Aspergillus terreus*

Cette espèce tellurique des régions chaudes, colonise les débris végétaux, la paille, le coton, les grains stockés (Badillet *et al.*, 1987). Il peut représenter jusqu'à 5 % des isolats aspergillaires cliniques en laboratoire de mycologie (Balajee *et al.*, 2007).

I.5.1. Caractéristiques des espèces responsables des aspergilloses invasives

Les espèces responsables d'AI sont principalement : *A. fumigatus*, *A. flavus*, *A. nidulans*, *A. niger*, *A. terreus* comme cité précédemment. Les morphologies macroscopiques et microscopiques de ces espèces sont décrites dans la Figure 3.

Tableau 1: Aspects macroscopiques et microscopiques des principales espèces d'*Aspergillus* (Chabasse *et al.*, 2002).

<i>Aspergillus</i>	Aspect macroscopique	Aspect microscopique
<i>Aspergillus fumigatus</i>		
<i>Aspergillus flavus</i>		
<i>Aspergillus niger</i>		
<i>Aspergillus terreus</i>		
<i>Aspergillus nidulans</i>		

I.5.2. Cas de l'espèce *Aspergillus fumigatus*

Aspergillus fumigatus est la principale espèce impliquée en pathologie humaine qui cause la majorité des maladies (80 à 90%). Ce champignon ubiquitaire, saprophyte mais pathogène opportuniste, dispose de multiples mécanismes de virulence : richesse antigénique, production de nombreuses toxines.

Le genre *Aspergillus* regroupe 339 espèces de champignons filamenteux, à répartition mondiale, ubiquitaires dans l'environnement de l'homme. Facilement aéroportés dans l'habitat comme dans l'air extérieur, chaque individu inhale quotidiennement entre 10 et 30 spores d'*Aspergillus* (Milla et Moss, 2015).

I.5.2.1. Caractéristiques macroscopiques

Les colonies d'*A. fumigatus* sont extensives à croissance rapide à 27°C (4 cm en 7 jours), elles ont un aspect de fumée et une couleur qui peut varier du blanc au vert ensuite au vert foncé à gris noirâtre. (Figure 4). L'autre face reste incolore, jaune ou tend vers un brun-rouge (Chabasse *et al.*, 2002) .

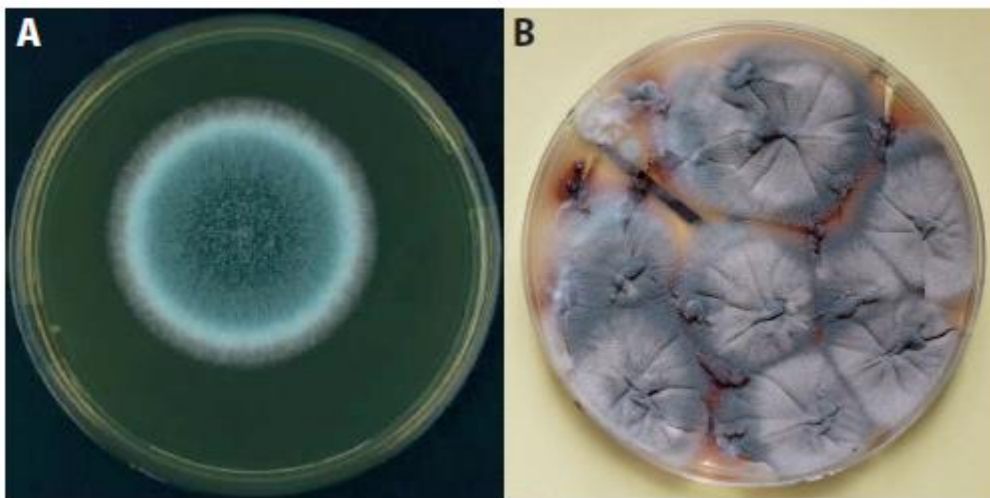


Figure 3 : Aspects macroscopiques de colonies d'*Aspergillus fumigatus* ((Elise, 2015)

I.5.2.2. Caractéristiques microscopiques

La tête conidienne, d'*Aspergillus fumigatus*, est unisériée, en colonne compacte, d'abord bleu-vert puis virant au vert-bronze. Le conidiophore est court, de 300 à 500 μm de long, lisse, vert, ce s'élargit insensiblement au sommet en une vésicule sub-hémisphérique. La vésicule est de 20 à 30 μm de diamètre, verte, fertile dans leur moitié supérieure. Les phialides sont dressées, densément groupées, vertes, allant de 6 à 8 μm au long et de diamètre variant entre 2 et 3 μm . Et les conidies sont de forme globuleuse, de 2,5 à 3 μm de diamètre, échinulées (Figure 5) (Botton *et al.*, 1990).

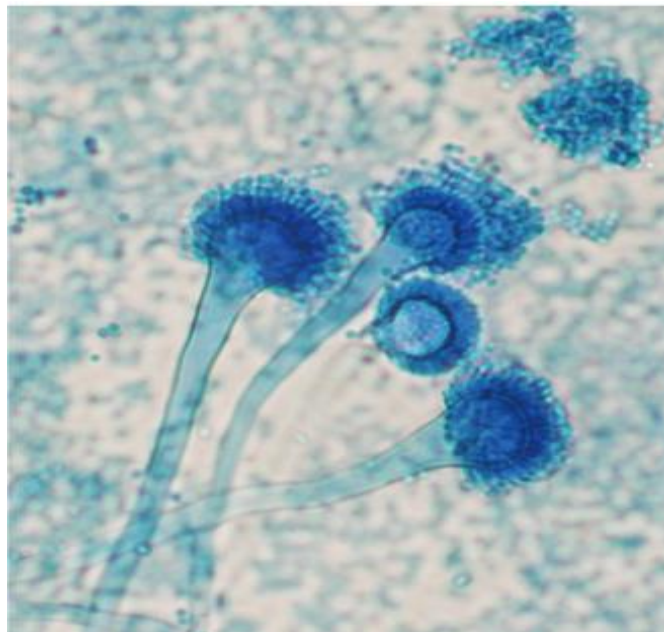


Figure 4 : Tête aspergillaire d' *Aspergillus fumigatus* (Chabasse *et al.*, 2002).

I.5.2.3. Ecologie

Aspergillus fumigatus est un champignon saprophyte présent dans tous les milieux, mais sa niche écologique primaire est le sol, au niveau de la végétation en décomposition, où il joue un rôle important dans la transformation des matières organiques (Elise, 2015).

Cette espèce se développe bien à des températures allant jusqu'à 45°C (Chabasse *et al.*, 2002), ou même à des températures plus élevées jusqu'à 55°C et constitue un des microorganismes les plus communs présents dans la tourbe, le compost et tout autre matériel organique se décomposant à des températures élevées (Abdelhadi et Boukhrouf, 2011)

Aspergillus fumigatus peut se développer avec des valeurs de l'activité de l'eau minimale (Aw) comprise entre 0,85-0,94, ce qui en fait un champignon hydrophile. Les conidies sont très résistantes et peuvent survivre à différents stress environnementaux, tels que la dessiccation, les températures extrêmes et les stress osmotiques et oxydatifs (Elise, 2015).

The title 'Chapitre II' is centered on the page. It is enclosed within a decorative frame consisting of four ornate, symmetrical floral corner ornaments. Each ornament features intricate scrollwork and leaf-like patterns, positioned at the corners of a rectangular frame that surrounds the text.

Chapitre II

II.1. Réservoirs

L'*Aspergillus* est une moisissure omniprésente dans notre environnement, ubiquitaire, qui se développe en saprophyte dans la terre, sur les plantes et débris végétaux en voie de décomposition. Il est retrouvé dans l'air, sur le sol et les surfaces (verticales ou horizontales), dans l'alimentation et même dans l'eau. Les spores peuvent être présentes également dans les épices, les fleurs séchées, la paille (Stankovic *et al.*, 2003). Les grains moisissus, les foin, dans le terreau des plantes, les fientes de pigeon, de volailles... L'humidité favorise sa survie et son développement.

À partir de ces réservoirs, les spores aspergillaires sont disséminées dans l'atmosphère et peuvent pénétrer à la faveur des courants d'air dans l'habitat et dans les hôpitaux, y séjourner et y proliférer si les conditions sont favorables (Morin, 2003).

II.2. Mode de contamination

A. fumigatus n'a pas de mécanisme élaboré pour libérer ses conidies dans l'air ; la dissémination repose simplement sur les perturbations de l'environnement et les forts courants d'air. Une fois que les conidies sont en l'air, leur petite taille les rend flottantes, ce qui les maintient en suspension à l'intérieur et à l'extérieur. Les études environnementales indiquent que tous les humains inhalent au moins plusieurs centaines de conidies d'*A. Fumigatus* par jour (Benfouila, 2011).

Le mode de contamination habituel se fait, dans la grande majorité des cas, par voie respiratoire par inhalation de spores, du fait de leur petite taille, pénètrent jusqu'aux alvéoles pulmonaires (Figures 6 et 7) *A. fumigatus* peut se propager, dans d'autres organes par l'intermédiaire de la circulation sanguine. (Latgé, 1999). Par conséquent, une contamination directe par déposition des spores sur de plaies ou brûlures cutanées ou un site opératoire est également rapportée peut aboutir à des infections locales à risque de dissémination (Adchira, 2011). La contamination peut également se faire par l'eau ou surtout par l'alimentation : poivre, thé, fruits... (Seghir et Zahed, 2019) qui sont riches en spores aspergillaires. L'infection digestive est possible en cas de lésions préexistantes de la muqueuse digestive.

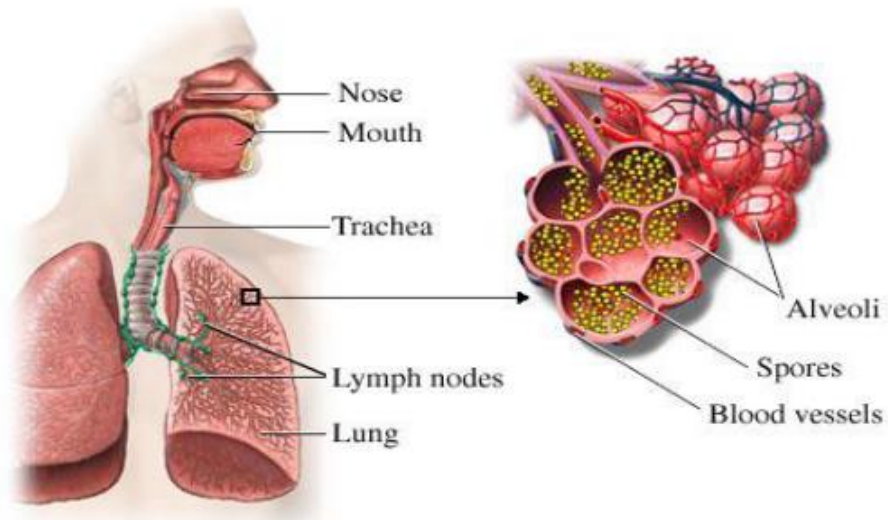


Figure 5 : contamination aérienne par les spores aspergillaires (Benfouila, 2011).

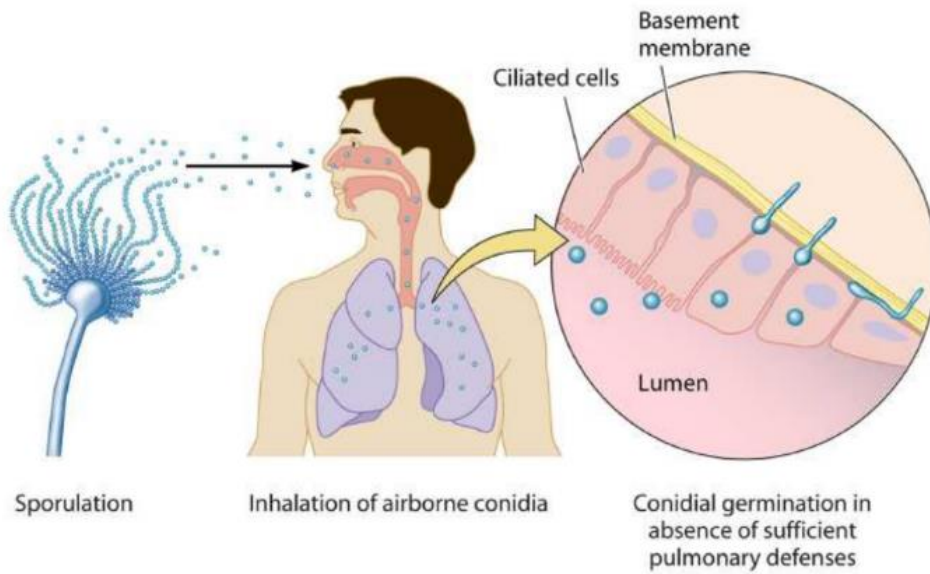


Figure 6: Mode de contamination (inhalation des spores) (Dumollard, 2015)

II.3. Facteurs de virulence d'*Aspergillus fumigatus*

Ils ont surtout été étudiés pour *A. fumigatus*, l'espèce la plus pathogène. Les moisissures sont des organismes peu virulents mais très opportunistes. Les *Aspergillus spp.* ne deviennent pathogènes que dans certaines conditions très particulières, aboutissant notamment aux formes cliniques les plus graves constituées par les aspergilloses pulmonaires invasives. Parmi les principaux éléments qui participent au pouvoir pathogène de ces champignons (Desoubeaux et Chandener, 2010), on retrouve :

- **Facteurs physiques** tels que la petite taille des conidies d'*A. fumigatus* ; qui est un élément essentiel de la virulence de ce champignon ; la température ; l'aptitude des spores à filamenter n'est pas non plus à négliger ; l'osmophilie ; la xérophilie..... (Morin, 2003).
- **Molécules d'adhésion** telles les adhésines (Benfouila, 2011).
- **Sécrétion d'enzymes** telles que les protéases et également la sérine protéase, l'aspartylprotéase, la métalloprotéase et les phospholipases (Desoubeaux, 2013).
- **Production de toxines** telle que la toxine majeure produite par *A. fumigatus* qui est la gliotoxine. (Rossignol, 2013).
- **Résistant aux traitements antifongiques** grâce à la production de biofilm par *A. fumigatus* par exemple (Kaur et Singh, 2013).

The title 'Chapitre III' is centered on the page. It is enclosed within a decorative frame consisting of four ornate, symmetrical floral corner ornaments. Each ornament features intricate scrollwork and leaf-like patterns, positioned at the top-left, top-right, bottom-left, and bottom-right corners of the text area.

Chapitre III

III. 1. Les aspergilloses

Les infections à *Aspergillus* figurent au second rang en termes de fréquence des infections fongiques (après les infections par *Candida sp*). Ces maladies sont regroupées sous le terme d'aspergilloses.

Les aspergilloses correspondent à un ensemble d'infections fongiques, provoquées par des champignons microscopiques du genre *Aspergillus* (Estelle, 2021). Ce sont des atteintes, le plus souvent pulmonaires, dues à un champignon filamenteux opportuniste à croissance rapide et extrêmement répandus dans l'environnement (Sadoudi et Saidi, 2018)

L'agent pathogène le plus souvent à l'origine de l'aspergillose invasive est *Aspergillus fumigatus* qui provoquent des infections respiratoires, au niveau des bronches, des poumons ou encore des sinus ou des oreilles. Chez les sujets immunodéprimés les autres espèces (*A. flavus*, *A. niger* et *A. nidulans*) susceptibles de devenir invasif du fait de la petite dimension de leurs spores (2 à 3 µm), de leur thermotolérance et de leur virulence (Auboyer, 1998).

III.1.1. Définition

Les aspergilloses sont des infections cosmopolites essentiellement opportunistes dues à la prolifération des champignons de type *Aspergillus* suite à l'inhalation de spores contenues dans n'importe quel débris organique. Elle est à l'origine de diverses atteintes respiratoires : Aspergillose invasive (AI), Aspergillome, asthme aspergillaire... (Berny *et al.*, 2017). Ce sont surtout les personnes immunodéprimées ayant: maladies hématologiques malignes, transplantations d'organe, granulomatoses chroniques, VIH, corticothérapie qui contractent cette maladie (Zeniou et Bouraoui ,2017).

La pathogénicité des espèces *Aspergillus* réside dans la nature de la réponse immune de l'hôte. Les diverses réponses immunitaires anormales de l'hôte vont ainsi entraîner le développement de différentes affections plus ou moins sévères (figure 27) (Park et Mehrad, 2009).

III.1.2. Différent Types d'aspergilloses

Chez l'homme, les aspergillus ont à l'origine de quatre types d'aspergilloses : L'aspergillose broncho-pulmonaire allergique, l'aspergillose invasive, l'aspergillome et la sinusite aspergillaire. Beaucoup plus rarement, et essentiellement chez les personnes aux

défenses immunitaires défaillantes (immunodéprimée) et à l'origine des aspergilloses superficielles. L'aspergilliose se manifeste par d'autres atteintes profondes : cérébrale, cutanée,...) (Koren *et al.*, 2013).

III.1.2.1. Aspergilloses profondes

III.1.2.1.1. L'aspergilliose broncho-pulmonaire allergique

Elle fait partie du groupe des maladies secondaires a des réactions d'hypersensibilité envers l'*Aspergillus*, appelée aussi la maladie de Hinson-Peppys (Direm *et al.*, 2018). L'aspergilliose broncho-pulmonaire allergique (ABPA) est une maladie inflammatoire liée au développement de la moisissure dans l'arbre bronchique causant une réponse immunologique complexe. Cette forme de pathologie touche essentiellement les sujets atteints d'un asthme ou d'une mucoviscidose ; mais elle est aussi couramment rencontrée chez les immunocompétents (Khechmar et Zaafr, 2017).

Cette mycose est décrite chez les patients asthmatiques ou atteints de mucoviscidose, non immunodéprimés. La prévalence estimée de l'ABPA varie entre 0,25 et 0,8 % chez les enfants asthmatiques et peut s'élever jusqu'à 11 % chez des enfants atteints de mucoviscidose. (Tillie-Leblond *et al.*, 2012) Il existe d'autres formes de manifestations allergiques provoquées par *A. fumigatus* (Figure 8) : l'asthme bronchique et l'alvéolite allergique extrinsèque (ou maladie du poumon de fermier) (Elise, 2015).

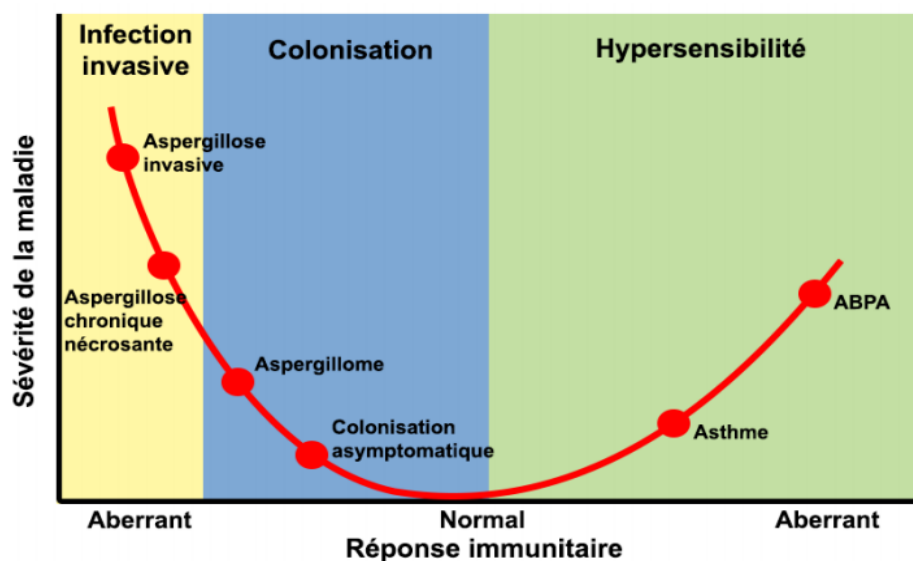


Figure 7 : Représentation des affections attribuées aux espèces du genre *Aspergillus* en fonction de la réponse immunitaire de l'hôte (Park et Mehrad, 2009).

III.1.2.1.2. Aspergillome

L'aspergillome pulmonaire (AP) est la forme localisée des aspergilloses broncho-pulmonaires. C'est une mycose due au développement d'un amas de filaments mycéliens dans une cavité parenchymateuse préexistante (Figure 9), elle est le plus souvent d'origine tuberculeuse (Elmghari *et al.*, 2017).

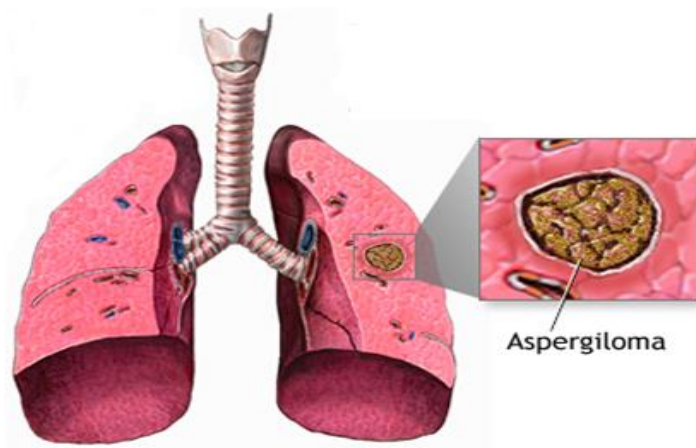


Figure 8: Truffe aspergillaire dans une cavité séquellaire de tuberculose

(Elmghari *et al.*, 2017).

Le champignon envahit alors toute la cavité et forme une véritable « truffe aspergillaire » (Figure 10), suite à l'absence de défense macrophagique et altération du tissu pulmonaire, elle correspond à un matériel grumeleux, marron, clivé constitué d'éléments fongiques vivants ou morts, de cellules inflammatoires, de mucus et de débris tissulaires (Zeniou et Bouraoui, 2017). L'aspergillome peut être asymptomatique ou se manifeste par des hémoptysies dans la plus part des cas, elles peuvent être associées à des toux, des expectorations et plus rarement à des douleurs thoraciques.

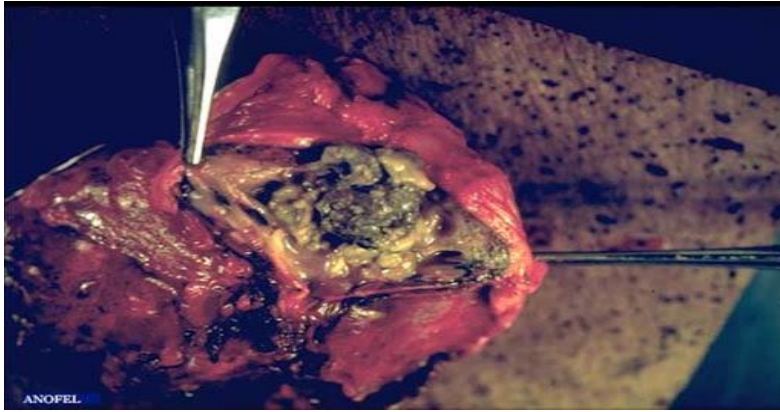


Figure 9 : Truffe aspergillaire observée après exérèse de la lésion (ANOFEL 2, 2002).

III.1.2.1.3. La sinusite aspergillaire

La sinusite aspergillaire est une infection chronique des sinus. Elle est due à l'interaction entre les muqueuses de ces derniers et la moisissure. Cliniquement, deux formes sont distinguées : la forme non invasive et la forme invasive qui se voit généralement sur terrain immunodéprimé. (Blandin et David 2008).

L'aspergillose des sinus est une maladie parfois reconnue chez les patients immunocompétents et peut prendre plusieurs aspects selon la présence ou l'absence d'une invasion tissulaire et l'état immunitaire du patient (Makni *et al.*, 2008).

III.1.2.2. Aspergilloses superficielles

III.1.2.2.1. L'aspergillose oculaire

Il s'agit principalement de kératite (inflammation de la cornée c'est-à-dire infection des yeux). Cependant toutes les parties de l'œil peuvent être touchées (Figure 11). L'atteinte des voies lacrymales, des conjonctives, et des paupières est presque toujours due à *Aspergillus niger* ce qui donne une teinte noirâtre aux lésions et aux sécrétions. Au niveau des paupières on peut observer des granulomes. L'atteinte de la cornée est bien plus fréquente, elle est surtout due à *Aspergillus fumigatus* (Direm *et al.*, 2018).

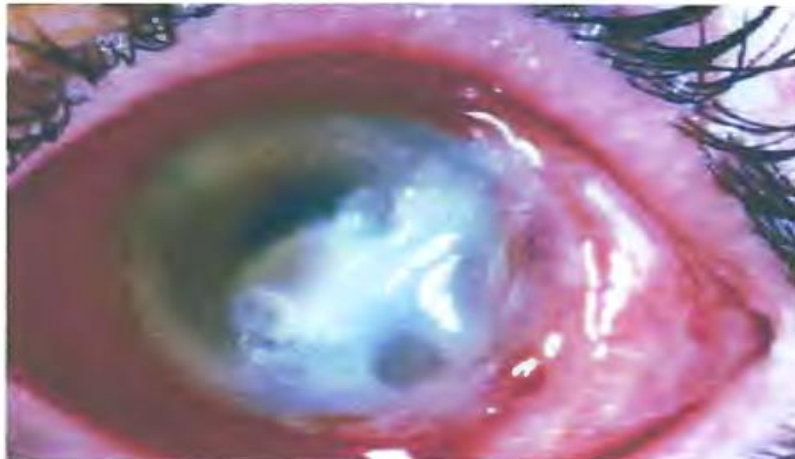


Figure 10: Aspect macroscopique d'une aspergillose oculaire
(Abdelhadi et Boukhroufa, 2011).

III.1.3.2.2 L'aspergillose de l'oreille ou otomycose

L'otomycose est décrite comme une infection fongique du canal de l'oreille externe (Figure 12). Elle se rencontre principalement sous les climats chauds et humides et l'agent responsable est dans 90 % des cas *Aspergillus fumigatus* ou, *Aspergillus niger* (Nowak *et al.*, 2017). Cette atteinte du conduit auditif externe est favorisée par des lésions préexistantes (eczéma...) (Direm *et al.*, 2018).

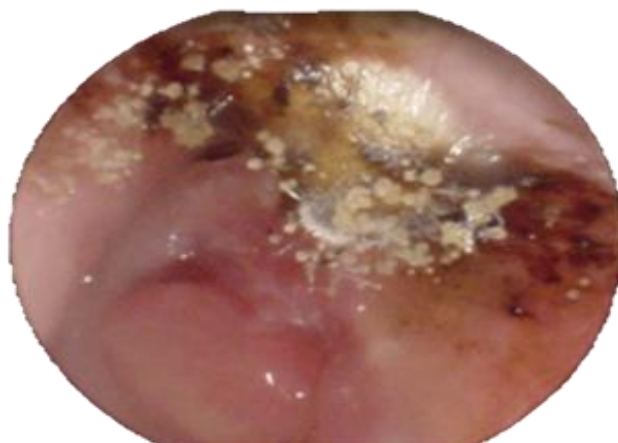


Figure 11: Aspect macroscopique d'une otomycose aspergillaire.
(Nowak *et al.*, 2017)

III.1.2.2.2. Onyxis aspergillaire

Les onychomycoses dues à des *Aspergillus* représentent 7% de l'ensemble des onychomycoses causées par des moisissures (2010). Les espèces aspergillaires isolées sont multiples : *Aspergillus versicolor*, *Aspergillus nidulans*, *Aspergillus terreus*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus flavus* et *Aspergillus fumigatus*. Certains facteurs pourraient favoriser l'atteinte onychomycotique : facteurs locaux tels que le port de chaussures occlusives et de la pratique de sports et des facteurs généraux tels que le diabète et l'immunosuppression (Amri *et al.*, 2010). L'atteinte est essentiellement sous-unguéale distale (Figure 13) ou représentée par des leuconychies superficielles. *Aspergillus versicolor* et *Aspergillus candidus* sont les espèces les plus souvent impliquées (Desoubeaux et Chandenier, 2010).



Figure 12: Atteinte sous unguéale distale aspergillaire (Direm *et al.*, 2018).

III.1.2.2.3. L'aspergillose cutanée

C'est une infection de la peau par une moisissure de genre *Aspergillus* notamment '*Aspergillus flavus*'. Elle peut se produire soit une infection primaire (non invasive), suite à une inoculation directe du champignon dans les sites de lésion cutanée ou une infection secondaire (invasive) suite de la diffusion hématogène (Figure 14), le plus couramment après une entrée pulmonaire ou d'extension contiguë d'une cavité voisine telle que le sinus maxillaire (Quatresooz *et al.*, 2003).



Figure 13: lésion cutanée d'une aspergillose disséminée (Raynard, 2018).

III.2. Aspergilloses invasives

III.2.1 Définition

L'aspergillose invasive est l'infection aspergillaire la plus grave avec une mortalité significative par un taux de 74 à 92 % (Delhaes *et al.*, 2010), elle est due principalement à *Aspergillus fumigatus*, mais aussi à d'autres espèces d'*Aspergillus* (Gangneux et Guiguen 2007). Une aspergillose est définie comme invasive lorsqu'elle atteint au minimum deux organes (Raynard, 2018).

Les sujets à risque pour cette infection sont toutes les personnes dont les défenses immunitaires sont diminuées et en particulier les patients ayant subi une greffe de moelle ou des transplantations d'organes, les patients soumis à des traitements anticancéreux qui ont peu de globules blancs, les patients gravement brûlés ou atteints du SIDA. L'aspergillose invasive est aussi rencontrée chez les patients ayant une maladie génétique rare appelée la granulomatose septique chronique, cette dernière diminue les défenses immunitaires de l'hôte et le rend donc plus susceptible à l'infection aspergillaire (Massou *et al.*, 2010, Pasqualotto, 2010).

La porte d'entrée de l'*Aspergillus* est essentiellement pulmonaire responsable de l'aspergillose pulmonaire invasive (API) qui représente la forme la plus fréquente de l'AI. La gravité de cette infection réside dans la capacité de la moisissure à causer un tropisme vasculaire responsable d'hémorragie, de nécrose et de dissémination vers tous les organes tels que le cerveau, l'os, l'endocarde, le foie ... (Gangneux et Guiguen 2007, Pilly 2008). A vrai dire, la grande dissémination d '*Aspergillus* est la première caractéristique de l'AI ; elle représente aussi l'origine du danger apporté par cette pathologie. Cette dernière étant le plus souvent mortelle (Delhaes *et al.*, 2010).

III.2.2. Epidémiologie

L'Aspergillose est une cause majeure de mortalité chez les patients greffés de moelle osseuse ou traités pour hémopathie maligne (Zeniou et Bouraoui, 2017). L'espèce responsable de 80 à 90 % des infections humaines est *Aspergillus Fumigatus* (Elise, 2015). L'infection se fait généralement par inhalation des spores et touche principalement les personnes immunodéprimées. Il a été montré que les malades neutropéniques représentent le groupe le plus exposé à l'aspergillose pulmonaire invasive.

Une étude faite au nord de l'Algérie a montré que sur 208 malades ayant une neutropénie sévère, seize étaient atteints d'Aspergillose invasive. *Aspergillus flavus* et *Aspergillus niger* étaient plus fréquents qu'*A. fumigatus* dans l'environnement local des patients. Il a été prouvé aussi en Algérie que 1,3% des malades atteints de BCPO et 2,6% des malades ayant un cancer de poumon présentent une aspergillose pulmonaire invasive (Zeniou et Bouraoui , 2017).

L'épidémiologie de ces maladies a changé depuis le début des années 90. Cela s'explique notamment par un diagnostic beaucoup plus pratique, une évolution des traitements mais aussi une augmentation du nombre de patients immunodéprimés ces quinze dernières années, qui permettent d'expliquer l'incidence encore élevée de ces pathologies. La figure 15 met en avant la répartition des AI en France de 2001 à 2010, 35876 nouvelles infections fongiques invasives ont été recensées en France métropolitaine. On remarque que l'ancienne région Rhône-Alpes fait partie des régions les plus touchées en France.

Le tableau 1 met en avant l'incidence élevée des AI (23.9 %) juste derrière les Pneumonies à *Pneumocystis* (26,1 %) concernant les infections fongiques invasives. Les candidémies restent le cas le plus fréquent (43,3 %). Le fort taux de létalité pour les AI est à mettre en avant, représentant avec les candidémies 87,6 % des décès. On remarque aussi que dans neuf cas sur dix, l'aspergillose reste localisée au niveau pulmonaire.

Ces données mettent en avant le problème de santé publique lié aux *Aspergillus* (Raynard , 2018)

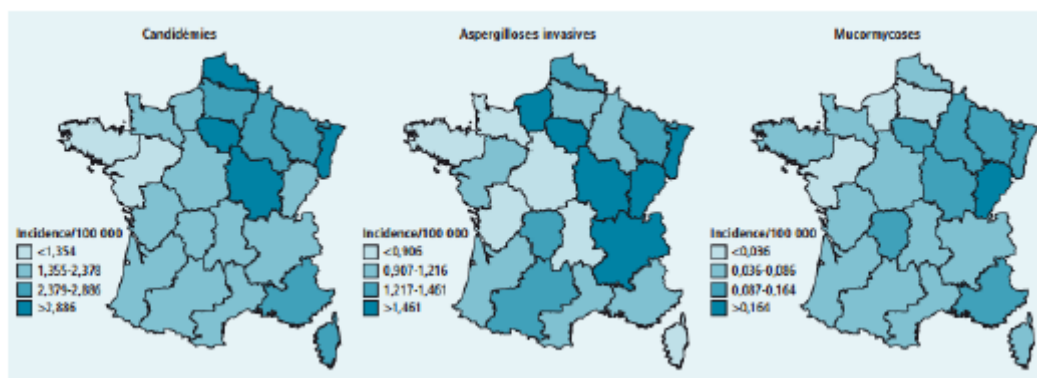


Figure 14 : Répartition régionale des Infections fongiques invasives en France Métropolitaine, 2001-2010 (moyenne annuelle des taux d'incidence, standardisés selon l'âge et le sexe) (Raynard , 2018).

Tableau 2 : Infections fongiques invasives en France métropolitaine, 2001-2010 : cas et décès par type d'infection (Raynard , 2018).

	Cas				Décès			
	N	Hommes (%)	Âge (ans) Médiane, IQ*	Incidence**	N	Hommes (%)	Âge (ans) Médiane, IQ*	Létalité (%)
Candidémies	15 559	58,8	64 [51-75]	2,5	6 217	59,9	69 [56-77]	40,0
Pneumonies à <i>Pneumocystis</i>	9 365	71,3	44 [37-55]	1,5	862	71,9	58 [43-70]	9,2
Aspergilloses invasives ¹	8 563	63,9	58 [45-68]	1,4	2 443	66,7	61 [49-71]	28,5
Cryptococcoses ²	1 859	72,3	43 [36-55]	0,3	278	73,4	49 [39-65]	15,0
Mucormycoses ³	530	57,7	58 [43-71]	0,1	89	62,9	57 [44-67]	16,8
Total	35 876	63,9	56 [42-70]	5,9	9 889	63,1	65 [53-75]	27,6

* IQ : intervalle interquartile ; **cas pour 100 000 personnes par an.
¹ Dont 91,7% pulmonaires et 8,3% disséminées.
² Dont 63,8% cérébrales ou disséminées.
³ Dont 50,9% pulmonaires, rhinocérébrales ou disséminées et 16,9% cutanées.

III. 2.3. Formes cliniques des aspergilloses invasives

III. 2.3.1. Aspergillose invasive pulmonaire

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

Les manifestations cliniques ne sont pas spécifiques : fièvre, toux, dyspnée, douleur thoracique. Elles ressemblent à celles d'une pneumopathie bactérienne, virale, parasitaire ou néoplasique, mais ne réagissent pas aux traitements spécifiques de ces maladies (Dupont 1981).

L'aspergillose pulmonaire invasive est de très mauvais pronostic car elle touche des patients fragilisés et fortement immunodéprimés. Le diagnostic et les traitements antifongiques sont souvent trop tardifs. La mortalité globale de l'API est très élevée, de 60 à 95% selon les études.

III.2.3.2. Trachéobronchite

Aspergillose trachéobronchique Cette forme se retrouvait classiquement chez le patient VIH+ au stade SIDA et le greffé pulmonaire. La trachéobronchite peut s'accompagner d'une simple production excessive de mucus avec une inflammation. Les signes cliniques sont semblables à l'API (fièvre, toux, dyspnée, douleur...). La dissémination fongique au reste de l'organisme est possible dans les formes évoluées de l'infection par le VIH (Rossignol, 2014).

III.2.3.3. Sinusite aspergillaire invasive

L'aspergillose est l'infection fongique la plus courante en ce qui concerne les sinus para-nasaux. (Marie-Pierre, 2002). Cette forme n'intervient que chez 5 à 10% des patients concernés par une AI. Les signes précoces sont peu spécifiques : fièvre, toux, épistaxis et céphalées. Par la suite peuvent apparaître une rhinorrhée, des douleurs sinusiennes et une angine. L'aspergillose sinusienne invasive peut apparaître seule ou accompagner une API. Les complications locales avec extension au palais, à l'orbite voire au cerveau sont fréquentes et apparaissent rapidement (Rossignol, 2014). Le développement de la maladie est fulminant chez les patients immunodéprimés: le taux de mortalité est de 100% chez les patients greffés de moelle (Marie-Pierre, 2002).

III.2.3.4. L'aspergillose disséminée

Les formes disséminées, c'est-à-dire qui concernent au moins deux organes, représentent entre 25 et 35% des aspergilloses. Bien sûr le poumon est l'organe le plus touché. L'atteinte pulmonaire est donc associée à des localisations diverses par dissémination hématogène.

III.2.3.4.1. L'atteinte cérébrales

Les aspergilloses cérébrales surviennent dans la grande majorité des cas au cours d'une aspergillose invasive, avec dissémination hémotogène à partir de lésions pulmonaires. La localisation cérébrale, non rare, est un des pires critères pronostiques au cours de l'aspergillose invasive. État des connaissances. Sur note actuellement une augmentation constante de cette mycose sévère parallèlement au développement des traitements immunosuppresseurs. (Tattevin *et al.*, 2004) Les aspergilloses cérébrales sont particulières par leur tropisme vasculaire, réalisant de véritables vascularites cérébrales infectieuses, des abcès (Figure 16)...

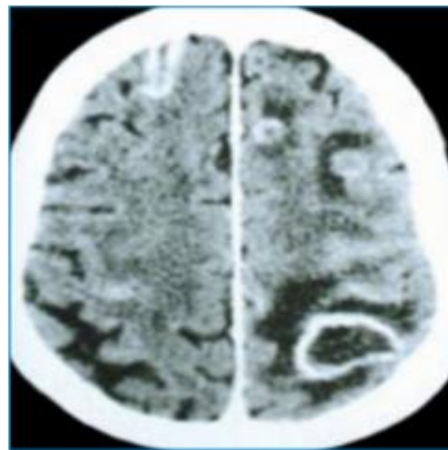


Figure 15 : Aspergillose Invasive Disséminée :tomodensitométrie cérébrale montrant plusieurs abcès (Herbrecht *et al.*,2001).

III. 2.3.4.2 L'atteinte rénale

Se voit également dans les formes disséminées, elle est d'origine hémotogène et réalise de multiples abcès. Le tropisme vasculaire est également mis en cause à ce niveau et peut aboutir à une nécrose (Figure17). L'hématurie et la protéinurie observées chez certains malades ne semblent pas spécifiques et peuvent s'expliquer par le contexte pathologique (Nicolas, 2011).



Figure 16 : Aspergillose invasive disséminée : nombreuses lésions macroscopiques rénales sous forme de plages hémorragiques et nécrotiques (Herbrecht *et al.*,2001).

III. 2.3.4.3 Le tube digestif

Un même malade peut présenter une ou plusieurs lésions au niveau de l'intestin, de l'œsophage ou de l'estomac. Il s'agit d'ulcérations pouvant atteindre plusieurs centimètres ; elles sont responsables d'hémorragies ou même de perforations. Peut aussi être atteint avec une fréquence variable (Nicolas, 2011).

III. 2.3.4.4. L'atteinte cardiaque

Les lésions habituellement observées sont des abcès myocardiques avec éventuellement des zones d'infarctissement par atteinte coronarienne. Les péricardites observées sont en rapport avec, soit une atteinte myocardique sous-jacente, soit une extension d'une atteinte pulmonaire voisine. Il est important de noter la survenue d'endocardite fongique à *Aspergillus* notamment suite à un acte de chirurgie cardiaque comme la mise en place de prothèse valvulaire ou les cathétérismes veineux prolongés. Cependant, il est remarquable de constater l'absence d'endocardite parmi les cas d'aspergillose cardiaque sur terrain compromis (Nicolas,2011).

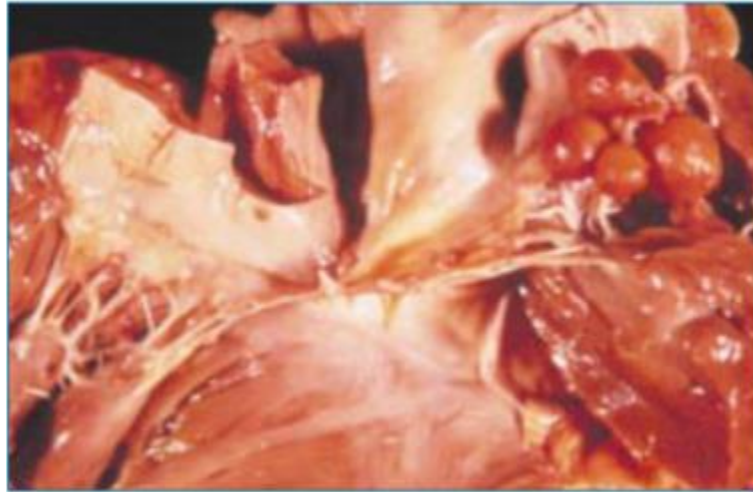


Figure 17: Endocardite aspergillaire :volumineuses végétations valvulaires cardiaques au cours d'une aspergillose invasive disséminée (Herbrecht *et al.*,2001).

III.2.3.4.5. L'atteinte cutanée

Habituellement de type hémotogène dans les formes diffuses chez l'immunodéprimé. Il s'agit d'abcès sous-cutanés, de pustules, de cellulite avec ulcérations. Cependant des cas d'aspergillose cutanée peuvent être observés chez des patients présentant des zones dermo-épidermiques nécrosées, notamment suite à un traumatisme ou chez les grands brûlés (Figure 19) (Nicolas, 2011).

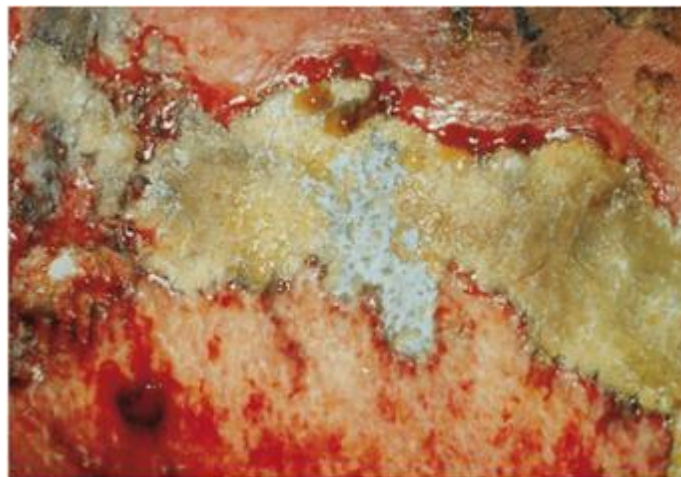


Figure 18 : Aspergillus fumigatus grandissant et sporulant dans une brûlure sur un garçon de 7 ans avec 50% de brûlures sur toute l'épaisseur ; il est mort plus tard (Denning, 1998).

L'apparence clinique d'aspergillose cutanée est au départ, une zone d'érythème surélevé est présente qui augmente rapidement de taille avec une douleur qui l'accompagne. Le centre de la lésion passe du rouge au violet et enfin au noir et peut s'ulcérer (Denning, 1998).

The title is framed by four decorative floral corner ornaments, each featuring intricate scrollwork and leaf patterns. The top-left and bottom-right ornaments are positioned at the corners of the text area, while the top-right and bottom-left ornaments are also placed at the corners, creating a symmetrical, ornate border around the text.

**Diagnostic
Mycologique**

VI. 1. Diagnostic mycologique direct

Le diagnostic mycologique demeure l'outil indispensable pour confirmer une infirmer une mycose ; c'est-à-dire la mise en évidence de l'agent pathogène responsable. Il est la conclusion d'un cheminement intellectuel qui conditionne la combinaison de 3 éléments :

- ✓ La bonne qualité du prélèvement.
- ✓ Expertise du spécialiste (biologiste, médecin, mycologue....).
- ✓ Le diagnostic doit être effectué à distance de toute application d'un antifongique (local ou général) (Berrichi *et al.*, 2019).

VI.1.1. Prélèvements

Tout type de prélèvement biologique peut porter contribution à l'établissement du diagnostic des aspergilloses. Il peut être ciblé, en fonction des différents points d'appel cliniques, ou sanguin pour la mise en évidence d'une dissémination hémotogène. Chaque prélèvement doit se faire dans des conditions strictes d'asepsie, dans un récipient stérile, et doit être conservé à +4°C en attendant son acheminement rapide au laboratoire (Nicolas, 2011).

Les modalités du prélèvement dépendent de la localisation des lésions et doivent être réalisés par un personnel qualifié. Les échantillons peuvent être : des selles, urines, LBA (liquide broncho-alvéolaire), LCR, biopsies, sang... (Tableau 2) (Ibnelhaj ,2010).

Tableau 3 : Différents Types des prélèvements profonds selon la localisation des mycoses

(El Hassani, 2013).

Localisations des mycoses	Types de prélèvement
Localisations broncho-pulmonaires	Lavage broncho-alvéolaire (LBA) Aspiration bronchique, Crachats
Localisations pleurale, articulaire et péritonéale.	Ponction pleurale, Liquide de ponction Liquide de dialyse, Redons et drains
Localisation cérébrales	Ponction lombaire (PL)
Septicémie	Sang ou cathéters centraux
Tissus profonds	Biopsie

Le délai d'acheminement est de 24h pour ces prélèvements sauf pour la ponction lombaire où le délai maximal est de 24h. Le recueil des produits pathologiques doit se faire en flacon stérile (1ml, 20ml).

Un prélèvement sanguin sera réalisé; mais dans la plupart des cas, du LBA sera prélevé au niveau endobronchique, il reste le prélèvement de choix. Le LBA sera idéalement ponctionné par fibroscopie laquelle donnera des prélèvements de meilleure qualité. Il permet d'obtenir une grande quantité de sécrétions réparties entre fractions alvéolaires et bronchiques (Dorfmueller et Ghigna, 2011).

L'analyse des crachats peut aussi être utilisée pour subir ensuite par examen cytotatériologique. Elle présente l'avantage de ne pas être invasive et facile à réaliser. Il y a cependant un risque de contamination oro-pharyngée (Dorfmueller et Ghigna, 2011).

La biopsie de sites profonds (prélèvements sinusiens, oculaires, cérébraux, cardiaques, digestifs, rénaux ...) C'est un examen rapide et de valeur diagnostic importante pour une AI. Il consiste à découper les fragments organiques en petits morceaux et les recueillir dans un flacon stérile. Le prélèvement est partagé en deux, une partie est réservée à l'examen direct et à la mise en culture. Parallèlement, la deuxième partie du prélèvement est fixée (liquide de Bouin) par le préleveur au laboratoire et envoyée pour un examen anatomopathologique (Dif et Edjekouane, 2016).

VI.1.2 Examen direct

L'examen direct est le plus simple et le plus rapide pour le diagnostic mycologique (Chabasse et Contet-Audonneau, 2003). Il permettra d'affirmer le caractère pathogène du champignon qui repose sur les méthodes d'examen microscopique des produits biologiques issus des lésions. Cet examen s'effectue en milieu humide entre lame et lamelle, à l'état frais avec éventuellement ajout d'un agent dissociant comme la potasse à 10%, qui permet d'éclaircir le milieu, ou le bleu lactique. Lorsque l'examen direct est positif, il permet de mettre en évidence les filaments mycéliens de type aspergillaire (Figure 20). Ces derniers mesurent entre 2 et 4 µm de diamètre. Ils apparaissent hyalins, septés et présentant parfois des ramifications à angle aigu. L'observation des têtes aspergillaires est beaucoup plus rare (prélèvement au cours de sinusite, otite ou aspergillome) mais offre une forte spécificité. Certaines méthodes de marquage ou de coloration (imprégnation argentique, coloration de May-Grünwald Giemsa) peuvent être utilisées car elles ont l'avantage d'être assez sensibles et

rapides à mettre en œuvre (Desoubeaux et Chandener 2010). Par contre si le résultat était négatif : pas de filaments cloisonnés ramifiés ni de tête aspergillaire (Zeniou et Bouraoui, 2017).

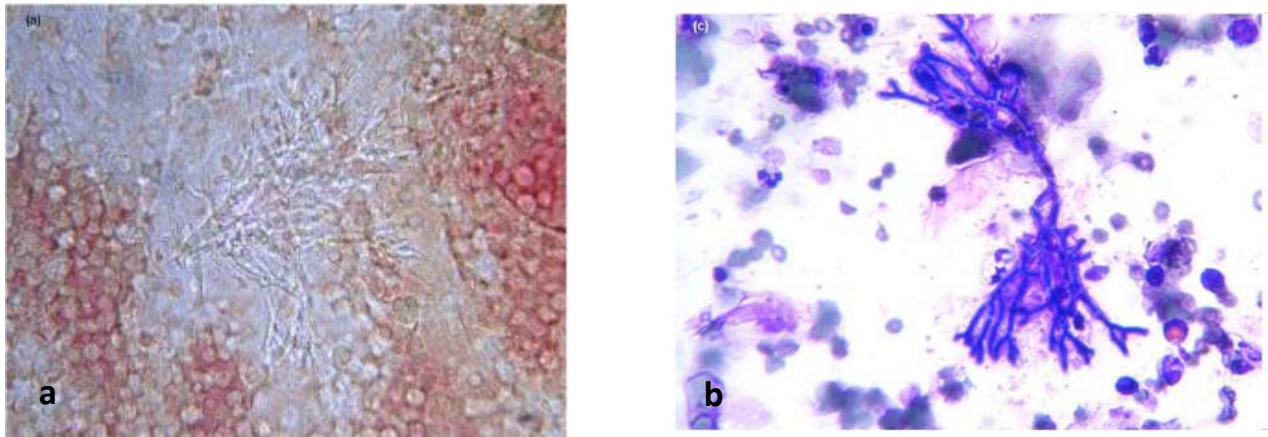


Figure 19 : Aspects mycologiques d'un examen direct positif (Dessoubeaux, 2013).Aspect typique des filaments de type aspergillaire : septés, de diamètre régulier, à bords parallèles et dont les ramifications forment des angles aigus. (a): état frais, grossissement x 400. (b) : coloration au M.G.G., grossissement x 400.

VI.1.3. Culture

C'est l'étape essentielle du diagnostic elle est indispensable dans tous les cas. Elle permet d'une part le diagnostic d'une mycose si l'examen direct est négatif, d'autre part l'identification précise du genre et de l'espèce du champignon en cause et la détermination de sa sensibilité aux antifongiques (Ibnelhaj, 2010). Elle est réalisée sur milieu fongique spécifique coulé sur une boîte de Pétri ou en tube (Anofel ,2014).

Les milieux que l'on utilise classiquement sont ceux de Sabouraud Dextrose Agar. On peut y ajouter des antibiotiques comme le chloramphénicol ou la gentamycine, ce qui permet de limiter les proliférations bactériennes, surtout pour les prélèvements potentiellement multi-contaminés. Par contre, il faut éviter l'utilisation d'actidione dans le milieu de Sabouraud car elle inhibe la croissance des *Aspergillus* (Anofel , 2014).

D'autres milieux peuvent être utilisés tels que :

- *Le milieu de Czapek* est également utilisé, en deuxième intention, car il permet d'étudier la macroscopie et la vitesse de croissance
- *le milieu à l'extrait de malt* peut aussi être utile, notamment car il permet un examen microscopique optimal grâce à l'apparition de fructifications abondantes (Nicolas,2011).

Le milieu de Czapek ou le milieu au malt sont utiles pour les repiquages et l'identification précise de l'espèce. Les hémocultures n'ont aucun intérêt dans le diagnostic de l'aspergillose invasive car elles ne sont que très exceptionnellement positives au cours des aspergilloses, même dans les formes disséminées, la raison en est actuellement inexplicée (Cordonnier et Herbrecht, 2000).

L'ensemencement doit évidemment être fait, par piqûre centrale, à partir de matériel stérile au point de vue microbien et mycotique. Les géloses sont ensuite placées à l'étuve et incubées à 37°C. Les *Aspergillus* se développent en moyenne en 2 à 5 jours à cette température (Dessoubes, 2013).

VI.1.4. Identification de l'espèce

VI.1.4.1. Aspect macroscopique

Les colonies filamenteuses, qui apparaissent en 24 à 48 heures, sont plates et blanches (couleur varié en fonction de l'espèce). Elles se colorent en 3 à 4 jours en noir, vert jaune ou marron en son centre et prennent un aspect poudreux, broussailleux ou granuleux selon l'espèce (Figure 22) (Tableau 3). Leur revers incolore ou jaune au départ, peut rougir ou brunir avec le temps (Benfouila, 2011).

Tableau 4 : Principaux caractères macroscopiques et microscopiques des *Aspergillus* responsables des Aspergilloses invasives (Benjamin, 2017).

Aspergillus	<i>A. fumigatus</i>	<i>A. flavus</i>	<i>A. niger</i>	<i>A. nidulans</i>	<i>A. terreus</i>
Aspect macroscopique	Blanc puis vert, vert-gris puis vert foncé à gris-noirâtre Verso : incolore, jaune, vert ou brun-rouge	Duveteux à poudreux, blanc puis jaune à jaune-vert Verso : incolore, rosé à brun rouge foncé	Blanc puis jaune puis granuleux et noirâtre Verso : incolore à jaune pâle	Duveteux à poudreux, vertes foncé à jaunâtres (cléistothèces) Verso : rougeâtre, pourpre	Duveteux à poudreux, beige à cannelle Verso : jaune à brun-orange
Tête aspergillaire	Unisériée En colonne	Radiée Uni ou bisériée	Radiée Bisériée	Bisériée en colonne courte	Bisériée en colonne longue Aspect en éventail
Conidiophore	Court (300µm), lisse, incolore, évasement progressif au sommet (aspect en massue)	Long (jusqu'à 2,5mm) souvent verruqueux incolore paroi épaisse	Long : 1,5-3mm Large: 15 - 20µm Lisse Incolore à jaune brun	Court : 75-100µm, sinueux, brun, lisse	100-250µm, lisse, incolore
Vésicule	Hémisphérique, 20-30µm, phialides au sommet	Sphérique (25-45µm)	Sphérique (30-100µm)	Hémisphérique (8-10µm)	Hémisphérique (10-16µm)
Conidies	Rondes, vertes, échinulées ou lisses 2,5-3µm	Grosses (3,5-4,5µm) globuleuses à subglobuleuses, vertes pâles, échinulées	Grosses conidies globuleuses (3,5-5µm), brunes, échinulées	Conidies (3-3,5µm), vertes, échinulées	Conidies petites (1,5-2,5µm), lisses, globuleuses à légèrement elliptiques

VI.1.4.2. Aspect microscopique

L'analyse microscopique de la culture se réalise par la technique en drapeau. Un morceau de ruban adhésif transparent type Scotch® est appliqué délicatement sur une colonie, et déposé ensuite dans une goutte de bleu de lactophénol sur une lame porte objet. Le bleu de lactophénol va imprégner les structures fongiques et faciliter la lecture au microscope (Desoubeaux , 2013).

L'identification de l'*Aspergillus* au microscope optique sera basée sur la morphologie des têtes aspergillaires (Figure 21) la morphologie et la taille des spores les dimensions et la surface des conidiophores (Adchira, 2011).

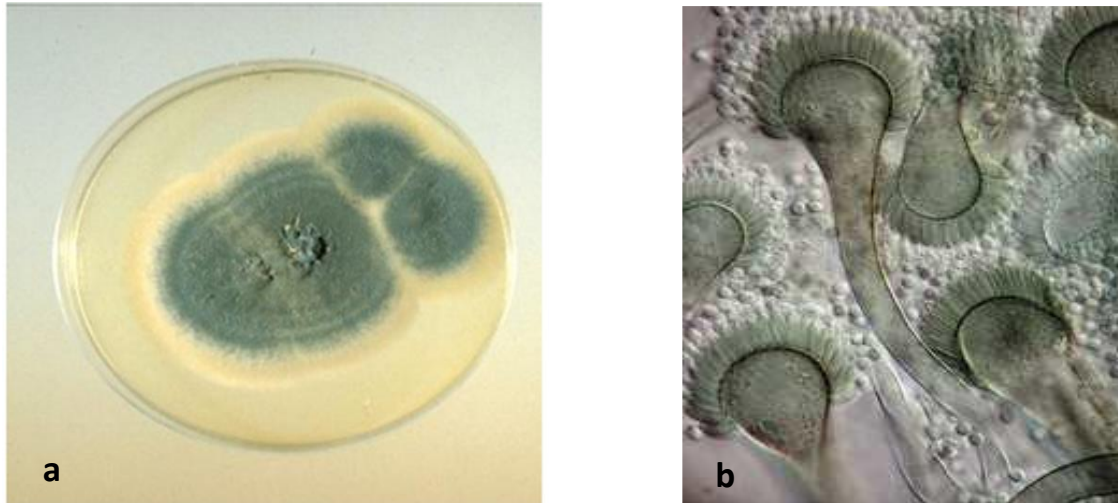


Figure 20: (a) : *A.fumigatus* sur milieu au Malt (Adchira, 2011) ; (b) : Tête aspergillaire d'*A.fumigatus* à l'examen microscopique (Thierry, 2011).

VI.2. Diagnostic indirect

Différentes approches diagnostiques non basées sur la culture ont été développées. Ces techniques sont la détection d'antigènes et d'anticorps... (Poissy *et al.*, 2014). La recherche indirecte d'*Aspergillus* comporte la recherche d'un antigène de l'agent fongique dans le sang ou un autre liquide biologique (LBA, liquide pleural, LCR) et la recherche d'anticorps anti-aspergillaire. Ces techniques sérologiques ont l'avantage d'être non invasives et permettent chez des patients fragiles de mettre en œuvre le diagnostic d'aspergillose. Elles sont le plus souvent complémentaires des techniques directes et permettent le suivi régulier du risque aspergillaire chez les patients à risque (Direm *et al.*, 2018).

VI.2.1. Détection des anticorps circulants

Des anticorps anti-aspergillaires sont alors décelables dans le sérum des malades. Cette recherche d'anticorps est un examen fondamental, car spécifique, et il traduit la présence du champignon dans l'organisme et la réaction de celui-ci (Nicolas, 2011).

Les techniques de détection des anticorps les plus utilisées sont des techniques de diffusion et de précipitation en milieu gélifié. Le nombre minimal de 3 arcs de précipitation est nécessaire pour porter un diagnostic d'aspergillose (Bamohamed, 2014).

VI.2.2. Technique d'Ouchterlony

C'est une immunodiffusion double qui consiste à mettre en évidence des arcs de précipitation. C'est une technique qualitative réalisée sur un gel d'agarose où les Ag et le sérum à tester sont déposés dans des puits préformés. Par diffusion radiale passive, des complexes immuns Ac-Ag se forment au point de contact et précipitent après un à deux jours d'incubation. La présence d'Ac sériques se traduit par l'apparition d'un ou plusieurs arcs entre les deux puits. Les arcs sont ensuite révélés par une coloration au Bleu de Coomassie (Figure 22) (Vainqueur, 2018).

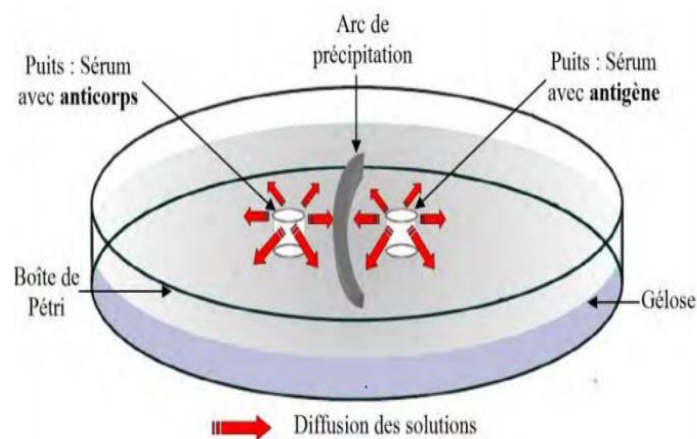


Figure 21 : Principe de la méthode d'IDD (Vainqueur, 2018).

Cette technique présente comme inconvénient de fournir un résultat tardif (4 à 5 jours). En outre, bien qu'il s'agisse d'une technique reproductible, elle manque de sensibilité et ne donne pas de résultat quantitatif. (Vainqueur, 2018).

VI.2.2.1. Protocole expérimental

➤ Préparation des gels :

- Mélanger 1,5 g d'agarose et 100 ml de tampon phosphate isotonique dans un flacon.

- Chauffer au bain marie à 100°C ou au four à micro-ondes en remuant de temps en temps jusqu'à ce que la solution soit transparente (tout l'agarose doit être parfaitement dissous). Lorsque le flacon peut être saisi dans la main sans se brûler (environ 60 °C), couler l'agarose sur son support sur une épaisseur d'environ 1 à 1,5 mm. Le support du gel peut être constitué par des boîtes de Pétri de 50 mm de diamètre, ce qui correspond à quelque 4 ml d'agarose par boîte. Pour le coulage, les boîtes doivent être disposées sur un plan parfaitement horizontal. Après coulage, laisser refroidir les gels jusqu'à solidification.

- Percer les puits dans le gel avec un emporte-pièces de diamètre 5 mm, commencer par le puits central de la boîte puis percer les autres puits autour du puits central en suivant le modèle visible sous la boîte.

- Eliminer les disques de gélose en les retirant avec une aiguille.

➤ Dépôt des solutions et diffusion

- Remplir dans chacun des puits 20 µl de la solution appropriée (dans le puits central antigènes d'*aspergillus fumigatus*, les autres puits des sérums à tester) avec la micropipette (20 µl) sans débordement ni bulles et sans endommager le gel d'agar.

- Mettre les boîtes à incuber à température ambiante dans une enceinte légèrement humidifiée par du papier filtre imprégné d'eau.

- Les résultats peuvent être lus 24 heures plus tard. Entre l'antigène et le puits central contenant le sérum, on distingue un arc de précipitation (Figure 23).

- NB : il est possible de colorer la réaction en utilisant du bleu de Coomassie qui se fixe sur les protéines, on visualise alors mieux les arcs de précipitation qui apparaissent en bleu-noir (<http://www.snv.jussieu.fr/bmedia/ATP/pressio.htm>). La vitesse de migration des substances dans la gélose dépend de la température, de la concentration des substances utilisées.



Figure 22 : Résultat positif se manifestant par un arc de précipitation
(Vainqueur, 2018)

VI.2.3. L'électrosynérèse

L'ELS est de principe comparable à celui de la double diffusion. Cette technique consiste à faire migrer les Ag et les Ac par un champ électrique en milieu tamponné, afin d'accélérer la migration. Les Ag chargés négativement migrent vers l'anode et les Ac chargés positivement migrent vers la cathode (Figure 24).

C'est une méthode qualitative, qui présente l'avantage d'être plus rapide (quelques heures) que la précédente (Warnock, 1977). Cependant, elle nécessite un équipement spécialisé et présente une sensibilité comparable à celle de la double diffusion en gel (Persat et Ranque, 2009).

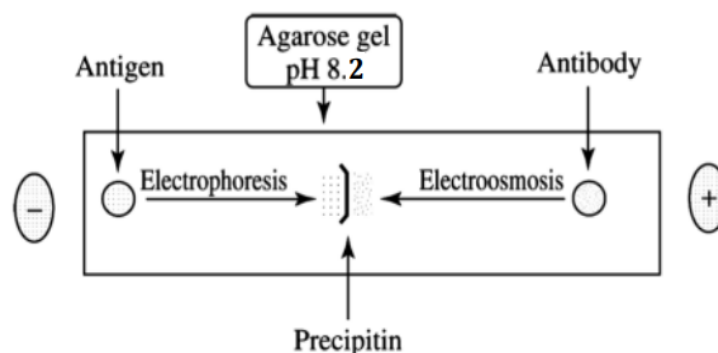


Figure 23 : Principe d'électrosynérèse (Dumollard , 2015).

VI.2.3.1. Protocole expérimental

- Les bandes d'acétate de cellulose sont conservées dans une boîte hermétiquement fermée contenant du méthanol à 35%. Avant leur utilisation, les bandes sont rincées sous agitation à l'eau distillée pendant 5 minutes, puis imprégnées dans du tampon TRIS sous agitation pendant 10 minutes. Enfin un léger essorage est réalisé.

- Le dépôt de 15 μ L de sérum réalisé du côté anode (+) de la bande se fait hors de la cuve de migration. Un dépôt de sérum témoin positif doit être ajouté pour chaque migration. 30 μ L d'antigène sont aussi déposés du côté cathode (-) de la bande hors de la cuve de migration.

- La migration se fait sous une tension de 80V pendant 2 heures, les cuves étant remplies de tampon TRIS, et la post migration pendant 5 minutes.

- Le premier lavage se fait à partir du tampon RBS (1mL de tampon RBS dilué dans 250mL d'eau physiologique) sous agitation pendant 15 minutes et le second à partir d'un tampon de migration (tampon TRIS) pendant 20 minutes sous agitation également.

- Enfin la coloration nécessite le passage de la bande dans une solution de bleu de Coomassie (1,5 g de bleu de Coomassie dilué dans 250 ml de méthanol, 250 ml d'eau distillée et 50mL d'acide acétique) pendant 5 minutes sous agitation, puis un rinçage à l'eau courante puis une décoloration à l'aide de deux bains dans le solvant de la solution de bleu de Coomassie pendant quelques minutes. La fixation se fait à l'aide d'acide acétique 10% pendant quelques secondes. La lecture se fait en posant les bandes à plat sur une plaque de verre (Mulon, 2002).

VI.2.4. Immunoélectrophorèse

Le principe de l'immunoélectrophorèse (IEP) consiste en la séparation électrophorétique du sérum sur un gel d'agarose, suivie par une double diffusion perpendiculaire à l'axe de migration des Ag et des Ac. Son résultat repose sur la visualisation d'arcs de précipitation. Chaque arc représente un complexe immun différent (Figure 25) (Persat, 2012).

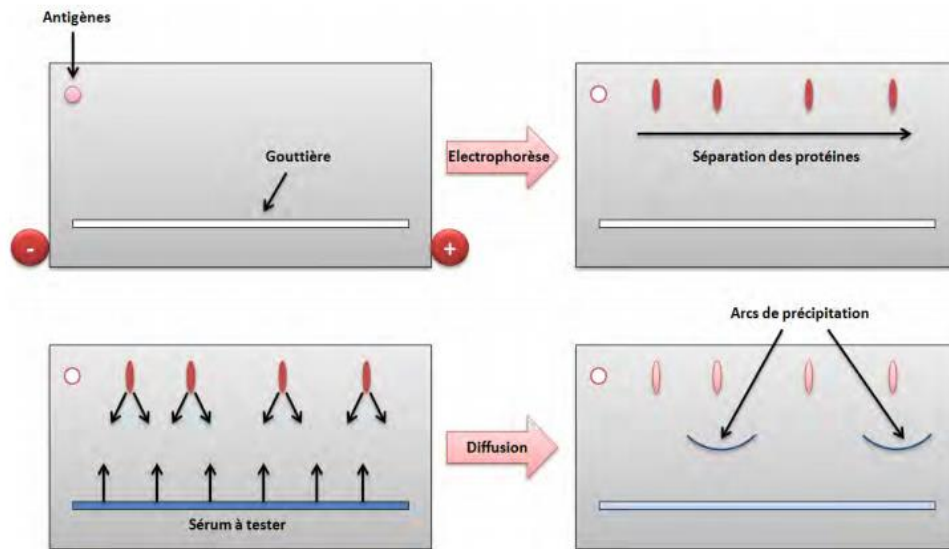


Figure 24 : Principe de l'IEP (Sheehan, 2009).

L'IEP est une technique quantitative considérée comme la technique de référence bien qu'elle présente quelques inconvénients. Il s'agit d'une technique longue à réaliser dont la lecture visuelle des arcs de précipitation nécessite un personnel expérimenté. De plus, elle manque de standardisation (Dumollard, 2015).

VI.2.4.1. Protocole expérimental

➤ Préparation des lames pré- enduites

Liquéfier la gélose à eau dans un bain marie. Aspirer 1,5 ml de gélose à eau et les couler sur des lames .Celles-ci seront placés dans l'étuve jusqu'à séchage complet.

➤ Le 1^{er} jour :

- Couler 3,5 ml de gélose véronal sur les lames pré-enduites.
- Placer les lames dans une chambre humide, constituée d'un bac en verre dans lequel est placé une compresse imbibée d'eau distillée ; laisser solidifier la gélose à 4°C pendant 30 min.
- Sur les lames précédemment préparés, tracer à l'aide de bistouris deux puits et une seule rigole d'environ 1 cm d'épaisseur .Evider le puits et y déposer 10 µl d'antigènes.
- Placer les lames dans la cuve d'électrophorèse remplie de tampon véronal.

- Former des ponts entre les lames et le tampon à l'aide de papier wattman imbibé du tampon.
- Régler le redresseur de courant à raison 5 A /lame et laisser migrer pendant 2 heures.
- Evider les rigoles à l'aide de l'aiguille d'une seringue et les remplir de 120 µl de sérum.
- Laisser diffuser à température ambiante dans une chambre humide pendant 48 heures.
 - Le 3^{ème} jour:
- Plonger les lames dans un bain de solution de lavage pendant 24 heures h.
 - Le 4^{ème} jour : Coloration, décoloration et lecture.
- Placer les lames pendant 7 minutes dans la solution colorante (rougeponceau) .
- Mettre les lames dans le bain de solution décolorante (acide acétique) pendant 5 minutes.
- Lecture des lames sur un fond blanc à la lumière du jour à la recherche d'arcs de précipitation (traits particulièrement fins) (Cherbal et Manseur , 2015).

VI.2.5. Détection d'antigènes circulants

Le diagnostic d'aspergillose invasive repose sur la surveillance de l'antigénémie aspergillaire, évaluée par la mise en évidence dans le sérum du galactomannane circulant par une méthode Elisa (Biorad®) (Kauffmann-Lacroix *et al.*, 2013).

VI.2.5.1. β -(1,3)-D-glucane

L'antigène circulant β -(1,3)-D-glucane, composant la paroi de nombreux champignons, peut être utilisé dans la stratégie de diagnostic de l'aspergillose dans le sang (Zeniou et Bouraoui, 2017). La recherche des β -D-glucanes se fait par technique colorimétrique ou turbidimétrique utilisant une sérine protéase, appelée facteur G (Direm *et al.*, 2018). Le seuil de détection de 1pg/ml de sérum est inférieur aux taux de b-D glucane observés chez les patients ayant une AI (>20pg/ml).

C'est une technique rapide et facile à réaliser. Kami *et coll* évaluent la sensibilité du test entre 27-67% et la spécificité entre 84-88%. Les inconvénients du test sont que l'antigène est commun aux principales espèces fongiques et que les quantités sériques de β -D glucane sont faibles car il s'agit d'un composant de paroi non sécrété par le champignon (contrairement au GM) (Aubry, 2005).

VI.2.5.1.1. Protocole expérimental

➤ Réalisation du dosage

Pour le dosage du BDG, le kit Fungitell® sera utilisé. Le kit contient : le réactif Fungitell® (Figure 26) (qui renferme sous forme lyophilisé le lysat d'amebocytes modifié et le substrat chromogénique) ; le tampon de reconstitution au Pyrosol ; le « Glucan standard » (pour la gamme d'étalonnage) ; de l'eau pure pour analyse (EPA) ; du KCL et KOH (pour réaliser la solution de prétraitement) ; des plaques de titration et la notice.

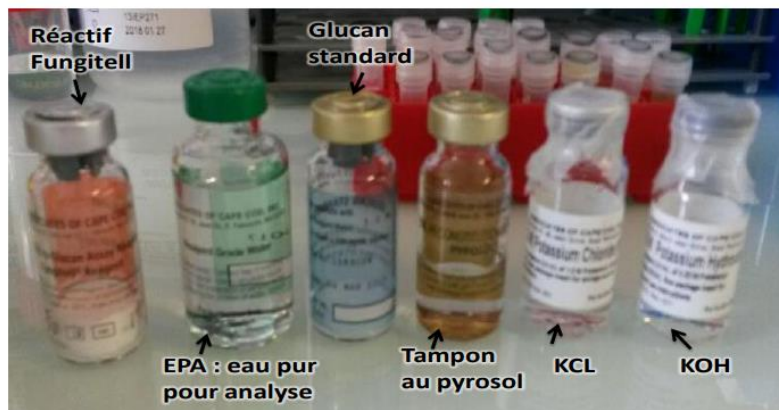


Figure 25: Contenu du kit Fungitell® (Minoza , 2015).

Hormis le « Glucan standard » l'ensemble du matériel doit être « glucan free », notamment celui non fourni par le kit (cônes, pipettes, verrerie, ...) (Minoza , 2015).

➤ Manipulation :

- Pour chaque série une gamme d'étalonnage sera réalisée variant de 31 à 500 pg/ml. Les dosages des sérums de nos patients seront réalisés en duplicata selon les recommandations du fournisseur.

- Un témoin positif sera constitué pour valider la manipulation en utilisant un sérum de patient atteint de pneumocystose et en diluant ce dernier pour être dans une fourchette de valeur entre 100 et 200 pg/ml. Le témoin négatif sera l'eau pure pour analyse fourni par le kit. Lors de la manipulation, 5µl du sérum du patient seront mis en contact avec 20µl de solution de prétraitement pour inactiver les protéases sériques et les inhibiteurs de protéase sériques potentiellement présents dans le sérum. Après 10 min d'incubation à 37°C, le réactif Fungitell® reconstitué sera ajouté.

- La lecture de la densité optique à 405 nm sera alors faite immédiatement après car la réaction débute instantanément et sera répétée plusieurs fois pendant 40 minutes (Minoza , 2015).

➤ La Manipulation spécifique au laboratoire

- Préparer la gamme d'étalonnage à partir du « Glucan Standard » reconstitué: à partir de la solution mère, préparer une série de 4 tubes pour effectuer des dilutions au demi en cascade.(500µl d'EPA dans chaque tube. Puis 500 µl de la solution mère dans le 1er tube. Puis 500µl du 1er tube dans le 2ème ...). On obtient une gamme en 5 Points 500-250-125-61.5-31 pg/ml.

- Préparer la solution de « prétraitement » : mélanger en quantité égale le KOH et KCL.(Quantité à préparer en fonction du nombre de puits à remplir (20µl/puits)).

-Déposer 5µL de sérum à tester dans chaque puits patient et témoin positif (toujours en double). Changer de cône pour chaque patient.

Conseil : déposer au niveau d'un angle, au fond du puits.

- Déposer 20µl de la solution de « prétraitement » dans chaque puits patient et témoin positif (toujours en double).

- Mettre la plaque dans l'automate avec le couvercle pour agiter 5 secondes (utiliser le mode agitation de l'appareil :). Sortir la plaque pour retirer le couvercle.

Laisser incuber 10 min à 37°C à l'intérieur de l'automate sans le couvercle (risque de condensation).

- Pendant ce temps : reconstituer le flacon de Fungitell : introduire 2.8ml de tampon pyrosol et 2.8 ml d'EPA. Agiter doucement. Surtout ne pas vortexer.

- A la fin des 10 min d'incubation, déposer 25µl d'EPA pour le contrôle négatif.

- Déposer 25µl de notre gamme d'étalonnage selon le plan de travail de la plaque.

- Déposer dans tout les puits 100µl de Fungitell. Utiliser un pipeteur à répétition avec un embout adapté.

- Mettre la plaque avec le couvercle dans l'automate, agiter 5-10 secondes. Retirer la plaque pour enlever le couvercle puis remettre la plaque.

- Lancer la lecture (40 min)

- Une fois la lecture terminée, enregistrer les données (Minoza , 2015).

VI.2.5.2. Galactomannane

Le galactomannane est le composant essentiel de la paroi fongique (Figure 27). Cet antigène est sécrété pendant la croissance et la lyse des champignons dans les tissus. C'est un marqueur assez sensible, précoce et spécifique des aspergilloses invasives (Zeniou et Bouraoui, 2017).

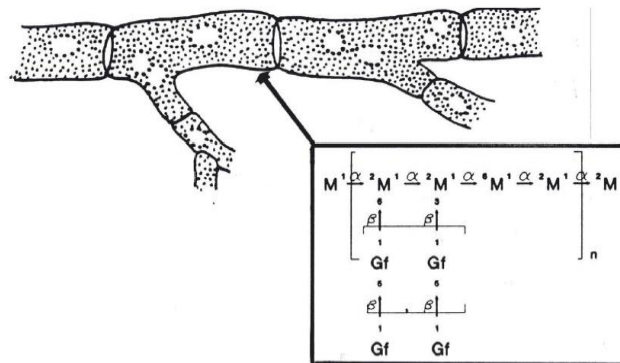


Figure 26: Structure du galactomannane (GM) (Benfouila, 2011).

Une fois libérés, il peut être détecté dans les liquides biologiques tels le sérum et le LBA (Raynard, 2018) par une méthode immuno-enzymatique. Le test ELISA sandwich (enzyme-linked immunosorbent assay (Platelia ELISA®) peut permettre le diagnostic précoce des aspergilloses invasives chez l'immunodéprimé ou chez le patient immunocompétent eu début d'infection aspergillaire (Bretagne *et al.*, 1998) en utilisant un Ac monoclonal de rat EB-A2 à la fois comme capteur et comme détecteur de galactomannane, qui est actuellement commercialisé (Platelia®Aspergillus, BioRad). La limite de détection est de 1 ng/ml (Mennink-Kersten *et al.*, 2014).

De nombreuses techniques de détection du GM ont été utilisées et en particulier l'agglutination de particules de latex sensibilisées (Pastorex®Aspergillus, BioRad), première technique à être commercialisée pour la détection de l'antigène galactomannane d'*Aspergillus*. Elle est spécifique à 65 - 99 % (Bamohamed, 2014) (Figure 28). La réaction, après dissociation des complexes immuns et destruction des protéines, met en contact le liquide supposé contenir l'antigène et les billes de latex seront agglutinées en quelques minutes en cas de réaction positive. Mais la sensibilité des tests proposés (10–15ng/ml) est trop faible pour être utile en clinique aux stades précoces de l'infection (Mennink-Kersten *et al.*, 2014).

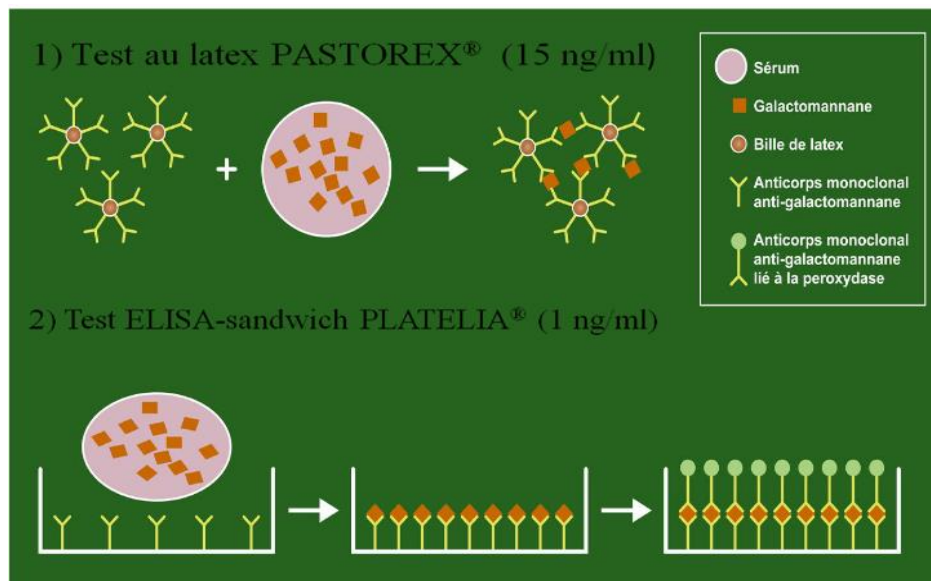


Figure 27: Principe du test au latex et test ELISA (Zeniou et Bouraoui, 2017).

L'ELISA permet aussi, dans certains cas, de détecter le galactomannane avant l'apparition des symptômes. Il permet aussi de mesurer le niveau d'antigènes et d'objectiver la réponse au traitement antifongique (Latge, 1999).

VI.2.5.2.1. Protocole expérimental d'ELISA Platelia® Aspergillus

- Un volume de 100 µl de chaque sérum est placé dans un tube Eppendorf de 1,5 ml. Un volume de 33 µl de solution d'acide d'EDTA est introduit dans chaque tube.
- Le mélange est homogénéisé au vortex, puis placé à 100°C pendant 3 minutes.
- Centrifuger à 10000 t/min pendant 10 minutes et récupérer le surnageant. Quatre sérums témoins fournis avec le test sont préparés à l'identique. Il s'agit d'un sérum de contrôle négatif, deux sérums seuils (1 ng/ml de galactomannane) et un sérum de contrôle positif (10 ng/mL de galactomannane).
- Dans les puits sensibilisés avec l'Ac monoclonal EB-A2 (dans lesquels va se réaliser la réaction) :
- Déposer 50µl/puits de conjugué (Ac monoclonal anti-GM marqué à la peroxydase).
- Ajouter 50µl du surnageant.

- Incuber la microplaque dans un incubateur sec à 37° pendant 90 minutes. Après incubation, la plaque est lavée 5 fois avec une solution de tampon TRIS-NaCl de pH 7,4 contenant 1% de Tween 20 et 0,01% d'un conservateur, le thimesoral. Elle est ensuite séchée sur du papier absorbant.
- Laver la plaque 5 fois (avec une solution de tampon TRIS-NaCl de pH 7,4 contenant 1% de Tween 20 et 0,01% d'un conservateur, le thimesoral.) en remplissant les puits de 370µl de solution de lavage.
- Distribuer 200µl/puits de la solution de révélation par l'ajout dans chaque cupule de 200 µl d'une solution de diméthylsulfoxyde (DMSO).
- Laisser à l'obscurité pendant 30 minutes à température ambiante.
- Arrêter la réaction enzymatique en ajoutant 100µl/ puits d'acide sulfurique 1,5N.
- Lecture dans les 30 minutes est effectuée par un spectrophotomètre à la longueur d'onde de 620 nm (Guillaume, 2005).

VI.3. Diagnostic moléculaire

La biologie moléculaire a sa place dans le diagnostic des infections aspergillaires, notamment différentes méthodes PCR (Polymerase Chain Reaction) existent pour le diagnostic de l'aspergillose invasive. Elles diffèrent par leurs protocoles d'extraction, d'amplification et de détection (Direm *et al.*, 2018).

Plus récemment, il a été appliqué au diagnostic de l'aspergillose, les techniques de biologie moléculaire avec l'utilisation soit d'amorce spécifique d'*Aspergillus* sp ou d'*A. fumigatus*, soit de primers universels permettant de reconnaître l'ADN fongique. L'identification du genre voire de l'espèce en cause étant assurée par hybridation avec des sondes spécifiques. Ces techniques ont été appliquées sur plusieurs types de prélèvements le lavage broncho-alvéolaire, les urines, le sérum et le sang total (Baudet, 1999).

A l'heure actuelle Il existe différentes types de PCR pour détecter l'ADN d'*Aspergillus* spp. au cours de l'AI : PCR classique, PCR panfongique, PCR en temps réel, la PCR nichée.

La PCR est une technique d'amplification de séquence nucléique, décrite par Mullis en 1985. Elle est devenue un outil quasi universel dans le domaine de la biologie : elle permet d'obtenir en quelques heures plusieurs millions de copies d'une séquence donnée d'ADN.

Son principe est d'utiliser de façon répétitive l'activité d'une ADN polymérase pour copier la séquence d'ADN à amplifier, sous forme de brin complémentaire d'un ADN servant de matrice. Le processus est initié par la fixation d'amorces oligonucléotidiques (≈ 20 pb) (primers) (Figure 29), de séquences complémentaires de l'un et l'autre des brins à amplifier. Elles délimitent la longueur du fragment à amplifier. La PCR consiste en une succession cyclique de 3 étapes :

- 1ère étape : dénaturation thermique de l'ADN $\approx 94^{\circ}\text{C}$.On sépare par la chaleur les 2 brins d'ADN par rupture des liaisons hydrogène. L'ADN passe sous forme de simple brin et les 2 brins peuvent alors servir de matrice.
- 2ème étape : hybridation des amorces ≈ 45 à 65°C .Les amorces, en large excès, s'hybrident à tout ADN comportant la séquence complémentaire.
- 3ème étape : élongation (ou extension) des amorces $\approx 72^{\circ}\text{C}$. L'ADN polymérase (Taq polymérase) allonge les amorces en incorporant des dNTP complémentaires de la séquence de la matrice à laquelle elle est hybridée. La synthèse se fait dans le sens $5' \rightarrow 3'$ (Djezzar-Mihoubi, 2006)

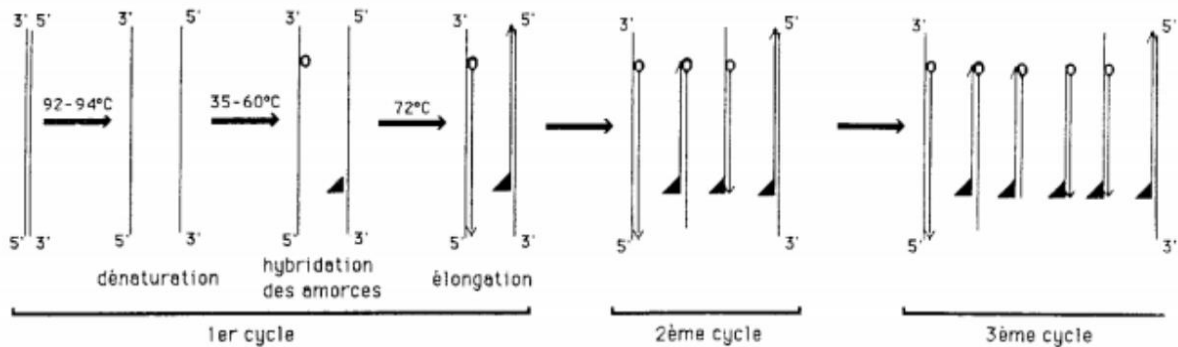


Figure 28 : principe de la PCR (Raynard, 2018).

Dans cette étude, nous avons choisis le protocole d'une PCR classique adopté pour l'identification de la souche *Aspergillus fumigatus*.

VI.3.1. Protocole expérimental

VI.3.1.1. Mise en culture de la souche

Une suspension de spores d'*A. fumigatus* est ensemencée sur boîte de Pétri (gélose Sabouraud-Chloramphénicol-Gentamicine, Bio-Mérieux). Les boîtes sont incubées 24 h à 42°C. Une colonie étoilée et parfaitement isolée est alors récupérée à l'ose et mise en suspension dans 500µl d'un milieu de culture «Sabouraud liquide» et placée 72 h à 42°C sous agitation. *A. fumigatus*, champignon thermotolérant, se développe à 42°C ce qui limite le risque de contamination. Les autres souches d'*Aspergillus* et de chaque champignon filamenteux seront mises en culture à 24°C (Baudet, 1999)

VI.3.1.2. Extraction de l'ADN fongique

VI.3.1.2.1. Lyse du mycélium

Après centrifugation, le culot est lavé par 400 µl de TE (Tris-HCl 10mM, pH7,5; EDTA 1mM), puis extrait par 300 µl de tampon d'extraction (Tris-HCl 200mM, pH8,5 ; NaCl 500mM ; EDTA 25mM ; SDS 1 %) et enfin placée à -20°C. La lyse du mycélium est favorisée par le broyage de la colonie congelée à l'aide d'un piston de polypropylène et sous l'action de la protéinase K (Sigma) à 10 µg/µl pendant 1h à 55°C sous agitation (38). 2-2-Extraction de l'ADN Une première extraction par le phénol permet d'enlever des protéines. Les traces de phénol sont éliminées par un lavage au chloroforme-alcool isoamylique. L'ADN est précipité dans l'isopropanol froid. Les ARN sont dégradés par 15 µl de RNase 10 µg/µl à 37°C pendant 1h 30, 2 fois consécutives.

L'ADN, extrait par le phénol-chloroforme, est précipité dans 0.1 V d'acétate de sodium 3M pH5,2 et 2,5V d'éthanol absolu pendant 30 mn à - 80°C puis dans l'éthanol à 70%. Le précipité est séché au «speed vac», repris dans 30µl de TE et congelé à -20°C (schéma n°2). La concentration d'ADN est mesurée au spectrophotomètre à 260 nm. En effet, les bases puriques et pyrimidiques absorbent à 260 nm. Les protéines absorbent non seulement à 280 nm mais aussi à 260 nm. L'extrait doit avoir un rapport D0260/D0280 compris entre 1,8 et 2. On obtient la concentration en µg/µl (Baudet, 1999).

VI.3.1.3. Polymerase Chain Reaction

VI.3.1.3.1. Conditions d'amplification

VI.3.1.3.2. Préparation du milieu réactionnel

La réaction d'amplification est effectuée dans 30 µl d'un mélange, préparé sous une hotte contenant : Tampon d'amplification: 67 mM Tris-HCl pH 8.8, 16 mM (NH₄)₂SO₄, 0.01% Tween 20 MgCl₂: 3mM dATP, dCTP, dGTP : 200 µM dUTP: 400 µM Asp 1, Asp 2: 0,8 µM (chacune) UNG:0,3U Taq Polymérase thermostable: 0,75 U Eau stérile qsp 30µl Le milieu réactionnel est recouvert d'une goutte d'huile minérale pour éviter l'évaporation. L'ADN, dilué en série, est ajouté au dernier moment sous l'huile minérale. Un témoin négatif contenant tous les composants nécessaires à la PCR, excepté l'ADN, est préparé en parallèle.

VI.3.1.3.3. Le cycle thermique

La réaction est effectuée dans un appareil automatique le «Perkin Elmer Cetus thermal cycler ®» (CETUS CORPORATION). Les produits PCR issus d'une amplification précédente sont dégradés par l'UNG pendant 10 mn à 45°C. Puis l'ADN est dénaturé pendant 7 mn à 94°C. Le cycle thermique va alors commencer et se répéter 40 fois selon la chronologie suivante : - dénaturation de l'ADN : 30 s à 94 °C - appariement des amorces : 30 s à 62°C - élongation par l'ADN polymérase : 1 mn à 72°C L'extension finale est réalisée à 72°C pendant 5 mn.

VI.3.1.3.4. Révélation sur gel d'agarose

La visualisation de la portion d'ADN amplifiée est obtenue après électrophorèse sur gel d'agarose. Pour une taille de fragment inférieure à 1 Kb, un gel à 1,5 % d'agarose est préparé. Du bromure d'éthidium, agent intercalent de l'ADN et fluorescent au UV, est incorporé au gel à raison d'une goutte pour 100 ml de TAE (Trisacétate-EDTA). Vingt µl de produit amplifié et 2 µl de bleu de bromophénol, pour visualiser le dépôt, sont déposés dans chaque puits. Vingt µl d'un témoin de poids moléculaire, le 1 Kb ladder (US Patent) sont déposés en parallèle. Après migration, le gel est observé sous UV puis photographié (Baudet, 1999).

VI.4. Diagnostic anatomo-pathologique

L'analyse d'une biopsie tissulaire est un examen réalisé par les anatomo-pathologistes. Il consiste à mettre en évidence par un examen microscopique après colorations la présence du champignon. Le diagnostic de l'AI nécessite donc la mise en évidence de filaments mycéliens septés et ramifiés à angle aigu de 45° dits en « Y » sur la biopsie, évocateurs de filaments aspergillaires (Figure 30). Cet aspect n'est cependant pas spécifique d'*Aspergillus* mais permet de conforter une infection (Denning, 1998).

Les colorations utilisées sont principalement :

- ***L'imprégnation argentique de Gomori-Grocott*** : Cette technique colore spécifiquement et de façon intense la paroi des champignons dans les tissus (El Hassani, 2013).
- ***Coloration à l'acide périodique Schiff (PAS)*** : elle met en évidence l'oxydation de certains polysaccharides. Elle peut aider au diagnostic des tumeurs et aussi de détecter des maladies fongiques (mise en évidence les filaments et les spores qui seront colorés en rouge. Coloration due à la leucofushine de Schiff) (Mihoubi, 2021).
- ***Coloration May-Grünwald Giemsa*** : elle repose sur l'action combinée de deux colorants neutres :

* Le May-Grünwald, contenant un colorant acide, l'éosine, et un colorant basique, le bleu de méthylène.

* Le Giemsa, contenant lui aussi le colorant acide, l'éosine, et un colorant basique (qui est métachromatique), l'azur de méthylène

Ces deux colorants sont en solution dans l'alcool méthylique sous forme inactive. Lors de l'addition d'eau, les sels (éosinate de méthylène et azur de méthylène) précipitent et se fixent sélectivement sur les constituants cellulaires.

- ***L'hématéine-éosine-safran (HES)*** : Cette coloration est particulièrement indiquée pour étudier la réaction de l'hôte à la présence du parasite (El Hassani, 2013).

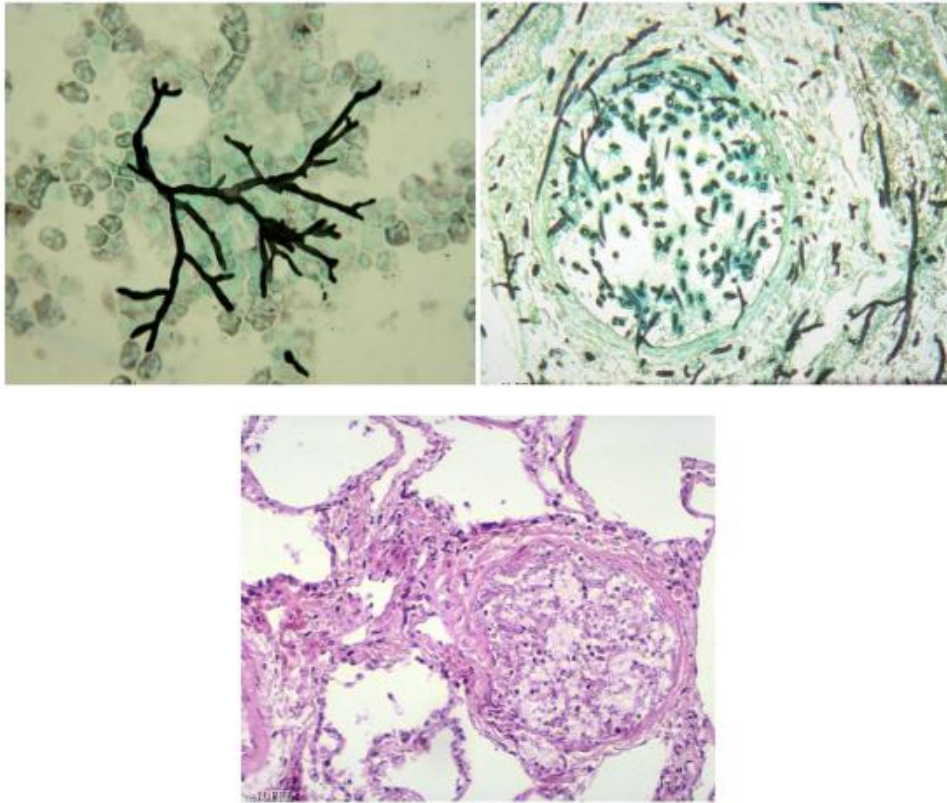
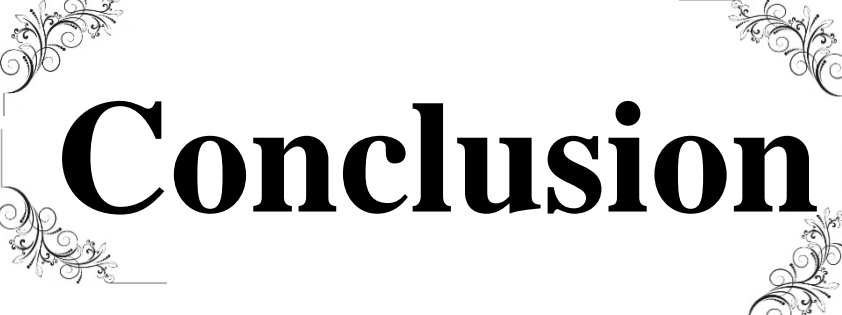


Figure 29: Aspect de l'Aspergillus dans des sections de tissus: coloration de Gomori-grocott en haut et à l'HES en bas (Benfouila, 2011).



Conclusion

Aspergillus est un genre qui est impliqué en pathologies humaines en causant différentes formes d'aspergilloses, notamment l'aspergillose invasive qui est considérée comme étant la forme la plus grave des aspergilloses car elle se propage au niveau de tout le corps rendant le diagnostic difficile. De plus, la fréquence d'apparition de cette pathologie a augmenté à cause du nombre croissant des sujets à risques (immunodéprimé). L'agent pathogène responsable le plus fréquent c'est *Aspergillus fumigatus*.

Les champignons du genre *Aspergillus* étant des moisissures largement distribuées dans l'environnement mais ne sont pas au premier plan du point de vue des maladies infectieuses humaines en Algérie. Cependant, dans le monde elles sont très importantes et peuvent être responsables de 74 à 92% des cas de mortalité (Abdelhadi et Boukhrouf, 2011).

La stratégie diagnostique actuelle pourrait bénéficier de l'apport des techniques de biologie moléculaire telles que la «Polymerase Chain Reaction». En effet, la PCR a déjà trouvé sa place dans le diagnostic d'autres maladies infectieuses, dues à des organismes eucaryotes comme la toxoplasmose. Des études récentes ont montré que la PCR pourrait améliorer le diagnostic de l'AI. En matière de *PCR-Aspergillus*, il n'existe pas encore de consensus ni sur la nature du prélèvement biologique ni sur le choix de la séquence à amplifier.

Enfin, de part cette étude prospective, nous nous sommes intéressées à mettre en exergue les principales méthodes mises en œuvre pour la détection et la prise en charge des aspergilloses invasives, particulièrement, celles causées par *A. fumigatus*. Par ailleurs, ce manuscrit pourrait représenter un support intéressant, pour les étudiants ainsi que pour les manipulateurs potentiels au niveau des laboratoires.



Références



Bibliographiques



A

1. Abdelhadi A, Boukhrouf F. Z. (2011).Pathologies humaines causée par 1 les espèces du genre *Aspergillus*. Mémoire de master : Microbiologie. Université de Jijel.70p.
2. Adchira, F (2011).les rhinosinuites fongiques Etude prospective à l'hôpital militaire d'instruction. Thèse ; pharmacie. Rabat. Université Mohammed v.148p.
3. Amri A, Gorcii M, Essabbah N, Belhajali H, Bru VL, Zili J, Azaiez R , Babba H. *Aspergillus sclerotiorum* à propos d'un cas d'otomycose en Tunisie. J Mycol Med, 2010, 20: i28-132.
4. Association Française des Enseignants de Parasitologie et Mycologie. ANOFEL.(2014) *Aspergilloses et autres champignons filamenteux opportunistes*.
5. Auboyer C, Jospe R, Mahul P. (1998). Les aspergilloses invasives en réanimation. Conférences d'actualisation.
6. Aubry, A.(2005).Etude des faux positifs liés au test platelia® *aspergillus* lors de l'administration de β -lactamines en hématologie.Thèse de doctorat : médecine .Université paris val-de-marne.81p.

B

7. Badillet G, DeBievre C, Gueho E. , (1987).Champignons contaminants des cultures. In : Atlas clinique et biologique,TomeII.Paris : éditions Varia.
8. Balajee, S. A., Houbraken, J., Verweij, P. E., Hong, S. B., Yaguchi, T., Varga, J., & Samson, R. A. (2007). *Aspergillus* species identification in the clinical setting. *Studies in mycology*, 59, 39-46.
9. Bamohamed, H.(2014). Les aspergilloses invasives en oncohématologie. 2014. Thèse de doctorat : Pharmacie .Université mohammed V – RABAT.88p.
10. Baudet , D.(1999) Mise au point de la PCR-*aspergillus* en vue du diagnostic biologique de l'aspergillose invasive. Thèse de Doctorat en pharmacie Université joseph fouriere de grenoble .99p.
11. Benfouila, F M.(2011). Interet de la recherche de l'antigène galactomannane dans le diagnostic de l'aspergillose pulmonaire invasive:Expérience du laboratoire de parasitologie mycologie de l'hmmim v. Thèse de doctorat :pharmacie.Rabat.Universite mohammed .121p.
12. Benjamin,V. (2017).Pertinence de prise en charge des aspergilloses invasives au CHU d'Amiens. Thèse en vue du diplôme d'état de docteur en pharmacie: Pharmacie hospitalière et des collectivités.Université de picardie jules verne -U.F.R. 54p.

13. Berny, L., H. Benjelloun, N. Zaghba, et N. Yassine. 2017. «Les différents aspects radiologiques de l'aspergillose pulmonaire». *Revue des Maladies Respiratoires* 34: A103.
14. Berrichi .S , Chendri . M , Bouizeri. A (2019) .Caractérisation physico-chimique et essais de sensibilité du fluconazole sur différentes espèces fongiques Thèse de doctorat : en Pharmacie , Université Mouloud MAMMERRI Faculté de Médecine Tizi-Ouzou, 131 P.
15. Blandin, S., David, G. (2008). L'aspergillose en pratique pour le pneumologue. *Revue de Pneumologie Clinique*, 64(4), 202-210.
16. Botton B, Breton A, Fevre M, Gauthier S, Guy PH, Larpent JP, Reymond P, Sanglier JJ, Vayssier Y et Veau P (1990). Moisissures utiles et nuisibles, importance industrielle. 2ièmeEd. Masson. 426p.
17. Bretagne S, Costa JM, Bart-Delabesse E, Dhedin N, Rieux C, Cordonnier C (1998).Comparison of serum galactomannan antigen detection and competitive polymerase chain reaction for diagnosing invasive aspergillosis. *Clin Infect Dis*. 26:1407–12.

C

18. Casselton, L. et Zolan, M. (2002). The art and design of genetic screens: filamentous fungi. *Nat Rev Genet*, 3(9), 683-697.
19. Chabasse D, et al.(2002).Les moisissures d'intérêt médical: BIOFORMA.
20. Chabasse, Dominique, et Nelly Contet-Audonneau. (2003). Examen direct et place de l'histologie en Mycologie. *Revue Française des Laboratoires* (357): 49–54.
21. Cherbal.S et Manseur. S.(2015).Hydatidose humaine à *Echinococcus granulosus* (Plathelminthes: Cestoda) dans la région de Tizi-Ouzou. Dépistage par la sérologie. Mémoire de Master: Sciences de la Nature et de la Vie: Parasitologie appliquée aux organismes animaux et végétaux : Université mouloud Mammeri de Tizi-Ouzou. 94 P.
22. Cordonnier, C., Herbrecht, R. (2000). *Infections en hématologie*. John Libbey Eurotext.
23. Cornet M, Fleury L, Maslo C, Bernard JF, BrückerG (2002).Invasive Aspergillosis Surveillance Network ofthe Assistance Publique-Hôpitaux de Paris. Epide-miology of invasive aspergillosis in France: a six-year multicentric survey in the Greater Paris area.*J Hosp Infect.*; 51(4): 288-96.

D

24. Delhaes L, Leroy S, Cameiro P, Ache S, Préalles E, Grunderbeeck NV, Cas ED, Wallaert B. Conduite à tenir face au risque d'aspergillome pulmonaire chez un patient atteint de maladie de Wegener. *J Mycol Med*, 2010, 20 (3): 231-234.
25. Delorme, J. (1997). *Mycologie médicale*. Mont-Royal, Qué. : Centre collégial de développement de matériel didactique. Décarie éditeur.
26. Denning, D. W. (1998). Invasive aspergillosis. *Clinical infectious diseases*, 781-803.
27. Desoubeaux, G. (2013). Apport de la protéomique dans l'amélioration de l'exploration de l'aspergillose pulmonaire invasive à partir d'un modèle murin. Thèse de doctorat, Ecole doctorale Ssbcv. France : université François-Rabelais de Tours. 162p.
28. Desoubeaux, G., et Chandénier, J. (2010). *Aspergillus et maladies aspergillaires*. Feuilles de Biologie, 51(293), 53-63.
29. Dif H, Edjekouane M. (2016). Recherche d'antigènes candidosiques chez les patients à haut risques au niveau du C.H.U. de Tizi-Ouzou. Mémoire de fin d'études : Parasitologie appliquée aux organismes animaux et végétaux. Université mouloud Mammeri de Tizi Ouzou. 90p.
30. Direm, M. Amamra, I. Belabbes, S. Ajabi, H. (2018). Les aspergilloses : Cas diagnostiqués au CHU Constantine. Mémoire de fin d'étude de l'obtention du diplôme de docteur en pharmacie. Constantine. Université 3 : Faculté Médecine. 91p.
31. Djezzar-Mihoub, I. (2006). Etude des leishmanioses diagnostiquées au centre hospitalo-universitaire ben baddis de Constantine. Thèse du diplôme : Doctorat d'Etat en Microbiologie. Université Mentouri Constantine. 119 p.
32. Dokkari, A. Rekhom, W. (2018). Diagnostic des mycoses superficielles. Mémoire de Master: mycologie et biotechnologie fongique. Université des Frères Mentouri Constantine Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie. 127p.
33. Dominique, B. (1999). Mise au point de la PCR-aspergillus en vue du diagnostic biologique de l'aspergillose invasive. Thèse de Doctorat en pharmacie Université Joseph Fourier de Grenoble. 99p.

34. Dorfmueller P, Ghigna MR. (2011) Lavage bronchioloalvéolaire. In: Encyclop Med Chir Pneumologie.
35. Dumollard , C.(2015).Evaluation prospective d'un nouveau kit Elisa pour la detection des IGG anti-aspergillus dans le diagnostic des aspergilloses pulmonaires chroniques et allergiques thèse de doctorat : pharmacie Université Joseph Fourier Faculté de pharmacie de Grenoble .99 p .
36. Dumollard,C.(2015).Evaluation prospective d'un nouveau kit ELISA pour la détection des IgG anti-Aspergillus dans le diagnostic des aspergilloses pulmonaires chroniques et allergiques.Thèse de doctorat :Sciences pharmaceutiques.Grenoble :Université Joseph Fourier .99p.
37. Dupont B. Candidoses, Cryptococcoses, Aspergilloses. (1981). Ceprime éd., Paris, 96p.
38. Dyer, P. S. et Paoletti, M. (2005). Reproduction in *Aspergillus fumigatus*: sexuality in a supposedly asexual species? *Med Myco*, 43 ; 1, S7-14.

E

39. El Hassani, N.(2013).Les mycoses: étude d'une série répertoriée au service de parasitologie-mycologie médicale de l'hôpital Ibn Sina de Rabat sur une période de 5 ans . Thèse de doctorat : Pharmacie. Université Mohammed V--Rabat. 199p.
40. Elise M. (2015) Aspergillose aviaire : Développement d'un modèle d'aspergillose chez la dinde(*Meleagris gallopavo*) et évaluation de l'efficacité de l'énilconazole .Thèse de doctorat : Agro Paris Tech, Institut des Sciences et Industries du Vivant et de l'Environnement ,244p.
41. Elmghari, M., N. Zaghba, H. Benjelloun, et N. Yassine. 2017a. « Intérêt de la bronchoscopie dans les aspergillomes pulmonaires ». *Revue des Maladies Respiratoires* 34 : A101.
42. Estelle B.(2021).Santé sur le net maladie infectieuses Aspergilloses(en ligne).(page consultée le 21/04/2021)<https://www.sante-sur-le-net.com/maladies/maladies-infectieuses/aspergilloses/>

G

43. Gangneux JP, Guiguen C. Modifications récentes de l'épidémiologie des mycoses invasives. *Rev Franc Labo*, 2007, 396: 85-89.
44. Germaud, P. 2005. *Aspergillus* et système respiratoire. *EMC-Médecine* 2 (6): 585–595.
45. Gugnani H.C. (2003). *Ecology and taxonomy of pathogenic Aspergillus*. Institut Saint James school of Medicine. Department Microbiology and Epidemiology.
46. Guillaume, L. E. (2005). *Diagnostic sérologique de l'aspergillose chez les oiseaux*. Thèse de doctorat : Vétérinaire, à Faculté de Médecine de Creteil .École nationale vétérinaire d'Alfort. 110p.

H

47. Herbrecht R, Oprea C, Natarajan-Ame S, Letscher-Bru V, Waller J. (2001). Les critères diagnostiques des aspergilloses invasives. *La lettre de l'infectiologie*, 16(4), 114-120.
48. <http://www.snv.jussieu.fr/bmedia/ATP/pressio.htm> Jussieu Biology and Multimedia web site consulté le 07.06.2021.

I

49. Ibnelhaj, H. (2010). *Mycoses opportunistes et immunodépression*. Thèse de doctorat : Pharmacie. Université Mohammed V. rabat. 189p.

K

50. Kauffmann-Lacroix, C., M. Arvier, M. Charron, M.-H. Rodier, et A. Vassault. (2013). Validation d'une méthode Elisa pour la recherche de l'antigène aspergillaire galactomannane en vue de l'accréditation. *Journal de Mycologie Médicale/Journal of Medical Mycology* 23 (1): 33–39.
51. Kaur S, Singh S. (2013). Biofilm formation by *Aspergillus fumigatus*. *Med Mycol*.
52. Ketfi, A. Ihadadene, D. Jaafar, M., Djillali, Y. Gharnaout, M. (2015). Profil radioclinique, diagnostique et thérapeutique de l'aspergillose pulmonaire. *Revue des Maladies Respiratoires*, 32, 176.

53. Khechmar D,Zaafri S.(2017).Activité antifongique de quelques huiles végétales sur les champignons responsables de mycoses humaines. Mémoire de Master .Microbiologie Appliquée et Sciences Alimentaires : université Mohammed Seddik Ben Yahia .JIJEL.60p.
54. Koren, O., Knights, D., Gonzalez, A., Waldron, L., Segata, N., Knight, R., ... & Ley, R. E. (2013). A guide to enterotypes across the human body: meta-analysis of microbial community structures in human microbiome datasets. *PLoS Comput Biol*, 9(1).

L

55. LatgéJ-P.(1999).Aspergillus fumigatus and Aspergillosis. *Clinical Microbiology Reviews*. 12(2):310-350.
56. Loeffert, S., P. Vanhems, M. Janez, P. Cassier, C. Dananche, T. Benet, M. Perraud, et M. Gustin. 2016. Impact des paramètres météorologiques sur la dispersion d'Aspergillus spp. à l'extérieur et l'intérieur des unités de soins lors de travaux majeurs à l'hôpital. *Journal de Mycologie Médicale/Journal of Medical Mycology* 26 (2): 35.

M

57. Makhlof,J.(2019).Caractérisation de la biodiversité des souches d'Aspergillus de la section Flavi isolées d'aliments commercialisés au Liban: approche moléculaire,métabolique et morphologique. Thèse de doctorat : Pathologie, Toxicologie,Génétique et Nutrition. Toulouse : Université de Toulouse, 142P.
58. Makni F, Cheikhrouhou F, Sellami A, Charfeddine 1, Gorbel A, Ayadi A. Les sinusites aspergillaires à propos de trois cas dans l'hôpital de Sfax Tunisie. *J Mycol Med*, 2008, 18: 103-105.
59. Marie-Pierre.Hayette (2002) Apport de la réaction de polymérisation en chaîne de diagnostic de l'aspergillose invasive. Thèse de doctorat : médecine Université de Liege ,70 p.
60. Massou S, Azendour H, Nebhani T, Lmimouni BE, Azendour B, Belkhi H, Haimeur.(2010). A. Aspergillose invasive du cavum associé à une méningite à Candida albicans. *Med et Maladies Infect*, 2010, 40 : 112-114.

61. Mennink-Kersten MA, Donnelly JP, Verweij PE. (2004) Detection of circulating galactomannan for the diagnosis and management of invasive aspergillosis. *Lancet Infect Dis.* 4:349–57.
62. Mihoubi,I.(2021) . Cours Technique d'analyse mycologique.identification des champignons d'intérêt médical.
63. Milla, C. E. et Moss, R. B. (2015). Recent advances in cystic fibrosis. *Curr. Opin. Pediatr.* 27, 317–324.
64. Minoza , A (2015) .Apport de la détection du (1-3) β -D-glucane au diagnostic de l'aspergillose invasive pulmonaire: expérience nantaise.Thèse De Doctorat : pharmacie .Université de nantes ufr sciences pharmaceutiques et biologiques 112 p .
65. Mori, T., Matsu mura, M., Yamada, K., Irie, S., Oshimi, K., Suda, K., et Ichinoe, M. (1998). Systemic aspergillosis caused by an aflatoxin-producing strain of *Aspergillus flavus*. *Medical mycology*, 36(2), 107-112.
66. Morin O. (1994), *Aspergillus et aspergilloses : biologie*, Ed. Techniques Encycl. Med. Chir. (Elsevier, Paris), Maladies infectieuses 8-600-A-10.
67. Morin O.(2003).*Aspergillus et aspergillose : biologie*. Encycl Méd Chir (Editions Scientifiques et Médicales Elsevier SAS, Paris), Maladies infectieuses;8-600-A-10:1-7.
68. Mulon, P-Y. (2002). Diagnostic expérimental de l'Aspergillose rhinosinusale du chien (Doctoral dissertation). Thèse de Doctorat : Vétérinaire. école nationale vétérinaire d'alfort.84p.

N

69. Nicolas, Q.(2011). Aspergillose humaine. Epidémiologie, diagnostic biologique, contrôle. Thèse pour le diplôme d'état de docteur en pharmacie : Limoges .université de limoges.136p.
70. Nowak, C., Tanaka, L., Bobin, S., & Nevoux, J. (2017). Les infections de l'oreille. *La Presse Médicale*, 46(11), 1071-1078.

O

71. O'Gorman, C. M., Fuller, H. et Dyer, P. S. (2009). Discovery of a sexual cycle in the opportunistic fungal pathogen *Aspergillus fumigatus*. *Nature*, 457(7228), 471-474.

P

72. Park, S.J. & Mehrad, B. Innate immunity to *Aspergillus* species. *Clin. Microbial. Rev.* 22, 535–551 (2009).
73. Pasqualotto AC.(2010). *Aspergillosis from diagnostic to prevention*. Ed. Springer, 7-1006p
74. Persat F, Ranque S.(2009) Intérêts et limites du sérodiagnostic fongique. *La Lettre de L'infectiologue* 24, 8–18.
75. Persat, F. (2012) Sérologie aspergillaire, d'hier à aujourd'hui pour demain. *Journal de Mycologie Médicale* 22, 72–82.
76. Pilly E. (2008). *Maladies infectieuses et tropicales*. Ed. Vavactis Plus, p : 130, 572, 573.
77. Poissy, J. Parmentier-Decrucq, E. Sendid, B. Mathieu, D. Poulain, D. (2014). Nouveaux marqueurs pour le diagnostic de la maladie fongique invasive. *Réanimation*, 23(3), 298-308.

Q

78. Quatresooz P, Arrese JE, Piérard GE. Synopsis des dermatomycoses invasives chez l'immunodéprimé. *Rev Med Liege*, 2003, 58 (11): 690-694.

R

79. Raper KB, Fennel DI. (1965) .The genus *Aspergillus*. Williams and Wilkins. Baltimore: Williams and Wilkins. 686 p.
80. Raynard, A (2018) Prévention et traitement des aspergilloses invasives liées *aspergillus fumigatus* thèse de doctorat : Pharmacie université Claude Bernard-Lyon1 .106 p.
81. Roquebert M.F, (1998), Taxonomie des moisissures ; Méthodes de culture et techniques d'observation ; Identification”, in “Moisissures des aliments peu hydratés”, Ed. Tec & Doc, 39-95.

82. Rossignol,D.(2013) .Diagnostic moléculaire des aspergilloses invasives : mise en place et évaluation d'une méthode de PCR en temps réel au CHU de Grenoble. Thèse de doctorat : Sciences pharmaceutiques. Grenoble. Faculté de Pharmacie de Grenoble.133p.

S

83. Sadoudi, M et Saidi, C .(2018). Epidémiologie des infections fongiques invasives au chu de tizi-ouzou.Mémoire fin d'étude e l'obtention du diplôme de docteur en pharmacie : Université Mouloud Mammeri, Tizi ousou : 138p.
84. Seghir.S, Zahed .F (2019) La fréquence des aspergilloses pulmonaires invasives chez les malades d'oncohématologie du CHU de Tlemcen .Mémoire De Fin d'études pour l'obtention du diplôme de docteur en pharmacie : université Abou Bekr Belkaid, 78.
85. Sheehan ,D.(2009) Physical Biochemistry: Principles and Applications. John Wiley & Sons.
86. Stankovic,K. P. Sève, A. Hot, N. Magy, I. Durieu, C. Broussolle. (2006).Aspergilloses au cours de maladies systémiques traitées par corticoïdes et/ou immunosuppresseurs : analyse de neuf cas et revue de la littérature. La Revue de médecine interne.27 : 813–827.
87. Sugui J A, Kwon-Chung, K J., Juvvadi, P. R., Latge, J. P. et Steinbach, W. J. (2014a). *Aspergillus fumigatus* and related species. Cold Spring Harb Perspect Med, 5(2).

T

88. Tattevin P, Jauréguiberry S, Gangneux. J.-P (2004). Les aspergilloses cérébrales. Revue Neurologique ,160(5) ,597_605.
89. Thierry, S. (2011) Etude de la diversité génétique et du pouvoir pathogène d'*Aspergillus fumigatus* et de *Chlamydomophila psittaci* chez les oiseaux.Thèse de Doctorat : Microbiologie. l'institut des sciences et industries du vivant et de l'environnement .Paris.224 P.
90. Tillie-Leblond , Le Rouzic , Cortot A. Aspergillose bronchopulmonaire allergique. Rev Fr Allergol, 2012, 52 (3): 134-137.

V

91. Vainqueur, d.(2018).diagnostic sérologique des aspergilloses pulmonaires chroniques et allergiques chez l'immunocompétent : évaluation de sept réactifs.thèse pour le diplôme d'état de docteur en médecine : biologie médicale. université toulouse iii – paul sabatier. 64p.

W

92. Warnock, D. W. (1977) Detection of *Aspergillus fumigatus* precipitins: a comparison of counter immunoelectrophoresis and double diffusion. *Journal of Clinical Pathology* 30, 388–389.

Z

93. Zeniou .H et Bouraoui .M, (2017) Les aspergilloses chez les malades ayant une hémopathie,Constantine .Mémoire de Master: Hygiène Hospitalière et Santé ,Université des Frères Mentouri Costantine , 59 p.



Résumés

Résumé

L'aspergillose est un terme qui regroupe les infections causées par des champignons appartenant au genre *Aspergillus*, ces champignons peuvent cependant provoquer différentes formes de mycoses. L'espèce *Aspergillus fumigatus* est responsable de plus de 80% des aspergilloses humaines, elle touche les sujets immunodéprimés. Les moyens de diagnostique sont la culture, la détection d'antigènes dans le sérum et l'aspect très particulier des lésions thoraciques à l'examen scannographique. La mise en route du traitement antifongique doit être précoce. La guérison n'est obtenue que dans 60% des cas au mieux et dépend à la fois de la précocité de la suspicion du diagnostic et de la pathologie sous-jacente. D'autres localisations, en particulier cérébrales peuvent se voir et sont de pronostic très sévère. L'objectif de cette étude est de mettre en exergue les techniques permettant le diagnostic des aspergilloses à savoir : l'examen direct par microscopie et par culture mycologique ainsi que les techniques indirectes comportant la recherche d'antigènes et d'anticorps anti-aspergillaire dans le sang ou un autre liquide biologique (LBA ,LCR) . La technique de référence reste la mise en évidence d'anticorps précipitants (précipitines) par immunoelectrophorèse (IEP), double-diffusion (méthode d'Ouchterlony) ou par électrosynérèse (ES). Quant aux techniques de biologie moléculaire (PCR), elles ont le potentiel de fournir à la fois des taux de détection élevée .

Mots-clé : Aspergilloses invasives ; *Aspergillus* ; *Aspergillus fumigatus* ; Diagnostic.

Abstract

Aspergillosis is a term that covers infections caused by fungi belonging to the genus *Aspergillus*, these fungi can however cause different forms of mycosis. The species *Aspergillus fumigatus* is responsible for more than 80% of human aspergillosis. It affects immunocompromised subjects. Diagnostic means are culture, detection of particular antigens in serum and the very particular appearance of thoracic lesions on scannographic examination. Antifungal treatment must be started early. Cure is obtained in only 60% of cases at best and depends on both the precocity of the suspected diagnosis and the underlying pathology. Other localizations, in particular cerebral, can be seen and have a very severe prognosis. The objective of this study is to highlight the techniques used to diagnose aspergillosis: direct examination by microscopy and mycological culture as well as indirect techniques involving the search for antigens and anti-*Aspergillus* antibodies in blood or other biological fluids (BAL, CSF). The reference technique remains the detection of precipitating antibodies (precipitins) by immunoelectrophoresis (IEP), double-diffusion (Ouchterlony's method) or by electrosynthesis (ES). As for molecular biology techniques (PCR), they have the potential to provide both high detection rates.

Key words : Invasive aspergillosis; *Aspergillus*; *Aspergillus fumigatus*; Diagnosis.

ملخص

داء الرشاشيات هو مصطلح يتمثل في العدوى التي تسببها الفطريات من جنس الرشاشيات، التي يمكن أن تسبب أشكالاً مختلفة من العدوى الفطرية. إن *Aspergillus fumigatus* مسؤولاً عن أكثر من 80% من داء الرشاشيات البشري، فهي تصيب الأشخاص الذين يعانون من نقص المناعة. وسائل التشخيص هي الزراعة، الكشف عن مستضدات معينة في المصل والمظهر المتعلق بأفات الصدر عن طريق الفحص بالأشعة المقطعية، العلاج بمضادات الفطريات يستوجب أن يكون مبكراً. ولا يتم الشفاء إلا بنسبة 60% من الحالات المرضية ويعتمد على كل من الإشتباه في التشخيص المبكر وعلم الأمراض الأساسي. يمكن رؤية أماكن أخرى خاصة الدماغ، وهي ذات تشخيص شديد للغاية. الهدف من هذه الدراسة هو تسليط الضوء على التقنيات التي تسمح بتشخيص داء الرشاشيات وهي: الفحص المباشر عن طريق الفحص المجهرى وعن طريق زراعة الفطريات وكذلك التقنيات غير المباشرة التي تشمل البحث عن المستضدات والأجسام المضادة لمضاد الرشاش في الدم أو السوائل البيولوجية (LCR،LBA). التقنية المرجعية تتمثل في اكتشاف الأجسام المضادة المترسبة (المترسبات) عن طريق الرحلان الكهربائي المناعي (IEP) أو الانتشار المزدوج (Ouchterlony) أو عن طريق التوليد الكهربائي (ES). أما بالنسبة للتقنيات البيولوجية الجزيئية (PCR)، لديها القدرة على توفير معدلات عالية الكشف.

الكلمات المفتاحية: داء الرشاشيات الغازية; *Aspergillus; Aspergillus fumigatus*; التشخيص.

TENAH Amira
HAYOUN Aicha

Date de soutenance : 09/ 09 /2021

Intitulé:

Revue bibliographique sur les techniques diagnostiques des aspergilloses invasives

Master en Biotechnologie
Spécialité : Mycologie et Biotechnologie Fongique

L'aspergillose est un terme qui regroupe les infections causées par des champignons appartenant au genre *Aspergillus*, ces champignons peuvent cependant provoquer différentes formes de mycoses. L'espèce *Aspergillus fumigatus* est responsable de plus de 80% des aspergilloses humaines, elle touche les sujets immunodéprimés. Les moyens de diagnostic sont la culture, la détection d'antigènes dans le sérum et l'aspect très particulier des lésions thoraciques à l'examen scannographique. La mise en route du traitement antifongique doit être précoce. La guérison n'est obtenue que dans 60% des cas au mieux et dépend à la fois de la précocité de la suspicion du diagnostic et de la pathologie sous-jacente. D'autres localisations, en particulier cérébrales peuvent se voir et sont de pronostic très sévère. L'objectif de cette étude est de mettre en exergue les techniques permettant le diagnostic des aspergilloses à savoir : l'examen direct par microscopie et par culture mycologique ainsi que les techniques indirectes comportant la recherche d'antigènes et d'anticorps anti-aspergillaire dans le sang ou un autre liquide biologique (LBA ,LCR) . La technique de référence reste la mise en évidence d'anticorps précipitants (précipitines) par immunoelectrophorèse (IEP), double-diffusion (méthode d'Ouchterlony) ou par électrosynérèse (ES). Quant aux techniques de biologie moléculaire (PCR), elles ont le potentiel de fournir à la fois des taux de détection élevée.

Mots clés : Aspergilloses invasives ; *Aspergillus* ; *Aspergillus fumigatus* ; Diagnostic.

Président du jury :	Mme ALATOU Radia	(Professeure - UFM Constantine 1).
Rapporteur :	Mme MIHOUBI Ilhem	(Professeure - UFM Constantine 1).
Examinatrice :	Mme GHORRI Sana	(M.C B. - UFM Constantine 1).