

MISE AU POINT D'UN MODELE EXPERIMENTAL D'ASPERGILLOSE PULMONAIRE CHEZ LA SOURIS

Reçu le 14/04/2001 - Accepté le 01/07/2002

Résumé

Aspergillus fumigatus est le principal agent causal des aspergilloses humaines dont la forme la plus grave est l'aspergillose pulmonaire invasive très fréquente chez des sujets fortement immunodéprimés, Nous avons donc tenté de mettre au point un modèle expérimental d'aspergillose pulmonaire invasive chez la souris se rapprochant le plus des conditions naturelles d'infestation, ce qui nous permettra d'étudier le développement *in vivo* de ce champignon. Le modèle expérimental que nous avons mis au point est réalisé par dépôt d'une suspension de spores sur les narines de l'animal immunodéprimé par administration quotidienne d'acétate de cortisone.

Mots clés: *Aspergillus fumigatus* - Aspergillose pulmonaire - Souris.

Abstract

Aspergillus fumigatus is the most principal agent involving the human aspergillosis. The invasiveness pulmonary aspergillosis is the most dangerous pathogenic form for the immunosuppressed patient. An experimental pulmonary aspergillosis for mice was performed according to the natural conditions of the infestation. This model of experimental pulmonary aspergillosis is used to study the development *in vivo* of this fungus. This model is realized by depositing an inoculum of spores in the nostril of the immunosuppressed mice by daily administration of cortisone acetate.

Keywords: *Aspergillus fumigatus* – pulmonary Aspergillosis - mice.

M. AISSI

Ecole Nationale Vétérinaire
Laboratoire de Parasitologie
Alger, Algérie

J.P. BOUCHARA

G. TRONCHIN

D. CHABASSE

C.H.U. Angers
Laboratoire de
Parasitologie - Mycologie
Angers, France

ملخص

إن الأسبيرجيلوس فوميفاطوس *Aspergillus fumigatus* عامل رئيسي سببي لإمراض الرشاشيات الإنسانية، و داء الرشاشيات الرئوي هو الشكل الأخطر غزواً، جد شائع عند الأشخاص ذوي المناعة المنخفضة، فسعيناً إذن ضبط نموذج تجريبي لداء الرشاشيات الرئوي الغازي عند الفأرة يقترب أكثر من الشروط الطبيعية للصابة، الشيء الذي يمكننا من دراسة انتشار هذا الفطر في الجسم الحي. و تحقق النموذج التجريبي الذي ضبطناه بمزيج بوغات spores معلق على منخري الحيوان ذي المناعة المنخفضة بتجربعات يومية من أسينات الكورتيزون acetate de cortisone.

الكلمات المفتاحية: أسبيرجيلوس *Aspergillus fumigatus*، داء الرشاشيات الرئوي، فأرة.

Chez l'homme, les atteintes aspergillaires sont extrêmement variées (kératites, otomycoses, sinusites). Cependant, la pathologie aspergillaire est dominée par des atteintes de l'appareil respiratoire présentant différentes formes cliniques, notamment l'aspergillose pulmonaire invasive. L'aspergillose intra-cavitaire, les aspergilloses allergiques [3,5]. L'espèce la plus fréquemment isolée est *Aspergillus fumigatus* [5] dont les capacités à envahir les tissus chez la souris semble être corrélées avec la production d'enzymes protéolytiques [15,21]. *In vivo*, cette enzyme pourrait contribuer à la dégradation des composants des membranes basales, préalable indispensable à l'invasion des tissus sous-jacents par les tubes germinatifs et filaments mycéliens.

Cette hypothèse nous a amené à développer un modèle expérimental d'aspergillose pulmonaire. Nous avons comparé plusieurs protocoles expérimentaux d'aspergillose pulmonaire chez la souris et avons retenus celui qui nous permettra d'obtenir 100% de mortalité, une semaine après l'infestation.

Ce modèle expérimental est validé par une étude anatomo-pathologique des poumons infestés, un dosage de chitine et la détermination des CFU dans les broyats de poumons infestés des souris. Ce modèle nous permettra ultérieurement d'effectuer des expérimentations *in vivo* pour la recherche notamment de la sécrétion d'enzymes protéolytiques.

MATERIEL ET METHODES

A- ORGANISMES ET CONDITIONS DE CULTURE

1- Souche d'*Aspergillus* utilisée

La souche d'*Aspergillus fumigatus* utilisée pour cette étude est la CBS 113.26 obtenue auprès du Centraalbureau voor Schimmelcultures (CBS) à Baarn (Pays Bas). Cette souche, initialement isolée du sol, est conservée sous forme lyophilisée.

Protocole	Nature du corticoïde	Voie d'administration	Dose (mg/souris/injection)	Rythme des injections
A	Acétate d'hydrocortisone	S.C.	5mg	J-2 et J0
B	Acétate d'hydrocortisone	S.C.	7,5mg	J-2 et J0
C	Acétate d'hydrocortisone	I.P.	5mg	J-2 et J0 puis tous les 3 jours
D	Acétate d'hydrocortisone	I.P.	5mg	Tous les 2 jours à partir de J-2
E	Méthyle prednisolone	I.M.	8mg	J-2
F	Acétate d'hydrocortisone	I.P.	2,5mg	Tous les 2 jours à partir de J-4
G	Acétate de cortisone	S.C.	5mg	J-1, J0 et J1, puis tous les 2 jours
H	Acétate de cortisone	S.C.	5mg	Tous les 2 jours à partir de J-2

Tableau 1: Protocoles expérimentaux d'aspergillose pulmonaire testés sur la souris.

2- Obtention d'une suspension de spores

Des cultures sur boîtes de pétri stériles, de la souche CBS 113.26 âgées de 5 jours, maintenues à 37°C, sont raclées dans de l'eau distillée stérile.

La suspension obtenue est filtrée sur toile à bluter dont les pores font 25µm de diamètre. La suspension de spores est centrifugée à 1500 g pendant 5 min et remise en suspension dans un petit volume d'eau distillée stérile puis dénombrées à la cellule de Malassez. La concentration de la suspension est ajustée de façon à obtenir une densité en spores comprise entre 10⁵ et 10¹⁰ /ml.

B- MISE AU POINT DU MODELE EXPERIMENTAL D'ASPERGILLOSE PULMONAIRE

1- Choix de l'animal

De nombreux protocoles d'aspergillose pulmonaire ont été proposés depuis plus de 55 ans réalisés principalement sur souris [1,2,7-14,20,22,27,33-35,38-40], plus rarement sur le rat ou le lapin [16,17,23-25,29,31,36,37]. Nous avons conduit toutes nos expérimentations sur des souris Swiss pesant de 18g à 20g, répartis en lots de 10 individus. Nous avons fixés notre choix sur des femelles car elles sont moins agressives que les mâles.

2- Protocoles d'immunodépression

Les modalités du développement fongique dans le tissu pulmonaire ont été précisés au cours d'infestations expérimentales chez des animaux préalablement immunodéprimés. Il est très difficile en effet d'établir une infection pour les champignons opportunistes chez des animaux de laboratoire sains [4].

Afin de mettre au point un modèle expérimental d'aspergillose pulmonaire se rapprochant le plus des conditions naturelles, et permettant d'obtenir 100% de mortalité dans la semaine qui suit l'infestation des animaux, nous avons choisi l'inoculation des animaux par voie nasale et testé l'efficacité de plusieurs protocoles d'immunodépression.

Les protocoles d'immunodépression testés sont dérivés pour la plupart de protocoles déjà publiés, dont ceux de

White (40), d'Eisenstein et Coll. [8], de Bathia et Coll. [1], et de Dixon et Coll [7]. L'immunodépression est obtenue en administrant un corticoïde aux animaux. En règle générale, la première injection est réalisée deux jours avant l'inoculation (j-2), et les injections suivantes sont répétées tous les deux jours.

Nous avons comparés l'efficacité de l'acétate d'hydrocortisone administrée à j-2 et j0 avant inoculation, par voie S.C., à des doses de 5mg (tableau 1, protocole A) et 7,5 mg (tableau 1, protocole B), et par voie I.P., à la dose de 5mg administrée à j-2, j0 puis tous les 3 jours (tableau 1, protocole C), ou tous les 2 jours à partir de j-2 (tableau 1, protocole D), ou encore 2.5mg tous les 2 jours à partir de j-4 (tableau 1, protocole F).

Nous avons également comparé l'efficacité de l'acétate de cortisone, administrée par voie SC à la dose de 5mg, tous les jours à partir de j-2 (tableau 1, protocole H) ou à j-1, j0, j+1, puis tous les 2 jours (tableau 1, protocole G).

Nous avons également étudié l'efficacité d'un troisième corticoïde à action prolongée, le méthyle prednisolone, administré aux souris par voie I.M. en une seule injection à la dose de 8 mg, deux jours avant l'inoculation (tableau 1, protocole E).

Des lots de souris témoins, recevant uniquement le corticoïde, sont réalisés pour contrôler l'innocuité des corticoïdes.

3 - Inoculation des souris

L'infestation est réalisée à J0 en déposant sur les narines des souris légèrement anesthésiées à l'éther, une goutte de 50 µl d'une suspension de spores. Divers inoculums ont été testés, allant de 10⁵ à 10¹⁰ spores par souris.

C- VALIDATION DU MODELE EXPERIMENTAL D'ASPERGILLOSE PULMONAIRE

1- Détermination des C.F.U. dans les broyats de poumons

Les souris mortes sont autopsiées, et les deux poumons sont prélevés puis déposés dans un tube en verre stérile pour potter, contenant 2 ml d'eau physiologique stérile. Le tout est broyé à l'aide du potter électrique. Des dilutions

successives de dixième en dixième sont effectués à partir de 10 µl du broyat pur dans de l'eau physiologique stérile. Chacune de ces dilutions est ensemencée sur le milieu gélose PDYA additionné de chloramphénicol. La lecture est effectuée après incubation à 37°C pendant 24 à 48 heures, et les colonies sont dénombrées.

2- Dosage de la chitine dans les broyats de poumons

Un dosage de chitine est réalisé sur les broyats de poumons et sur du mycélium obtenu après culture sur milieu PDYA liquide (peptone pancréatique, glucose, extrait de levure, agar-agar) additionnée de chloramphénicol. Dans cette optique, nous avons comparés deux méthodes chimiques, celle de Lehmann et White [19] et celle de Rondle et Morgan [26].

a) Méthode de Lehmann et White

Succinctement, la méthode comporte trois étapes: une déacétylation, suivie d'une dépolymérisation, et enfin d'une déamination:

- La déacétylation est identique aux deux méthodes testées. L'échantillon contenant la chitine subit une déacétylation sous l'action de la potasse durant 1 heure à 130°C, pour obtenir du chitosan insoluble.

- La dépolymérisation est réalisée sous l'action de l'acide nitreux sur le chitosan. Le mélange est agité vigoureusement pendant 15 minutes pour obtenir de la glucosamine.

- La déamination de la glucosamine est réalisée par addition de sulfamate d'ammonium puis de FeCl₃. Le glucose libéré est dosé par spectrophotométrie par addition d'une solution de MBTH (3-méthyl benzo-2-thiazolone hydrazone chlorhydrate monohydraté).

Le dosage de la glucosamine dans l'échantillon traité est évalué par rapport à une gamme d'étalonnage de glucosamine croissante (de 0 à 100 µg/ml). La lecture est effectuée par mesure de la densité optique au spectrophotomètre à 650 nm.

b) Méthode de Rondle et Morgan

Après la phase de déacétylation commune aux deux méthodes, la chitine est dépolymérisée par action de l'acide chlorhydrique à chaud, conduisant à de la glucosamine, dosée par méthode colorimétrique (mesure de l'absorbance à 530 nm).

3 - Etude anatomopathologique

Pour cette étude, durant l'autopsie réalisée dans des conditions stériles, les poumons des souris sont immédiatement récupérés, lavés dans de l'eau distillée stérile et immergés dans du formol tamponné à 10% (10 ml de formol concentré, 0.35g phosphate monosodique anhydre, 0.65 phosphate disodique anhydre) durant 2 heures.

a) Déshydratation et inclusion des poumons

Les poumons sont coupés en petits cubes de 3 mm³ et déposés dans des capsules d'inclusion. Ils subissent une déshydratation par immersion dans des bains successifs d'éthanol (de concentrations croissantes), durant une heure chacun. Une première immersion est réalisée dans de

l'éthanol à 70°, suivie d'un bain d'éthanol à 95° et le dernier bain dans de l'éthanol à 100°. Les capsules sont ensuite immergées dans deux bains de toluène pendant 30 minutes chacun et finalement imprégnées de paraffine liquide durant 2 heures à 58°C. Le matériel est ensuite enrobé dans de la paraffine qu'on laisse polymériser pendant 15 minutes à température ambiante.

b) Déparaffinage et réhydratation des coupes poumons

Après l'inclusion dans de la paraffine, des coupes de 7µm d'épaisseur sont réalisées au microtome. Avant la coloration, les coupes de poumons sont déparaffinées dans deux bains de toluène de 3 minutes chacun puis réhydratées dans deux bains successifs d'alcool à 100°, puis un à 95° et le dernier à 70° et finalement dans de l'eau distillée.

Le champignon est détecté grâce à différentes méthodes de coloration spécifiques de la paroi fongique, notamment la coloration à l'acide périodique-Schiff (PAS) et l'imprégnation argentique de Gomori-Grocott. Elles permettent de déceler les glucides, particulièrement abondants dans la paroi des champignons.

c) La coloration à l'acide périodique-Schiff (PAS)

Elle consiste en une oxydation des glucides par l'acide périodique à 1% durant 15 minutes, puis les coupes sont lavées à l'eau courante pendant 10 minutes et rincées à l'eau distillée. Les coupes sont ensuite colorées avec le réactif de Schiff, puis subissent trois bains successifs de 2 minutes chacun dans de l'eau sulfureuse (50 ml d'HCl N, 6 g de Bisulfite de sodium, 60 ml d'eau distillée).

Après un lavage à l'eau distillée pendant 10 minutes, les coupes sont recouvertes d'hémateïne de Harris durant 30 minutes, puis lavées pendant 10 minutes à l'eau du robinet. Elles sont ensuite déshydratées, éclaircies et montées en Eukitt.

d) La coloration à l'imprégnation argentique de Gomori-Grocott

Elle débute par l'immersion des coupes durant 5 minutes dans un bain d'acide périodique à 5%, puis deux lavages de 30 secondes en eau distillée sont ensuite effectués. Les lames sont ensuite immergées pendant 1 minute dans du nitrate d'argent ammoniacal, préalablement chauffé (95°C) au four micro-ondes durant 1 minute. Les lames sont ensuite ressorties du four, puis incubées dans du nitrate d'argent chaud. Elles sont alors lavées à l'eau distillée durant quelques secondes puis plongées dans du chlorure d'or pendant 30 secondes et lavées à l'eau distillée. Finalement, les lames sont immergées 30 secondes dans un bain de thiosulfate puis rincées à l'eau distillée. Une dernière coloration au vert lumière est réalisée durant 3 minutes, puis elles sont rincées à l'eau distillée, déshydratées, éclaircies et montées en Eukitt.

RESULTATS

Les différents protocoles expérimentaux testés nous ont permis d'obtenir les résultats suivants :

Le pourcentage de mortalité obtenus après l'administration aux souris de l'acétate d'hydrocortisone par voie S.C. (Fig. 1A et 1B) ou par voie I.P. (Fig. 1C, 1D et 1F) ne dépassent pas les 50%, quinze jours post-inoculation, et cela quelles que soient la dose de corticoïde

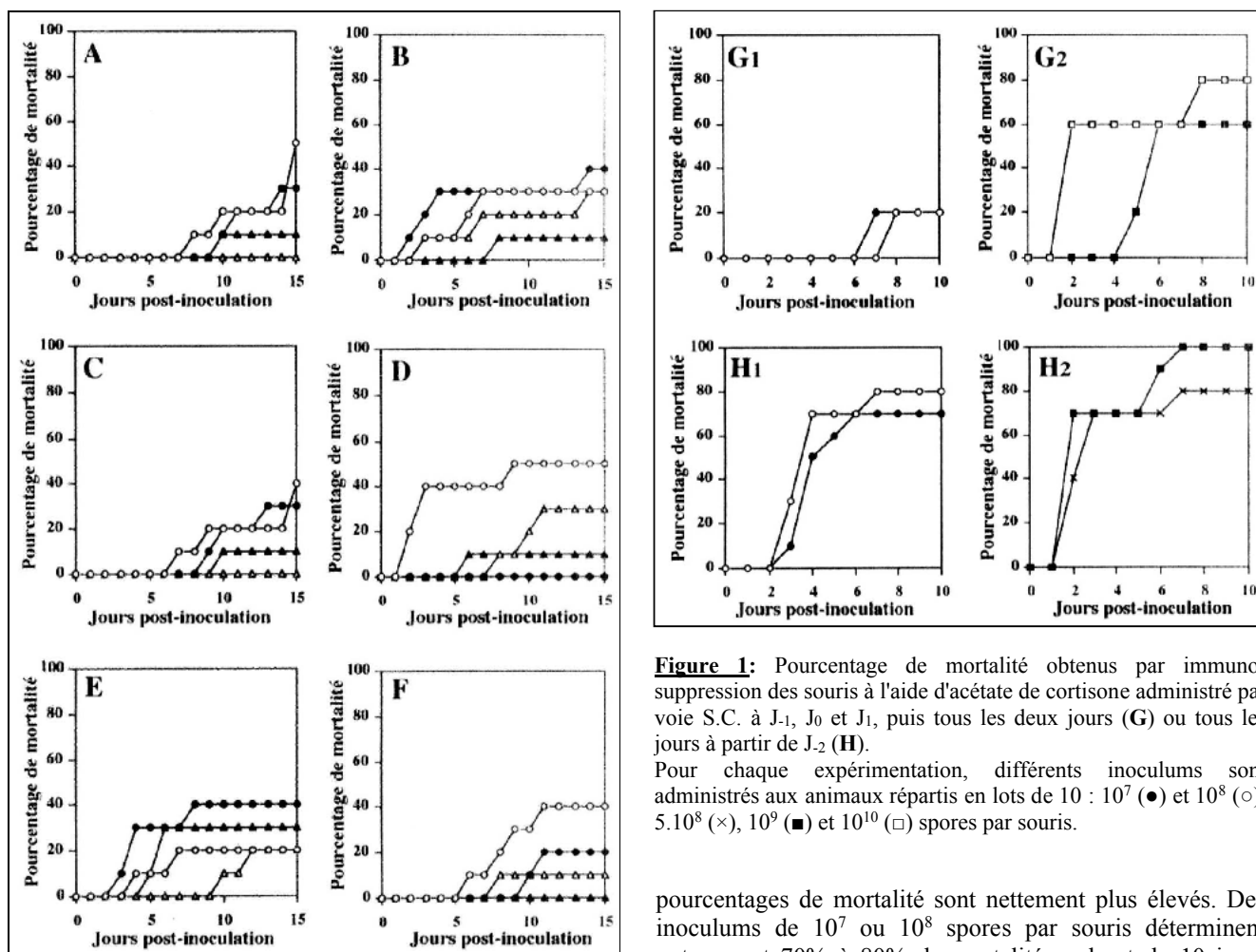


Figure 1: Pourcentages de mortalité obtenus par immunosuppression des souris à l'aide d'acétate d'hydro-cortisone par voie S.C. (A et B) ou I.P. (C, D et E) ou de méthylprednisolone par voie I.M. (F). Pour chaque expérimentation, quatre inoculums sont administrés aux animaux répartis en lots de 10 : 10^5 (▲), 10^6 (△), 10^7 (●) et 10^8 (○) spores par souris.

injecté, la fréquence de son administration et l'importance de l'inoculum. L'inoculum le plus élevé (10^8 spores par souris) ne provoque que 20% à 30% de mortalité au bout de 7 à 10 jours chez les animaux n'ayant reçu que deux injections d'acétate d'hydrocortisone (Fig. 1A et 1B). Une légère augmentation du nombre de décès est obtenue avec des administrations plus fréquentes du corticoïde. A titre d'exemple, avec des injections d'acétate d'hydrocortisone répétées tous les deux jours, 40% de mortalité sont obtenus dès le troisième jour après l'infestation, et 50% au bout d'une semaine (Fig. 1D). Pour des inoculums moins élevés (10^5 ou 10^6 spores par souris), les taux de mortalité sont beaucoup plus faibles.

L'utilisation d'un corticoïde à action prolongée, la méthylprednisolone administré par voie I.M., s'est avérée toute aussi décevante puisque la mortalité engendrée ne dépasse pas les 40% (Fig. 1E).

Par contre, lorsque les souris sont immunodéprimées par l'administration d'acétate de cortisone en S.C., les

Figure 1: Pourcentage de mortalité obtenus par immunosuppression des souris à l'aide d'acétate de cortisone administré par voie S.C. à J-1, J₀ et J₁, puis tous les deux jours (G) ou tous les jours à partir de J₂ (H).

Pour chaque expérimentation, différents inoculums sont administrés aux animaux répartis en lots de 10 : 10^7 (●) et 10^8 (○), 5.10^8 (×), 10^9 (■) et 10^{10} (□) spores par souris.

pourcentages de mortalité sont nettement plus élevés. Des inoculums de 10^7 ou 10^8 spores par souris déterminent notamment 70% à 80% de mortalité au bout de 10 jours chez les animaux immunodéprimés par des injections quotidiennes d'acétate de cortisone (Fig. 1H1).

Lorsque les injections sont réalisées tous les deux jours seulement, l'obtention de pourcentages de mortalité comparables nécessitent des inoculums plus importants, de 10^9 ou 10^{10} spores par souris (Fig. 1G2).

Aucune mortalité n'est observée dans les lots de souris témoins avant reçu uniquement le corticoïde.

Les 100% de mortalité sont obtenus, selon les expériences, en 7 à 10 jours lorsque les animaux sont immunodéprimés par des injections journalières de 5 mg d'acétate de cortisone et inoculés avec 10^9 spores par animal, protocole que nous avons retenu.

Afin d'évaluer le développement du champignon dans le tissu pulmonaire, le dosage de la chitine, à partir d'un mycélium obtenu après culture sur milieu PDYA liquide, nous a permis de retenir la méthode de Rondle et Morgan car elle permet de maintenir une relation linéaire entre l'absorbance à 530 nm et le taux de glucosamine dans une gamme de concentration de glucosamine comprise entre 25 et 300 $\mu\text{g/ml}$ (Fig. 2). En outre, cette méthode permet de libérer, à partir du mycélium, un taux de glucosamine 5 fois supérieur à celui obtenu par la technique de Lehmann et White.

Appliqué à notre modèle expérimental, le taux de chitine dans les broyats de poumons de souris infestées, curieusement, diminue légèrement suivant la date du décès

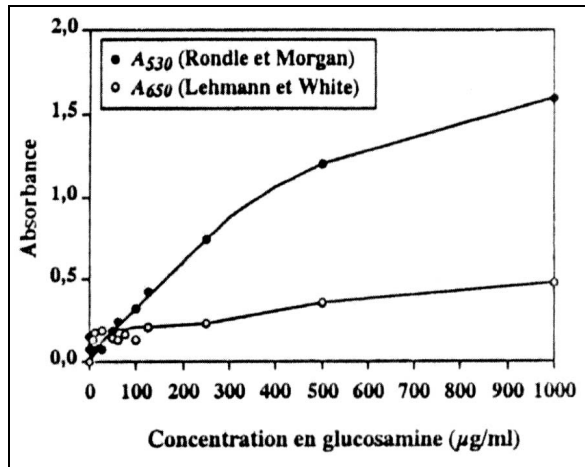


Figure 2: Etude comparative de la sensibilité des techniques de Rondle et Morgan [25] et de Lehmann et White [18].

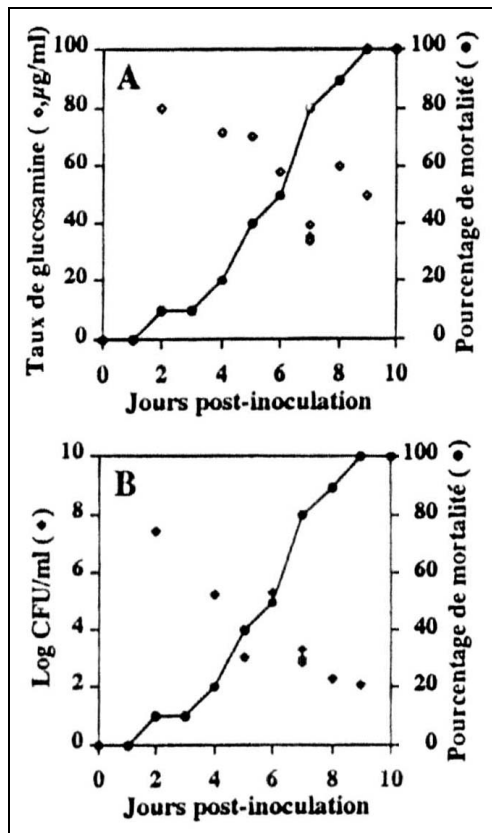


Figure 3: Dosage de chitine (A) et détermination de CFU (B) sur les broyats de poumons.

Les poumons des souris mortes sont homogénéisés au potter. Puis, le taux de chitine contenu dans les échantillons est déterminé par dosage de la glucosamine libérée après déacétylation et dépolymérisation. Après addition de réactif d'Eirlich, l'absorbance est mesurée à 530 nm. Parallèlement, le nombre de CFU est déterminé par ensemencement de 10 µl de dilutions successives de l'homogénéisat sur milieux PDYA.

de l'animal après infestation. Le taux de glucosamine oscille en effet, entre 80 µg / ml chez les souris décédées 48 heures après l'infestation et 50 µg/ml chez celles mortes au 9ème jour (Fig. 3A). Ce dosage appliqué à l'inoculum (10^9

spores) révèle un taux de glucosamine extrêmement faible de 10 µg/ml, et donc inférieur au seuil de linéarité de la technique. Enfin, aucune trace de chitine n'est détectée à partir d'un homogénéisat de poumon de souris saine.

La détermination des CFU, à partir des broyats de poumons, apparaît beaucoup moins intéressante pour évaluer le développement fongique *in vivo*. En effet, le nombre de CFU (exprimé en log) est généralement très élevé chez les souris décédées 48 heures après l'infestation, puis diminue de manière significative chez les animaux morts plus tardivement, passant de 7.4 à 2 chez les souris décédées respectivement 2 et 9 jours après l'infestation (Fig. 3B).

L'étude anatomopathologique nous a permis de confirmer l'invasion du tissu pulmonaire par le champignon. Sur des coupes en paraffine de poumons de souris sacrifiées 24 heures après l'infestation, de nombreux filaments mycéliens sont visibles après coloration aux PAS ou à l'imprégnation argentique (Fig. 4 A). Chez les souris sacrifiées 48 heures après l'infestation, comme chez les souris sacrifiées tardivement, des nodules aspergillaires sont visualisés sur des coupes de poumons colorés à l'acide periodique-Schiff PAS (Fig. 4A) et à l'imprégnation argentique de Gomori-Grocott (Fig. 4B).

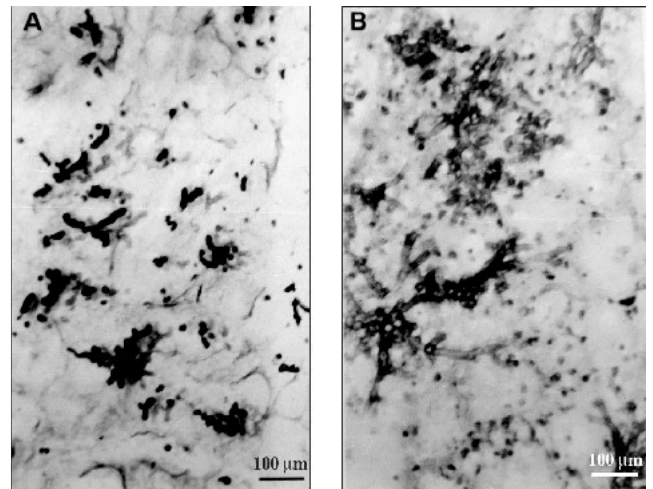


Figure 4: Etude anatomopathologique sur coupes de poumons des souris sacrifiées 24h (A) ou 48h (B) après l'infection.

A: imprégnation argentique de Gomori-Grocott.

B: coloration au PAS révélant des filaments mycéliens entourés de nombreux polynucléaires.

DISCUSSION

L'étude des facteurs potentiels de virulence des micro-organismes implique la mise à disposition d'un modèle expérimental. En matière d'aspergillose, des modèles expérimentaux extrêmement variés ont été proposés. Pour notre part, nous avons développé un modèle expérimental se rapprochant des conditions naturelles, ce qui nous a conduit à choisir l'inoculation des souris par dépôt d'une goutte de suspension de spores sur les narines de l'animal, préalablement anesthésié à l'éther. De plus, pour permettre le développement *in vivo* de la souche *Aspergillus fumigatus* et provoquer 100% de mortalité en une semaine,

un inoculum de 10^9 spores par animal nous a été nécessaire, associé à une immunodépression réalisée par l'administration quotidienne de 5 mg d'acétate de cortisone par voie S.C.

Avec des doses moins élevées, ou des injections moins fréquentes, Sidransky et Coll. [33], Sandhu et Coll. [27] et Waldorf et Coll. [38] n'ont pu obtenir que 67% à 88% de mortalité au bout de 7 à 21 jours.

D'autres auteurs, utilisant d'autres souches aspergillaires mais aussi des variétés différentes de souris (LACA, BALB/c, BDA/2N ou CF1) ont pu obtenir 100% de mortalité au bout de 15 à 30 jours avec des inoculums plus faibles, de $9 \cdot 10^4$ ou 10^6 spores par animal [12,13,34,40].

Le pourcentage de mortalité, obtenu dans les lots d'animaux immunodéprimés avec de l'acétate d'hydrocortisone, est beaucoup plus faible, et cela quelles que soient la dose injectée, la fréquence et la voie d'administration. Très peu d'auteurs utilisent en fait ce corticoïde. En effet, il ne semble donner de bons résultats que lorsqu'il est administré à des lapins N.Z. par voie IM., tous les jours, à raison de 3 mg/kg/jour [36]. De même, la méthylprednisolone, corticoïde à action prolongée, s'est avérée décevante à la dose utilisée, les pourcentages de mortalité obtenus ne dépassant pas 40%. Par ailleurs, différentes méthodes ont été comparées afin d'évaluer le développement du champignon dans le tissu pulmonaire, notamment la détermination des unités fongiques formant colonies dans les broyats de poumons des souris. Largement utilisée en matière de candidose expérimentale, cette technique permet en effet de quantifier la présence du champignon dans un tissu infesté. Cependant, bien que certains auteurs aient observé une augmentation de la valeur des CFU au cours de l'évolution de la maladie [8,23,28,36], cette technique s'est avérée décevante pour évaluer le développement fongique après infestation des souris immunodéprimées avec les spores d'*Aspergillus fumigatus*. En effet, le nombre de CFU est très élevé dans les poumons de souris mortes au cours des premiers jours, puis diminue chez les souris décédées plus tardivement. La détermination des CFU, à partir d'homogénéisat d'organes infectés, semble peu adaptée dans le cas de champignon se développant dans les tissus sous forme filamenteuse, des spores ou de courts filaments mycéliens produisant les mêmes valeurs de CFU.

Certains auteurs ont donc associé à la détermination des CFU dans les poumons, qui offre une meilleure estimation de l'inoculum les premiers jours, un dosage de la chitine pour suivre l'extension des hyphes *in vivo* [8, 28, 36]. En effet, comme l'ont montré Lehmann et White [19] ainsi que Spreadbury et Coll. [36], le taux de glucosamine présent dans l'inoculum est négligeable. Conformément aux résultats d'Eisenstein et Coll. [8], le taux de glucosamine, détecté dans les poumons, reste stable tout au long de l'expérimentation. Le champignon semble donc trouver au même stade évolutif chez tous les individus morts. Les variations observées dans la période d'incubation seraient liées à des différences de susceptibilité individuelles, les souris mortes tardivement étant probablement plus résistantes à l'infection aspergillaire que celles mortes au cours des premiers jours suivant l'infestation.

L'étude anatomopathologique réalisée sur des coupes en paraffine de poumons des souris sacrifiées 24 ou 48 heures après l'infestation, confirme le développement fongique *in vivo*. Elle révèle, en effet, la présence de nodules aspergillaires et des filaments mycéliens envahissant le parenchyme pulmonaire. Ces mêmes lésions sont également retrouvées sur des coupes en paraffine des poumons des souris décédées au cours des expérimentations, quelle que soit la date du décès après inoculation.

CONCLUSION

Le protocole d'immunodépression et le protocole d'infestation des souris que nous avons choisis, nous ont permis d'obtenir un modèle expérimental d'aspergillose pulmonaire qui se rapproche le plus des conditions naturelles d'infestation avec comme méthodes de validation, l'étude anatomopathologique des poumons avec des colorations spécifiques, associée à un dosage de la chitine.

REFERENCES

- [1]- Bhatia V.N. and Mohapatra L.N., "Experimental aspergillosis in mice. Part I. Pathogenic potential of *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus flavus* and *Aspergillus niger*", *Mykosen.*, 12, (1969), pp. 651-654.
- [2]- Bhatia V.N. and Mohapatra L.N., "Experimental aspergillosis in mice. Part II. Enhanced susceptibility of cortisone treated mice to infection with *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus flavus* and *Aspergillus niger*", *Mykosen.*, 13, (1970), pp. 105- 110.
- [3]- Bodey G.P. and Vartivarian S., "Aspergillosis", *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.*, 8, (1989), pp. 413-437.
- [4]- Bouchara J.P., Larcher G., Joubaud F., Penn P., Tronchin G. and Chabasse D., "Extracellular fibrinolytic enzyme of *Aspergillus fumigatus* : substrate-dependent variations in the proteinase synthesis and characterization of the enzyme", *FEMS Immunol. Med. Microbiol.*, 7, (1993), pp.81-92.
- [5]- Cimon B., Carrere J., Chazalette J.P., Ginies J.L., Chabasse D., et Bouchara J.P., "Mycoses broncho-pulmonaires au cours de la mucoviscidose. Résultats d'une étude épidémiologique longitudinale sur une période de 5 ans", *J. Mycol. Méd.*, 10, (2000), pp. 128-135.
- [6]- Denning D.W., Ward P.N., Fenelon L.E. and Benbow E.W., "Lack of vessel wall elastolysis in human invasive pulmonary aspergillosis", *Infect. Immun.*, 60, (1992), pp. 5153-5156.
- [7]- Dixon D.M., Polak A. and Walsh T.J., "Fungus dose-dependent primary pulmonary aspergillosis in immunosuppressed mice", *Infect. Immun.*, 57, (1989), pp.452-1456.
- [8]- Eisenstein D.J., Binddinger P.W. and Rhodes J.C., "Experimental murine invasive pulmonary aspergillosis", *Am. J. Clin. Path.*, 93, (1990), pp.510-515.
- [9]- Epstein S.M., Verney E., Miale T.D. and Sidransky H., "Studies on the pathogenesis of experimental pulmonary aspergillosis", *Amer. J. Pathol.*, 51, (1967), pp.769-788.
- [10]- Ford S. and Friedman L., "Experimental study of the pathogenicity of *Aspergilli* for mice", *J. Bacteriol.*, 94, (1967), pp. 928-933
- [11]- Graybill J.R., and Kaster S.R., "Experimental murine aspergillosis. Comparison of amphotericin B and a new polyene antifungal drug SCH 28193", *Am. Rev. Respir. Dis.*, 129, (1984), pp.292-295.
- [12]- Graybill J.R., Kaster S.R. and Drutz D.J., "Treatment of

- experimental murine aspergillosis with BAY n° 7133", *J. Infect. Dis.*, 148, (1983), pp.898-906.
- [13]- Hector R.F., Yee E. and Collins M.S., "Use of DBA/2N mice in models of systemic candidiasis and pulmonary and systemic aspergillosis", *Infect. Immun.*, 58, (1990), pp.1476-1478.
- [14]- Kolattukudy P.E., Lee J.D., Rogers L.M., Zimmerman P., Ceselski S., Fox B., Stein B. and Copelan E.A., "Evidence for possible involvement of an elastolytic serine protease in aspergillosis", *Infect. Immun.*, 61, (1993), pp.2357-2368.
- [15]- Kothary M.H., Chase T.Jr. and Mc. Millan J.D., "Correlation of elastase production by some strains of *Aspergillus fumigatus* with ability to cause pulmonary invasive aspergillosis in mice", *Infect. Immun.*, 43, (1984), pp. 320-325.
- [16]- Kurup V.P. and Sheth N.K., "Experimental aspergillosis in rabbits", *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.*, 4, (1981), pp. 161-174.
- [17]- Land C.J., Sostaric B., Fuchs R., Lundstrom H. and Hult K., "Intratracheal exposure of rats to *Aspergillus fumigatus* spores isolated from sawmills in Sweden", *Appl. Environ. Microbiol.*, 55, (1989), pp.2856-2860.
- [18]- Larcher G., Bouchara J.P., V. Annaix, F. Symoens, D. Chabasse and G. Tronchin, "Purification and characterization of a fibrinogenolytic serine proteinase from *Aspergillus fumigatus* culture filtrate", *FEBS Lett.*, 308, (1992), pp.65-69.
- [19]- Lehmann P.F., and White E.O., "Chitin assay used to demonstrate renal localisation and cortisone-enhanced growth of *Aspergillus fumigatus* mycelium in mice", *Infect. Immun.*, 12, (1975), pp.987-992.
- [20]- Merkow L.P., Epstein S.M., Sidransky H., Verney E. and Pardo M., "The pathogenesis of experimental pulmonary aspergillosis. An ultrastructural study of alveolar macrophages after phagocytosis of *Aspergillus flavus* spores *in vivo*", *Am. J. Pathol.*, 69, (1971), pp.57-74.
- [21]- Miyaji M., and Nishimura K., "Relationship between proteolytic activity of *Aspergillus fumigatus* and the fungus invasiveness of mouse brain", *Mycopathologia*, 62, (1977), pp.561-666.
- [22]- Monod M., Paris S., Sarfati J., Jaton-Ogay K., Ave P. and Latgé J.P., "Virulence of alkaline protease-deficient mutants of *Aspergillus fumigatus*", *FFMS. Microbiol. Lett.*, 106, (1993), pp.39-46.
- [23]- Niki Y., Bernard E.M., Edwards F.F., Schmitt H.J., Yu B. and Armstrong D., "Model of recurrent pulmonary aspergillosis in rats", *J. Clin. Microbiol.*, 29, (1991), pp.1317-1322.
- [24]- Olenchock S.A., Green F.H.Y., Mentnech M.S., Mull J.C. and Sorenson W.G., "In vivo pulmonary response to *Aspergillus terreus* spores" *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.*, 6, (1983), pp.67-80.
- [25]- Rippon J.W. and Anderson D.N., "Experimental mycosis in immunosuppressed rabbits- II. Acute and chronic aspergillosis", *Mycopathologia*, 64, (1978), pp.97-100.
- [26]- Rondle C.J. and Morgan W.T.J., "Determination of glucosamine and galactosamine", *Biochein. J.*, 61, (1955), pp. 586-589.
- [27]- Sandhu D.K., Sandhu R.S., Damodaran V.N. and Randhawa H.S., "Effect of cortisone on bronchopulmonary aspergillosis in mice exposed to spores of various *Aspergillus* specie", *Sabouraudia*, 8, (1970), pp. 32-38.
- [28]- Schaffner A., Douglas H., and Braude A., "Selective protection against conidia by mononuclear and against mycelia by polymorphonuclear phagocytes in resistance to aspergillosis. Observations on these two lines of defense *in vivo* and *in vitro* with human and mouse phagocytes", *J. Clin. Invest.*, 69, (1982), pp. 631-657.
- [29]- Schmitt H.J., Bernard E.M., Edwards F.F. and Armstrong D., "Combination therapy in a model of pulmonary aspergillosis", *Mycoses*, 34, (1991), pp. 281-285.
- [30]- Schmitt H.J., Bernard E.M., Hauser M. and Armstrong D., "Aerosol amphotericin B is effective for prophylaxis and therapy in a rat model of pulmonary aspergillosis", *Antimicrob. Agents Chemother.*, 32, (1988), pp. 1676-1679.
- [31]- Schmitt H.J., Edwards F., Andrade J., Niki Y. and Armstrong D., "Comparison of azoles against aspergilli *in vitro* and in an experimental model of pulmonary aspergillosis", *Chemotherapy*, 38, (1992), pp.118-126.
- [32]- Shibuya K., Takaoka M., Uchida K., Wakayama M., Yamaguchi H., Takahashi K., Paris S., Latgé J.P., and Naoe S., "Histopathology of experimental invasive pulmonary aspergillosis in rats : pathological comparison of pulmonary lesions induced by specific virulent factor deficient mutants", *Microb. Pathog.*, 27, (1999), pp.123-131.
- [33]- Sidransky H. and Friedman E., "The effect of cortisone and antibiotic agents on experimental pulmonary aspergillosis", *Am. J. Pathol.*, 35, (1959), pp.169-184.
- [34]- Sidransky H. and Verney E., "Experimental aspergillosis", *Lab. Invest.*, 11, (1962), pp. 1972-1183.
- [35]- Sidransky H., Verney E. and Beed H., "Experimental pulmonary aspergillosis", *Arch. Pathol.*, 79, (1965), pp.299-309.
- [36]- Spreadbury C.I., Krausz T., Pervez S. and Cohen J., "Invasive aspergillosis : clinical and pathological features of a new animal model", *J. Med. Vet. Mycol.*, 27, (1989), pp. 5-15.
- [37]- Turner K.L., Hackshaw R., Papadimitrou J. and Perrot J., "The pathogenesis of experimental pulmonary aspergillosis in normal and cortisone-treated rats", *J. Pathol.* 118, (1975), pp. 65-73.
- [38]- Waldorf A.R., Lavitz S.M. and Diamond R.D., "In vivo bronchoalveolar macrophage defense against *Rhizopus oryzae* and *Aspergillus fumigatus*". *J. Infect. Dis.*, 150, (1984), pp.752 -760.
- [39]- Walzl H.L., Ackerbauer H., Meingassner J.G. and Mieth H., "Histopathology of organ lesions in mice after an intravenous or intratracheal or intrarenal infection with *Aspergillus fumigatus*", *Mykosen*, 30, (1986), pp. 10-18
- [40]- White L.O., "Germination of *Aspergillus fumigatus* conidia in the lungs of normal and cortisone-treated mice", *Sabouraudia.*, 15, (1977), pp. 37-41. □