

ASPERGILLOSE EXPERIMENTALE DU LAPIN

Réponses immunologiques et anatomo-pathologiques à un envahissement pulmonaire unique et massif de spores vivantes d'*Aspergillus fumigatus*, Corrélations anatomo-sérologiques. Problèmes posés par les infestations pulmonaires aspergillaires fugaces.

par

O. Morin, M. F. Nombalais, C. Vermeil

Resumé

Les auteurs ont étudié sur 40 lapins les réponses sérologiques et histologiques des animaux à une imprégnation aspergillaire par instillation intra-trachéale de spores vivantes d'*Aspergillus fumigatus*. Ils soulèvent les problèmes de diagnostic posés par des malades chez lesquels les examens sérologiques mettent en évidence des arcs de précipitation, au niveau desquels il n'est pas possible de révéler les activités enzymatiques caractéristiques d'aspergillome pulmonaire. A ce sujet, ils évoquent les hypothèses de bronchite aspergillaire, de phénomènes allergiques aspergillaires, d'imprégnation fugace de l'organisme par un *Aspergillus*.

Depuis les travaux originaux de Renon en 1893, de nombreux chercheurs ont étudié l'aspergilliose broncho-pulmonaire expérimentale. Depuis quelques années, la pathologie pulmonaire fongique connaît un regain d'actualité, les recherches visant à étudier le rôle favorisant des thérapeutiques antibiotiques usuelles ou la réponse immunitaire de l'organisme à une implantation fongique (travaux de l'école de Lille: J. Biguet et collaborateurs, 1–2).

En 1966, Hirotsugu Sawasaki et ses collaborateurs au Japon (3), étudiant la pathogénie de l'aspergillome pulmonaire montraient que l'implantation et la croissance fongique d'*Aspergillus fumigatus* dépendaient de trois conditions: bronco-sténose et ligature de l'artère pulmonaire, déterminant des bronchectasies, des cavités où la croissance des spores d'*Aspergillus fumigatus* injectées secondairement est massive.

En 1967, Gernez-Rieux et ses collaborateurs (4) étudiaient le rôle des macrophages alvéolaires dans la défense des voies respiratoires après inhalation massive de spores d'*Aspergillus fumigatus*.

L'*Aspergillus* peut également être l'agent premier infectant, déterminant une aspergilliose primaire, ceci semble possible puisque des auteurs ont décrit des bronchites aspergillaires, des pneumonies dues à un *Aspergillus*.

Laboratoire de Parasitologie et Pathologie Exotique Unité d'Enseignement et de Recherche de Médecine et de Techniques Médicales (Pr C. Vermeil) de Nantes.

Laboratoire d'Anatomo-Pathologie – Unité d'Enseignement et de Recherche de Médecine et de Techniques Médicales (Pr J. P. Kerneis) de Nantes.

Accepted for publication:

C'est dans cet esprit que nous avons entrepris l'étude de ce problème de l'aspergillose primitive, en essayant de préciser les modalités réactionnelles du tissu pulmonaire après injection unique de spores d'*Aspergillus*, et parallèlement les réponses immunitaires de l'organisme.

Moyens d'étude

La souche aspergillaire

La souche d'*Aspergillus fumigatus* utilisée a été isolée de l'aspergillome broncho-pulmonaire d'un de nos malades. Les spores sont récoltées après 2 jours de culture à 37 °C sur milieu de Sabouraud gélosé à 2%. Elles sont utilisées fraîches sous forme d'une suspension de 100 à 200 mgr de spores par animal pour 1 ml d'eau physiologique à 8,5 ‰ stérile.

Les animaux utilisés

Pour la réalisation de ce travail, 40 lapins d'un poids moyen de 3 Kgs ont été utilisés.

Technique d'infestation utilisée

La suspension de spores a été inoculée dans la trachée des animaux sous anesthésie générale. Cette instillation intra-trachéale a été unique.

Nous avons réalisé des examens histologiques précoces et tardifs suivis dans les deux cas de contrôles sérologiques. Pour ceci, nous avons réparti les animaux en deux groupes :

1) des lapins ont reçu 1 ml de suspension de spores vivantes et ont été sacrifiés 8 jours après leur inoculation à raison d'un lapin tué tous les jours. Une ponction cardiaque et le prélèvement des deux poumons étaient effectués, ces derniers étant confiés au laboratoire d'Anatomie-Pathologique. Nous avons recommencé trois fois cette première partie de notre travail et avons utilisé 25 animaux.

2) des lapins ont reçu 1 ml de suspension de spores vivantes dans les mêmes conditions, mais ont été étudiés pendant un à deux mois sur le plan sérologique par ponction veineuse effectuée tous les jours, 8 jours après l'instillation intratrachéale. Après un à deux mois les animaux étaient sacrifiés et les deux poumons prélevés. Nous avons utilisé 15 lapins dans cette seconde partie de notre travail.

Technique d'étude

1. Sérologique

La recherche d'anticorps anti-aspergillaires dans les sérums des lapins a été effectuée par analyse immunoélectrophorétique suivant les méthodes préconisées par l'école Lilloise.

Nous avons adopté la macro-méthode en support d'agarose sur des plaques de verre de $110 \times 50 \times 2,5$ mm recouvertes de 10 ml d'un gel à 0,9 g d'agarose pour 10 ml de tampon véronal sodé HCl de pH = 8,2. Les réservoirs d'antigène de 2,5 mm de diamètre sont situés à 8 mm du réservoir de sérum et à 30 mm du pôle négatif. La migration de l'antigène dure 5 H 30 sous une d.d.p. de 20 volts aux extrémités de la lame. L'équilibre antigène-anticorps est obtenu avec une dilution de 20 mgr de produit sec dans 0,1 ml de tampon pour un sérum concentré 4 fois en principe.

Nous avons utilisé pour ces analyses l'antigène *Aspergillus fumigatus* total de même souche que celle ayant servi à l'inoculation des animaux.

Les plaques d'agarose révèlent pendant 48 H à $+4^\circ\text{C}$, elles sont ensuite lavées pendant 3 jours à $+4^\circ\text{C}$ dans l'eau physiologique, puis déminéralisées au papier whatman n° 1 sous courant d'air froid pendant 4 H environ.

Des réactions de caractérisations enzymatiques ont ensuite été effectuées sur ces plaques et pour en augmenter le contraste sur des plaques partiellement séchées.

En effet, l'école Lilloise (5-6) a montré qu'au niveau des arcs spécifiques (arcs C et J) observés en cas de développement fongique de l'*Aspergillus*, il existait une activité enzymatique: activité chymotrypsique (arc C), activité catalasique (arc J).

Les lames sont ensuite colorées au Noir-amido de Schwarz.

2. Histologique

Les deux poumons D et G des 40 lapins ont été prélevés systématiquement pour examen anatomo-pathologique. Ces poumons sont fixés dans du formol à 10%. Après inclusion à la paraffine, ils sont colorés par l'hématéine-phloxine-safran et le hotchkiss-mac-manus.

Resultats

Nous envisagerons les résultats des examens sérologiques avant d'entreprendre l'étude anatomo-pathologique des 40 lapins, essayant ensuite de dégager les corrélations anatomosérologiques possibles.

1. Etude sérologique

Sur les 40 animaux inoculés, nous n'avons pu étudier que 33 sérums, 7 lapins étant décédés des suites de l'inoculation sans qu'il soit possible de les ponctionner.

Donc, sur 33 sérums étudiés, 19 nous ont donné une réponse immunologique sous forme de systèmes précipitants, de caractère différent suivant les 2 séries de lapins inoculés.

Nous pouvons globalement résumer nos résultats dans le tableau ci-dessous:

Séries de lapins \ Résultats sérologiques	Sérologie positive	Sérologie négative
Lapins tués après 8 jours d'inoculation (25 lapins)	12	11
Lapins suivis pendant 1 à 2 mois (15 lapins)	7	3

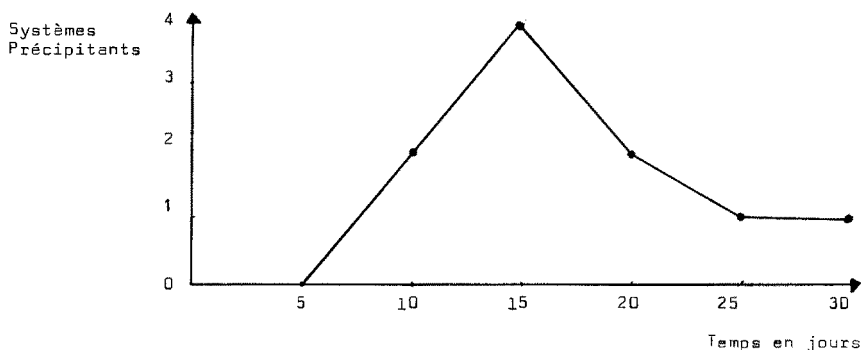
a. Dans la série des lapins sacrifiés après 8 jours d'inoculation (un animal sacrifié par jour)

L'étude sérologique nous a donné peu de systèmes précipitants: un maximum de 2 arcs seulement a été retrouvé dans 6 cas de réponses positives sur 12, dans les 6 autres cas, nous n'avons obtenu que l'arc parfois à peine visible.

b. Dans la série des lapins étudiés pendant 1 à 2 mois

L'étude sérologique nous a donné, dans 5 cas sur 7, une réponse immunologique avec une élévation du taux des anticorps débutant 10 jours après l'inoculation, montrant un maximum après 15 jours à 3 ou 4 systèmes précipitants, pour amorcer une chute au bout de 20 jours et se maintenir à 1 arc au moment où les animaux ont été sacrifiés (fig. 1).

Si nous essayons de donner une expression graphique à ces résultats, nous obtenons une courbe correspondant à la figure ci-dessous :



Courbe d'évolution des systèmes précipitants en fonction du temps exprimé en jours, dans le sérum des lapins dont l'évolution sérologique a été suivie pendant 1 à 2 mois.

2. Etude anatomo-pathologique

Notre étude analyse les lésions élémentaires et les regroupe pour essayer de définir un tableau anatomopathologique.

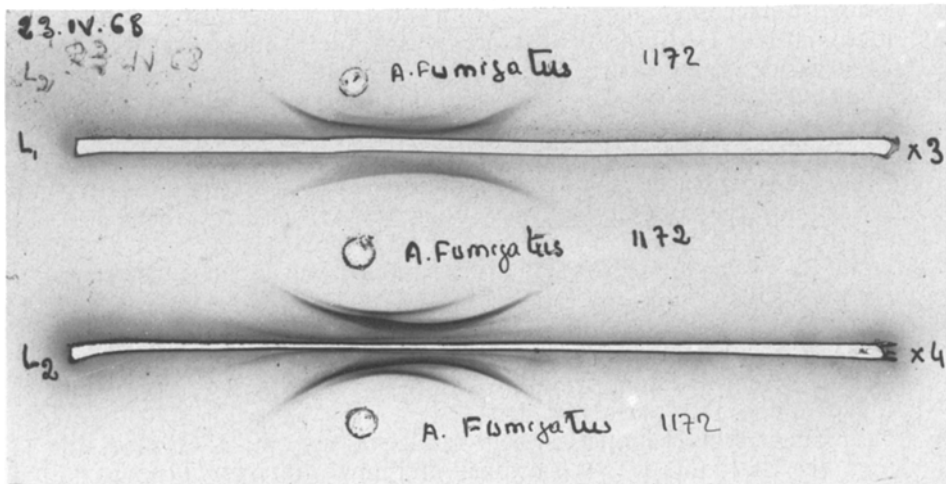


Fig. 1. Analyse immunoélectrophorétique révélant respectivement 2 et 4 systèmes précipitants dans les sérums des lapins.

a. Etude des lésions élémentaires

Sur les 80 poumons, nous avons étudié de façon systématique le revêtement pleural, les gros axes vasculaires, les axes bronchiques, les lumières et les parois alvéolaires.

. *la plèvre*: nous n'avons jamais observé de lésions pleurales. Le feuillet viscéral est toujours d'épaisseur normale. Il n'existe aucun exsudat en surface, aucun infiltrat inflammatoire.

. *les axes vasculaires*: sur les gros vaisseaux artériels ou veineux, nous n'avons également jamais observé de lésions. Les lumières sont larges et béantes. Les parois sont toujours subnormales sans aucun dépôt pathologique. Par contre, au niveau des parois alvéolaires, il existe une ectasie des capillaires.

. *les axes bronchiques*: là encore les lésions sont très peu fréquentes (4 cas) et se résument à des bouchons mucopurulents obstruant les lumières bronchiques, mais sans aucune atteinte des parois bronchiques elles-mêmes.

. *les alvéoles*: les lésions alvéolaires sont par contre beaucoup plus fréquentes puisqu'elles ont été notées dans les 40 cas.

Dans les lumières alvéolaires, il existe un exsudat de nature variée réalisant soit une alvéolite fibrineuse (5 cas) soit une alvéolite fibrino-hémorragique (22 cas), soit une alvéolite fibrino-purulente (2 cas). Parfois, les trois sont associées et réalisent une alvéolite fibrino-hémorragique et purulente (2 cas).

. *les parois alvéolaires*: elles sont épaissies. Ceci est le fait d'une ectasie

vasculaire s'accompagnant de suffusions hémorragiques et d'un infiltrat inflammatoire. Cet infiltrat est tantôt diffus, tantôt localisé et d'abondance variée. Il est constitué parfois d'éléments polynucléés, le plus souvent d'éléments mononucléés: lymphocytes, plasmocytes ou histiocytes. Ces histiocytes constituent des placards cellulaires. Leurs cytoplastes sont étalés, chargés de granulations P.A.S. positives. Cet infiltrat peut prendre un aspect très particulier et réalise le granulome type tuberculoïde ou sarcoïde like dont nous préciserons les caractères ci-dessous.

. les îlots lymphoïdes ne sont jamais lésés. Il n'existe aucune atrophie ou hyperplasie lymphoïde.

b. Regroupement des lésions élémentaires

Ces différentes lésions réalisent trois types lésionnels touchant l'un ou l'autre poumon, parfois les deux.

. le premier type lésionnel est tout à fait Aspécifique. C'est celui que l'on observe au cours de tout processus inflammatoire. Il touche les parois et les lumières alvéolaires et se traduit par la présence d'une alvéolite hémorragique ou fibrineuse à laquelle s'associent des lésions interstitielles: épaissement des septa par une ectasie vasculaire et un infiltrat mononucléé. Il n'existe pas de métaplasie du revêtement alvé-

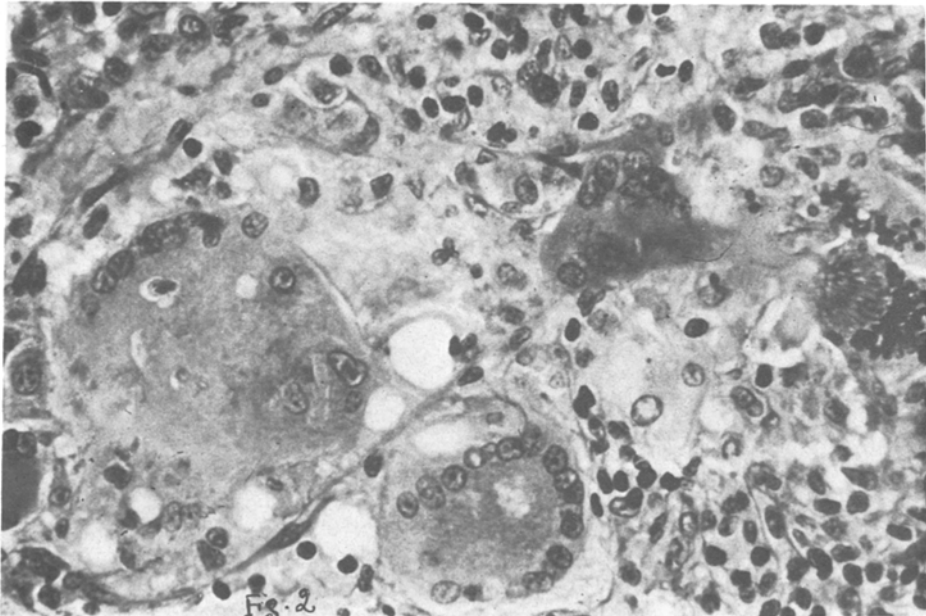


Fig. 2. Granulome tuberculoïde. Au centre: 3 cellules géantes plurinucléées macrophagiques. A droite: présence d'*Aspergillus*.

olaire. Cette lésion correspond à la pneumonie réticulée hypertrophique ou Atelectasie au stade initial vasculo-histiocytaire encore réversible.

. le deuxième type lésionnel considéré comme spécifique, est le granulome type tuberculoïde ou 'sarcoïde like'.

Sur le fond lésionnel précédemment décrit, apparaît un granulome: formation nodulaire riche en éléments inflammatoires où l'on reconnaît des histiocytes spumeux, des lymphocytes, parfois des cellules éosinophiles et des cellules géantes plurinucléées. Dans le cytoplasme des cellules géantes macrophagiques, nous avons pu observer des spores d'*Aspergillus fumigatus* mais jamais de filaments mycéliens. Ces granulomes sont parfois confluents et centrés par une nécrose piquetée d'éléments polynucléés. Parfois, ils ne sont qu'ébauchés et se caractérisent par la présence d'une seule cellule géante et de quelques rares éléments épithélioïdes au sein d'un granulome inflammatoire par ailleurs banal. Cet aspect bien connu est le dénominateur commun aux agressions antigéniques et on l'observe dans toutes les réactions s'apparentant aux réactions d'hypersensibilité retardée. Nous avons observé cette lésion 10 fois dans le poumon droit, 11 fois dans le poumon gauche, 7 fois ce granulome était centré par des spores d'*Aspergillus fumigatus*. (fig. 2 & 3).

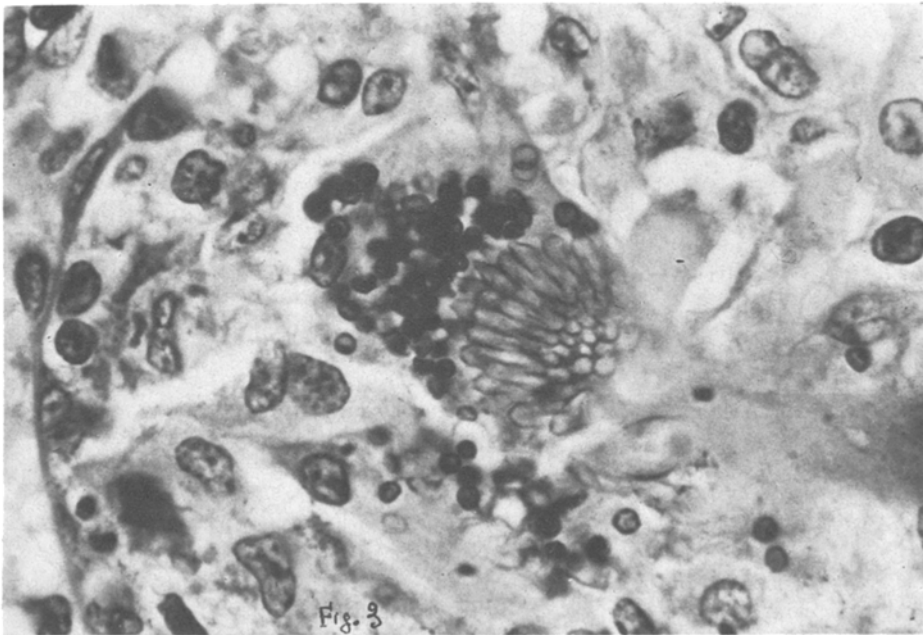


Fig. 3. Tête aspergillaire au fort grossissement.

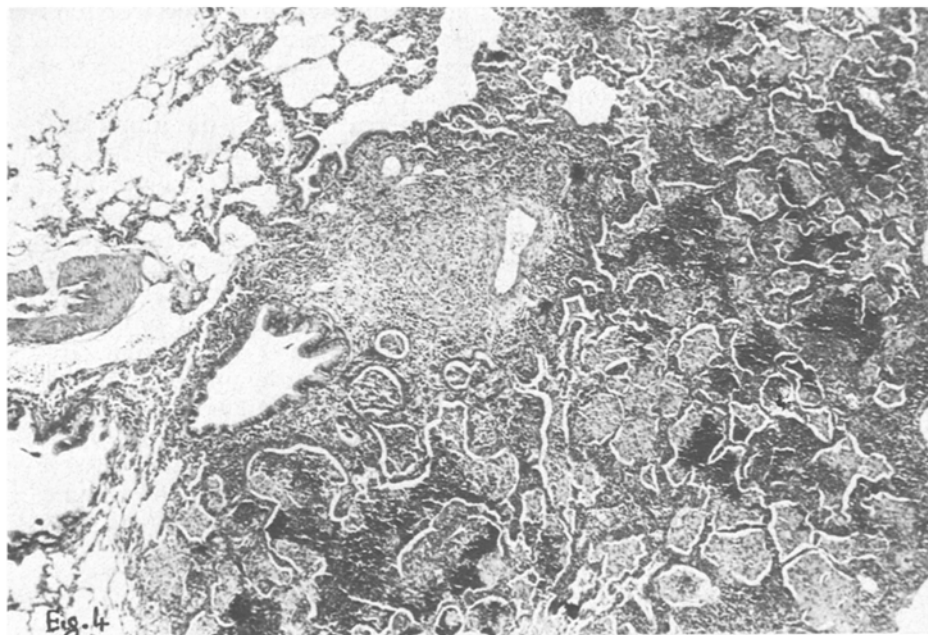


Fig. 4. Pneumonie interstitielle desquamative. Présence intraalvéolaires de pneumocytes granuleux PAS+.

. enfin, nous avons observé des lésions assez particulières caractérisées par la présence intra-alvéolaire de larges placards cellulaires (fig. 4). Il s'agit de pneumocytes granuleux ou cellules alvéolaires desquamées. Leur cytoplasme est large, étalé, finement granuleux et la coloration du hotchkiss-mac-manus objective la présence d'une substance P.A.S. positive. En aucun point on ne retrouve cependant de lésions folliculaires. Il s'y associe un infiltrat inflammatoire mononucléé souvent histiocyttaire ou plasmocytaire dans les parois alvéolaires.

Une telle lésion est le substratum anatomique d'une entité clinique actuellement bien connue en pathologie pulmonaire et décrite sous le nom de Pneumonie interstitielle desquamative. Cette pneumonie interstitielle desquamative serait un syndrome consécutif à des étiologies diverses. Les conséquences alvéolaires en sont toujours les mêmes, à savoir l'hyperplasie puis la desquamation intra-alvéolaire de pneumocytes granuleux avec perturbation de la sécrétion de surfactant dont rend compte l'accumulation intracellulaire de granulations P.A.S. positives.

Ces trois types lésionnels peuvent être isolés ou associés et il serait évidemment assez satisfaisant d'en faire des stades évolutifs successifs.

3. *Corrélations anatomo-sérologiques*

Trois points nous paraissent intéressants à relever au terme de ce travail :

a. Dans tous les cas, où nous avons obtenu une réponse
sérologique positive

. nous avons essayé de retrouver les activités enzymatiques chymotrypsique et catalasique spécifiques au niveau des systèmes précipitants élaborés dans les sérums des animaux. Nos résultats se sont toujours révélés négatifs. Ce fait s'explique, puisque nous n'avons pas créé d'aspergillome pulmonaire chez les lapins, les lésions histologiques retrouvées et considérées comme spécifiques étant un granulome type tuberculoïde ou 'sarcoïde like' dans lequel on retrouve des spores d'*Aspergillus* mais jamais de filaments mycéliens témoins d'un développement aspergillaire.

b. Dans la série des lapins sacrifiés après 8 jours d'inoculation,
nous avons des images histologiques intéressantes :

. dans 5 cas, nous retrouvons des granulomes typiques centrés par des spores aspergillaires. A ce granulome s'associe d'ailleurs une pneumonie réticulée hypertrophique et un infiltrat histiocytaire PAS positif intra-alvéolaire, mais dans ces cas, nous n'avons pas de réponse immunitaire décelable en précipitation : réaction négative ou faiblement positive (1 arc) dans 2 cas, les lapins n'ayant pas eu le temps de développer des anticorps anti-aspergillaires avant d'être sacrifiés.

. dans cette même série, nous avons observé 12 fois dans le poumon D, 11 fois dans le poumon G, le tableau correspondant à une pneumonie interstitielle desquamative, dans ces cas, nous avons une réponse sérologique révélant 1 ou 2 systèmes précipitants témoins de la résorption des spores d'*Aspergillus* par les macrophages.

c. Dans la série des lapins dont l'étude sérologique a été poursuivie
pendant 1 ou 2 mois, et qui ont été sacrifiés à cette date,
il a été observé :

. 7 fois dans le poumon D et 7 fois dans le poumon G des lésions non spécifiques à type de pneumonie interstitielle desquamative. Parmi ces cas, 3 fois, nous avons mis en évidence des cellules géantes sans toutefois retrouver de spores aspergillaires. L'évolution sérologique chez ces animaux nous avait montré une élévation, puis une baisse des systèmes précipitants correspondant à la disparition des spores aspergillaires sous l'effet de l'activité macrophagique.

. dans 2 cas, il a été observé un granulome tuberculoïde centré par des spores d'*Aspergillus*, mais dans ces 2 cas, il s'agissait d'animaux décédés quelques jours après l'inoculation et pour lesquels nous n'avons pu faire d'étude sérologique.

Conclusion

Nos constatations vérifient ce que Gernez-Rieux et ses collaborateurs (4) avaient établi: la disparition rapide des spores d'*Aspergillus* du tissu pulmonaire et le caractère spontanément régressif des lésions inflammatoires, puisque lorsque la réponse immunologique commence à apparaître, les lésions pulmonaires sont en voie de régression. Cependant, dans plusieurs cas (7 cas), nous avons retrouvé des images de granulome tuberculoïde centré sur les spores aspergillaires, et dans 19 cas, des images de pneumonie interstitielle desquamative.

Ces résultats nous posent le problème de l'interprétation des réactions sérologiques en pratique courante de laboratoire, à chaque fois que nous révélons des systèmes précipitants où il n'est pas possible de mettre en évidence une activité enzymatique.

—S'agit-il de malades ayant subi une imprégnation aspergillaire fugace par inhalation de spores d'*Aspergillus*?

—De malades qui pourraient par la suite développer une aspergillose pulmonaire interstitielle ou bronchectasique?

—Ou de malades présentant des phénomènes allergiques aux spores d'*Aspergillus fumigatus*?

Les arguments cliniques, radiologiques, épidémiologiques joints aux résultats sérologiques doivent s'étayer réciproquement pour départager les éventualités que la sérologie ne permet pas de préciser.

Bibliographie

1. Gernez-Rieux, Ch., J. Biguet, C. Voisin, A. Capron, E. Balgaires & P. Tran Van Ky (1963) Diagnostic sérologique des aspergillomes bronchopulmonaires par immunoélectrophorèse. J. Français de Médecine et Chirurgie, 17: 663-676.
2. Biguet, J., P. Tran Van Ky, S. Andrieu & J. Fruit (1964) Analyse immunoélectrophorétique d'extraits cellulaires et de milieux de culture d'*Aspergillus fumigatus* par des immunosérums expérimentaux et des sérums de malades atteints d'aspergillome bronchopulmonaire. Ann. Inst. Past. 107: 72-97.
3. Hirotsugu Sawasaki, Kazuo Horie, Yukio Naito, Shigeru Watabe, Gen Tajima & Yoshio Mizutani (1967) Experimental pulmonary aspergilloma. Mycopath. & Mycol. Appl. 32: 265-274.
4. Gernez-Rieux, Ch., C. Voisin, C. Aerts, F. Wattel, B. Gosselin, avec la collaboration de S. Andrieu, A. Petitprez & P. Tran Van Ky (1967) Aspergillose expérimentale du cobaye. Etude dynamique du rôle des macrophages alvéolaires dans la défense des voies respiratoires, après inhalation massive de spores d'*Aspergillus fumigatus*. Revue de Tuberculose et de Pneumologie, 36: 705-725.
5. Biguet, J., P. Tran Van Ky, J. Fruit & S. Andrieu (1967) Identification d'activité chymotrypsique au niveau des fractions remarquables d'extraît antigénique d'*Aspergillus fumigatus*. Répercussions sur le diagnostic immunologique de l'aspergillose. Revue d'Immunologie, 31: 317-328.
6. Tran Van Ky, P., J. Biguet & T. Vaucelle (1968) Etude d'une fraction antigénique d'*Aspergillus fumigatus* support d'une activité catalasique. Conséquence sur le diagnostic immunologique de l'aspergillose. Revue d'Immunologie, 32: 37-52.
7. Walbaum, S., J. Biguet, P. Tran Van Ky (1969) Structure antigénique de *Thermopolyspora polyspora*. Répercussions pratiques sur le diagnostic du 'poumon du fermier'. Ann. Inst. Past. 117: 673-693.