

## HISTOPLASMOSES

J. MASLIN, J-J. MORAND, G. MENARD, V. CLAUDE

• Travail du service de Biologie Clinique (J.M., Médecin Principal), Hôpital d'Instruction des Armées du Val de Grâce, 74 boulevard Port Royal, 75230 Paris cedex 05 • Fax : 01 40 51 42 98 • E-mail : maslin\_j@yahoo.com, du Service de dermatologie (J.J.M., Médecin Principal), Hôpital d'Instruction des Armées Laveran, Marseille, du Service de biologie clinique (G.M., Médecin Principal), Hôpital d'Instruction des Armées Ste Anne, Toulon et du Service d'anatomo-pathologie (VC, Médecin principal) Hôpital d'Instruction des Armées Bégin, St Mandé, France..

*Med Trop* 2002 ; 62 : 589-593

### Pour comprendre (classification)

L'agent responsable de l'histoplasmose est un champignon dimorphique encapsulé, *Histoplasma capsulatum*. La forme sexuée appartient au genre *Emmonsia* (Ascomycota, Euascomycetes, Onygenales : Onygenaceae). Ce champignon existe sous sa forme filamenteuse dans le sol et produit des spores très résistantes à dissémination aérienne. Ce sont les levures responsables des formes cliniques de l'histoplasmose. On distingue deux variétés, *var. capsulatum* et *var. duboisii*, de répartition géographique et de spectre anatomo-clinique très différentes. La variété *capsulatum* (Syn : histoplasmose à petites formes, histoplasmose américaine, maladie de Darling) a été décrite essentiellement sur le continent américain (centre et sud-est des USA-états du Mississippi du Missouri et de l'Ohio, Amérique centrale - Guyane et Caraïbes) mais également en Afrique, en Océanie - Nouvelle Calédonie et en Asie (Fig. 1). Les cas européens sont tous des cas d'importation. La forme filamenteuse a été isolée du sol, en particulier des terrains riches en azote apporté par les fientes d'oiseaux et le guano de chauves souris (grottes). Les facteurs de risque d'exposition sont représentés par les entretiens et nettoyages de poulaillers et les travaux d'excavation à l'origine d'aérosols de spores contaminantes. La variété *duboisii* (Syn : histoplasmose à grandes formes, histoplasmose africaine) est moins fréquente, et n'a été décrite qu'en Afrique inter-tropicale, du Sahara à l'Afrique du Sud (15°N - 10°S), et à Madagascar. Mais sur le continent africain, elle semble prédominer à l'ouest (Côte d'Ivoire). Sa forme filamenteuse environnementale est strictement identique à celle de la variété *capsulatum*.

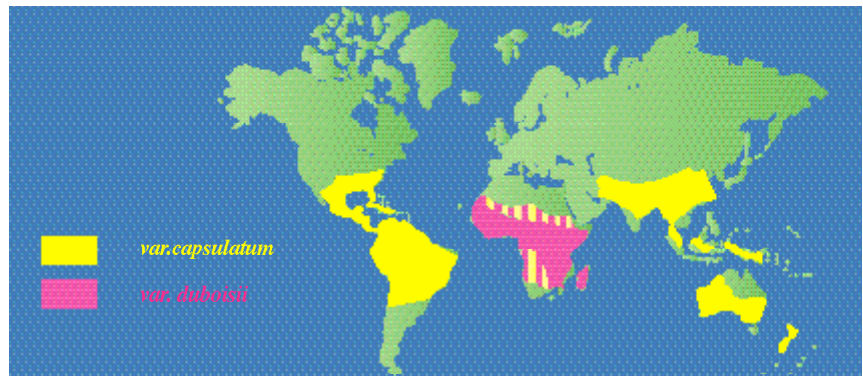


Figure 1 - Zones de distribution préférentielle de l'histoplasmose.

### Clinique

La symptomatologie de l'histoplasmose due à *Histoplasma capsulatum* variété *duboisii* (dite africaine, à juste titre) est très différente de celle due à *Histoplasma capsulatum* variété *capsulatum* (dite américaine, à tort, car de répartition mondiale).

L'atteinte cutanée de l'histoplasmose africaine domine, se traduisant par des papules ombiliquées, pouvant simuler une cryptococcose ou des molluscum contagiosum (Fig. 2), par des nodules abcédés, ou des ulcérations topiques (Fig. 3). Les adénopathies sont souvent associées et volontiers fistulisées. Les lésions ostéo-articulaires touchant préférentiellement les membres inférieurs, le crâne et les côtes, comportent des gommages ou des abcès simulant une tuberculose. L'atteinte pulmonaire ou muqueuse, la dissémination sont plus rares et s'observent alors sur un terrain d'immunosuppression.

L'atteinte initiale de l'histoplasmose américaine est surtout pulmonaire (en raison du mode de transmission par l'inhalation de spores présentes dans le sol contaminé). D'une manière générale, chez 90 % des sujets sains, l'inhalation

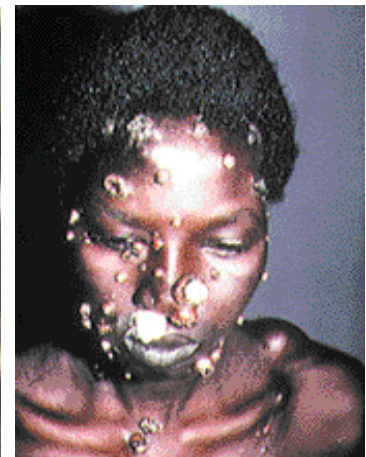


Figure 2 - Molluscum contagiosum provoqué par *Histoplasma capsulatum* variété *duboisii* (dite africaine, à juste titre) est très différente de celle due à *Histoplasma capsulatum* variété *capsulatum* (dite américaine, à tort, car de répartition mondiale).  
Figure 3 - Histoplasmose africaine (Coll. P. IMTSSA) Saint André.)

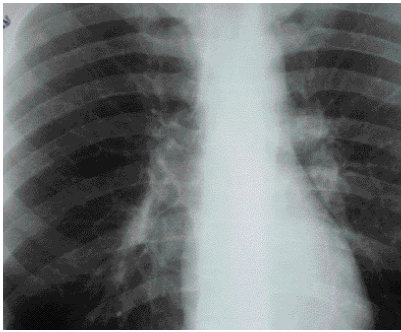


Figure 4 - Primo-infection d'histoplasmosis (Coll. Dr Bonnet).

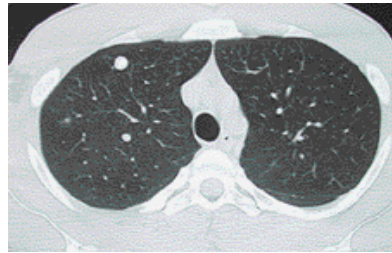


Figure 5 - Calcification du nodule d'histoplasmosis (Coll. Dr Bonnet).

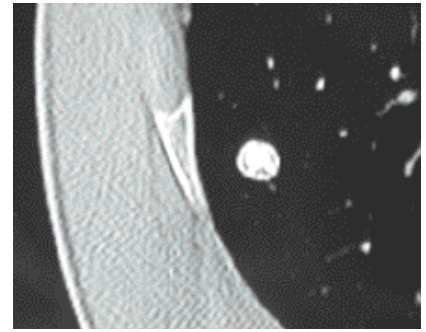


Figure 6 - Gros plan sur les calcifications (Coll. Dr Bonnet)

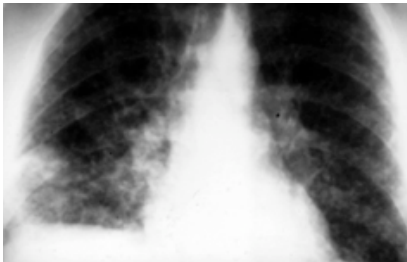


Figure 7 - Histoplasmosis invasive (Coll. Dr Bonnet).

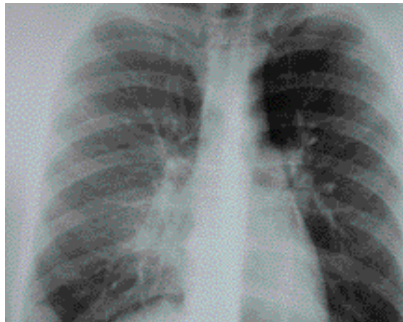


Figure 8 - Forme pseudotumorale (Coll. Dr Bonnet).

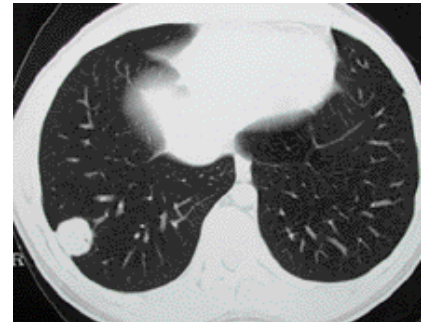


Figure 9 - Histoplasme (Coll. Dr Bonnet).

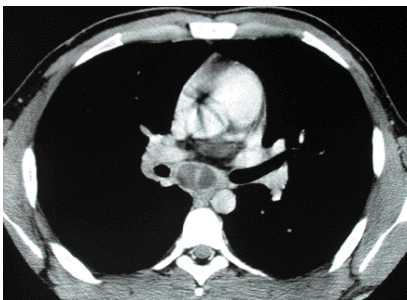


Figure 10 - Adénopathie médiastinale (Coll. Dr Bonnet)



Figure 11 - Histoplasmosis américaine (Coll. Dr Normand).



Figure 12 - Histoplasmosis muqueuse (Coll. Pr Sayag).

d'une quantité modérée de spores entraîne une infection pulmonaire bénigne ou asymptomatique, guérissant spontanément, laissant parfois quelques calcifications retrouvées fortuitement à la radiographie thoracique. Ces sujets présentaient classiquement une IDR à l'histoplasmine positive traduisant un état d'hypersensibilité. Les 10 % restants présentent une maladie plus grave, aux formes variables. Ils sont représentés par les sujets immunocompétents mais ayant inhalé une dose massive de spores, par des patients immunodéprimés (agammaglobulinémie, hémopathie maligne, sida, corticothérapie) ou présentant des anomalies fonctionnelles respiratoires. La primo-infection est souvent découverte à l'occasion d'une radiographie pulmonaire systématique : on y observe un ou plusieurs micro-nodules d'évolution fréquemment calcifiée, avec ou sans adénopathie médiastinale (Fig. 4-6). Les principaux diagnostics différentiels sont la primo-infection tuberculeuse, la sarcoïdose ou le cancer bronchique surtout chez le fumeur. On retrouve parfois la notion d'un épisode pseudo-grippal quelques jours après un séjour en zone d'endémie ; on peut observer une pneumopathie infiltrative hypoxémiante aiguë (Fig. 7), parfois pseudo-épidémique lors d'expositions massives notamment après des activités professionnelles ou de loisirs souterraines (spéléologie). La forme pseudotumorale ou histoplasme est silencieuse et s'exprime radiologiquement par une opacité ronde sans adénopathie (Fig. 8, 9). On décrit aussi une forme chronique pulmonaire résultant soit de l'évolution de la primo-infection, soit d'une réinfection ; elle se traduit par des infiltrats pulmonaires souvent excavés avec adénopathies médiastinales (Fig. 10), parfois par une fibrose médiastinale tardive avec péricardite, par une fièvre, un amaigrissement, des hémoptysies simulant également une tuberculose ou une néoplasie. Il existe des formes sévères à type de miliaire lors d'immunodépression. L'atteinte cutanée ne s'observe que dans les formes généralisées notamment lors de sida et comporte aussi des papules ombiliquées (Fig. 11) avec un net tropisme muqueux et une tendance à l'ulcération (Fig. 12) ou à une évolution végétante. Elle s'accompagne d'une fièvre, en général modérée, d'une hépato-splénomégalie, d'une polyadénopathie et parfois de diarrhées compliquées de perforations intestinales, d'insuffisance surrénalienne ou d'une atteinte neuro-méningée. On décrit des formes fulminantes avec coagulation intra-vasculaire disséminée et insuffisance rénale aiguë.



## Diagnostic au laboratoire

### Généralités

- Une histoplasmosse se doit d'être envisagée chez tout patient de retour de zone d'endémie présentant une pneumopathie traînante de type pseudo-tuberculeuse ne cédant pas sous antibiothérapie.
- La recherche d'*Histoplasma capsulatum* doit impérativement être notifiée au laboratoire pour pouvoir prendre d'emblée les mesures de précaution indispensables à cette recherche.
- La culture est très dangereuse : risque élevé de contamination lors des manipulations par inhalation de spores. A ce titre, elle est règlementée : acte réservé de mycologie régi par l'arrêté du 7 novembre 1980, avec obligation de travailler sous hotte à flux laminaire et de cultiver en tubes à vis. Il est préférable de proscrire les boîtes de Pétri, ou, si l'on ne dispose que de ce support d'isolement, de les sceller avec du Parafilm.
- Tout le matériel utilisé doit être décontaminé par autoclavage.

### Matériel

Microscope optique avec objectif X40 sans immersion, lames de verre et lamelles, pipette Pasteur, cône, récipient stérile à fermeture hermétique pour envoi des souches, écouvillon coton stérile, ciseau à tissu stérile, lame de bistouri stérile, méthanol, gélose en tube à vis type agar – glucose – peptone (Sabouraud) sans cycloheximide (inhibe la phase levure), milieu à la pomme de terre (PDA), gélose cœur-cerveau (BHI), gélose au sang. Pour les prélèvements contaminés, utilisation de géloses additionnées d'antibiotiques (chloramphénicol). Solution de KOH à 30 % enrichie en DMSO. Colorants Giemsa, Gram, PAS, Wright, Gomori Grocott. Solution de bleu de méthylène. Incubateur 22 à 30°C en atmosphère humide, matériel de protection (hottes, masques), centrifugeuse étanche, matériel à hémocultures.

### Prélèvement

La contamination étant essentiellement aérienne, le poumon est l'organe cible majeur même si les signes pulmonaires sont souvent absents dans l'histoplasmosse africaine. Par dissémination hématogène les levures peuvent atteindre tous les organes et les lésions secondaires peuvent se révéler très tardivement. Les formes disséminées s'observent notamment au cours du sida. Dans la plupart des cas, en particulier pour les expectorations, il s'agit de prélèvements polycontaminés dont la flore risque d'inhiber l'agent pathogène recherché. Les échantillons seront donc traités dans les plus brefs délais.

Pour la variété *capsulatum*, on recherchera les levures :

- dans les prélèvements pulmonaires profonds
- dans le sang, par hémoculture (la technique de lyse - centrifugation - Isolator, est la plus efficace)
- dans la moelle osseuse
- sur frottis ou biopsies de lésions buccales, pharyngées ou laryngées
- par biopsies diverses (ganglion, foie, rate, digestive...)
- dans divers liquides biologiques (LCR, urines...)

Pour la variété *duboisii*, il s'agit essentiellement de biopsies cutanées, ganglionnaires, ou osseuses, et de ponctions d'abcès.

### Examen direct

En pratique, le diagnostic repose sur la mise en évidence à l'examen direct de levures pseudo-encapsulées (d'où son nom) caractéristiques dans les produits pathologiques ou dans les biopsies tissulaires.

A l'examen cytologique, l'image caractéristique d'*H.c. var. capsulatum* à la coloration de *Giemsa* est celle d'un petit élément levuriforme réfringent, apparaissant limité par une pseudo-capsule avec un bourgeonnement unipolaire à base étroite, intra-macrophagique, ovalaire ou rond, de 3 à 4 µ de diamètre, contenant un noyau volumineux occupant plus de la moitié de la cellule (Fig. 13). Cet aspect de petite levure fera discuter *Candida glabrata*, ou *Cryptococcus*. La moelle osseuse et la couche leucocytaire du sang centrifugé feront l'objet de frottis fixés au méthanol et colorés au Wright ou au *Giemsa*.

*H.c. var. duboisii* est une levure de plus grande taille, intra-cellulaire, de 8 à 15 µ de diamètre avec une paroi épaisse et très réfringente lui donnant parfois un aspect pseudo-capsulé en « verre de montre », également avec un bourgeonnement à base étroite. Le diagnostic différentiel essentiel est la blastomycose. A ce stade, et dans les cas douteux, sont disponibles actuellement des anticorps spécifiques d'espèce utilisables en immuno-histochimie (immunofluorescence ou immunoperoxydase) que l'on peut utiliser sur des prélèvements biopsiques.

### Culture

Elle est inconstante et lente et l'ensemencement d'un volume important de produit pathologique doit être le plus précoce possible et dans un grand nombre de tubes à vis que l'on gardera (à part) au minimum 1 mois en atmosphère humide pour éviter le dessèchement. Les cultures sont examinées tous les 3 jours, sous hotte et sans ouvrir le tube. Le repiquage et l'isolement de toute colonie suspecte permet de s'affranchir d'une éventuelle contamination. L'identification est orientée par l'aspect de la forme filamenteuse et sur sa conversion en levure à 37 °C sur milieux au sang ou spéciaux. Ce test est parfois décevant *in vitro* et d'autres tests sont d'un apport contributif.

- La forme filamenteuse caractéristique du genre *Histoplasma* est obtenue après incubation à 25-30°C. Différents milieux peuvent être utilisés : milieu de Sabouraud, milieu PDA, gélose BHI. Le développement est lent (10 à 30 jours) : colonie duveteuse blanche puis ocrée à revers blanc à marron, plane à centre surélevé. En microscopie on observe les filaments septés portant des spores à base tronquée formées directement ou sur un court pédoncule. Les microconidies sont rondes ou piriformes, de 2 à 3 µ, les macroconidies de grande taille (10 à 25 µ) sont à paroi lisse et échinulée (aspect vermuqueux) (Fig. 14). Elles apparaissent plutôt sur les cultures anciennes. Cet aspect est commun aux deux variétés. Au stade précoce, l'aspect morphologique est évocateur de *Blastomyces dermatitidis*.
- La forme levuriforme sera obtenue à partir des produits pathologiques ou de la forme mycélienne à 37°C, sous humidité de 100 % et atmosphère enrichie en CO<sub>2</sub>, avec des repiquages réguliers.

On pourra utiliser un milieu BHI additionné de sang, mais d'autres milieux spéciaux existent.

Les colonies sont blanches à brunes. D'aspect glabre au début, la colonie se plisse et peut acquérir un aspect cérébriforme. En microscopie les levures d'*H. c. capsulatum* sont ovalaires, de petite taille (3 à 5 µ), à paroi épaisse et bourgeonnement et à base étroite. Pour *H. c. duboisii*, la forme levure se caractérise par l'association de levures ovalaires en citron à bourgeonnement polaire ou bipolaire de grande taille (8 à 15 µ) qui sont les plus nombreuses, à des formes plus petites (2 à 5 µ).

## Caractères physiologiques

Au stade de la culture mycélienne on peut faire le diagnostic différentiel par le test à l'uréase sur un milieu à l'urée qui est fortement positif en 48 heures pour la variété *capsulatum* et très faiblement positif ou négatif pour la variété *duboisii*.

## Diagnostic histologique

À l'examen direct d'une préparation cytologique colorée par Giemsa, *Histoplasma capsulatum* var. *capsulatum* est une levure réfringente intra macrophagique arrondie ou ovalaire de 1 à 4 µ de diamètre, correspondant à un volumineux noyau entouré d'une pseudo capsule réalisant un aspect de halo clair.

L'étude histologique des prélèvements d'un patient immunocompétent montre un granulome épithélioïde et géant cellulaire (Fig. 15) centré dans 30 à 50 % des cas par une nécrose caséuse trompeuse, plus rarement de type fibrinoïde ou hémorragique. L'examen minutieux, parfois en immersion, révèle des levures intra histiocytaires faiblement colorées, réfringentes (comme la plupart des levuriformes), de 2 à 4 µ de diamètre. L'imprégnation argentique de Gomori-Grocott est la coloration complémentaire de référence, qui montre la paroi colorée en noir des levures en position intra histiocytaires ou dispersées dans la nécrose (Fig. 16). La coloration par P. A. S. (Periodic Acid Schiff) colore ces formes en rose pourpre, avec la pseudo capsule visible en négatif.

Les lésions anciennes sont modifiées par des phénomènes de fibrose cicatricielle non spécifique et calcifiée de manière inconstante.

Lorsqu'il existe un déficit immunitaire, le granulome ne peut se constituer, et les macrophages conservent leur phénotype histiocytaire sans évolution vers la cellule épithélioïde ou géante, conduisant à la constitution d'un granulome principalement histiocytaire et riche en levures. L'histoplasmose à grandes formes, *Histoplasma capsulatum* var. *duboisii* (Fig. 17) apparaît morphologiquement moins spécifique. La levure (intra histiocytaire également), est de plus grande taille, de 8 à 15 µ. La paroi est épaisse et très réfringente, avec un aspect pseudo capsulé en « verre de montre ». Il existe des aspects de bourgeonnement sur base étroite.

Des aspects morphologiques moins spécifiques, ou des levures peu nombreuses, conduisent parfois à recourir à l'immunohistochimie avec des anticorps spécifiques anti-*Histoplasma capsulatum*. Cependant, l'immunohistochimie permettra d'identifier un agent pathogène non observé au Gomori-Grocott.

Le « gold standard » diagnostique reste l'identification mycologique d'*Histoplasma capsulatum* ce qui souligne l'indispensable collaboration entre les laboratoires d'anatomie pathologique et de biologie.

## Aspects immunologiques

La recherche d'anticorps peut conforter le diagnostic par des réactions de précipitation qui mettent en évidence deux fractions spécifiques (Fig. 18) :

- la bande H porteuse d'une activité glucuronidase, témoin d'une affection aiguë ;
- la bande M porteuse de l'activité catalase, persistante, témoin d'une affection aiguë ou chronique.

Il existe des réactions croisées avec les autres champignons dimorphiques et la sensibilité de ces tests est très moyenne (80% pour les immunocompétents et 50% pour les immunodéprimés). Les méthodes de fixation du complément ou d'immunodiffusion doivent être considérées comme complémentaires.

La recherche d'antigènes circulants est en cours de développement et semble intéressante pour les immunodéprimés en cas de maladie disséminée.

## Envoi aux laboratoires spécialisés :

L'identification précise fera souvent appel aux laboratoires spécialisés : Centre National de Référence des Mycoses et des Antifongiques (CNRMA), Institut Pasteur, 25-28 rue du Dr Roux, 75724 Paris Cedex 15 • E-mail : bdupont@pasteur.fr •

La réglementation du transport des matières infectieuses doit être respectée (triple emballage/normes 6.2 ONU) avec fiche de renseignements cliniques et épidémiologiques et l'identification de l'expéditeur.

On utilise un tube à vis avec milieu de Sabouraud.

## Techniques spécialisées et recherche

Elle ne peuvent être pratiquées en routine et nécessitent des installations spécifiques.

- L'inoculation à l'animal par voie intratesticulaire (cobaye) ou par voie intra-péritonéale (hamster doré) permet une recherche plus facile des levures pathogénomiques.
- Les techniques de biologie moléculaire sont actuellement en cours de développement dans ces laboratoires de référence et semblent intéressantes chez les immunodéprimés. Elles passent par l'utilisation de sondes moléculaires d'identification.
- L'étude de la génétique moléculaire par insertion de cassettes de disruption ou fusion de gènes vise actuellement à étudier les gènes responsables de l'adaptation du champignon à son hôte, de sa pathogénicité et de sa résistance aux antifongiques.

## Traitement

Le traitement de l'histoplasmose africaine doit être systématique et comporte en première intention de l'amphotéricine B (à raison de 2 g au total), de l'itraconazole (600 mg/j puis 400 mg/j). Le fluconazole ou le kétoconazole restent des alternatives. La primo-infection asymptomatique d'histoplasmose américaine n'est pas traitée. Les formes sévères de l'immunocompétent ou les formes symptomatiques de l'immunodéprimé bénéficient des mêmes thérapeutiques et notamment de l'amphotéricine B liposomale. Dans le cadre du sida, l'intérêt des prophylaxies primaires et secondaires sont discutées d'une part en raison de la fréquente restauration immunitaire favorisée par la multi-thérapie anti-rétrovirale, d'autre part par la constatation d'induction de résistance des mycoses. ■

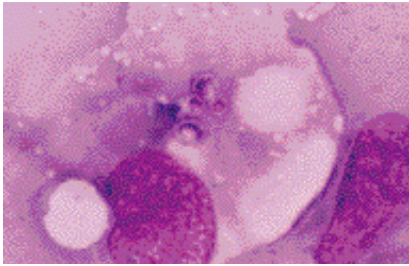


Figure 13 - Frottis d'*Histoplasma capsulatum* var. *capsulatum* (coloration de Giemsa).

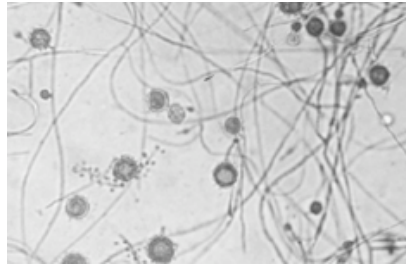


Figure 14 - Culture sur milieu de Sabouraud. Coloration au bleu de lactophénol montrant des chlamydo-spores échinulées et de filaments caractéristiques.

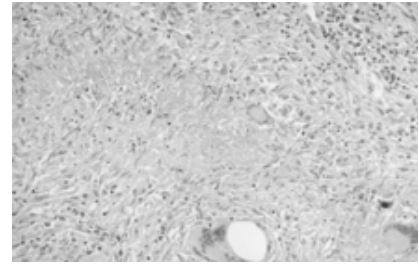


Figure 15 - Granulome tuberculoïde histoplasmique en HES.

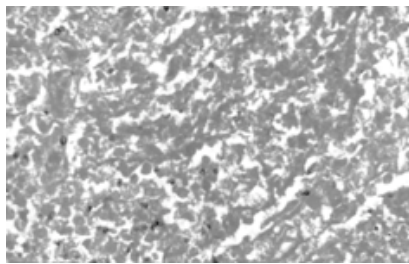


Figure 16 - Coupe histologique colorée au Gomori-Grocott (grossissement x 40) : granulome tuberculoïde avec les levures qui apparaissent en noir.

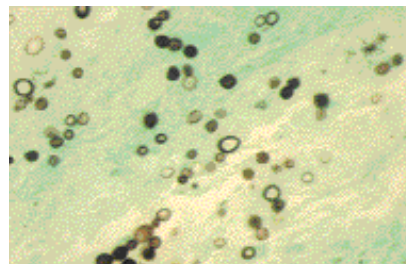


Figure 17 - *Histoplasma capsulatum* var. *duboisii* (coloration de Gomori-Grocott).

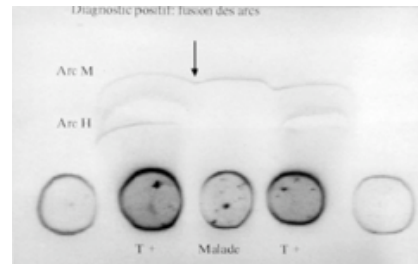


Figure 18 - Sérologie histoplasmique par électro-immunodiffusion : exemple de patient positif pour l'arc M. L'arc M est en continuité avec les arcs des témoins positifs.

Remerciements • Les auteurs remercient les docteurs Bonnet et Normand et les professeurs Saint-André et Sayag pour avoir prêté gracieusement leur iconographie.

### POUR EN SAVOIR PLUS

- BONNET D, NGUYEN G, DE PINA JJ *et Coll* - Histoplasmose pulmonaire africaine. Etude prospective chez 232 militaires ayant effectué un séjour de 2 ans en Guyane. *Med Trop* 2002; **62** : 33-38.
- COUPPIE P, CLYTI E, NACHER M *et Coll* - Acquired immunodeficiency syndrome-related oral and/or cutaneous histoplasmosis: a descriptive and comparative study of 21 cases in French Guiana. *Int J Dermatol* 2002; **41** : 571-576.
- IMBERT P, POIZOT-MARTIN I, LACOUR JP *et Coll* - Histoplasmose disséminée à *Histoplasma capsulatum* et sida chez l'Africain (à propos de 3 cas). *Med Trop* 1995; **55** : 151-153.
- CUGUILLERE A, MASLIN J, RAILLAT *et Coll* - Un nodule pulmonaire tropical. *Rev Pneumol Clin* 1997; **53** : 198-202.
- MOCHERLA S, WHEAT LJ - Treatment of histoplasmosis. *Semin Respir Infect* 2001; **16** : 141-148.
- IGNATOV A, KEATH EJ - Molecular cell biology and molecular genetics of *Histoplasma capsulatum*. *Int J Med Microbiol* 2002; **292** : 349-361.
- RICKERTS V, BIALEK R, TINTELOT K *et Coll* - Rapid PCR-Based diagnosis of disseminated histoplasmosis in an AIDS Patient. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2002; **21** : 821-823.