

ESTERRE P.*, ANDRIANTSIMAHAVANDY A.*

RESUME

Une approche moderne de Pathologie, mêlant immunohistochimie, microscopie électronique et analyse d'images, a permis de décrire le profil matriciel de fibrose irréversible dans la lésion cutanée de Chromomycose. Les populations cellulaires présentes dans l'infiltrat inflammatoire dense, parfois organisées en granulomes, ont été identifiées de même que le TGF- β , cytokine pro-fibrosante. Les phagocytes professionnels (polynucléaires neutrophiles et macrophages) ne semblent pas capables d'éliminer les éléments fongiques, et c'est cette persistance qui explique la réaction immune cellulaire exubérante.

Mots-clés : Chromomycose - Immunologie - Granulome - Fibrose - Peau.

SUMMARY

"Lesson from a cutaneous lesion : Chromomycosis." A modern approach of Pathology, using immunohistochemistry, electron microscope and image analysis, was made to describe the matrix profile of the non reversible fibrosis observed in the cutaneous lesion of Chromomycosis. The distribution pattern of cell populations in dense inflammatory infiltrate, sometimes organized in granulomas, has been identified concurrently with the *in situ* demonstration of the pro-fibrotic cytokine TGF- β . The professional phagocytes (polymorphonuclear neutrophils and macrophages) seem unable to fully eliminate the fungi. We suppose it is this persistence which explains the exuberant cell immune response.

Key-words : Chromomycoblastomycosis - Immunology - Granuloma - Fibrosis - Skin.

INTRODUCTION

Dermatite chronique provoquée par l'inoculation sous-cutanée de divers champignons colorés (**Dematiaceae**), la chromomycose (ou chromoblastomycose) est connue depuis 1915. Si la clinique et l'anatomo-pathologie sont décrites depuis longtemps, très peu de données immunologiques ont été recueillies sur cette mycose tropicale.

Mais de récents progrès techniques en matière de Morphologie (microscopie électronique et analyse d'image, assistées par ordinateur), d'Immunologie (immunohistochimie) et de Biologie moléculaire (hybridation *in situ*, PCR) ont révolutionné l'approche au niveau tissulaire. L'article suivant présente un bilan préliminaire d'une telle démarche de Pathologie moderne appliquée à l'étude de la lésion cutanée de Chromomycose.

GENERALITES SUR LES MYCOSES

Les champignons pathogènes sont de nature plus allergéniques que les bactéries, d'où de fortes réactions d'hypersensibilité retardée (un cas particulier d'immunité à médiation cellulaire), mais moins antigéniques, ce qui explique la rareté des anticorps mis en évidence et leur caractère non protecteur (2, 4, 5).

Les Mycoses sont généralement des infections chroniques, d'où par exemple au niveau cutané, les analogies observées entre chromomycose et diverses affections microbiennes (lèpre, tuberculose) ou parasitaires (leishmanioses cutanées) (6). Au niveau tissulaire, ces analogies seront mises en évidence par l'observation de réactions inflammatoires de type hypersensibilité retardée évoluant vers un granulome plus ou moins organisé (6). L'immunité protectrice fait généralement appel à des acteurs cellulaires non spécifiques: polynucléaires neutrophiles, macrophages, "Natural Killer" (1, 3, 4, 5, 17).

RAPPEL D'IMMUNODERMATOLOGIE

Au cours des deux dernières décennies, de nombreuses études ont établi l'importance de la peau dans les réactions immunitaires cutanées, d'où le développement de cette nouvelle spécialité médicale qu'est l'Immunodermatologie (7, 8, 9, 10).

Les réactions inflammatoires cutanées comportent une phase précoce, principalement vasculaire, au cours de laquelle sont secrétées des protéines pro-inflammatoires (cytokines IL-1, TNF- α ; PF-4; etc..) qui induisent l'apparition de molécules d'adhésion sur l'endothélium vasculaire. Celles-ci permettent la migration trans-endothéliale de leucocytes sanguins (lymphocytes, principalement T; monocytes se transformant en macrophages tissulaires; polynucléaires en particulier

* Unité d'Immunologie Parasitaire, Institut Pasteur de Madagascar, BP 1274, 101 Antananarivo.

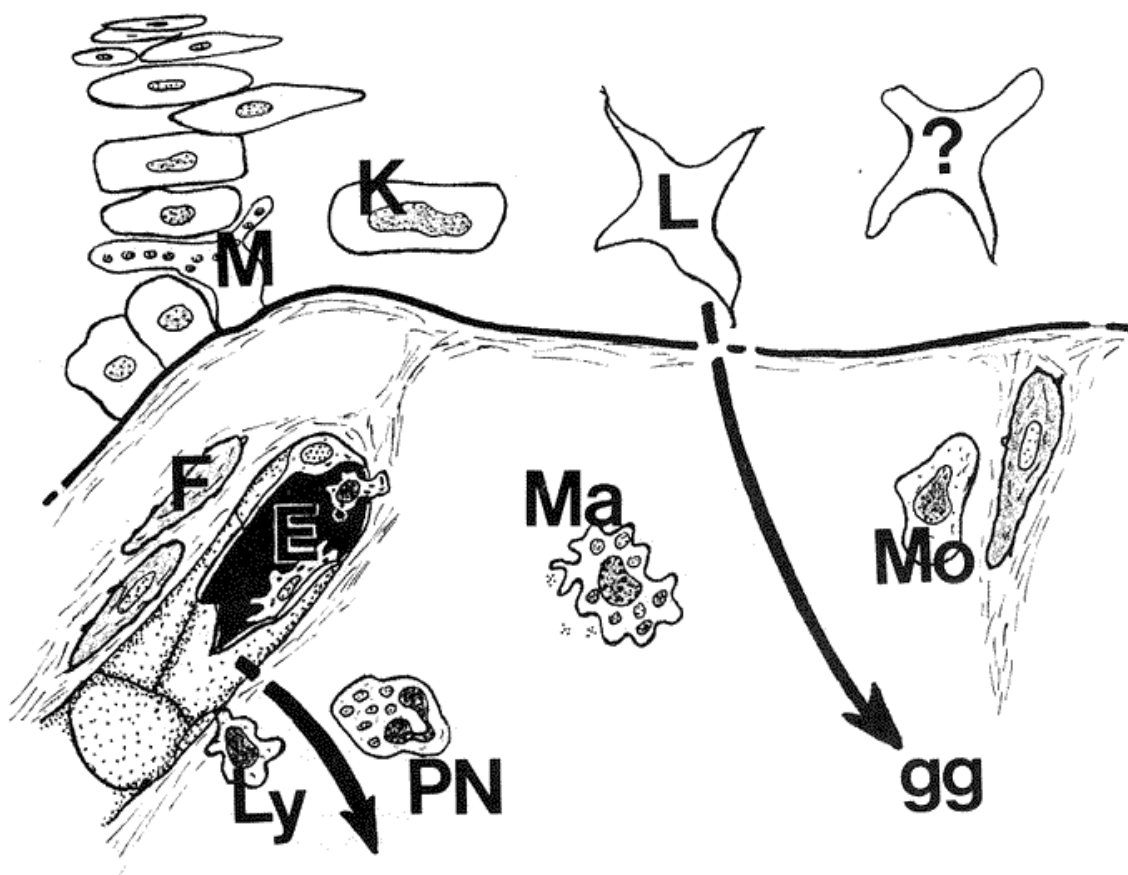
neutrophiles) vers le site inflammatoire (Figure 1). D'autres cellules sont déjà présentes dans le tissu (mastocytes, macrophages dermiques, fibroblastes). Le rôle des kératinocytes, longtemps négligé, est maintenant bien établi en particulier les possibilités de sécrétion de cytokines (IL-1, IL-3, GM-CSF,...) diffusant dans le derme. Les cellules de Langerhans ont elles pour fonction de dégrader l'antigène («processing») et de migrer vers le ganglion drainant où s'effectue la présentation des peptides antigéniques aux lymphocytes T sensi-

lisés. En cas de pénétration directe jusqu'au niveau dermique, il est probable qu'une autre cellule assure la présentation de l'antigène : les macrophages dermiques sont de bons candidats à cette fonction. Une dernière population cellulaire, portant le marqueur de surface Thy-1, a été identifiée dans l'épiderme de souris et est en cours de caractérisation chez l'homme (8).

Généralement, l'ensemble du phénomène immunitaire s'arrête au niveau du ganglion drainant, qui a donc un rôle de barrière bien précis.

Figure 1 : Acteurs immunitaires cutanés intervenant dans la phase vasculaire de la réaction inflammatoire.

K : Kératinocyte, M : Mélanocyte, L : cellule de Langerhans, ? : cellule de Thy-1+, F : Fibroblaste, E : Endothélium, Ly : Lymphocyte, PN : Polynucléaire, Ma : Mastocyte, Mo : Macrophage, gg : ganglion drainant



ANATOMO-PATHOLOGIE DES LESIONS

Souvent utilisée comme moyen diagnostique, la biopsie cutanée permet de mettre fréquemment en évidence les éléments fongiques caractéristiques ("cellules fumagoïdes", ou "sclerotic cells" des auteurs anglo-saxons).

Laissons DESTOMBES décrire la réaction tissulaire (11): «elle montre une hyperplasie épidermique papillomateuse considérable et irrégulière, parfois pseudo-tumorale avec hyperkératose. Dans les bourgeons épithéliaux et surtout dans le derme, existent des nodules mycotiques élémentaires dans lesquels la zone histiocyttaire prend des aspects variés, macrophagiques surtout, folliculaires tuberculoïdes parfois». On remarque donc la forte participation macrophagique, avec la morphologie typique des cellules épithélioïdes souvent rangées en palissade autour d'une zone purulente (6). Ces lésions peuvent poser, lorsqu'aucune cellule fumagoïde n'a pu être mise en évidence, un problème de diagnostic différentiel (12).

LA REACTION IMMUNE CELLULAIRE

Une biopsie réalisée dans les berges inflammatoires d'une lésion verruqueuse, ou dans une lésion desquamée de type psoriasis (forme plus rare) montre une intense réaction inflammatoire. De nombreux abcès à polynucléaires neutrophiles, identifiés facilement par des marqueurs de surface ou par la présence d'enzymes caractéristiques, sont observés dans l'épiderme papillomateux ou dans le derme superficiel. Le

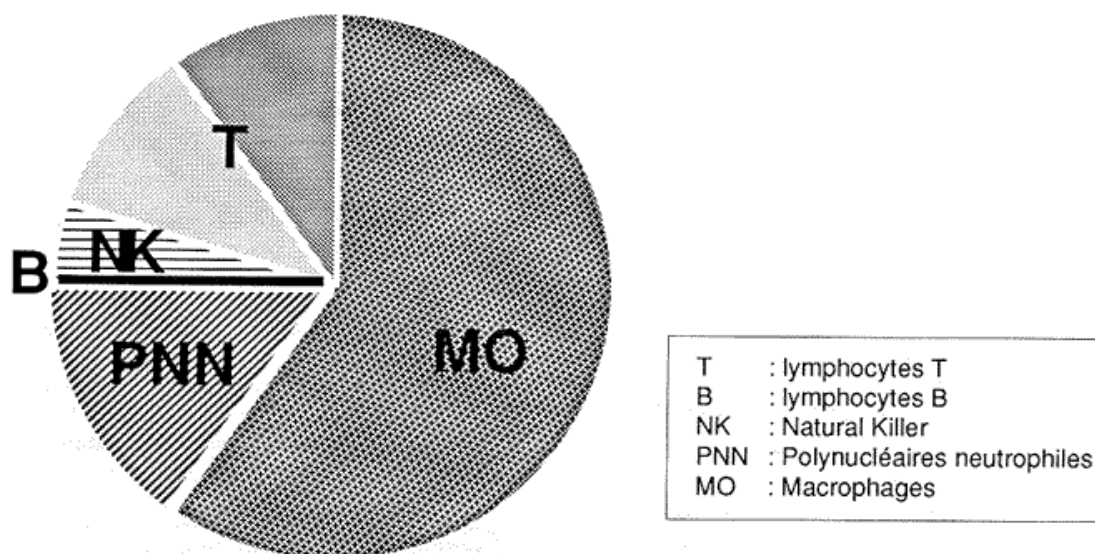
microscope électronique révèle un fort oedème, dissociant l'organisation tissulaire et associant activité cytotoxique des neutrophiles et destruction des kératinocytes voisins (images de nécrose cellulaire) (16). La phagocytose complète des cellules fumagoïdes semble impossible, même si des images de dégradation partielle de la paroi sont fréquentes (15, 16).

Ces infiltrats denses prennent souvent un aspect granulomateux hautement organisé, avec macrophages activés (parfois sécrétant la cytokine TNF- α) et cellules géantes de type Langhans, dans le derme. La proportion relative des différentes sous-populations cellulaires a pu être déterminée à l'aide d'anticorps monoclonaux et de marquages immunoenzymatiques (16 et Figure 2). Notons la faible présence de lymphocytes «NK», ce qui jette le doute sur leur éventuel rôle protecteur dans cette mycose par rapport à la cryptococcose et l'histioplasmosse (14).

Une réponse immune T est indispensable, non seulement pour développer une réaction cellulaire de défense contre les éléments pathogènes inoculés, mais aussi pour réguler la réponse humorale (effet «help»). L'existence d'anticorps circulants, persistants tout au long de l'évolution clinique et à forte affinité, est probablement reliée à la libération continue de fractions antigéniques solubles (13).

Par comparaison, une biopsie réalisée au centre des lésions verruqueuses révèle la présence surprenante de travées inflammatoires au sein d'un tissu fibrotique profondément remanié (15).

Figure 2 : Proportions relatives des différentes populations cellulaires dans la lésion de Chromomycose.



LA FIBROSE PERI-GRANULOME

L'ancien terme de «tissu conjonctif» doit être abandonné au profit de celui de «matrice extracellulaire» pour désigner l'armature biomécanique des tissus et organes. Mélange complexe riche en protéines (collagènes, élastine, protéoglycanes et glycoprotéines d'adhésion), cette structure macromoléculaire constitue un réseau insoluble très stable (23). La cellule responsable de la biosynthèse de ces constituants interstitiels est le fibroblaste dont le phénotype est très variable d'une situation à l'autre (22). La fibrose est un état pathologique caractérisé par un excès de dépôt de matrice extra-cellulaire, en particulier de collagène. L'exploration moléculaire des facteurs déclenchant cette réaction anormale est récente. Particulièrement instructive pour toutes les fibroses cutanées, la démonstration d'une activation précoce du gène du TGF- β 1 (la cytokine pro-fibrosante la plus étudiée actuellement) dans les cellules endothéliales et les fibroblastes adjacents a été effectuée sur des chéloïdes (20).

Pour notre part, nous avons étudié la portion centrale, sclérotique, des lésions verruqueuses de Chromomycose. Ultrastructuralement, on note une intense fibrose en périphérie des granulomes. Celle-ci finit par envahir tout le derme. Les seules cellules viables dans cet environnement anormal sont de nombreux mastocytes et des fibroblastes en synthèse (17, 19). Aucune démonstration d'un processus cellulaire (par des macrophages ou des fibroclastes) ou extracellulaire (enzymatique) de remodelage tissulaire n'a pu être réalisée (19). Par contre, la présence de TGF- β a été démontrée dans ces mêmes zones (19). Ce profil matriciel typique d'une fibrose totalement irréversible nous a permis de vérifier la validité de nouveaux marqueurs

biochimiques (21). L'hypothèse de travail actuelle consiste à considérer cette fibrose, associée au granulome (18), comme une réponse cellulaire aux antigènes fongiques qui est exubérante et maintenue dans le temps par la persistance du champignon *in situ*.

CONCLUSION

Les nombreuses données nouvelles présentées ici ne doivent pas nous faire oublier les nombreux points obscurs qui restent à étudier, tant au niveau immunopathologique (Tableau I) qu'au niveau moléculaire (mécanismes d'activation et de désactivation des gènes concernés). On constate que la plus grande partie des manifestations tissulaires observées proviennent de la réaction inflammatoire elle-même plutôt que par des dommages créés par le champignon lui-même. L'un des problèmes fondamentaux à résoudre reste l'identification des antigènes dominants initiant la réponse immune cellulaire et ceux qui sont les cibles de la réponse par anticorps.

Des recherches supplémentaires sur cette pathologie tropicale seront nécessaires, en particulier par comparaison avec d'autres fibroses irréversibles (sclérodermie, chéloïdes) ou plus remodelables (fibroses pulmonaires et hépatiques, notamment bilharzienne). L'importance en Santé Publique de cette affection à Madagascar (13, 24, 25, 26) nous permet de disposer d'un matériel biologique de haute qualité et de continuer l'approche immunologique développée récemment (13).

A plus long terme, l'espoir de développer une nouvelle stratégie thérapeutique associant un antifongique spécifique (imidazolés ou nouvelles allylamines) et un antifibrosant (cytokine ou produit chimique) paraît raisonnable.

TABLEAU I : Questions à propos de la Chromomycose : ce que ne savent pas les immunologistes.

* QUELLES CELLULES JOUENT UN ROLE DANS L'IMMUNITE PROTECTRICE ?

- POLYNUCLEAIRES NEUTROPHILES (où est l'IL-8 ?)
- MACROPHAGES RESIDENTS ("Histiocytes")
- MACROPHAGES recrutés (IL-3 ? GM-CSF ?) et ACTIVES (IFN- γ ?)
- QUELLES PREUVES D'UNE REACTION D'HYPERSENSIBILITE ?
 - ... SPECIFIQUE DE QUELS ANTIGENES ??
 - ... EXISTE-T-IL DES "Pathology-related Antigens" ??

* QUELLES POPULATIONS CELLULAIRES ACTIVENT LES LYMPHOCYTES T ?

- MACROPHAGES DERMIFIQUES ?
- MACROPHAGES ACTIVES du granulome ?
- CELLULES DE LANGERHANS de l'épiderme ?

* QUELS SIGNAUX INDUISENT / ENTRETIENNENT LA FIBROSE ?

- FIBROSE ET GRANULOME SONT-ILS INTERDEPENDANTS ? SI "NON", SONT-ILS REGULES DE MANIERE DIFFERENTIELLE ?
- "Switch on" : QUELLE CYTOKINE ? TGF- β ?
- "Switch off" : PRODUITS DE DEGRADATION MATRICIELLE ? CYTOKINE ?
- DES FACTEURS GENETIQUES (pas seulement immunogénétiques) SONT-ILS IMPLIQUES DANS LA PATHOLOGIE ?
- UNE THERAPEUTIQUE ANTIFONGIQUE PEUT-ELLE INTERFERER AVEC L'IMMUNOREGULATION DE LA PATHOLOGIE (Granulome / Fibrose) ?
- PEUT-ON ESPERER MANIPULER LE RESEAU DES CYTOKINES DE FACON A EMPECHER LE DEVELOPPEMENT PATHOLOGIQUE ?
 - ... Association Immunothérapie (antifibrosante) + Chimiothérapie (antifongique) ?

BIBLIOGRAPHIE

I. GENERALITES SUR LES MYCOSES

1. DIAMOND R.D. – Immune response to fungal infection. *Rev. Inf. Dis.*, 1989, **11**: 1600-1604.
2. DROUHET E. – Les phénomènes d'immunité dans les Mycoses. Cours de Mycologie Médicale, Institut Pasteur, Paris, 1990.
3. GREENFIELD R.A. – Host defense system interactions with *Candida*. *J. Med. Veterin. Mycol.*, 1992, **30**: 89-104.
4. LAGRANGE P., HURTREL B. – Mécanismes de défense dans les Mycoses profondes. *Méd. Mal. Inf.*, 1984, **14**: 558-564.
5. LEVITZ S.M. – Overview of host defenses in fungal infections. *Clin. Inf. Dis.*, 1992, **14**: 37-42.
6. RAVISSE P. – Eléments d'histopathologie des lésions mycosiques. Cours de Mycologie Médicale, Institut Pasteur, Paris, 1981.

II. IMMUNODERMATOLOGIE

7. ASSIM. – Immunologie et Maladies cutanées, chap. 8, in: Immunologie Clinique, Medsi/McGraw-Hill Ed., Paris, 1990.
8. BAGOT M., DUBERTRET L. – La peau: un organe lymphoïde périphérique. *Médecine/Sciences*, 1988, **5**: 287-297.
9. BOS J.D., KAPSENBERG M.L. – The skin immune system: Its constituents and interactions. *Immunol. Today*, 1986, **7**: 235-240.
10. SHIMADA S., KATZ S.I. – The skin as an immunologic organ. *Arch. Pathol. Lab. Med.*, 1988, **112**: 231-234.

III. ANATOMO - PATHOLOGIE

11. DESTOMBES P. – Histopathologie des mycoses et des fausses mycoses. *Arch. Inst. Past. Algérie*, 1968, **46**: 5-36.
12. SALFELDER K. – Atlas of Fungal Pathology, Current Histopathology. Kluwer Ac. Pub., Dordrecht, Netherlands, 1990.

IV. IMMUNITE CELLULAIRE

13. ANDRIANTSIMAHAVANDY A., MICHEL P., RASOLOFONIRINA N., ROUX J. – Apport de l'Immunologie au diagnostic de la Chromomycose à Madagascar. *J. Mycol. Méd.*, 1993, **3**: 30-36.
14. AHRENS J., GRAYBILL J.R., ABISHAWL A., TIO F.O., RINALDI M.G. – Experimental murine chromomycosis mimicking chronic progressive human disease. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 1989, **40**: 651-658.

15. ESTERRE P., RAVISSE P., PEYROL S., PRADINAUD R., SAINTE-MARIE D., DUPONT B., GRIMAUD J.A. Immunopathologie de la lésion cutanée de Chromomycose. *J. Mycol. Méd.*, 1991, **1**: 201-207.

16. ESTERRE P., PEYROL S., SAINTE-MARIE D., PRADINAUD R., GRIMAUD J.A. – Granulomatous reaction and tissue remodelling in the cutaneous lesion of Chromomycosis. *Virchows Arch. A*, 1993, **422**: 285-291.

17. ROITTI I. Immunologie Clinique (Ed. française). Pradel Ed., Paris, 1990.

V. FIBROSE ET MATRICE EXTRA-CELLULAIRE

18. DUNN M.A. – Fibrosis in Granulomas, in: Basic and Clinical aspects of Granulomatous Diseases. Boros and Yoshida Eds., Elsevier, 1980.
19. ESTERRE P., PEYROL S., GUERRET S., SAINTE-MARIE D., PRADINAUD R., GRIMAUD J.A. – Cell-matrix patterns in the cutaneous lesion of Chromomycosis. *Pathol. Res. Pract.*, 1992, **188**: 894-900.

20. PELTONEN J., HSIAO L.L., JAAKKOLA S., SOLBERG S., AUMAILLEY M., TIMPL R., CHU M.L., UITTO J. – Activation of collagen gene expression in keloids: co-localization of type I and VI collagen and TGF- β 1 mRNA. *J. Invest. dermatol.*, 1991, **97**: 240-248.

21. RICARD-BLUM S., ESTERRE P., GRIMAUD J.A. – La pyridinoline, marqueur de la stabilité des fibres tissulaires. Poster Société Française du Tissu Conjonctif, Caen, 18-20 Mars 1993.

22. ROBERT L. – Le fibroblaste, définition de son phénotype par son «programme» de biosynthèse de la matrice extracellulaire. *Pathol. Biol.*, 1992, **40**: 851-858.

23. VAN DER REST M. – Le placenta, source de protéines humaines. *Biofutur*, 1992, **116**: 54-56.

VI. LA CHROMOMYCOSE A MADAGASCAR.

24. BRYGOO E.R., SEGRETAI G. Etude clinique, épidémiologique et mycologique de la Chromoblastomycose à Madagascar. *Bull. Soc. Path. Exot.*, 1960, **3**: 443-473.

25. COULANGES P. – La Chromoblastomycose. *Arch. Inst. Pasteur Madagascar*, 1971, **40**: 63-84.

26. MICHEL P., ANDRIANTSIMAHAVANDY A., LE JEANNIC P., RATSIOHARANA M., COULANGES P. – La Chromomycose à Madagascar. *Méd. Armées*, 1992, **20**: 171-175.