



HAL
open science

Évaluation prospective d'un nouveau kit ELISA pour la détection des IgG anti-Aspergillus dans le diagnostic des aspergilloses pulmonaires chroniques et allergiques

Carine Dumollard

► To cite this version:

Carine Dumollard. Évaluation prospective d'un nouveau kit ELISA pour la détection des IgG anti-Aspergillus dans le diagnostic des aspergilloses pulmonaires chroniques et allergiques. Sciences pharmaceutiques. 2015. dumas-01368082

HAL Id: dumas-01368082

<https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-01368082v1>

Submitted on 19 Sep 2016

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il n'a pas été réévalué depuis la date de soutenance.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact au SID de Grenoble : thesebum@ujf-grenoble.fr

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10

<http://www.cfcopies.com/juridique/droit-auteur>

<http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm>

UNIVERSITE JOSEPH FOURIER
FACULTE DE PHARMACIE DE GRENOBLE

Année : 2015

N°

**EVALUATION PROSPECTIVE D'UN NOUVEAU KIT ELISA POUR LA
DETECTION DES IgG ANTI-ASPERGILLUS DANS LE DIAGNOSTIC DES
ASPERGILLOSES PULMONAIRES CHRONIQUES ET ALLERGIQUES**

MEMOIRE

DU DIPLOME D'ETUDES SPECIALISEES DE BIOLOGIE MEDICALE :

Conformément aux dispositions du décret N° 90-810 du 10 septembre 1990, tient lieu de

THESE

PRESENTEE POUR L'OBTENTION DU TITRE DE DOCTEUR EN PHARMACIE

DIPLOME D'ETAT

DUMOLLARD Carine

[Données à caractère personnel]

Thèse soutenue publiquement à la Faculté de Pharmacie de Grenoble*

le 17 septembre 2015

DEVANT LE JURY COMPOSE DE

Présidente du Jury : Madame le Professeur Muriel CORNET

Membres :

Madame le Professeur Muriel CORNET, Directrice de thèse

Madame le Docteur Florence PERSAT

Monsieur le Professeur Hervé PELLOUX

Monsieur le Professeur Frédéric GRENOUILLET

Monsieur le Docteur Boubou CAMARA

**La Faculté de Pharmacie de Grenoble n'entend donner aucune approbation ni improbation aux opinions émises dans les thèses; ces opinions sont considérées comme propres à leurs auteurs.*

Doyen de la Faculté : M. le Pr. Christophe RIBUOT
Vice-doyen et Directrice des Etudes : Mme Delphine ALDEBERT

Année 2014-2015

ENSEIGNANTS A L'UFR DE PHARMACIE

STATUT	NOM	PRENOM	DEPARTEMENT**	LABORATOIRE
MCU	ALDEBERT	Delphine	D4	LAPM_UMR SNRS 5163
PU-PH	ALLENET	Benoît	D5	THEMAS TIMC-IMAG (UMR CNRS 5525)
PU	BAKRI	Aziz	D5	TIMC-IMAG
MCU	BATANDIER	Cécile	D1	LBFA, Inserm U1055
MCU-PH	BEDOUCHE	Pierrick	D5	THEMAS TIMC-IMAG (UMR CNRS 5525)
MCU	BELAIDI-CORSAT	Elise	D5	HP2-Inserm U1042
PAST	BELLET	Béatrice	D5	-
PU	BOUMENDJEL	Ahcène	D3	DPM, UJF/CNRS UMR 5063
MCU	BOURGOIN	Sandrine	D1	CRI Inserm/UJF U823, équipe 5
MCU	BRETON	Jean	D1	L.C.I.B. - UMR E3 CEA/UJF
MCU	BRIANCON-MARJOLLET	Anne	D5	HP2-Inserm U1042
MCU	BUDAYOVA SPANO	Monika	D4	IBS
PU	BURMEISTER	Wim	D4	UVHCI, UMI 3265 UJF-EMBL-CNRS
MCU-PH	BUSSER	Benoit	D1	CRI Inserm/UJF U823, équipe 5
Professeur Emérite	CALOP	Jean	D5	-
MCU	CAVAILLES	Pierre	D1	LAPM
MCU	CHOISNARD	Luc	D2	DPM, UJF/CNRS UMR 5063
PU-PH	CORNET	Murielle	D4	THEREX, TIMC-IMAG
PU-PH	DANEL	Vincent	D5	SMUR SAMU
PU	DECOUT	Jean-Luc	D2	DPM, UJF/CNRS UMR 5063
MCU	DELETRAZ-DELPORTE	Martine	D5	Equipe SIS « Santé, Individu, Société »-EAM 4128) UCB

Mise à jour le 17 novembre 2014 par Lantou FAURE NEUHAUSER.

UFR de Pharmacie de Grenoble

DOMAINE DE LA MERCI
38706 LA TRONCHE CEDEX – France
TEL : +33 (0)4 76 63 71 72
FAX : +33 (0)4 76 63 71 70
Affaire suivie par Lantou FAURE NEUHAUSER

Lantou.Faure@ujf-grenoble.fr



MCU	DEMEILLIERS	Christine	D1	LBFA, Inserm U1055
PU	DROUET	Christian	D4	AGIM - CNRS 3405
PU	DROUET	Emmanuel	D4	UVHCI, UMI 3265 UJF-EMBL-CNRS
MCU	DURMORT-MEUNIER	Claire	D1	I.B.S
PU-PH	FAURE	Patrice	D1	HP2-Inserm U1042
PRCE	FITE	Andrée	D6	-
PRAG	GAUCHARD	Pierre-Alexis	D3	-
MCU-PH	GERMI	Raphaëlle	D4	UVHCI, UMI 3265 UJF-EMBL-CNRS
MCU	GEZE	Annabelle	D2	DPM, UJF/CNRS UMR 5063
MCU	GILLY	Catherine	D3	DPM, UJF/CNRS UMR 5063
PU	GODIN-RIBUOT	Diane	D5	HP2-Inserm U1042
PRCE	GOUBIER MATHYS	Laurence	D6	-
Professeure Emérite	GRILLOT	Renée	D4	-
MCU	GROSSET	Catherine	D2	DPM, UJF/CNRS UMR 5063
MCU	GUIEU	Valérie	D2	DPM, UJF/CNRS UMR 5063
MCU	HININGER-FAVIER	Isabelle	D1	LBFA, Inserm U1055
MCU	JOYEUX-FAURE	Marie	D5	HP2-Inserm U1042
MCU	KHALEF	Nawel	D5	TIMC-IMAG
MCU	KRIVOBOK	Serge	D3	IRTSV
PU	LENORMAND	Jean Luc	D1	THEREX, TIMC-IMAG
PU	MARTIN	Donald	D1	TIMC-IMAG, UMR 5525 UJF-CNRS
MCU	MELO DE LIMA	Christelle	D4	L.E.C.A
PU-PH	MOSSUZ	Pascal	D4	THEREX, TIMC-IMAG
MCU	MOUHAMADOU	Bello	D3	L.E.C.A
MCU	NICOLLE	Edwige	D3	DPM, UJF/CNRS UMR 5063
MCU	OUKACINE	Farid	D2	DPM, UJF/CNRS UMR 5063
MCU	PERES	Basile	D3	DPM, UJF/CNRS UMR 5063
MCU	PEUCHMAUR	Marine	D3	DPM, UJF/CNRS UMR 5063
PU	PEYRIN	Éric	D2	DPM, UJF/CNRS UMR 5063
MCU	RACHIDI	Walid	D1	L.C.IB - UMR E3 CEA/UJF

Mise à jour le 17 novembre 2014 par Lantou FAURE NEUHAUSER

UFR de Pharmacie de Grenoble

DOMAINE DE LA MERCI
38706 LA TRONCHE CEDEX – France
TEL : +33 (0)4 76 63 71 72
FAX : +33 (0)4 76 63 71 70

Affaire suivie par Lantou FAURE NEUHAUSER Lantou.Faure@uif-grenoble.fr



MCU	RAVELET	Corinne	D2	DPM, UJF/CNRS UMR 5063
PU	RIBUOT	Christophe	D5	HP2-InsERM U1042
PAST	RIEU	Isabelle	D5	-
Professeure Émérite	ROUSSEL	Anne -Marie	D1	-
PU-PH	SEVE	Michel	D1	CR INSERM / UJF U823 Institut Albert Bonniot
MCU	SOUARD	Florence	D3	DPM, UJF/CNRS UMR 5063
MCU	TARBOURIECH	Nicolas	D4	UVHCI, UMI 3265 UJF-EMBL- CNRS
PAST	TROUILLER	Patrice	D5	-
MCU	VANHAVERBEKE	Cécile	D2	DPM, UJF/CNRS UMR 5063
PU	WOUESSIDJEWE	Denis	D2	DPM, UJF/CNRS UMR 5063

**** D1 : Département « Mécanismes Biologiques des Maladies et des Traitements (DMBMT) »**

D2 : Département « Bases Physicochimiques du Médicament »

D3 : Département « Origine, Obtention et Optimisation des Principes Actifs des Médicaments » (O3-PAM)

D4 : Département « Bases Immunologiques, Hématologiques et Infectieuses des Maladies et Médicaments associés »

D5 : Département « Médicaments et Produits de Santé »

D6 : Département « Anglaks »

ATER : Attachés Temporaires d'Enseignement et de Recherches
CHU : Centre Hospitalier Universitaire
CIB : Centre d'Innovation en Biologie
CRI : Centre de Recherche Institut
CNRS : Centre National de Recherche Scientifique
DCE : Doctorants Contractuels
DPM : Département de Pharmacochimie Moléculaire
et de Cognition et Ontogénèse
HP2 : Hypoxie Physiopathologie Respiratoire et Cardiovasculaire
IAB : Institut Albert Bonniot, Centre de Recherche « Oncogénèse
IPB :
IBS : Institut de Biologie Structurale
JR : Jean Rogot
LAPM : Laboratoire Adaptation et Pathogénèse des Microorganismes
LBFA : Laboratoire Biogénéthique Fondamentale et Appliquée

LCBM : Laboratoire Chimie et Biologie des Métaux
LCIB : Laboratoire de Chimie Inorganique et Biologie
LECA : Laboratoire d'Ecologie Alpine
LR : Laboratoire des Radio-pharmaceutiques
LR : Laboratoire des Radio-pharmaceutiques
MCU : Maîtres de Conférences des Universités
MCU-PH : Maîtres de Conférences des Universités et Praticiens Hospitaliers
PAST : Professeur Associé à Temps Partiel
PRAG : Professeur Agrégé
PRCE : Professeur certifié affecté dans l'enseignement
PU : Professeur des Universités
PU-PH : Professeurs des Universités et Praticiens Hospitaliers
TIMC-EMAG : Laboratoire Technique de l'Imagerie, de la Modélisation
UMR : Unité Mixte de Recherche
UVHCI : Unit of Virus Host Cell Interactions

Mise à jour le 17 novembre 2014 par Lantou FAURE NEUHAUSER

Remerciements

Au Professeur Muriel Cornet, pour avoir initié ce projet et me l'avoir confié dans le cadre de mon travail de thèse. Merci pour votre encadrement, votre disponibilité, votre rigueur et vos nombreux conseils tout au long de ce travail;

Au Professeur Hervé Pelloux, pour avoir m'avoir accueillie dans votre service et avoir accepté de juger ce travail;

Au Professeur Frédéric Grenouillet et au Docteur Florence Persat, pour votre collaboration et votre investissement dans cette étude et pour avoir accepté de juger ce travail;

Au Docteur Boubou Camara, pour avoir accepté de participer à ce jury et de juger ce travail en tant que clinicien;

A Sébastien, pour ton aide précieuse sur les statistiques et pour tes nombreux conseils lors de la rédaction de cet article;

A toutes les personnes qui ont participé à ce projet, en particulier Sylvain, qui a initié ce projet avec le Pr Muriel Cornet et qui me l'a ensuite transmis, aux techniciens du laboratoire de Parasitologie-Mycologie, notamment Amandine, Ali et Edith pour leur aide précieuse et leur disponibilité tout au long de ce projet;

A tous les biologistes et pharmaciens qui m'ont encadrée et formée au cours de mon internat, pour m'avoir transmis leur compétences et leurs enseignements, pour m'avoir fait confiance et appris l'autonomie en particulier Sophie Anselme-Martin, François-Xavier Babin, Monique Baccard, Marion Bronnert, Claudine Giroux-Lathuile, Sylvie Larrat, Julien Lupo, Raphaël Marlu, Didier Raffenetot et tous les autres;

A Claudine, Sophie et Marion pour votre soutien et votre compréhension pendant ces derniers mois;

A tous les techniciens rencontrés aux cours de mes différents stages d'interne, pour tout ce que vous m'avez appris et pour votre bonne humeur au travail;

Et plus personnellement,

Aux copains parapentistes (Gautier, Anne-So, Adri, Toinou, Dédé, PEM, Greg et les autres) avec qui les week-ends passent toujours trop vite et avec lesquels j'ai de supers souvenirs en l'air. J'espère qu'on continuera sur notre lancée et que j'arriverai à rattraper mon retard de cet été pour revenir voler avec vous ;)

A l'ensemble de mes co-internes avec qui j'ai passé 4 merveilleuses années en région grenobloise, avec tant de souvenirs, à l'hôpital mais aussi de rando, ski, parapente, via, soirées...Yvan, Anne-So, Gautier, Dédé, Maëlle, Clém, Sultan, Céline, Clara, Charlotte, Mylène, Isa, Pauline et tous ceux que j'oublie;

Aux filles du R+3 pour m'avoir soutenue pendant ce travail de rédaction et pour m'avoir motivée pendant ces longues soirées et week-ends passés au R+3;

A Amandine, pour nos soirées escalade et parce qu'on avançait ensemble dans nos travaux de thèse et nos préparations de mariage ;) Merci pour ton soutien;

A mes amis avec qui je passe des moments formidables, même si parfois je ne donne pas assez souvent de nouvelles : Fanny, Popiche, CloClo, Jo, Sophie, Marion, Mick, Chloé, Pauline, Titi, Dorothée, Julie, les amis d'Haïti et du Mexique et tous les autres;

A Bérénice pour m'avoir supportée pendant cette année de travail. J'ai parfois été la coloc "fantôme". Merci pour ta compréhension;

A Coralie, ma sœur, ma confidente, avec qui je partage tant de choses : les activités sportives, les voyages à l'autre bout du monde et les appels 5 fois par jour, etc. Merci pour ton aide sur les fichiers Excel, même à 2h du matin. Merci de m'avoir permis de m'évader un peu de ce travail de rédaction en préparant ton EVJF et ton mariage. Merci pour ton aide et ton soutien;

A Nicolas, mon petit-grand frère. Merci pour ton soutien et ta présence;

A ma maman, pour toutes les valeurs que tu m'as inculquées, tes encouragements et ton soutien qui m'ont permis d'arriver là aujourd'hui;

A mon papa, pour que tu sois fier de moi aujourd'hui...

Sommaire

Liste des figures	10
Liste des tableaux	10
Liste des acronymes	11
INTRODUCTION.....	12
RAPPELS BIBLIOGRAPHIQUES SUR LES ASPERGILLOSES	14
1. Agent pathogène : <i>Aspergillus spp.</i>	14
1.1. Généralités.....	14
1.2. Historique.....	14
1.3. Caractéristiques mycologiques et facteurs de virulence.....	15
1.3.1. Caractéristiques mycologiques.....	15
1.3.2. Facteurs de virulence.....	17
1.3.2.1. La structure de la paroi.....	18
1.3.2.2. Les adhésines.....	18
1.3.2.3. La production de toxines	18
1.3.2.4. La production d'enzymes.....	19
1.3.2.5. La production de pigments	19
1.3.2.6. La capacité d'angioinvasion.....	19
1.3.2.7. La formation de biofilms	19
1.3.2.8. Le caractère allergisant.....	20
2. Physiopathologie des aspergilloses.....	20
2.1. Aspergillose invasive (AI)	20
2.2. Aspergilloses Pulmonaires Chroniques (APC) et formes d'hypersensibilité	22
2.2.1. APC	22
2.2.2. Formes d'hypersensibilité.....	22
2.3. Autres formes chroniques.....	24
3. Pathologies sous-jacentes, facteurs favorisants et épidémiologie.....	25
3.1. Pathologies sous-jacentes et facteurs favorisants	25
3.1.1. AI.....	26
3.1.2. APC et formes d'hypersensibilité	26
3.2. Epidémiologie	27
3.2.1. AI.....	27
3.2.2. APC et formes d'hypersensibilité	27
3.2.2.1. APC	27
3.2.2.2. ABPA	28

4. Clinique et classification	28
4.1. Patient immunodéprimé	28
4.2. Patient immunocompétent.....	29
4.2.1. Colonisation bronchique	29
4.2.2. APC et formes d'hypersensibilité	30
4.2.2.1. APC	30
4.2.2.1.1. Aspergillome simple	31
4.2.2.1.2. APCC	32
4.2.2.1.3. APCF.....	33
4.2.2.1.4. APCN.....	35
4.2.2.2. Formes d'hypersensibilité.....	36
4.2.2.2.1. ABPA	36
4.2.2.2.2. Asthme aspergillaire.....	39
4.2.2.2.3. Alvéolite allergique extrinsèque.....	39
4.2.2.2.4. Autres formes allergiques	40
4.2.3. Autres formes non pulmonaires	41
4.3. Classification.....	41
5. Diagnostic biologique des aspergilloses chroniques et formes d'hypersensibilité	43
5.1. Critères mycologiques.....	43
5.1.1. Prélèvements	43
5.1.2. Examen direct.....	43
5.1.3. Culture.....	44
5.2. Détection d'antigènes	44
5.3. Sérodiagnostic : détection des anticorps IgG	45
5.3.1. Méthodes de dépistage	47
5.3.1.1. Immunodiffusion (Double diffusion en gel d'agar)	47
5.3.1.2. Electrosynérèse ou contre-immunoelectrophorèse (CIE).....	47
5.3.1.3. ELIEDA (Enzyme-Linked-Immuno-Electro-Diffusion-Assay).....	48
5.3.1.4. Immunofluorescence indirecte	49
5.3.1.5. Immunogold assay.....	49
5.3.1.6. ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay).....	50
5.3.1.7. Hémagglutination indirecte	54
5.3.2. Méthodes de confirmation.....	55
5.3.2.1. Immunoelectrophorèse	55
5.3.2.2. Co-electrosynérèse	55
5.3.3. Méthodes "inclassables"	56

5.3.3.1.	Radioimmunoassay (RIA).....	56
5.3.3.2.	BALISA=Biotin-Avidin-Linked-Enzyme ImmunoSorbent Assay	56
5.3.3.3.	Western-Blot	56
5.3.4.	Suivi sérologique des patients avec une APC ou une ABPA.....	58
5.4.	Autres marqueurs d'aspergilloses allergiques.....	58
5.4.1.	IgE totales.....	58
5.4.2.	IgE spécifiques anti- <i>Aspergillus fumigatus</i>	59
5.4.3.	Tests cutanés	59
5.5.	Anatomopathologie	59
6.	Traitement des APC et formes d'hypersensibilité des aspergilloses	61
6.1.	Aspergillome	61
6.2.	APCC	62
6.3.	APCF.....	62
6.4.	APCN	62
6.5.	ABPA	63
INTRODUCTION DE LA PUBLICATION ISSUE DU TRAVAIL DE THESE :		65
EVALUATION PROSPECTIVE D'UN NOUVEAU KIT ELISA POUR LA DETECTION DES IgG ANTI- <i>ASPERGILLUS</i> DANS LE DIAGNOSTIC DES ASPERGILLOSES PULMONAIRES CHRONIQUES ET ALLERGIQUES.....		65
PUBLICATION ISSUE DU TRAVAIL DE THESE :		67
PROSPECTIVE EVALUATION OF A NEW <i>ASPERGILLUS</i> IgG EIA FOR THE DIAGNOSIS OF CHRONIC AND ALLERGIC PULMONARY ASPERGILLOSIS		67
CONCLUSION		85
BIBLIOGRAPHIE		87

Liste des figures

Figure 1 : Colonies d' <i>Aspergillus</i> sp après 7 jours d'incubation à 25°C sur milieu de Czapek (I et J sur gélose avec extrait de Malt + 20% de sucrose pendant 14 jours).....	16
Figure 2 : Appareil reproducteur des <i>Aspergillus</i> spp.....	17
Figure 3 : Cycle infectieux d' <i>A. fumigatus</i>	21
Figure 4 : Schéma représentant la physiopathologie de l'ABPA.....	23
Figure 5 : Formes cliniques des infections bronchopulmonaires à <i>Aspergillus</i> spp., selon le statut immunitaire de l'hôte.....	25
Figure 6 : Scanner pulmonaire montrant un nodule avec signe du halo révélant une aspergillose angioinvasive chez un patient atteint de leucémie aigüe.....	29
Figure 7 : Scanners de patients présentant un aspergillome.....	32
Figure 8 : Imagerie d'APCC.....	33
Figure 9 : Scanner d'un patient présentant une APCF.....	34
Figure 10 : Radiographies d'un patient présentant une APCC (A) (Juin 1994) qui a évolué en APCF (B) (Septembre 1997).....	34
Figure 11 : Images d'APCN.	36
Figure 12 : Images d'ABPA.	39
Figure 13 : Coloration de Grocott mettant en évidence une masse d'hyphes d' <i>Aspergillus fumigatus</i> (aspergillome).....	44
Figure 14 : Principe de la contre-immunoelectrophorèse ou électrosynérèse.....	48
Figure 15 : Résultats positifs en IGA.....	50
Figure 16 : Résultats négatifs en IGA.....	50
Figure 17 : Principe de l'ELISA indirect.....	51
Figure 18 : Résultats de sérologie aspergillaire obtenus en hémagglutination indirecte.....	54
Figure 19 : Principe de l'immunoelectrophorèse.....	55
Figure 20 : Exemples de résultats de sérologie aspergillaire en Western-Blot.....	57
Figure 21 : Image d'aspergillome montrant une balle fongique à l'intérieur d'une cavité.....	60
Figure 22 : Coloration de Giemsa mettant en évidence, dans une coupe de tissu pulmonaire, des hyphes septés d' <i>A. fumigatus</i> ramifiés de façon dichotomique.....	60

Liste des tableaux

Tableau 1 : Descriptions historiques et rapports des pathologies causées par <i>Aspergillus</i> spp.....	15
----------------------------------------------------------------------------------------------------------	----

Liste des acronymes

ABPA : Aspergillose Broncho-Pulmonaire Allergique / Allergic Broncho-Pulmonary Aspergillosis

Ac : Anticorps

Ag : Antigène

AI : Aspergillose Invasive

APC : Aspergillose Pulmonaire Chronique

APCC : Aspergillose Pulmonaire Chronique Cavitaire

APCF : Aspergillose Pulmonaire Chronique Fibrosante

APCN : Aspergillose Pulmonaire Chronique Nécrosante

BPCO : Broncho-Pneumopathie Chronique Obstructive

CCPA : Chronic Cavitory Pulmonary Aspergillosis

CFPA : Chronic Fibrosing Pulmonary Aspergillosis

CLIN : Comité de Lutte contre les Infections Nosocomiales

CNPA : Chronic Necrotizing Pulmonary Aspergillosis

COPD : Chronic Obstructive Pulmonary Disease

CPA : Chronic Pulmonary Aspergillosis

CSH : Cellules Souches Hématopoïétiques

DO : Densité optique

EIA : Enzyme ImmunoAssay

EORTC/MSG : European Organization for Research and Treatment of Cancer/Invasive Fungal Infections Cooperative Group and the National Institute of Allergy and Infectious Diseases Mycoses Study Group Consensus Group

ECIL : European Conference on Infections in Leukaemia

HEPA : High Efficiency Particulate Air filtration

IDSA : Infectious Diseases Society of America

ROS : Reactive Oxygen Species = dérivés réactifs de l'oxygène

SAIF : Surveillance des Aspergilloses Invasives en France

TB : Tuberculose

TDM : TomoDensitoMétrie = scanner

TNF : Tumor Necrosis Factor

INTRODUCTION

Les champignons du genre *Aspergillus* spp. sont des champignons filamenteux ubiquitaires et opportunistes à l'origine de nombreuses pathologies chez l'homme. *Aspergillus fumigatus* est l'espèce la plus souvent impliquée dans les aspergilloses pulmonaires [1,2]. Les formes cliniques d'aspergilloses, habituellement décrites comme invasives, chroniques ou allergiques, varient selon le statut immunitaire des patients et leurs pathologies sous-jacentes [3,4]. D'un côté, l'aspergillose invasive se développe le plus souvent chez les patients immunodéprimés tels que les patients neutropéniques, les patients avec une pathologie hématologique, les transplantés d'organes ou de cellules souches et les patients traités par immunosuppresseurs [5,6]. D'un autre côté, les aspergilloses pulmonaires chroniques (APC) et les aspergilloses allergiques sont les manifestations pulmonaires les plus courantes chez l'hôte immunocompétent [4,7–10]. Les APC affectent surtout les patients avec des pathologies pulmonaires sous-jacentes telles que la tuberculose ou une infection à mycobactérie atypique, la broncho-pneumopathie chronique obstructive (BPCO), les antécédents de cancer pulmonaire, l'aspergillose broncho-pulmonaire allergique (ABPA) et l'emphysème [4,11]. Les patients souffrant d'asthme ou de mucoviscidose développent plutôt une hypersensibilité aux antigènes d'*Aspergillus* spp. aboutissant à une ABPA, une bronchite aspergillaire ou un asthme sévère avec sensibilisation fongique [1,12].

Le diagnostic d'APC et d'ABPA est toujours difficile et repose sur une combinaison d'arguments cliniques, radiologiques, biologiques, mycologiques et histologiques. La détection des anticorps IgG anti-*Aspergillus* est considérée comme un critère majeur dans le diagnostic des aspergilloses pulmonaires chez l'hôte non-immunodéprimé [1,2,4,9,12–16]. Plusieurs méthodes biologiques ont été utilisées au fil des années pour détecter les IgG anti-*Aspergillus* [14]. Les techniques permettant la détection des immunoprécipitines sont considérées comme les méthodes de référence grâce à leur spécificité, mais elles manquent de standardisation et sont longues à réaliser [14–16]. Par conséquent, un test de screening choisi parmi l'hémagglutination indirecte, l'immunofluorescence indirecte, l'immunodiffusion et les techniques immunoenzymatiques (ELISA : Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay) est souvent pratiqué en première intention. La tendance actuelle est d'utiliser pour ce dépistage des tests ELISA car ils permettent une évaluation quantitative des anticorps et une réalisation rapide et facile par leur possibilité d'automatisation [14–16].

Nous avons réalisé dans ce travail de thèse de pharmacie et mémoire de DES de biologie médicale, une étude prospective multicentrique, ayant pour but d'évaluer les performances d'un nouveau kit ELISA pour la détection des anticorps anti-*Aspergillus*. Cette étude a été conduite dans 5 hôpitaux français universitaires (Grenoble, Rennes, Dijon, Lyon, Besançon). Ce kit ELISA (*Aspergillus fumigatus* IgG, Bordier affinity products, Crissier, Suisse) est innovant par sa composition antigénique. En effet, il associe deux antigènes recombinants avec des antigènes somatiques et métaboliques d'*A. fumigatus*. Nous l'avons comparé à deux autres kits ELISA commerciaux : Platelia™ *Aspergillus* IgG (Bio-Rad, Marnes-la-Coquette, France) et ELISA Classic™ *Aspergillus* IgG (Virion\Serion, Würzburg, Allemagne) ainsi qu'à une technique "maison" d'immunoélectrophorèse permettant la détection des immunoprécipitines [17].

Après quelques rappels bibliographiques sur *Aspergillus* spp. et les aspergilloses, sur le diagnostic des aspergilloses chroniques et allergiques et sur les méthodes de détection des anticorps anti-*Aspergillus*, ce mémoire présente le travail d'évaluation du kit ELISA Bordier réalisé au cours de cette étude.

RAPPELS BIBLIOGRAPHIQUES SUR LES ASPERGILLOSES

1. Agent pathogène : *Aspergillus* spp.

1.1. Généralités

Les *Aspergillus* spp. sont des champignons filamenteux, cosmopolites, ubiquitaires, pathogènes et opportunistes. Moisissures de l'environnement, elles se développent dans le sol, les débris organiques, les végétaux, les terreaux, les foins car elles se nourrissent en recyclant le carbone et l'azote de ces substrats [18]. A partir de ces réservoirs, ces champignons sporulent et disséminent des spores aspergillaires (éléments de reproduction asexuée) en suspension. L'homme peut alors se contaminer via ces spores contenues dans l'air, l'eau, l'alimentation, la poussière, les climatiseurs.

Les *Aspergillus* spp. appartiennent à la classe des ascomycètes ou des hyphomycètes, selon que, respectivement, on leur connaît ou pas une reproduction sexuée. Leur mycélium est septé et hyalin. Les spores asexuées sont des exospores ou conidies qui se forment à partir de la tête aspergillaire, élément caractéristique du genre *Aspergillus* spp.

Environ 300 espèces composent ce genre, mais seulement une vingtaine sont impliquées en pathologie humaine. *Aspergillus fumigatus* est l'espèce la plus souvent isolée [17,19,20]. L'étude française du réseau SAIF rapporte que *A. fumigatus* est retrouvé seul dans 80% des aspergilloses invasives (AI) lorsque le champignon est isolé en culture [5]. D'autres espèces, telles que *A. niger*, *A. terreus*, *A. flavus*, *A. nidulans*, *A. versicolor* sont moins fréquemment retrouvées [21–24].

1.2. Historique

Aspergillus spp. a été décrit pour la première fois en 1729 [25] et le premier cas humain d'aspergillome, en 1842 [26] (Tableau 1). C'est uniquement en 1952 qu'a été rapporté le premier cas d'aspergillose broncho-pulmonaire allergique (ABPA) [27].

Reference	Year	Author(s)	Report
[5]	1729	Micheli	First description of <i>Aspergillus</i>
[4]	1815	Mayer	Air sac and pulmonary infection in a jackdaw
[6]	1842	Bennett	Aspergilloma complicating tuberculosis with <i>Aspergillus</i> in sputum
[7]	1842	Rayer	Pleural aspergillosis
[8]	1844	Mayer	Aspergillus otomycosis
[9]	1863	Fresenius	Clear species description of <i>A. fumigatus</i> (isolated from air sacs and bronchi of a great bustard)
[10]	1879	Leber	Aspergillus keratitis following chaff entering the eye
[11]	1886	Boström	Cutaneous aspergillosis
[12]	1887	Popoff	Allergic pulmonary disease caused by <i>Aspergillus</i>
[13]	1890	Wheaton	Aspergillus tracheobronchitis
[14]	1891	Ross	Renal aspergillosis
[15]	1891	Zarniko	Maxillary sinus aspergillosis
[16]	1897	Oppe	Sphenoid sinus aspergillosis
[17]	1931	Just	Cerebral aspergillosis
[18]	1936	Shaw and Warthen	Aspergillosis of bone
[19]	1947	Cawley	Invasive aspergillosis (probable) complicating chronic granulomatous disease (with meningitis)
[20]	1950	Zimmerman	Native valve aspergillus endocarditis
[21]	1952	Hinson, Moon, and Plummer	Allergic bronchopulmonary aspergillosis, definition of disease
[1]	1953	Rankin	Invasive pulmonary aspergillosis as an opportunistic infection (during neutropenia)
[22]	1955	Zimmerman	Invasive aspergillosis in infancy
[23]	1959	Finegold, Will, and Murray	Classification of invasive aspergillosis
[24]	1964	Newman and Cordell	Postoperative aspergillus endocarditis
[25]	1966	Milosev et al.	Paranasal aspergillus granuloma in Sudan
[26]	1970	Young et al.	Comprehensive description of pathology of invasive aspergillosis, with clinical correlation
[27]	1983	Katzenstein, Sale, and Greenberger	Allergic aspergillus sinusitis

Tableau 1 : Descriptions historiques et rapports des pathologies causées par *Aspergillus* spp.

(d'après [28]).

1.3. Caractéristiques mycologiques et facteurs de virulence

1.3.1. Caractéristiques mycologiques

Aspergillus spp. est un champignon cultivable sur les milieux mycologiques standards tel que le milieu Sabouraud. La plupart des espèces sont inhibées par la présence du cycloheximide. Le milieu de Czapek favorise la fructification.

Après 24 à 48h d'incubation à 27°C, on voit apparaître des colonies blanches spiculées qui deviennent poudreuses et dont la couleur évolue avec le temps et varie selon l'espèce. L'aspect macroscopique du recto et du verso de la colonie permet une orientation rapide du diagnostic d'espèce. Le recto des colonies est gris-vert pour *A. fumigatus* (Figure 1D), vert-

jaune pour *A. flavus* (Figure 1C), noires pour *A. niger* (Figure 1E), brun-cannelle pour *A. terreus* (Figure 1M), vert foncé pour *A. nidulans*, beige clair, jaunes et roses pour *A. versicolor* (Figure 1O). Le verso de la colonie est habituellement incolore à jaune mais peut brunir ou rougir avec l'âge de la culture.

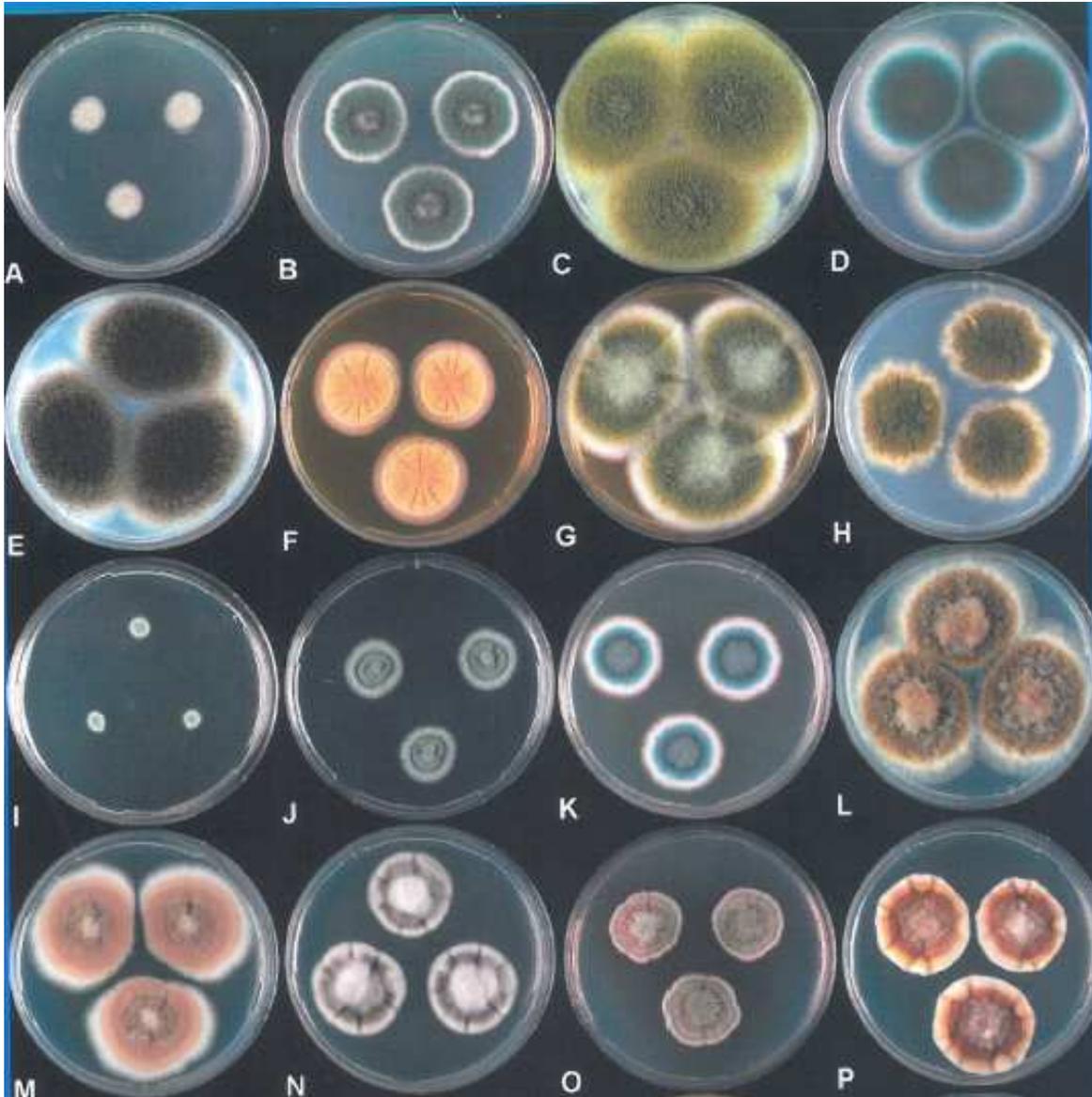


Figure 1 : Colonies d'*Aspergillus* sp après 7 jours d'incubation à 25°C sur milieu de Czapek (I et J sur gélose avec extrait de Malt + 20% de sucrose pendant 14 jours).

A. *A. candidus*, B. *A. clavatus*, C. *A. flavus*, D. *A. fumigatus*, E. *A. niger*, F. *A. ochraceus*, G. *A. oryzae*, H. *A. parasiticus*, I. *A. penicillioides*, J. *A. restrictus*, K. *A. sydowii*, L. *A. tamari*, M. *A. terreus*, N. *A. ustus*, O. *A. versicolor*, P. *A. wentii*. (d'après [29]).

L'examen microscopique des cultures d'*Aspergillus* spp. permet de mettre en évidence les caractéristiques de ce genre : des filaments mycéliens hyalins cloisonnés et ramifiés, une tête aspergillaire composée d'une vésicule avec des phialides, parfois des métules, et des

conidies (Figure 2). On parle de tête bisériée s'il y a la présence de métules et de phialides; de tête unisériée lorsque seules les phialides sont présentes. La disposition des phialides sur la tête aspergillaire constitue une aide à l'identification des différentes espèces d'*Aspergillus* spp.

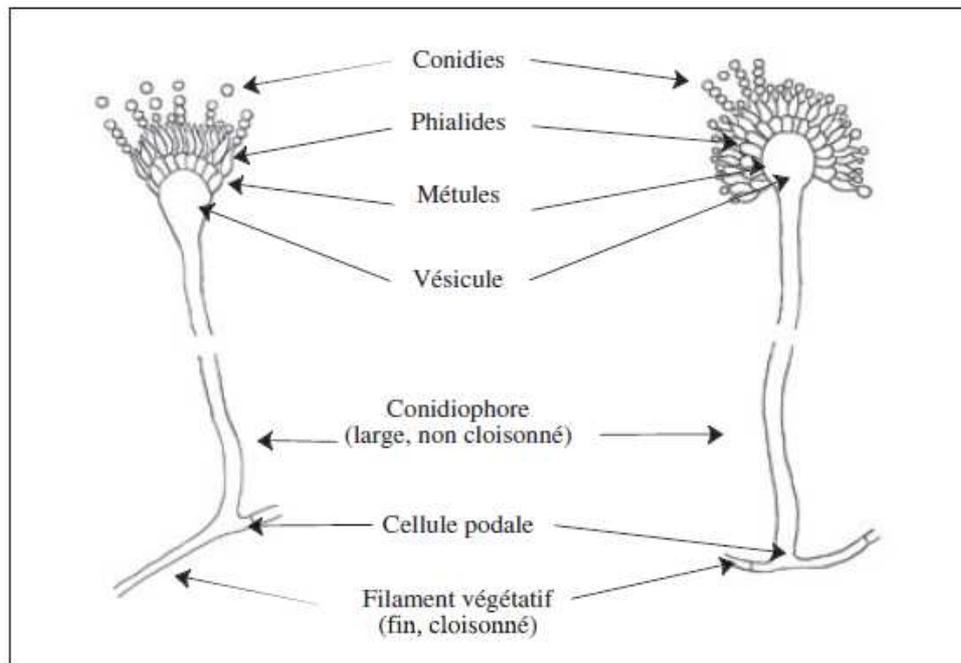


Figure 2 : Appareil reproducteur des *Aspergillus* spp.
(d'après [30])

1.3.2. Facteurs de virulence

Les *Aspergillus* spp. ne sont pas majoritaires parmi les champignons de l'environnement et *A. fumigatus* n'est pas l'espèce prédominante parmi les *Aspergillus* spp. [31,32]. Leur pathogénicité s'explique par une virulence spécifique des *Aspergillus* spp. et plus particulièrement d'*A. fumigatus* qui est multifactorielle.

Les espèces d'*Aspergillus* spp. impliquées en pathologie humaine sont thermotolérantes, c'est-à-dire qu'elles sont capables de se développer à 37°C, voire plus pour *A. fumigatus*, qui survit à des températures supérieures à 50°C [30].

La taille des spores d'*A. fumigatus* constitue un facteur de virulence du champignon. En effet, les spores sont de très petite taille (2 - 3 µm), ce qui leur permet de pénétrer profondément dans les voies aériennes respiratoires et d'atteindre les alvéoles pulmonaires,

à la différence d'autres espèces d'*Aspergillus* spp. qui possèdent des conidies plus grosses comme *A. flavus* et *A. niger* [33]. Les spores ont la capacité de germer et vont former de vrais filaments, ce qui leur permet d'échapper à la phagocytose par les macrophages. En effet, les spores phagocytées vont germer dans le cytoplasme des cellules de l'immunité innée; les filaments ainsi formés vont pouvoir se développer et envahir le parenchyme pulmonaire pour ensuite disséminer dans l'organisme [34].

1.3.2.1. La structure de la paroi

La rigidité de la paroi des *Aspergillus* spp., essentiellement constituée d'un réseau de polysaccharides, notamment de glucanes et de chitine, constitue à la fois une protection pour le champignon, mais joue aussi un rôle dans la virulence. L'allongement du filament participe à la perforation des tissus et des épithéliums et la plupart des molécules toxiques et d'invasion transitent par cette paroi [35]. La paroi des conidies présente une couche hydrophobe, composée d'hydrophobines, qui leur permet de résister aux réponses immunitaires innées et adaptatives [34,36] et facilite leur dissémination dans l'air [18,37].

1.3.2.2. Les adhésines

Les *Aspergillus* spp. possèdent des protéines d'adhésion, les adhésines, qui leur permettent d'adhérer aux tissus de l'hôte, facilitant ainsi leur persistance et leur croissance pour le développement d'une pathologie aspergillaire. Les adhésines ou lectines se lient aux récepteurs de l'hôte, les ligands [38], tels que le fibrinogène, la laminine, l'albumine, etc.

1.3.2.3. La production de toxines

Un autre facteur de virulence d'*A. fumigatus* est la production de métabolites toxiques, dont le plus connu est la gliotoxine, reconnue également actuellement comme possible marqueur diagnostique [39]. Cette toxine est capable d'induire une immunodépression en inhibant la phagocytose des macrophages et des polynucléaires [40]. Deux autres molécules, ayant une activité toxique, ont été décrites chez *A. fumigatus* : une RNase (18 kDa) et une hémolysine (30 kDa) entraînant respectivement la destruction des cellules de l'hôte et une lyse des érythrocytes [18].

Certaines souches d'*A. flavus* ont également la capacité de produire une toxine, l'aflatoxine, dont la plus importante est l'aflatoxine B1 par sa toxicité et son potentiel carcinogène [41].

1.3.2.4. La production d'enzymes

A. fumigatus est capable de sécréter de nombreuses enzymes, notamment des protéases, des élastases, des phospholipases, etc. qui participent à la pathogénicité du champignon via divers mécanismes [18,28,38]. La catalase (350 kDa) possède des propriétés antioxydantes et inactive les espèces réactives de l'oxygène (ROS) produites par les cellules de l'immunité. *A. fumigatus* produit également d'autres molécules capables d'inhiber les effets des ROS, comme les superoxydes dismutases.

1.3.2.5. La production de pigments

A. fumigatus produit un pigment, la dihydroxynaphtalène mélanine, responsable de la coloration verte des conidies, qui intervient dans la pathogénicité du champignon en protégeant les conidies des défenses immunitaires de l'homme, notamment des macrophages alvéolaires mais également en inhibant les ROS [18,36]. Ces effets immunomodulateurs de la mélanine fongique ont été décrits également chez *Cryptococcus neoformans* [37].

1.3.2.6. La capacité d'angioinvasion

Comme la plupart des champignons filamenteux, *A. fumigatus* possède une croissance polaire, lui permettant d'explorer son environnement à la recherche de nutriments. Il possède également la caractéristique d'être un champignon angiotrophique, c'est-à-dire qu'après avoir pénétré dans les tissus en dissociant les épithéliums grâce aux enzymes protéolytiques sécrétées, il entre en contact avec les endothéliums vasculaires puis les traverse [8] : il s'agit du caractère d'angioinvasion du mycélium aspergillaire expliquant la dissémination, les complications thrombotiques et hémorragiques au cours de l'aspergillose invasive.

1.3.2.7. La formation de biofilms

A. fumigatus possède la capacité de former des biofilms, limitant encore plus l'action des antifongiques [42]. Ces biofilms sont constitués par la croissance de mycélium à l'intérieur d'une matrice extracellulaire hydrophobe composée de polysaccharides, hydrophobine, mélanine, etc. [43]. Ils participent à la virulence du champignon car ils constituent des foyers de dissémination secondaire par essaimage de fragments mycéliens. Ils permettent également la persistance d'autres microorganismes au sein de structures mixtes, fongiques et bactériennes.

1.3.2.8. Le caractère allergisant

A. fumigatus produit également de nombreux allergènes (nommés Asp f1 à Asp f34) qui interviennent dans la physiopathologie des aspergilloses allergiques telles que l'ABPA, en déclenchant une réaction d'hypersensibilité de type I, III et IV avec la production d'IgG et d'IgE spécifiques [44].

2. Physiopathologie des aspergilloses

La contamination par *Aspergillus* spp. se fait essentiellement par les voies aériennes (tractus respiratoire) après inhalation quotidienne de plusieurs douzaines ou centaines de spores d'*Aspergillus* spp. en suspension, la concentration de spores aspergillaires dans l'air variant entre 0-85 cfu/m³ selon les saisons [45]. Elles sont bloquées mécaniquement, puis éliminées par les cils mucociliaires avec la production de mucus s'opposant au développement du champignon : il s'agit de la clairance mucociliaire. Le système immunitaire, via les macrophages alvéolaires et les polynucléaires neutrophiles, détruit les conidies résiduelles. En effet, les macrophages constituent la première ligne de défense de l'hôte en éradiquant les spores inhalées ; tandis que les polynucléaires neutrophiles détruisent les filaments mycéliens par production superoxyde d'entités oxygénées toxiques pour le champignon [46]. Via l'inhalation de spores, les poumons ainsi que les voies aériennes supérieures (bronches, sinus) sont les principales localisations d'atteinte aspergillaire.

2.1. Aspergillose invasive (AI)

Chez les patients immunodéprimés ayant un déficit fonctionnel ou quantitatif des macrophages ou des polynucléaires, les spores aspergillaires inhalées s'installent dans les alvéoles pulmonaires pour se développer (bourgeonner) et émettre des filaments [7,8,33]. Chez l'hôte immunodéprimé, *Aspergillus* spp. exprime son tropisme vasculaire, aboutissant à l'invasion des vaisseaux sanguins par les filaments mycéliens, puis à une thrombose vasculaire et une hypoxie tissulaire, et dans certains cas une dissémination par voie hématogène à tous les organes et tissus (cerveau, rein, foie, peau, etc.) (Figure 3). Il en résulte des localisations secondaires de l'infection depuis le compartiment sanguin. La

prise en charge des aspergilloses invasives doit être la plus précoce possible compte tenu de la sévérité de la maladie.

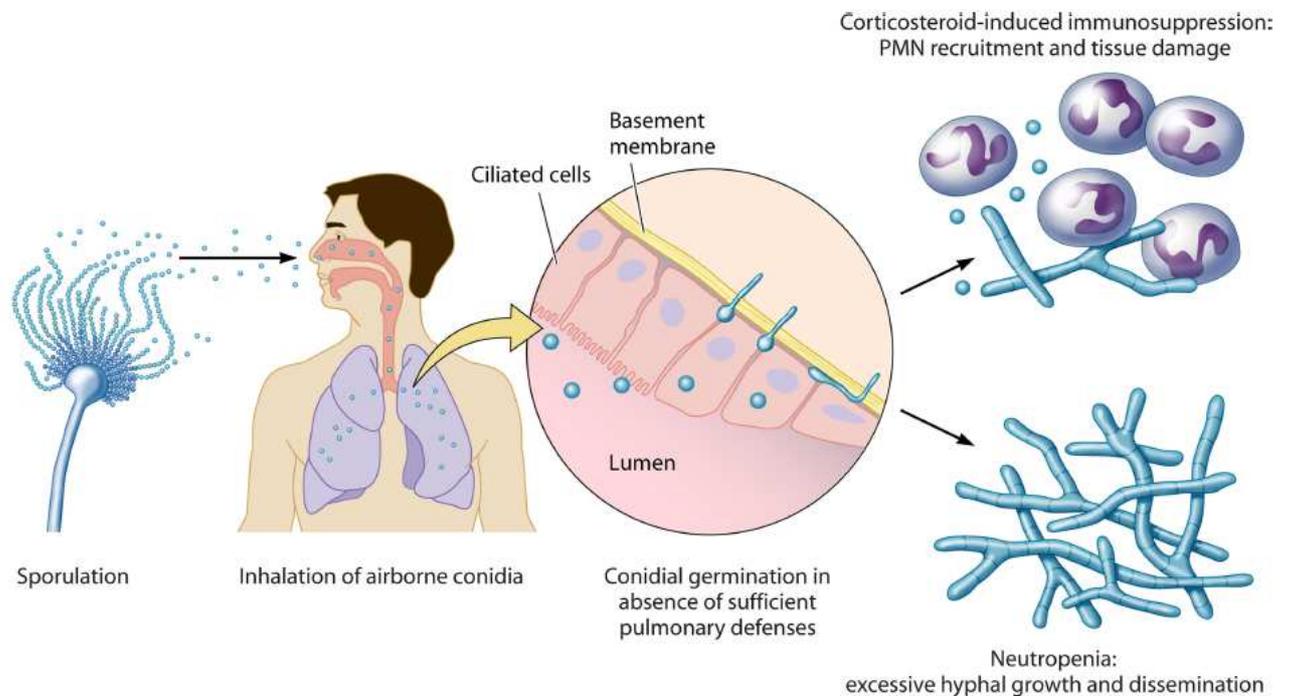


Figure 3 : Cycle infectieux d'*A. fumigatus*.

Aspergillus est ubiquitaire dans l'environnement, sa reproduction asexuée conduit à la production de conidies en suspension dans l'air. L'inhalation des conidies par certains groupes de patients immunodéprimés entraîne leur installation dans le tissu pulmonaire, leur germination et soit leur contrôle par les polynucléaires neutrophiles avec des signes d'inflammation (chez les patients traités par corticothérapie) soit une croissance incontrôlée des hyphes avec un défaut de polynucléaires neutrophiles et, dans certains cas, une dissémination (neutropénie). (d'après [33])

La contamination peut également se faire par l'alimentation (en prévention chez les patients à risques, il est recommandé d'avoir une alimentation stérile, c'est-à-dire sans spore).

2.2. Aspergilloses Pulmonaires Chroniques (APC) et formes d'hypersensibilité

Les différentes manifestations cliniques décrites chez l'homme sont souvent liées à la réponse immunologique de l'hôte contre les antigènes d'*Aspergillus* spp.

2.2.1. APC

Les formes d'APC sont liées à la persistance des spores d'*Aspergillus* spp. qui, via les filaments mycéliens, colonisent et infectent le tissu pulmonaire préalablement endommagé par une pathologie pulmonaire. Une fois installé dans le tissu pulmonaire, le champignon se développe et peut soit former une simple balle fongique, soit envahir le parenchyme pulmonaire et créer des cavités et expansions [4].

Les manifestations cliniques des APC varient selon les pathologies sous-jacentes de l'hôte et son statut immunitaire.

2.2.2. Formes d'hypersensibilité

Les formes d'hypersensibilité se développent suite à une réponse immunitaire exacerbée secondaire à un inoculum important de spores aspergillaires inhalées. L'accumulation des spores dans l'appareil broncho-pulmonaire est souvent liée à un défaut de clairance mucociliaire d'ordre génétique (mucoviscidose) ou liée à une pathologie pulmonaire.

L'ABPA, entité la plus importante des formes d'hypersensibilité, apparaît suite à un défaut de clairance mucociliaire (liée principalement à un asthme ou une mucoviscidose, mais aussi à une BPCO). Les spores aspergillaires persistant dans l'arbre bronchique se transforment alors en filaments qui altèrent la barrière épithéliale et produisent des protéines et allergènes d'*A. fumigatus* (Asp f1 à Asp f34). Ceux-ci induisent une réponse Th2 par les cellules CD4, avec la synthèse et la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires (IL-4, IL-5, IL-13) mais également la synthèse d'IgG et d'IgE spécifiques d'*A. fumigatus*, la dégranulation des mastocytes et une hyperéosinophilie, responsables des symptômes de l'ABPA (Figure 4) [47–49].

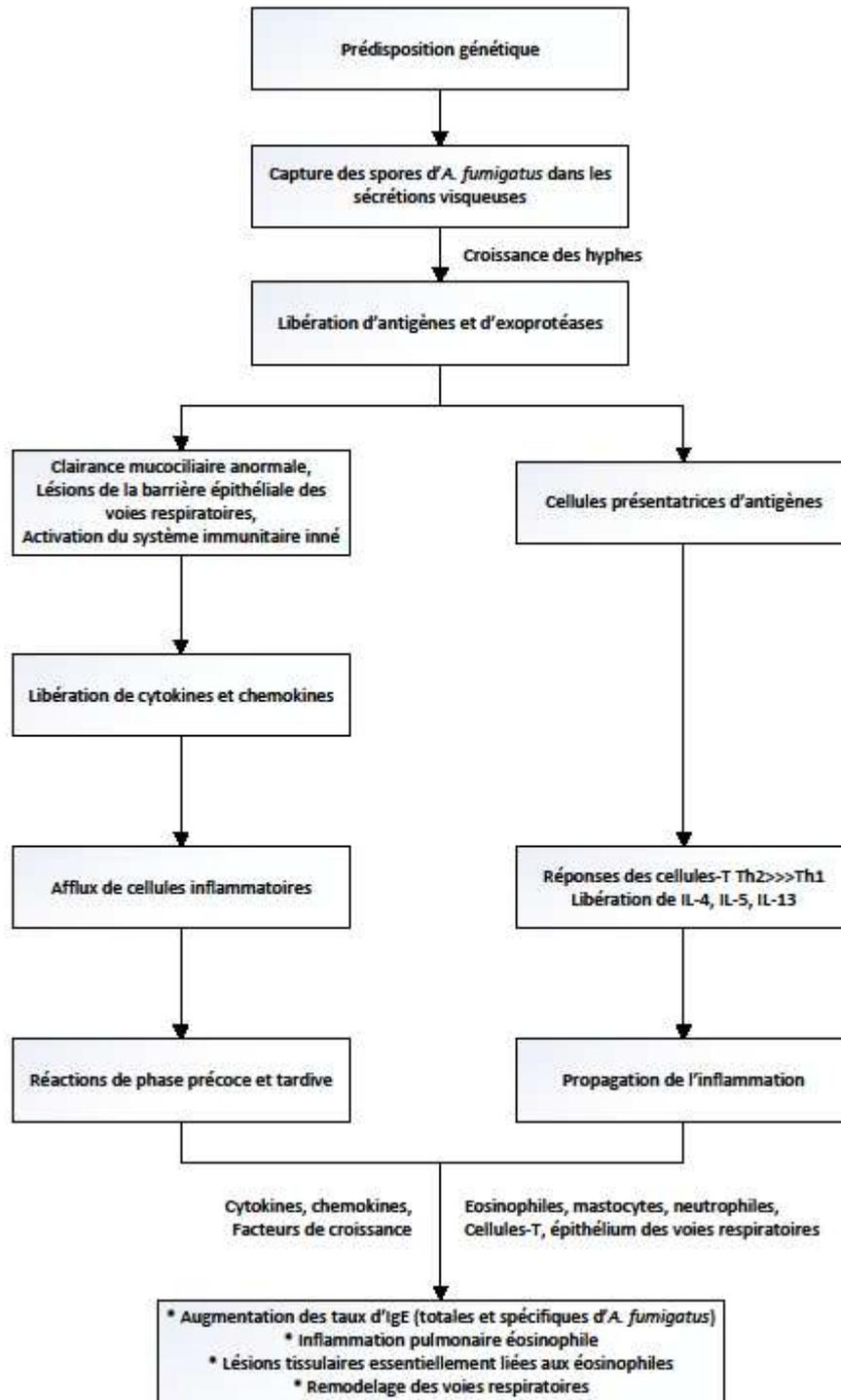


Figure 4 : Schéma représentant la physiopathologie de l'ABPA.
(d'après [48])

D'autres formes d'hypersensibilité liées à *Aspergillus* spp., moins communes que l'ABPA, ont été décrites : il s'agit de l'asthme aspergillaire allergique, l'alvéolite allergique extrinsèque, la sinusite aspergillaire allergique ou encore la bronchite aspergillaire. La physiopathologie de ces formes d'hypersensibilité est complexe et n'est pas totalement élucidée.

Brièvement, l'asthme aspergillaire allergique est une réaction d'hypersensibilité de type I, médiée par les IgE [50].

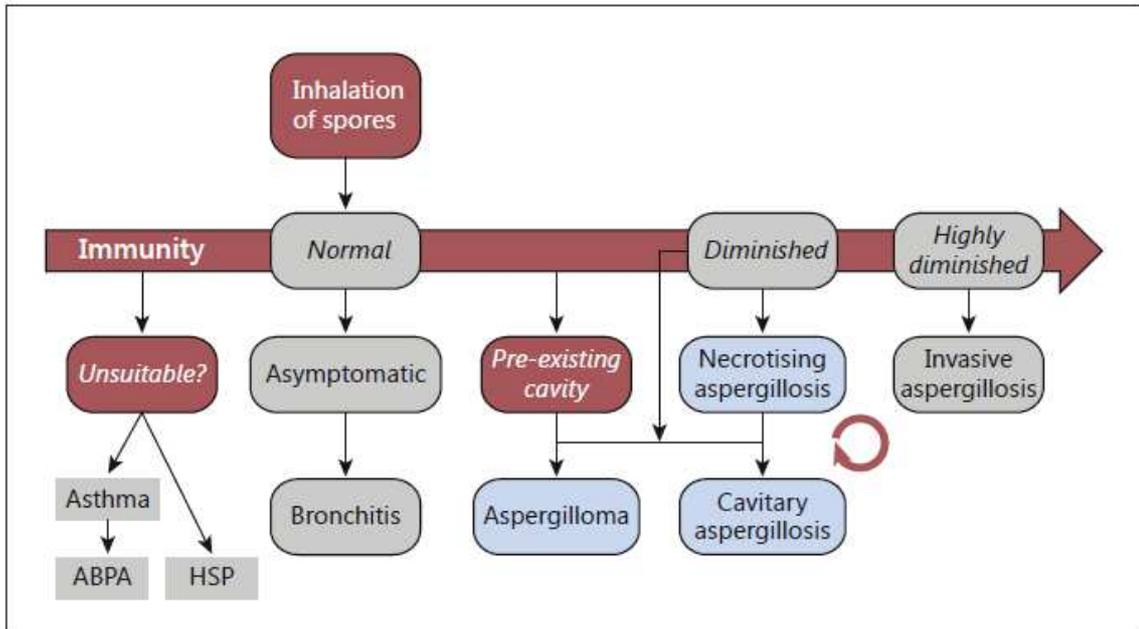
L'alvéolite allergique extrinsèque est, quant à elle, une manifestation clinique liée à l'exposition répétée à des concentrations importantes d'*Aspergillus* spp. [13]. L'existence d'un facteur génétique impliqué dans cette pathologie est probable puisque seulement une partie de la population exposée est touchée. La physiopathologie implique à la fois une réponse cellulaire et une réponse humorale avec une hypersensibilité de type III et IV à *Aspergillus* spp. [51,52].

2.3. Autres formes chroniques

Dans certaines situations, on peut observer des infections locales par *Aspergillus* spp., telles que des infections cutanées par contamination exogène (plaies, brûlures), des atteintes auriculaires (otomycoses) ou encore des atteintes ophtalmiques (kératites), manifestations qui apparaissent souvent après une lésion traumatique.

3. Pathologies sous-jacentes, facteurs favorisants et épidémiologie

Aspergillus spp. est à l'origine de nombreuses pathologies chez l'homme. Le système immunitaire de l'hôte est souvent un déterminant de la pathologie développée (Figure 5).



HSP = Hypersensitivity pneumonitis ou alvéolite allergique extrinsèque

Figure 5 : Formes cliniques des infections bronchopulmonaires à *Aspergillus* spp., selon le statut immunitaire de l'hôte.

(d'après [3])

3.1. Pathologies sous-jacentes et facteurs favorisants

Les facteurs favorisant une aspergillose sont environnementaux, locaux ou généraux liés à l'hôte.

Lorsqu'on observe une augmentation des spores aspergillaires dans un environnement, le risque de colonisation ou de développement d'une pathologie aspergillaire chez l'hôte évoluant dans cet environnement est augmenté.

Les facteurs locaux liés à l'hôte rassemblent l'ensemble des affections, pathologies sous-jacentes ou antécédents d'infections pulmonaires qui peuvent altérer les défenses locales de l'hôte, à savoir l'altération des cellules épithéliales ou des cils mucociliaires.

Les facteurs généraux liés à l'hôte sont surtout retrouvés dans les cas d'aspergillose invasive puisque ceux-ci altèrent le système immunitaire de l'hôte.

Des prédispositions génétiques seraient décrites dans les formes d'ABPA et les formes d'hypersensibilité mais nécessitent d'être confirmées [53].

3.1.1. AI

L'augmentation des spores aspergillaires dans l'environnement a été décrite comme facteur favorisant une AI notamment dans les services d'hématologie avant qu'ils ne soient contrôlés sur le plan de la contamination aérienne par des champignons ou encore lorsque des travaux sont effectués à proximité d'un hôpital [54].

Les facteurs généraux favorisant une AI sont liés à l'altération sévère du système immunitaire de l'hôte. Il s'agit de la neutropénie profonde, de la corticothérapie prolongée, du déficit en NADPH-oxydase, des traitements par chimiothérapie, des transplantations d'organes solides et greffes de cellules souches, des thérapeutiques immunosuppressives [33,55]. L'AI a également été rapportée récemment chez les personnes atteintes de BPCO et traitées par corticothérapie [11].

3.1.2. APC et formes d'hypersensibilité

La colonisation bronchique des patients immunocompétents, dont la définition n'est pas consensuelle, a été rapportée comme pouvant être un pré-requis au développement d'une pathologie aspergillaire; certains auteurs considérant même ces patients comme des malades [56]. Il est en effet difficile de faire la distinction entre une colonisation et une réelle infection; il faut pour cela s'appuyer sur un faisceau d'arguments prenant en compte l'ensemble des facteurs prédisposants, résultats biologiques et mycologiques [57].

Les facteurs locaux jouant un rôle dans le développement d'aspergillose chez l'immunocompétent sont nombreux et varient selon le type d'aspergillose.

Si l'on considère les cas d'aspergillomes, d'APCC et d'APCF, les principales pathologies sous-jacentes ou antécédents pulmonaires rapportés sont la tuberculose, les infections à mycobactéries atypiques, l'ABPA, la BPCO et l'emphysème, la sarcoïdose pulmonaire, un antécédent de cancer pulmonaire, etc. [3,4].

Les formes d'APCN sont décrites chez des patients présentant une immunodépression modérée ou localisée; les pathologies sous-jacentes rapportées sont essentiellement la

cirrhose, le diabète, la sarcoïdose, les pathologies auto-immunes, une corticothérapie à faible dose prolongée mais également la dénutrition [58].

Dans les formes d'hypersensibilité telles que l'ABPA, les facteurs favorisants décrits sont principalement l'asthme et la mucoviscidose, conditions qui permettent la persistance des conidies dans les voies respiratoires et donc leur développement en filaments. Dans de rares cas, la BPCO a été rapportée comme pathologie sous-jacente de l'ABPA [50].

Des facteurs génétiques semblent prédisposer à une ABPA ou à une aspergillose allergique, tels que certaines mutations du gène CFTR ou encore certaines molécules du complexe majeur d'histocompatibilité de type II (notamment HLA-DR). Cependant, l'implication de ces prédispositions génétiques dans la survenue d'une ABPA ou autre forme d'hypersensibilité n'est pas certaine et nécessite d'être confirmée [48,49,53].

3.2. Epidémiologie

3.2.1. AI

Les AI sont décrites chez des patients sévèrement immunodéprimés. Les données concernant l'épidémiologie de ces infections ont souvent été rapportées chez les patients traités pour une leucémie aigüe myéloïde avec une incidence des AI de 4,4% à 8% [59–61]. Chez les patients allogreffés de cellules souches hématopoïétiques, une incidence des AI de 2,5% à 12% a été rapportée [5,60]. Chez les greffés d'organes solides, on retrouve une incidence des AI entre 0,3 et 4,8% [5].

La létalité des AI est parmi les plus importantes des infections fongiques invasives et atteint 28.5% dans les données françaises recueillies entre 2001 et 2010 [62].

3.2.2. APC et formes d'hypersensibilité

3.2.2.1. APC

La prévalence des différentes formes d'APC n'est pas rapportée précisément dans la littérature. Des études récentes ont estimé que la prévalence sur 5 ans des APC après une tuberculose pulmonaire varie entre <1/100 000 en Europe de l'Ouest et aux Etats-Unis et 42.9/100 000 au Nigéria et en République Démocratique du Congo [63,64].

La tuberculose et autres infections à mycobactéries atypiques, antécédents pulmonaires les plus souvent décrits, sont retrouvées dans 30% des APC et jusqu'à 93% en Corée [4].

L'ABPA est une pathologie sous-jacente décrite dans 14% des APC [4].

3.2.2.2. ABPA

La prévalence de l'ABPA varie de 1 à 15% chez les patients atteints de mucoviscidose et de 1 à 2% chez les adultes asthmatiques [1,20,48,49,65–67]. Deux études européennes ont montré que la prévalence de l'ABPA diffère considérablement selon le pays considéré [1,66], les méthodes et critères diagnostiques étant différents. En France, une prévalence de 7.4% à 17.7% a été rapportée chez les patients atteints de mucoviscidose [1,66]. Les critères utilisés en France pour le diagnostic de l'ABPA au cours de la mucoviscidose semblent efficaces puisque le taux d'ABPA déclaré est très proche du taux d'ABPA théorique estimé dans une population de référence [1].

4. Clinique et classification

4.1. Patient immunodéprimé

La principale porte d'entrée des spores aspergillaires étant les poumons, le patient immunodéprimé développe une aspergillose pulmonaire invasive (API) dans 80-90% des cas [28].

Les symptômes de l'API sont non spécifiques mais comprennent une toux, une dyspnée, de la fièvre, des douleurs thoraciques et des hémoptysies [28].

Le caractère angioinvasif de l'AI s'observe principalement chez le patient neutropénique ($PNN < 100/mm^3$) [68], qui se traduit par une hémoptysie, conséquence de la thrombose vasculaire et de l'hémorragie péri-lésionnelle. La fièvre prolongée peut être le seul signe clinique chez le patient neutropénique.

La forme bronchoinvasive se retrouve surtout chez le patient non neutropénique allogreffé sous traitement immunosuppresseur pour une réaction du greffon contre l'hôte [68]. Elle est caractérisée par un développement fongique limité, un infiltrat granulomateux, une nécrose tissulaire et une réponse inflammatoire excessive. Cette forme aboutit à une destruction de la paroi bronchiolaire [68].

Il faut penser à évoquer une aspergillose invasive chez un patient très immunodéprimé qui présente une fièvre persistante sous antibiothérapie à large spectre depuis plus de 48h. Tout patient chez qui une aspergillose invasive est suspectée doit alors bénéficier le plus rapidement possible d'un scanner thoracique, à la recherche de signes évocateurs tels que signe du halo, croissant gazeux, et de recherches mycologiques (Figure 6).



Figure 6 : Scanner pulmonaire montrant un nodule avec signe du halo révélant une aspergillose angioinvasive chez un patient atteint de leucémie aigüe.

(d'après [68])

D'autres formes d'AI sont décrites chez le patient immunodéprimé comme l'aspergillose trachéobronchique ou la sinusite aspergillaire invasive.

A partir de ces sites primitifs, l'AI peut disséminer et former des localisations secondaires dont les principales sont le cerveau et la peau [28].

L'aspergillose invasive chez les patients sévèrement immunodéprimés ne fait pas l'objet d'un développement dans ce travail qui concerne le diagnostic des formes chroniques et allergiques de l'immunocompétent.

4.2. Patient immunocompétent

4.2.1. Colonisation bronchique

Il s'agit de la présence du champignon dans les voies respiratoires sans dommages apparents sur le tissu pulmonaire ni signe clinique spécifique. Les facteurs prédisposant à la colonisation aspergillaire des voies respiratoires sont la BPCO, l'asthme, la bronchectasie, la bronchite chronique, la mucoviscidose, l'utilisation prolongée d'antibiotiques à large spectre et la malnutrition [13].

La définition de la colonisation aspergillaire est controversée et aucun consensus n'a été établi. Elle est définie par certains auteurs comme la simple présence d'*Aspergillus* spp. dans les prélèvements respiratoires [57]. D'autres équipes la définissent plus rigoureusement avec l'isolement répété d'*Aspergillus* spp. dans un prélèvement respiratoire (≥ 2 prélèvements positifs) [53,69,70]. Il n'existe pas de recommandation concernant l'indication d'un traitement antifongique chez ces patients colonisés.

Le risque de développer une pathologie aspergillaire suite à une colonisation dépend essentiellement du statut immunitaire de l'hôte.

4.2.2. APC et formes d'hypersensibilité

Nous nous intéressons dans ce mémoire aux aspergilloses pulmonaires chez l'immunocompétent ainsi qu'à leur diagnostic.

4.2.2.1. APC

L'hôte non immunodéprimé peut développer une APC qui peut prendre différentes formes [10,71] :

- Aspergillome simple
- Aspergillose pulmonaire chronique caverneuse (APCC)
- Aspergillose pulmonaire chronique fibrosante (APCF)
- Aspergillose pulmonaire chronique nécrosante (APCN) = AI subaigüe ou semi-invasive

A noter que les aspergilloses pulmonaires sont des entités cliniques proches les unes des autres et un patient peut évoluer d'une forme à une autre, ou encore présenter plusieurs formes intriquées. Les formes chroniques évoluent pendant plusieurs mois, voire années. Les manifestations cliniques observées ne sont pas spécifiques de l'aspergillose. Selon la localisation de l'aspergillose et le stade d'avancement de la maladie, on peut retrouver des manifestations cliniques telles que altération de l'état général, fièvre, toux, dyspnée, douleur thoracique, hémoptysies [4,10].

Les images radiologiques observées sont non pathognomoniques mais permettent d'évoquer l'aspergillose. La tomodensitométrie reflète les images observées sur la radiographie mais permet de mieux apprécier les anomalies pulmonaires décrites (par une meilleure résolution de contraste mais également l'absence de superposition anatomique) et

constitue un élément clé dans le diagnostic des aspergilloses. Elle permet en effet d'observer l'aspect pseudo-tumoral, l'épaississement des parois des cavités, des images hydro-aériques, des bronchectasies, des infiltrats, des aspects d'emphysème ou de fibrose, etc. mais également d'autres signes évocateurs d'aspergillose tels que des consolidations, des cavités ou des nodules périphériques.

La TDM est également intéressante pour suivre l'évolution des patients.

4.2.2.1.1. Aspergillome simple

L'aspergillome se forme en général sur une cavité existante (séquelles de tuberculose, cancer, sarcoïdose pulmonaire chronique, spondylodiscite ankylosante, emphysème, etc.) [4,10,72]. *Aspergillus* spp. colonise la cavité pour former une "truffe aspergillaire", constituée d'une masse de mycélium fongique, de cellules inflammatoires, de fibrine, de mucus et de débris cellulaires [73,74]. *A. fumigatus* est l'espèce la plus souvent impliquée dans les aspergillomes. L'aspergillome peut se localiser à différents niveaux (selon la cavité préexistante) : sinusien, pulmonaire ou pleural. Lorsque la cavité est aérée, on peut observer une sporulation asexuée, avec des conidiophores se développant sur le mycélium, des têtes et conidies aspergillaires.

L'aspergillome simple est stable, sans progression pendant plus de 3 mois, sans signes cliniques majeurs généraux. La symptomatologie de l'aspergillome n'est pas spécifique, les patients sont généralement asymptomatiques sans altération majeur de l'état général; cependant, des hémoptysies sont souvent décrites chez ces patients [4,10,72]. On peut également observer une toux chronique productive.

L'aspergillome est souvent caractéristique à l'imagerie, l'aspect "en grelot" est retrouvé dans la majorité des cas. On observe une opacité occupant une cavité qui est souvent entourée d'un "croissant gazeux" (Figure 7).

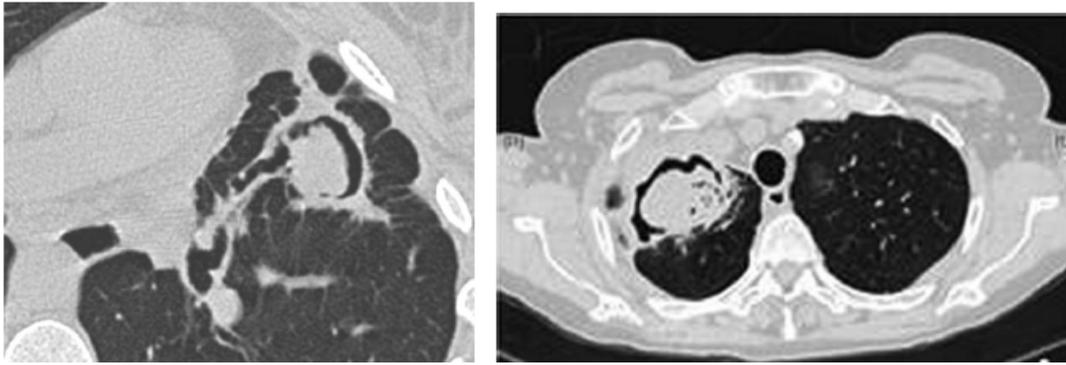


Figure 7 : Scanners de patients présentant un aspergillome

(image du grelot aspergillaire et du croissant gazeux)

(d'après [73,75])

L'aspergillome simple est unique. Les formes multiples et bilatérales sont regroupées sous le terme d'APCC [10,76].

4.2.2.1.2. APCC

Anciennement appelée aspergillome complexe, il s'agit de formations et expansions de multiples cavités, dont certaines peuvent contenir des balles aspergillaires évoluant depuis plus de 3 mois [4,10,77]. Le patient présente une altération de l'état général avec une perte de poids, une asthénie, de la toux des hémoptysies et de la fièvre [4].

La physiopathologie de l'APCC débute avec une réaction granulomateuse et une nécrose tissulaire entraînant une destruction du tissu pulmonaire et la formation de cavités. L'APCC est caractérisée par une bronchectasie localisée, la présence de multiples cavités, une réaction inflammatoire et une fibrose. Si elles ne sont pas traitées, ces cavités s'étendent pour se rejoindre et des balles fongiques peuvent apparaître.

L'APCC montre à l'imagerie de multiples cavités, entourées d'un liseré inflammatoire et d'infiltrats péri-cavitaires. Ces cavités peuvent contenir ou non une balle aspergillaire (Figure 8). Elles progressent pour ensuite former une seule grande cavité ou évoluent vers la fibrose [4,10,77]. Cette progression est généralement observée sur une période supérieure à 3 mois.

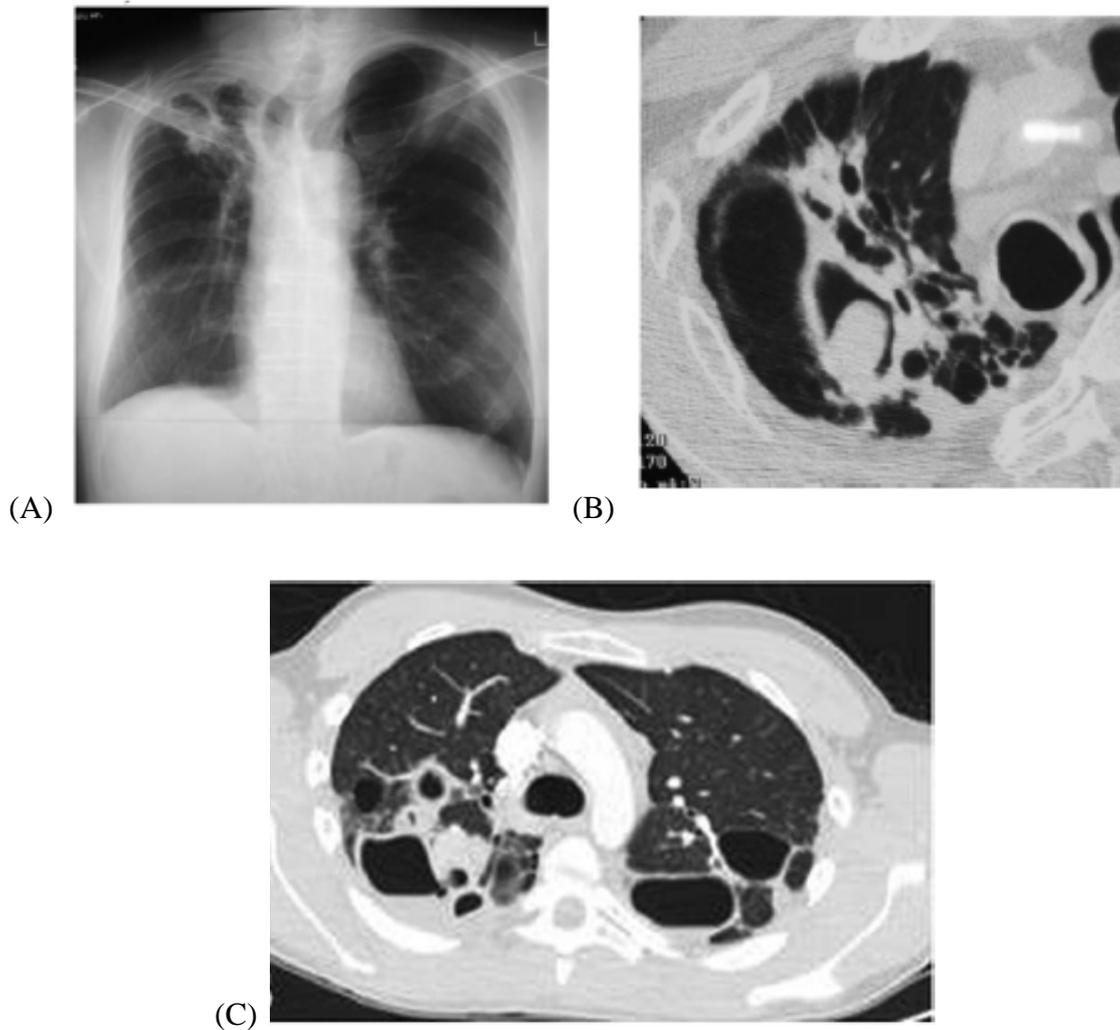


Figure 8 : Imagerie d'APCC

A et B : Radiographie et scanner d'un patient présentant une APCC avec des antécédents de tuberculose pulmonaire. On observe de multiples cavités avec un aspergillome au niveau du lobe supérieur droit. (d'après [77]). C : Scanner d'un patient présentant une APCC. (d'après [73]).

4.2.2.1.3. APCF

L'APCC peut évoluer vers une fibrose pulmonaire extensive : on parle alors d'APCF. La fibrose peut être limitée à un lobe supérieur ou alors s'étendre à toute l'aire pulmonaire entraînant une altération de la fonction pulmonaire [4,10]. Les principales manifestations cliniques comprennent une altération de l'état général avec une toux productive, un amaigrissement, des hémoptysies et une dyspnée [4,10].

L'APCF est caractérisée par une fibrose majeure, qui peut être limitée à un lobe ou alors s'étendre à tout l'hémithorax (Figure 9, Figure 10).



Figure 9 : Scanner d'un patient présentant une APCF.
(d'après [73])

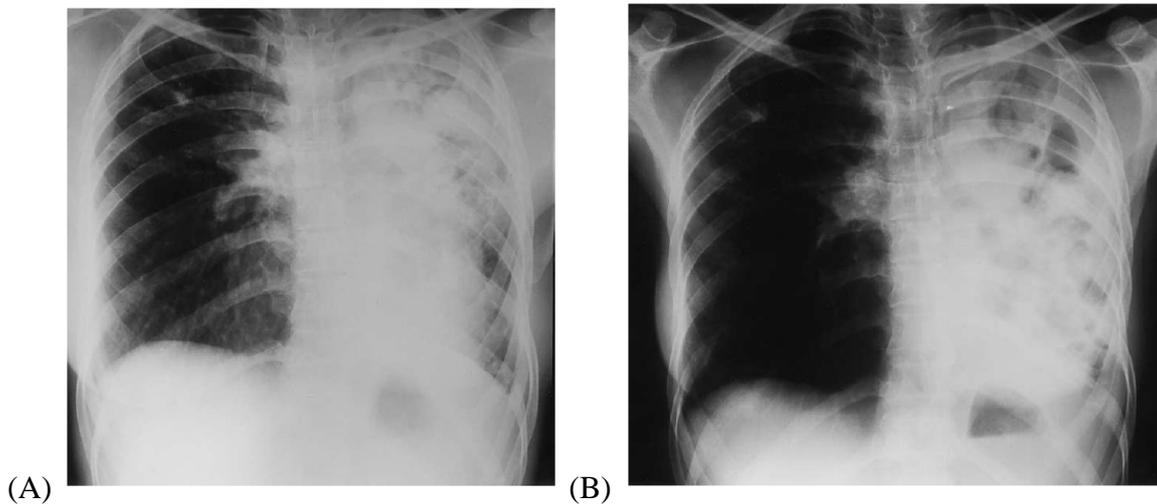


Figure 10 : Radiographies d'un patient présentant une APCC (A) (Juin 1994) qui a évolué en APCF (B) (Septembre 1997).

(d'après [10])

(A) : Mise en évidence d'un aspergillome au minimum avec une balle fongique entourée du signe du halo. Le patient n'a pas reçu de traitement antifongique.

(B) : Détérioration avec élargissement des cavités, extension de la fibrose du lobe inférieur et présence d'un épanchement pleural. Possibilité de la persistance d'une balle fongique avec le signe du halo dans la zone moyenne gauche. Le patient n'a pas reçu de traitement antifongique.

4.2.2.1.4. APCN

Le développement de l'APCC en APCN est liée à l'expansion des cavités préexistantes et est retrouvée chez les patients avec un système immunitaire légèrement affaibli, tels que ceux traités par faible doses immunosuppressives de corticoïdes, ceux ayant une pathologie pulmonaire sous-jacente ou ceux ayant des co-morbidités telles que diabète, alcoolisme ou cirrhose hépatique [4,10,78]. Du fait de cette immunodépression modérée, l'APCN évolue sur un mode subaigu, plus rapidement que les autres formes d'APC, en quelques semaines, généralement entre 1 et 3 mois : on parle alors de forme semi-invasive ou d'aspergillose invasive subaigüe [4,10]. On considère cette entité clinique comme un intermédiaire entre APC et AI. Les premiers cas d'APCN ont été décrits par Binder en 1982 [58] et Geftter en 1981 [79].

Le début est insidieux et progressif, marqué par l'apparition de signes évocateurs tels que la fièvre, la toux chronique productive, des hémoptysies, une dyspnée, un amaigrissement et une altération de l'état général [10,77,78]. Contrairement à l'aspergillome, le parenchyme pulmonaire est envahi localement par le champignon, les filaments aspergillaires entraînant des lésions inflammatoires. La présence de cavité préexistante n'est pas nécessaire (même si une cavité avec une balle fongique peut se développer secondairement à la destruction du tissu pulmonaire par le champignon). L'invasion vasculaire par *Aspergillus* spp. n'est pas retrouvée dans l'APCN, à la différence de l'AI.

La tomodensitométrie permet de mettre en évidence des infiltrats plus ou moins excavés avec apparition de nouvelles cavités ou extension des cavités préexistantes.

L'évolution de l'APCN dépend de la précocité du traitement, de l'immunité de l'hôte et de l'extension des lésions [80].

Lors d'APCN, on observe initialement sur l'imagerie des infiltrats et consolidations dans le lobe supérieur ou sur le segment supérieur du lobe inférieur associés à une bronchectasie (Figure 11) [10,75,77]. Les consolidations évoluent pour former des cavités après plusieurs semaines ou mois [81]. On peut également voir une balle fongique, mais cela dépend du stade d'évolution de la maladie. L'épaississement de la paroi pleurale adjacente est souvent décrit.

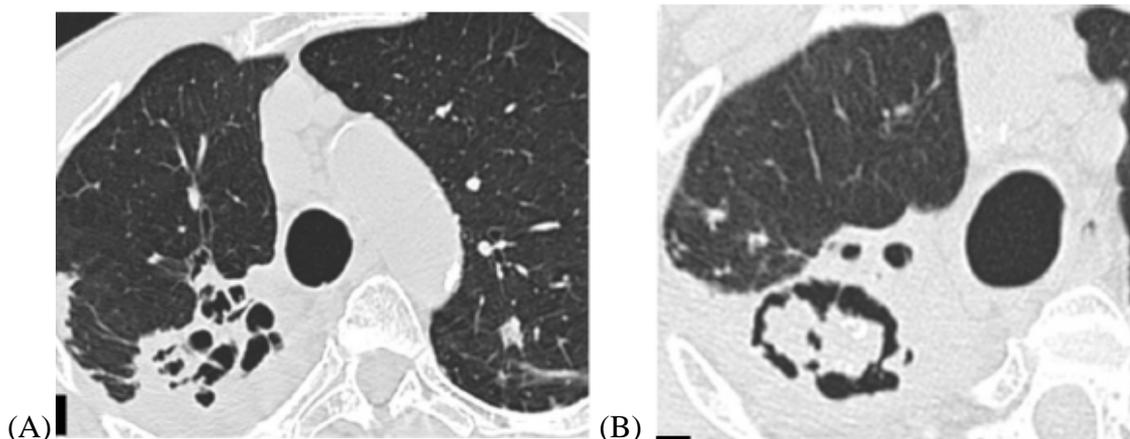


Figure 11 : Images d'APCN.

(A) : Consolidation du lobe supérieur droit avec bronchectasie. (B) : Même patient 7 mois plus tard : la consolidation initiale évolue progressivement vers la formation d'une cavité.

(d'après [75])

4.2.2.2. Formes d'hypersensibilité

Lorsque le patient présente des facteurs favorisants comme un asthme, une BPCO ou une mucoviscidose, etc., il peut développer des formes dites d'hypersensibilité qui se manifestent par :

- un asthme allergique,
- une aspergillose broncho-pulmonaire allergique (ABPA),
- une alvéolite allergique extrinsèque.

Les aspergilloses allergiques résultent de l'exposition aux protéines et allergènes d'*Aspergillus* spp. entraînant chez l'hôte une réponse d'hypersensibilité.

4.2.2.2.1. ABPA

Aussi appelée maladie de Hinson-Pepys [27,82], elle touche principalement les patients avec un terrain propice (asthme, mucoviscidose, dilatation des bronches, BPCO). Il s'agit d'une pathologie pulmonaire allergique causée par une hypersensibilité aux antigènes aspergillaires. Le diagnostic, chez ces patients prédisposés, reste difficile et est souvent évoqué lors d'exacerbation des signes cliniques associée à des signes biologiques d'hypersensibilité immédiate (type I) et semi-retardée, réaction Ag-Ac (type III).

Chez les patients asthmatiques, les exacerbations d'ABPA se manifestent par une dyspnée fébrile, des douleurs thoraciques, une toux productive et une altération de l'état général [47]. Les patients asthmatiques sont souvent asymptomatiques à distance des exacerbations car ils sont contrôlés par leurs thérapeutiques au long cours.

L'ABPA débute, en phase aiguë, avec des manifestations asthmatiformes sévères avec des sifflements, des épisodes de malaise, une fièvre, une perte de poids, des douleurs thoraciques ainsi qu'une toux productive, parfois associée à des hémoptysies. Lorsque l'ABPA devient chronique, le patient développe une bronchectasie, une fibrose et la production d'expectorations purulentes, contenant parfois des éosinophiles, des cristaux de Charcot-Leyden ou encore des éléments fongiques [27]. Une ABPA non prise en charge peut causer des dommages pulmonaires irréversibles (bronchectasies, fibrose).

Les critères diagnostiques d'ABPA chez les patients non atteints de mucoviscidose ont été largement décrits [83] et réactualisés en 2013 [47], les critères essentiels incluent :

- un asthme
- une réactivité cutanée immédiate à *Aspergillus* spp. ou des taux sériques élevés d'IgE spécifiques anti-*A. fumigatus*
- des taux sériques d'IgE totales > 1000 UI/ml

associés à 2 critères parmi les 3 suivants :

- la présence de précipitines ou d'IgG anti- *A. fumigatus* dans le sérum
- des anomalies radiologiques concordantes avec une ABPA (consolidation, nodules, opacités, bronchectasie centrale, etc.)
- un taux d'éosinophiles > 500/mm³, chez les patients non traités par corticoïdes.

Cinq stades d'ABPA ont été décrits par Patterson [84] chez les patients atteints d'asthme et d'ABPA [49,84] et ont récemment été repris et précisés par Agarwal *et al.* en 6 stades [47] :

- stade 0 : phase asymptomatique : le patient présente un asthme contrôlé et n'a jamais eu de diagnostic d'ABPA, mais remplit les critères diagnostiques d'ABPA (ci-dessus).
- stade I : phase aiguë, caractérisée par un asthme incontrôlé et des symptômes pulmonaires. Le patient n'a jamais eu de diagnostic d'ABPA, mais remplit les critères diagnostiques,

- stade II : phase de réponse : amélioration de l'état clinique (résolution des symptômes et contrôle de l'asthme), amélioration des images radiologiques, le taux d'IgE totales chute ($\geq 25\%$ en 8 semaines),
- stade III : phase d'exacerbation : détérioration clinique ou radiologique avec une augmentation des IgE totales $\geq 50\%$,
- stade IV : phase de rémission : amélioration prolongée de la clinique et de l'imagerie associée à un taux d'IgE totales égal ou inférieur au taux initial sur une période ≥ 6 mois (en l'absence de traitement par corticoïdes),
- stade V : phase de cortico-dépendance : le patient est dépendant aux corticoïdes pour contrôler sa pathologie.
Le diagnostic d'ABPA est souvent fait à ce stade.
- stade VI : phase avancée de l'ABPA: phase terminale de la pathologie pulmonaire avec une insuffisance respiratoire et/ou un cœur pulmonaire associée à des images radiologiques de fibrose. Peu de patients évoluent vers ce stade.

L'ABPA est également une complication retrouvée chez les patients mucoviscidosiques et y est associée à une détérioration des fonctions pulmonaires, un fort taux de colonisation bactérienne, des pneumothorax, des hémoptysies massives et un statut nutritionnel altéré [48].

L'élément important qui intervient dans la pathogénicité de l'ABPA chez ces patients est la forte exposition aux allergènes d'*Aspergillus* spp. en raison d'une sécrétion importante de mucus stagnant dans les voies respiratoires. Le diagnostic d'ABPA chez ces patients est difficile puisque les manifestations cliniques sont similaires à celles liées à la mucoviscidose.

Les recommandations de la Conférence de Consensus de 2003 [49] définit l'ABPA chez les patients atteints de mucoviscidose par les 5 critères majeurs suivants :

- détérioration aiguë ou subaiguë des fonctions respiratoires, non attribuable à une autre cause
- taux d'IgE totales sériques > 1000 UI/ml
- réactivité cutanée immédiate à *Aspergillus* spp. mise en évidence soit par un prick-test positif aux antigènes d'*Aspergillus* spp. soit par la présence d'IgE spécifiques anti-*A. fumigatus*

- présence de précipitines d'*A. fumigatus* ou d'IgG anti-*A. fumigatus* dans le sérum
- présence d'anomalies récentes ou nouvelles à l'imagerie : infiltrats pulmonaires, bronchectasie centrale, stagnation de mucus, etc. sans amélioration après traitement antibiotique.

L'isolement d'*Aspergillus* spp. dans des prélèvements respiratoires fait partie des critères mineurs pour le diagnostic d'ABPA [48,49].

Les signes radiologiques sont souvent absents lors d'une ABPA. On peut cependant observer des infiltrats transitoires, des nodules, des consolidations, des accumulations de mucus et une bronchectasie centrale [47,75].



Figure 12 : Images d'ABPA.

(b,c) : bronchectasie bilatérale sub-segmentaire, remplie de mucus. (e) après traitement : la bronchectasie persiste mais le mucus a disparu. (d'après [75])

4.2.2.2.2. Asthme aspergillaire

L'asthme aspergillaire est un asthme provoqué à la suite d'une exposition prolongée aux spores aspergillaires [13,50]. Les symptômes nasaux observés ressemblent à un rhume suivi d'une toux et d'une respiration sifflante.

On observe souvent des signes d'hypersensibilité immédiate avec la présence d'IgE spécifiques et des tests cutanés positifs.

4.2.2.2.3. Alvéolite allergique extrinsèque

L'alvéolite allergique extrinsèque, ou pneumopathie d'hypersensibilité, peut être d'origine professionnelle ou non. Trois formes cliniques ont été décrites :

- la forme aiguë avec un syndrome pseudo-grippal, une toux sèche, une dyspnée et des râles crépitants bilatéraux apparaissant 4 à 8 h après l'exposition. Cette forme semble liée à l'exposition intermittente à des antigènes aspergillaires. Les symptômes persistent environ 12 h et sont spontanément réversibles.
- la forme subaiguë avec une asthénie, un amaigrissement, une toux chronique, une dyspnée et un syndrome interstitiel.
- la forme chronique, liée à la répétition des expositions, qui est une forme évoluant vers l'insuffisance respiratoire chronique par fibrose pulmonaire [51,52].

Cette entité n'a pas été prise en compte dans notre étude car elle constitue une forme clinique particulière et concerne un faible nombre de patients.

4.2.2.2.4. Autres formes allergiques

➤ Sinusite aspergillaire allergique

La sinusite aspergillaire allergique se développe en général chez l'hôte immunocompétent atopique ou ayant des antécédents d'asthme ou de polypes nasaux chroniques. Il s'agit du développement d'*Aspergillus* spp. dans le(s) sinus de façon chronique, sans invasion tissulaire [85]. On retrouve, comme dans l'ABPA, du mucus contenant des éosinophiles, des cristaux de Charcot-Leyden et des filaments fongiques, mais l'atteinte est sinusienne. Les principaux signes cliniques sont des céphalées chroniques, une obstruction nasale et une rhinite [13]. Le traitement repose principalement sur le drainage des sinus qui suffit dans la plupart des cas.

➤ Bronchite aspergillaire

Il s'agit d'une infection rare, locale et superficielle. Les patients présentent des prélèvements positifs pour *Aspergillus* spp. (culture ou sérologie) mais sans atteinte pulmonaire parenchymateuse [73]. Les manifestations cliniques observées lors de bronchite aspergillaire sont non spécifiques. La muqueuse bronchique est inflammatoire et les patients présentent une hyperthermie, une dyspnée, des douleurs thoraciques, des hémoptysies avec ou non une altération de l'état général. La bronchite aspergillaire peut être responsable de la persistance de symptômes respiratoires.

4.2.3. Autres formes non pulmonaires

Aspergillus spp. peut également être responsable d'aspergilloses non pulmonaires comme par exemple :

- des sinusites aspergillaires non allergiques : il s'agit d'une atteinte locale du sinus avec production de balle fongique [13].
- des otomycoses : il s'agit d'une atteinte auriculaire, favorisée par des lésions préexistantes du conduit auditif externe et l'usage local de corticoïdes. L'agent étiologique le plus souvent impliqué est *A. niger*.
- des atteintes oculaires : il s'agit le plus souvent de kératites aspergillaires post-traumatiques, à la suite de projection d'objets souillés dans les yeux.
- des atteintes cutanées, le plus souvent retrouvées chez les grands brûlés.

4.3. Classification

Smith et Denning ont catégorisé en 2011 les différentes formes cliniques d'APC [4,10]. Les critères de classification établis reposent sur l'ensemble des arguments cliniques, radiologiques et biologiques.

- L'aspergillome simple est défini comme la présence simultanée (à l'imagerie ou en histologie), d'une balle fongique à l'intérieur d'une cavité unique et d'une preuve sérologique et/ou microbiologique de l'implication d'*Aspergillus* spp. Il n'existe pas d'altération de l'état général et aucune progression de l'aspergillome n'est observée sur au moins 3 mois.
- L'APCC est décrite comme la présence d'une ou plusieurs cavités, contenant ou non, une balle fongique, associée à une preuve sérologique et/ou microbiologique de l'implication d'*Aspergillus* spp. L'APCC s'observe chez les patients immunocompétents présentant des symptômes pulmonaires ou systémiques ainsi qu'une progression radiologique sur une période d'au moins 3 mois. Si une biopsie est réalisée, elle met en évidence des hyphes aspergillaires sur un tissu inflammatoire, mais ne montre pas d'invasion tissulaire par le champignon.

- L'APCF est déterminée comme la fibrose sévère atteignant au minimum 2 lobes pulmonaires. Elle est consécutive de l'APCC et entraîne une diminution des fonctions respiratoires.
- L'APCN est considérée comme l'aspergillose invasive des patients modérément immunodéprimés. Elle progresse sur une période de 1 à 3 mois entraînant des lésions tissulaires et des anomalies à l'imagerie (nodules, consolidations, etc.). Des arguments sérologiques (y compris la détection d'antigènes sériques) et/ou microbiologiques en faveur de la présence du champignon sont détectés.

Les arguments sérologiques et microbiologiques pris en compte dans le diagnostic des CPA sont respectivement la présence de précipitines anti-*Aspergillus* dans le sérum et l'isolement d'*Aspergillus* spp. dans un prélèvement respiratoire ou pleural [10].

Les critères diagnostiques des formes d'hypersensibilité reposent sur des arguments cliniques, radiologiques, immunologiques et biologiques [12,47,83], à savoir la fonction respiratoire et les EFR, l'imagerie (radiologie, scanner), les IgG et IgE anti-*Aspergillus fumigatus*, les IgE totales et la réactivité cutanée aux antigènes d'*Aspergillus* spp. La culture des prélèvements respiratoires ne fait pas partie des critères diagnostiques car ces patients sont souvent colonisés par le champignon. Le détail des critères diagnostiques est précisé plus haut dans ce mémoire.

Baxter *et al.* a récemment décrit 3 nouvelles classes d'aspergilloses chez le patient atteint de mucoviscidose (ABPA, sensibilisation aspergillaire et bronchite aspergillaire) en utilisant comme marqueurs biologiques la sérologie (IgG et IgE anti-*Aspergillus*), la PCR aspergillaire et l'antigène galactomannane dans les crachats [12]; la culture des prélèvements respiratoires n'étant pas prise en compte dans les critères diagnostiques. Publiée après le début de notre étude, cette classification n'a pas été utilisée. D'autre part, une étude dans différents pays, compare la prévalence théorique d'ABPA (d'après une prévalence de 17% estimée sur une population de référence avec les nouveaux critères proposés par Baxter *et al.* [12]), avec les cas réellement recensés dans les registres nationaux d'après les critères propres à chaque pays [1]. Le diagnostic d'ABPA en France semble bien réalisé puisque les cas d'ABPA recensés correspondent parfaitement aux cas théoriques (101.2%), ce qui signifie que les critères diagnostiques utilisés en France (et donc dans notre étude) semblent corrects. [1].

5. Diagnostic biologique des aspergilloses chroniques et formes d'hypersensibilité

Le diagnostic d'aspergillose est difficile et repose sur l'ensemble des éléments cliniques, radiologiques, biologiques et histologiques.

Le diagnostic d'APC repose sur les antécédents pulmonaires et comorbidités du patient, l'imagerie, la détection des précipitines (IgG) d'*Aspergillus* spp. dans le sérum et/ou la mise en évidence du champignon en culture dans les prélèvements respiratoires.

Il faut éliminer d'autres causes, infectieuses (tuberculose, histoplasmosse, etc.) ou non (cancer pulmonaire, sarcoïdose, etc.), avant de conclure à une APC.

5.1. Critères mycologiques

5.1.1. Prélèvements

L'isolement d'*Aspergillus* spp. d'un site non stérile et potentiellement colonisé (tractus respiratoire, etc.) est d'interprétation délicate et doit prendre en compte le contexte clinique, l'immunodépression et les autres arguments biologiques.

Ainsi, pour les prélèvements respiratoires, il est préférable de privilégier des prélèvements protégés comme la broncho-aspiration ou le lavage bronchio-alvéolaire. Ces prélèvements font l'objet d'une recherche mycologique conventionnelle (examen direct et culture) mais récemment la recherche d'antigène galactomannane ainsi que la PCR *Aspergillus* spp. ont été évoqués comme critères diagnostiques d'ABPA chez le patient atteint de mucoviscidose [12].

Pour la sérologie (détection des anticorps), la recherche d'antigènes ou la PCR, des prélèvements sanguins (sérum) sont réalisés.

5.1.2. Examen direct

Une coloration, permettant de mettre en évidence les filaments mycéliens, comme le Gomori-Grocott, est réalisée (Figure 13). Les filaments aspergillaires sont hyalins, cloisonnés (à la différence des mucorales), ramifiés avec des angles aigus. Les têtes aspergillaires sont exceptionnellement observées à l'examen direct et témoignent d'une croissance du champignon *in vivo* au sein d'une cavité bien aérée (aspergillome sinusien ou otite externe).



Figure 13 : Coloration de Grocott mettant en évidence une masse d'hyphes d'*Aspergillus fumigatus* (aspergillome).
(d'après [86])

5.1.3. Culture

La culture d'*Aspergillus* spp. dans un prélèvement respiratoire est un examen qui manque de sensibilité. Elle est notamment inférieure à 50% dans le liquide bronchiolo-alvéolaire au cours des aspergilloses chroniques [65,87]. La sensibilité de la culture de la broncho-aspiration est supérieure à celle du lavage bronchiolo-alvéolaire [88]. D'autre part, elle ne permet pas de faire la différence entre une colonisation et une infection [57].

Dans les nouveaux critères proposés pour les aspergilloses allergiques chez le sujet atteint de mucoviscidose, Baxter *et al.* ne prend plus en compte la culture dans les critères diagnostiques [12]. Cependant, la culture est l'élément qui permet d'identifier l'espèce d'*Aspergillus* sp et qui permet de tester la sensibilité aux antifongiques (antifongigramme). Le développement des résistances d'*Aspergillus* spp. aux antifongiques azolés rend le suivi des sensibilités de plus en plus nécessaire.

5.2. Détection d'antigènes

Aspergillus spp. possède de nombreux antigènes, qu'ils soient présents sur la paroi du champignon, sécrétés dans le milieu extérieur ou libérés lors de la rupture du champignon. Les antigènes galactomannane et (1-3) β -D-glucane sont isolés de la paroi fongique et utiles notamment dans le diagnostic des aspergilloses invasives. L'Ag galactomannane est assez spécifique d'*Aspergillus* spp. alors que l'Ag (1-3) β -D-glucane est un marqueur pan-fongique : il ne détecte pas uniquement *Aspergillus* spp. mais également *Candida* spp.,

Pneumocystis jirovecii et les autres champignons pathogènes en dehors de *Cryptococcus* spp. et des mucorales [89,90].

5.3.Sérodiagnostic : détection des anticorps IgG

La détection d'anticorps type IgG dirigés contre *A. fumigatus* dans le sérum est utile dans le diagnostic des APC et des formes d'hypersensibilité [10,13]; les patients immunodéprimés développant une réponse humorale très faible. Les IgG sont utiles au diagnostic de toutes les formes chroniques et allergiques alors que les IgE anti-*Aspergillus* ne sont détectées que dans les formes d'hypersensibilité [12,47] et seront développées plus loin dans ce mémoire. On s'intéresse uniquement aux anticorps dirigés contre *A. fumigatus* car il est l'agent le plus souvent impliqué dans les aspergilloses [13,18].

Actuellement en France, la nomenclature des actes de biologie médicale impose aux laboratoires la réalisation de 2 techniques pour la détection des anticorps anti-*A. fumigatus*: une technique de dépistage suivie d'une technique de confirmation si la première est positive [91]. En effet, l'objectif de la technique de dépistage est d'avoir une excellente sensibilité, afin de détecter tous les malades; celui de la technique de confirmation est d'avoir une excellente spécificité afin de confirmer les vrais positifs et d'éliminer les éventuels faux positifs du dépistage. La stratégie utilisée en France est donc de coupler une technique de dépistage (sensible) avec une technique de confirmation (spécifique).

Les techniques actuellement recommandées pour le dépistage des IgG anti-*A. fumigatus* sont l'hémagglutination indirecte, l'ELISA, l'immunodiffusion double et l'electrosynérèse [91]. La technique de confirmation réalisée doit être une parmi l'immunoélectrophorèse, le Western-Blot ou la coélectrosynérèse avec utilisation d'un sérum de référence positif [91,92].

Pour une même technique (ELISA, immunoprécipitation), il existe une grande variabilité, à la fois dans la composition des antigènes utilisés pour la détection des IgG anti-*A. fumigatus* y compris pour les techniques commerciales, et dans les méthodes elles-mêmes. De nombreux laboratoires utilisent encore des méthodes « maisons » développées à partir d'antigènes commerciaux ou à partir d'antigènes de production également « maison ». Les antigènes présentent des différences qualitatives et quantitatives qui entraînent une variabilité inter-laboratoire importante. Ceci est d'autant plus vrai que la qualité des

antigènes "maison" issus de broyat et/ou de filtrat de culture d'*Aspergillus* spp. dépend de la durée de la culture du champignon mais également de la souche d'*A. fumigatus* utilisée. Les différents antigènes utilisés peuvent être somatiques, métaboliques ou recombinants. Les antigènes somatiques d'*Aspergillus* spp. proviennent d'un broyat du mycélium du champignon alors que les antigènes métaboliques sont obtenus par filtrat de culture [14,93]. Les précipitines, dont la détection est recommandée pour la confirmation d'un dépistage positif, sont des anticorps mis en évidence par une réaction de précipitation lorsqu'ils sont mis en contact avec l'antigène correspondant [10]. De nombreuses précipitines anti-aspergillaires ont été mises en évidence dont les plus fréquentes sont les arcs C, F, J et M [14]. Ces précipitines peuvent être des enzymes. L'arc C est un arc chymotrypsique, correspondant à la dipeptidylpeptidase V, spécifique d'*A. fumigatus*. L'arc J porte une activité catalasique, non spécifique d'*A. fumigatus* et retrouvée dans la majorité des *Aspergillus* spp. La catalase est une enzyme qui protège le champignon du stress oxydant et des dérivés réactifs de l'oxygène. *A. fumigatus* possède des catalases liées aux conidies et d'autres liées aux filaments [44]. La détection de l'activité catalasique serait indicatrice de l'action immunomodulatrice du champignon et donc d'une virulence accrue. Une autre activité enzymatique mise en évidence est la ribonucléase, ribonucléotoxine ou mitogilline. Cette activité s'observe lors d'infections aspergillaires actives. Des protéines recombinantes de ces enzymes ont été produites et sont utilisées dans certaines méthodes commercialisées [14,94–96].

Au-delà de la variabilité des antigènes utilisés, les méthodes de détection des immunoprécipitines ne sont pas standardisées car les gels utilisés varient d'un laboratoire à un autre (gel commercial ou gel "maison"); les dépôts des antigènes et du sérum dans le gel diffèrent également selon les techniques. De plus, les critères d'interprétation sont propres à chaque laboratoire. La détection des activités enzymatiques permet d'augmenter la spécificité des tests.

Dans le cadre de l'accréditation des laboratoires, de nombreuses techniques "maison", de dépistage ou de confirmation, sont abandonnées au profit de kits commerciaux, permettant ainsi d'améliorer la standardisation de la sérologie aspergillaire. Les différentes techniques utilisées dans le sérodiagnostic aspergillaire sont détaillées ensuite.

5.3.1. Méthodes de dépistage

5.3.1.1. Immunodiffusion (Double diffusion en gel d'agar)

L'immunodiffusion (ID) consiste à mettre en évidence des arcs de précipitines en gel d'agar [97]. Les antigènes d'*A. fumigatus* utilisés sont extraits de filtration de culture ou de mycélium [98].

Sur une lame recouverte d'agarose dans laquelle des puits ont été préformés, on dépose dans un puits central le sérum du patient et dans un puits périphérique les antigènes d'*A. fumigatus*. On laisse incuber plusieurs jours (jusqu'à une semaine) dans une chambre humide, ce qui permet aux antigènes et aux anticorps de migrer dans le gel. Lorsque l'anticorps rencontre l'antigène correspondant, la liaison antigène-anticorps induit la précipitation des complexes immuns, les précipités se présentent alors sous la forme d'arcs de précipitation. Après incubation, les lames sont rincées puis colorées au bleu de Coomassie afin de révéler les arcs de précipitation.

L'immunodiffusion manque de sensibilité et ne donne pas d'information quantitative, mais est une technique bien reproductible [97,98]. Elle tend à être remplacée par la CIE.

5.3.1.2. Electrosynérèse ou contre-immunoélectrophorèse (CIE)

Le principe de l'électrosynérèse, ou contre-immunoélectrophorèse, est comparable à celui de l'immunodiffusion. Il s'agit d'une double diffusion en gélose, accélérée par une migration électrophorétique. Sur un gel d'agarose, les antigènes d'*Aspergillus* sp sont déposés dans un puits du côté de la cathode et le sérum du patient à tester dans un puits du côté de l'anode. Après application d'un champ électrique, les antigènes (chargés négativement sur l'agarose) migrent vers l'anode alors que les anticorps soumis au courant d'électroendosmose (phase mobile chargée positivement), migrent en sens inverse, c'est-à-dire en direction de la cathode (Figure 14). Les complexes antigènes-anticorps formés sont révélés par la formation de précipitines colorées par le Bleu de Coomassie.

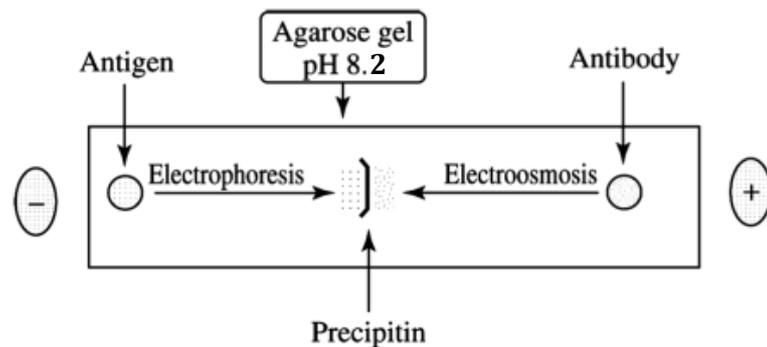


Figure 14 : Principe de la contre-immunoelectrophorèse ou électrosynérèse.
(d'après [99])

L'électrosynérèse a rapidement remplacé l'immunodiffusion car les performances sont comparables mais la technique est plus rapide [98,100].

L'électrosynérèse est une technique non standardisée puisque les laboratoires ont le choix des antigènes d'*Aspergillus* spp. utilisés : antigènes "maison" ou antigènes commerciaux d'*A. fumigatus* (Bencard, München, Allemagne ou Microgen Bioproducts, Camberley, Surrey, UK) [15,100]. Les arcs de précipitation sont détectés par lecture visuelle et les résultats sont exprimés en titre, en considérant la dernière dilution du sérum pour laquelle des précipitines sont visibles. Un titre ≥ 1 est considéré positif [15].

L'électrosynérèse présente les avantages d'être une technique rapide et simple à mettre en oeuvre même si elle nécessite un équipement spécialisé. Les inconvénients de l'électrosynérèse est sa faible sensibilité (comparable à l'immunodiffusion) et des résultats qualitatifs subjectifs [15,92].

5.3.1.3. ELIEDA (Enzyme-Linked-Immuno-Electro-Diffusion-Assay)

La technique ELIEDA (Enzyme-Linked-Immuno-Electro-Diffusion-Assay) repose sur le principe de l'électrosynérèse couplée à un marquage enzymatique des complexes immuns formés, permettant ainsi d'augmenter la sensibilité par rapport à l'électrosynérèse. Les complexes antigènes-anticorps formés en électrosynérèse sont révélés par un anticorps anti-immunoglobulines conjugué à la peroxydase.

Cette technique permet d'obtenir une sensibilité proche de celle obtenue avec les techniques RIA. De plus, la technique enzymatique offre la possibilité de déterminer la nature des immunoglobulines présentes dans le sérum des patients [101].

5.3.1.4. Immunofluorescence indirecte

La technique d'immunofluorescence indirecte (IFI) a été développée après les techniques d'immunodiffusion, présentant ainsi une meilleure sensibilité. Les antigènes sont obtenus à partir de mycélium après culture d'*A. fumigatus* sur lame (méthode de culture préservant l'intégrité des structures du champignon) [92,96]. Les complexes antigènes-anticorps sont révélés par addition d'un anticorps anti-IgG humaine fluorescent. L'immunofluorescence est lue au microscope, les filaments mycéliens apparaissant vert fluorescent. Les résultats semi-quantitatifs sont rendus en taux de dilution.

L'immunofluorescence présente l'inconvénient d'une lecture subjective, opérateur-dépendant et nécessite un matériel spécifique et coûteux.

5.3.1.5. Immunogold assay

L'immunogold assay (IGA) est une technique similaire à l'immunofluorescence indirecte, mais plus sensible [13]. Des cultures sur lame d'*Aspergillus* sp sont préparées et ensuite fixées au méthanol. Puis, elles sont mises en contact avec différentes dilutions du sérum du patient. Des anticorps IgG (ou IgE) caprins anti-humain sont ajoutés, puis des IgG de lapin anti-chèvre, conjugués avec de l'or colloïdal [97]. Les lames ainsi préparées sont lues sous la lumière et au microscope à contraste de phase. Une coloration marron à la surface des filaments indique une réaction positive, due à la liaison des particules d'or.

Les avantages de l'IGA sont la détection simultanée des IgG et des IgE anti-*Aspergillus*. C'est une technique simple, rapide, semi-quantitative et qui ne nécessite pas d'équipement particulier. La sensibilité de l'IGA est inférieure à celle de BALISA et RIA.

Les particules d'or étant éloignées, dans l'espace, des filaments qu'elles mettent en évidence, cela induit une imprécision lors de la lecture. D'autre part, un autre inconvénient réside dans la préparation des cultures sur lame d'*Aspergillus* sp, délicates à réaliser car elles doivent être très fines, afin de faciliter la lecture.

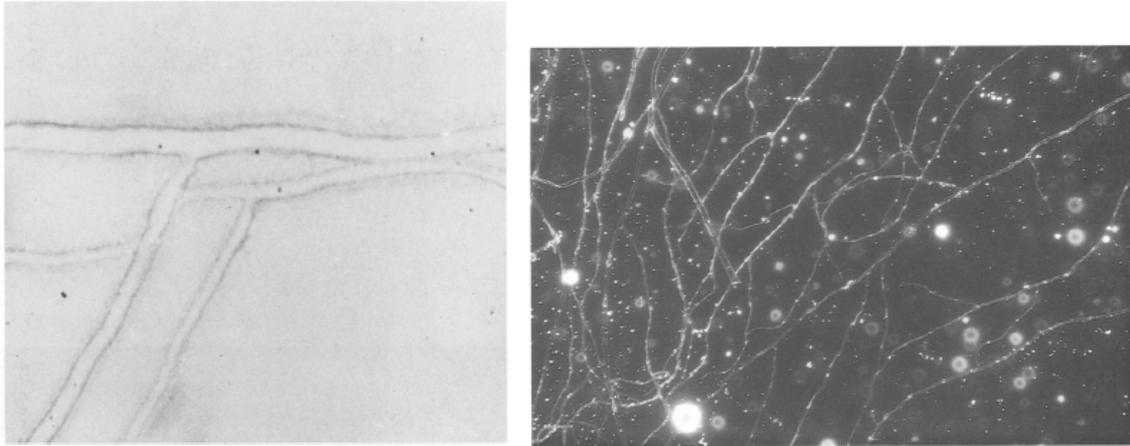


Figure 15 : Résultats positifs en IGA

A gauche : Culture sur lame d'*A. fumigatus* montrant une réaction positive en IGA (x400).

A droite : Culture sur lame d'*A. fumigatus* montrant une réaction positive en IGA sous un microscope à contraste de phase (x125) (d'après[97])

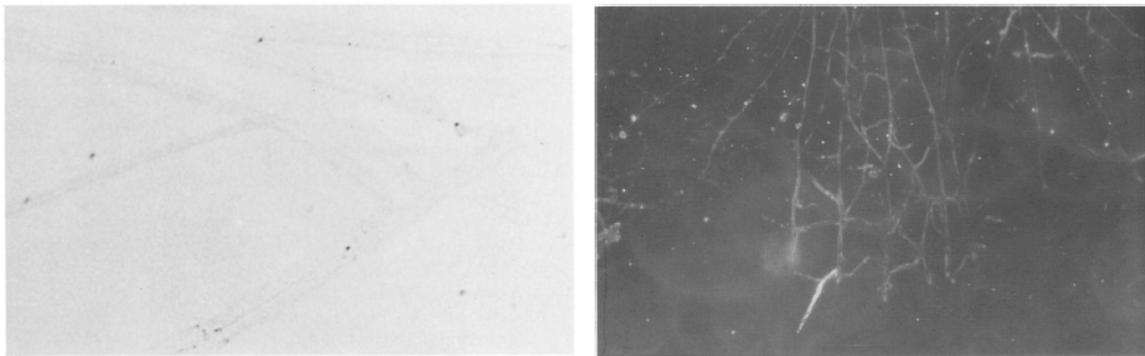


Figure 16 : Résultats négatifs en IGA.

A gauche : Culture sur lame d'*A. fumigatus* montrant une réaction négative en IGA (x125).

A droite : culture sur lame d'*A. fumigatus* montrant une réaction négative en IGA sous un microscope à contraste de phase (x125) (d'après [97])

5.3.1.6. ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay)

L'ELISA est une technique immuno-enzymatique, largement utilisée en immunologie pour la détection d'anticorps ou d'antigènes. Pour la détection des anticorps anti-*Aspergillus*, son principe repose sur celui de l'ELISA indirect, c'est-à-dire que des antigènes d'*Aspergillus* sp sont coatés au fond des puits d'une plaque de microtitration. Les anticorps anti-*Aspergillus* contenus dans le sérum des patients se lient aux antigènes de la plaque. Ces complexes immuns sont révélés par addition d'un anticorps secondaire, une antiglobuline humaine, couplé à un marquage enzymatique. L'addition du substrat de l'enzyme entraîne

l'émission d'un signal chromogénique ou fluorescent (Figure 17). La lecture se fait habituellement par spectrophotométrie.

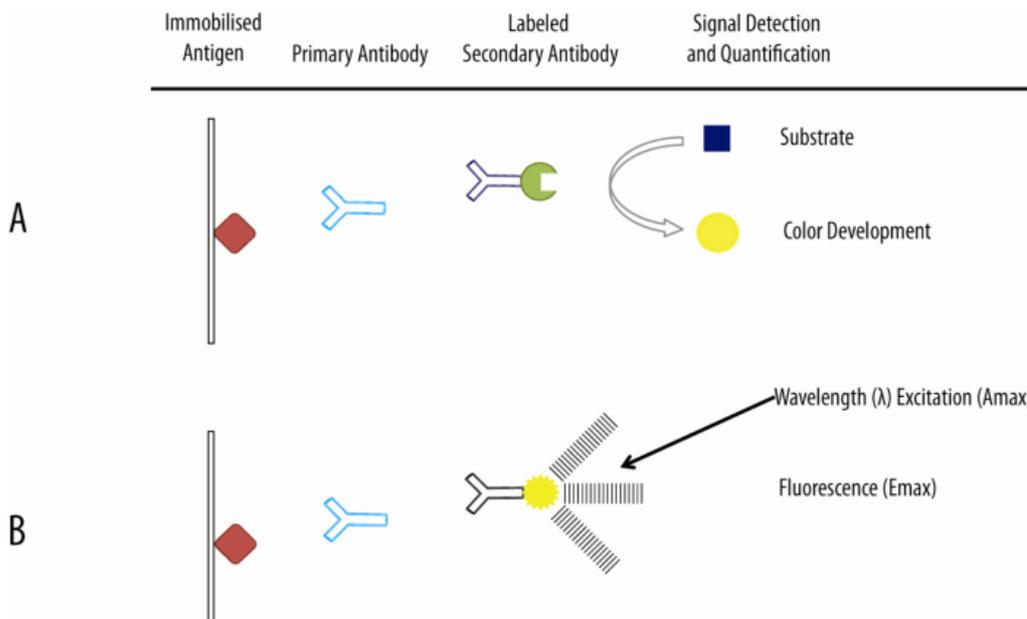


Figure 17 : Principe de l'ELISA indirect.

(d'après [102])

Les résultats rendus sont qualitatifs et/ou quantitatifs, alors exprimés en densité optique (DO) ou unité de fluorescence, selon une valeur seuil ou une courbe d'étalonnage.

Les différentes étapes de la technique peuvent être automatisées, permettant ainsi de calibrer parfaitement les temps d'incubation et de standardiser les étapes de rinçage.

D'autre part, l'étape de lecture peut être automatisée par un spectrophotomètre, permettant de calibrer les densités optiques ou les intensités de fluorescence, et donc de rendre des résultats quantitatifs.

Ce sont des techniques sensibles, mais les performances varient selon les kits et dépendent principalement de la nature des antigènes d'*Aspergillus* spp. utilisés.

Les antigènes initialement utilisés, soit des antigènes dans leur totalité, soit des fractions, étaient issus de filtrat de culture et/ou de mycélium d'*A. fumigatus* [13,96]. Des antigènes d'*A. fumigatus* issus de filtrat de culture et de mycélium partiellement purifiés ont ensuite été utilisés. Des antigènes métaboliques d'*A. fumigatus* ont également été utilisés.

Des antigènes recombinants d'*A. fumigatus*, possédant des activités enzymatiques, ont ensuite été produits pour le sérodiagnostic aspergillaire permettant ainsi d'augmenter les

performances des kits ELISA [16]; les plus importants étant la ribonucléase (mitogilline), la catalase et la dipeptidylpeptidase V (chymotrypsine) [94,95].

Afin d'augmenter la sensibilité des kits ELISA, les études ont montré qu'il est intéressant d'associer plusieurs antigènes différents, car les sérums des patients ne réagissent pas de la même façon vis -à-vis des antigènes d'*A. fumigatus* [94].

Dans la stratégie en deux temps utilisant une technique de dépistage et une de confirmation en cas de dépistage positif, les méthodes ELISA sont les plus fréquemment utilisées pour le dépistage. Elles présentent les avantages d'être faciles et rapides à réaliser, d'avoir une lecture automatisée (évitant la variation inter-opérateur), de pouvoir traiter de grandes séries de prélèvements, de pouvoir déterminer la classe d'immunoglobulines détectées (principalement IgG et IgE) et peuvent être automatisables.

De nombreux laboratoires utilisent une technique "maison", mais parmi les kits ELISA commercialisés, on trouve :

➤ **le kit ELISA ClassicTM *A. fumigatus* IgG (Serion/Virion, Würzburg, Allemagne) [103]**

Les antigènes d'*A. fumigatus* utilisés dans ce kit sont des antigènes somatiques et métaboliques obtenus à partir d'un extrait global et d'un filtrat du champignon.

La sensibilité et la spécificité de ce kit évaluées dans l'étude de Guitard *et al.* varient respectivement entre 90.6-85.9% et 75.7-84.4%, selon que les résultats équivoques sont considérés comme positifs ou négatifs, respectivement [16].

Un des inconvénients majeurs de ce kit est le changement des valeurs de cut-off, négatif et positif, à chaque lot. Cela entraîne donc des manipulations supplémentaires pour les techniciens et surtout un risque d'erreur d'interprétation si les seuils ne sont pas modifiés.

➤ **le kit PlateliaTM *Aspergillus* IgG EIA (Bio-Rad, Marnes-la-Coquette, France)**

Ce kit utilise un antigène recombinant d'*A. fumigatus* (non précisé par le fabricant) [94,104] et présente des performances supérieures au test Virion\Serion dans l'étude précédente les ayant comparé [16]. La sensibilité de ce test est estimée entre 93.8-90.6% et la spécificité entre 87.3-89.6%, selon que les résultats équivoques sont considérés comme positifs ou négatifs, respectivement [16]. Une autre étude a évalué la sensibilité de ce kit à 93% [15].

Un des inconvénients de ce kit est sa faible reproductibilité (coefficient de variation (CV) inter-séries estimé à 33% [15] et un seuil de saturation des DO peu élevé imposant des dilutions fréquentes. En effet, si la concentration en anticorps est supérieure à 80 UA/ml, le

résultat qualitatif est positif, mais pour obtenir un résultat quantitatif précis, le sérum doit être retesté dilué, dilution dépendant de la densité optique obtenue initialement avec l'échantillon pur [104]. Ces 2 limites diminuent la fiabilité de ce test dans le suivi des patients et dans l'interprétation des variations des titres d'anticorps pour le monitoring du patient. Baxter *et al.* a montré que 78% des résultats obtenus avec Bio-Rad sont corrélés avec la CIE (si l'on exclut les résultats > 80 UA/ml) [15]. Cependant, sa faible reproductibilité inter-essai et sa limite de linéarité font que ce kit est difficile à utiliser pour le suivi des patients.

➤ **le kit ELISA *Aspergillus fumigatus* IgG (Bordier Affinity Products, Crissier, Suisse)**

Ce kit, développé récemment, combine des antigènes somatiques et métaboliques avec des antigènes recombinants. Les antigènes somatiques et métaboliques sont des antigènes "maison" produits par le laboratoire de Parasitologie-Mycologie du CHU de Grenoble depuis plus de 20 ans. Ils ont été mis au point par le Dr. Claudine Pinel, qui est l'inventrice de cette méthode. Ces antigènes ont été utilisés jusqu'à janvier 2014 dans une méthode ELISA « maison » qui constituait la méthode de dépistage du CHU de Grenoble. Le partenariat établi entre le laboratoire de Parasitologie-Mycologie du CHU de Grenoble et l'entreprise Bordier affinity products a abouti au développement et à la commercialisation de ce nouveau kit, grâce essentiellement au travail de Claudine Pinel. Les antigènes recombinants associent la dipeptidylpeptidase V (chymotrypsine) et la ribonucléase (mitogilline) [94,95]. Ces antigènes recombinants ont été sélectionnés car ils ont montré les meilleures performances pour la détection des anticorps anti-*Aspergillus* parmi 8 protéines recombinantes et l'antigène galactomannane testés [94]. L'association de ces différents antigènes semble améliorer les performances de ce kit ELISA, comparativement à ceux déjà commercialisés. C'est ce kit qui est évalué dans l'étude présentée dans ce mémoire.

➤ **le kit PhadiaTM ImmunoCap fluorenyoimmunoassay (FEIA) (Uppsala, Suède)**

Ce kit récemment développé utilise des antigènes dérivant d'un extrait total de conidies et de mycélium d'*A. fumigatus* [15]. Les concentrations en anticorps anti-*Aspergillus* IgG sont exprimées en mg/l. Une concentration > 40 mg/l est considérée comme positive. Si le titre d'anticorps est > 200 mg/l, le sérum du patient doit être redilué (1:200) et le test répété.

Baxter *et al.* rapporte une sensibilité équivalente à celle du kit Bio-Rad mais des études complémentaires sont nécessaires pour confirmer cela [15]. Il présente néanmoins l'avantage d'avoir une très bonne reproductibilité (CV= 5%), ce qui est intéressant pour le suivi de l'évolution des patients [15,105]. Dans cette étude, les taux d'anticorps anti-*Aspergillus* obtenus avec ce kit sont corrélés (92%) avec les résultats de CIE [15]. De par sa reproductibilité inter-essai et sa corrélation avec la CIE, le kit Phadia ImmunoCap semble adapté pour le suivi et le monitoring des taux d'anticorps aspergillaires chez les patients atteints d'APC ou d'ABPA.

5.3.1.7. Hémagglutination indirecte

L'hémagglutination indirecte a été l'une des premières techniques commercialisées (FumouzeTM, Serbib, Paris, France) [106].

Les antigènes d'*A. fumigatus* utilisés sont des antigènes solubles obtenus à partir de broyat de champignon et/ou surnageant de culture [14,107]. Les hématies sensibilisées sont des hématies animales recouvertes avec les antigènes d'*A. fumigatus*. Lorsque les anticorps anti-*Aspergillus* sont présents dans le sérum du patient, ils s'agglutinent sur les hématies sensibilisées formant ainsi un voile rouge/marron dans la cupule. Une réaction négative se traduit par la sédimentation des hématies en un point au fond de la cupule (Figure 18). La lecture des agglutinations est visuelle. Les résultats semi-quantitatifs sont rendus en taux de dilution.

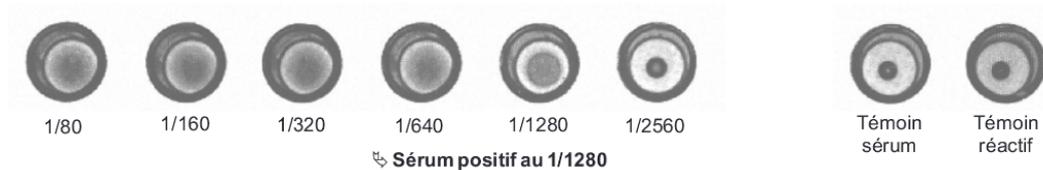


Figure 18 : Résultats de sérologie aspergillaire obtenus en hémagglutination indirecte.

(d'après [106])

La sensibilité de cette technique varie de 32%, si l'on respecte le seuil fournisseur, à 76% si l'on abaisse le seuil de positivité, et la spécificité est estimée à 93 % [108].

5.3.2. Méthodes de confirmation

5.3.2.1. Immunoélectrophorèse

Le principe de l'immunoélectrophorèse (IEP), technique d'immunoprécipitation, repose sur la migration électrophorétique des antigènes d'*Aspergillus* spp. dans un gel d'agarose et sur la double diffusion des antigènes et des anticorps formant ainsi des arcs de précipitation révélés par coloration (Figure 19). Il s'agit d'une technique qualitative.

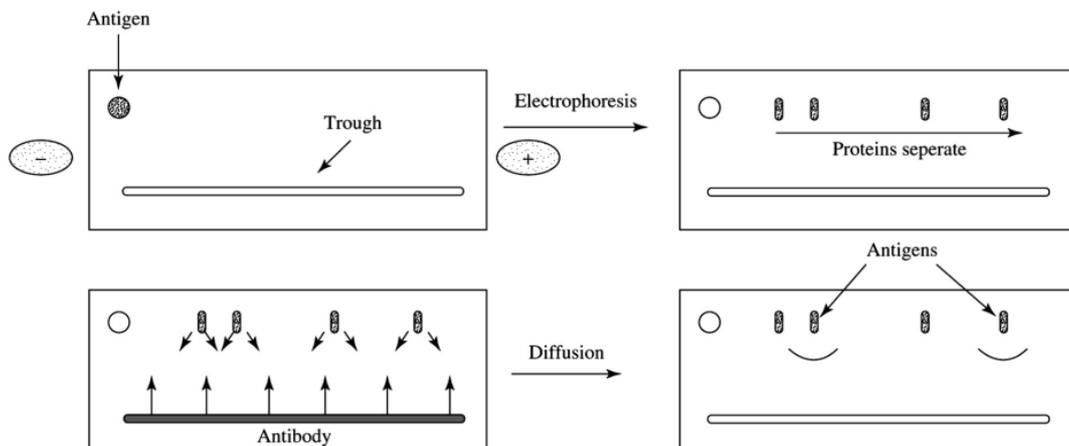


Figure 19 : Principe de l'immunoélectrophorèse.

(d'après [99])

L'immunoélectrophorèse est considérée comme la technique de référence [14,15] bien qu'elle présente des inconvénients. Elle manque de standardisation et varie d'un laboratoire à un autre, selon les antigènes utilisés, le mode opératoire de la technique et les seuils de positivité. C'est une technique longue à réaliser et la lecture des arcs de précipitation est visuelle, nécessitant du personnel expérimenté. Enfin, les seuils de positivité, fonction du nombre d'arcs observés et des activités enzymatiques, ne sont pas clairement établis. Certains considèrent l'IEP positive si ≥ 3 arcs protéiques de précipitation sont observés [14,92], d'autres si ≥ 2 [16].

5.3.2.2. Co-électrosynérèse

La co-électrosynérèse reprend le principe de l'électrosynérèse en intégrant la migration concomitante d'un sérum témoin et permet d'obtenir des arcs en continuité de ceux du sérum témoin.

5.3.3. Méthodes "inclassables"

5.3.3.1. Radioimmunoassay (RIA)

Les antigènes d'*A. fumigatus* utilisés avec les techniques radioimmunologiques (RIA) sont obtenus à partir de filtrat de culture. Les antigènes sont purifiés par précipitation puis radiomarqués [93].

Ces techniques radioimmunologiques ont rapidement été abandonnées car elles présentent de nombreux inconvénients tels que la courte stabilité des radioisotopes, la nécessité d'un équipement spécifique pour la détection de la radioactivité, l'élimination des déchets radioactifs et les potentiels risques d'exposition des techniciens aux radiations [13].

5.3.3.2. BALISA=Biotin-Avidin-Linked-Enzyme ImmunoSorbent Assay

BALISA est une technique reposant sur les principes de l'ELISA et associant les capacités de forte liaison de la biotine et de la streptavidine. Les puits d'une microplaque sont coâtés avec des antigènes d'*A. fumigatus* issus d'un filtrat de culture. Le sérum du patient est ajouté dans les plaques, puis des IgG ou IgE caprin anti-humain, puis des IgG de lapin biotinylés anti-chèvre et de la streptavidine peroxydase. Des lavages sont réalisés entre chaque étape. Enfin, le substrat chromogénique de la peroxydase est ajouté et l'absorbance est lue à 490 nm [97,109].

BALISA a l'avantage de détecter simultanément les IgG et les IgE. Les antigènes d'*A. fumigatus* utilisés sont caractérisés par différentes méthodes immunochimiques comparés à un standard permettant ainsi leur reproductibilité [109]. La sensibilité de BALISA est équivalente à celle de la RIA mais supérieure à celle des techniques conventionnelles ELISA grâce à l'utilisation de la forte capacité et affinité de liaison de la streptavidine à la biotine (une molécule de streptavidine peut se lier à 4 molécules de biotine et cette liaison est stable et non affectée par les variations de température, pH, solvants organiques).

5.3.3.3. Western-Blot

Le Western-BlotTM (WB) *Aspergillus* IgG est un test qualitatif de diagnostic sérologique de l'aspergillose. Même s'il ne détecte pas les précipitines et que sa spécificité n'a pas été suffisamment évaluée, il est utilisé actuellement comme test de confirmation, au même titre que l'IEP, après obtention d'un résultat positif ou douteux avec les techniques de dépiage.

Le principe du Western-Blot est celui d'un immunoblot. Les antigènes d'*A. fumigatus*, après séparation électrophorétique, sont fixés à la surface de bandelettes de nitrocellulose [13,110]. Un kit a été récemment commercialisé et les bandelettes sont prêtes à l'emploi (LDBIO, Lyon, France) [111].

Le sérum du patient est incubé en présence d'une bandelette. Les anticorps anti-*Aspergillus* éventuellement présents se fixent sur les antigènes de la bandelette. Le conjugué, la phosphatase alcaline couplé à des anti-IgG humaines, est ajouté et se lie aux anticorps fixés. Enfin, le substrat de la phosphatase alcaline est ajouté dans le milieu réactionnel et se lie aux complexes immuns formés (antigènes d'*A. fumigatus*-anticorps anti-*Aspergillus*-IgG anti-humaine couplée à la phosphatase alcaline). Des lavages entre chaque étape permettent d'éliminer les éléments non fixés. La présence d'anticorps IgG anti-*Aspergillus* est révélée par la présence de bandes transversales violettes. La réaction de coloration est stoppée par un rinçage à l'eau distillée.

Le Western-Blot est considéré positif si l'on observe simultanément la présence de 2 bandes au minimum parmi P16, P18-20, P22 et P30 (Figure 20)[111].

Le Western-Blot présente une sensibilité qui varie de 92.3 à 96.5% et une spécificité de 94% évaluée sur des donneurs de sang [56,112].

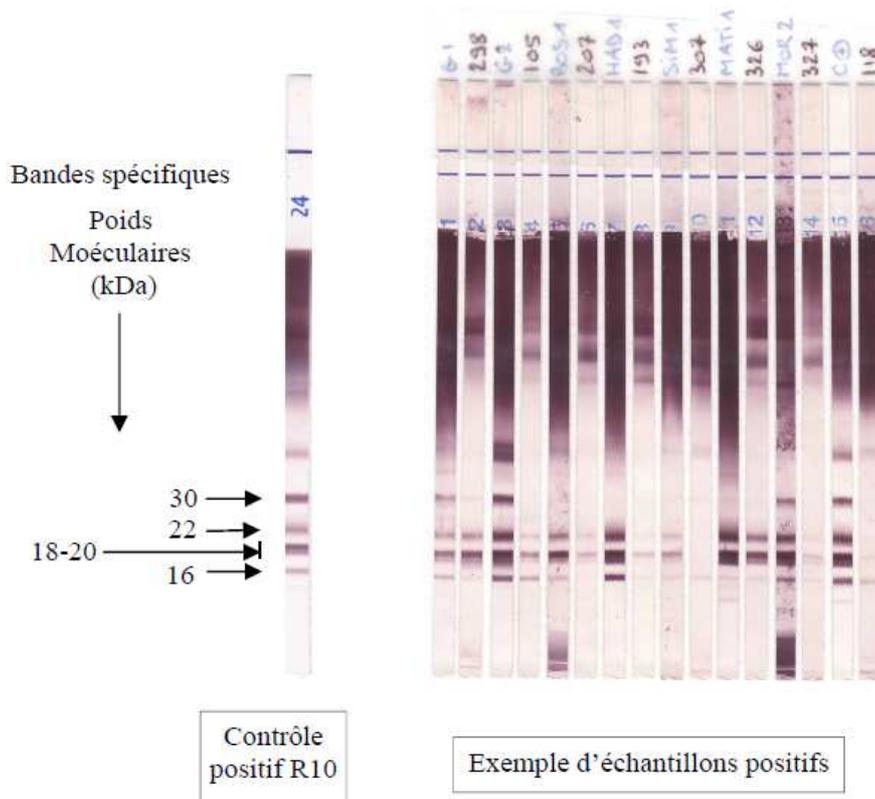


Figure 20 : Exemples de résultats de sérologie aspergillaire en Western-Blot.

(d'après [111])

La technique du Western-Blot nécessite environ 4h de technique, est standardisée, facile à utiliser et interpréter.

Les études de Grenouillet *et al.*, Brun *et al.* et Ranque *et al.* ont comparé les performances du Western-Blot à celles de l'immunoélectrophorèse dans des études rétrospectives [56,112,113]. Dans ces études les méthodes d'IEP sont très variables. Les 3 équipes ont montré que les résultats du Western-Blot sont sensiblement concordants à ceux obtenus avec l'immunoélectrophorèse (respectivement 91.3% de concordance, un coefficient kappa à 0.77, et 76 à 86% de concordance) et que les performances de ces deux tests sont comparables. Ces résultats sont à confirmer dans des études prospectives sur de plus grands échantillons de patients.

5.3.4. Suivi sérologique des patients avec une APC ou une ABPA

Les taux d'anticorps IgG anti-*Aspergillus* chez les patients atteints d'APC ou d'ABPA semblent intéressants à suivre au cours du temps pour monitorer ces patients [15]. Les variations des taux d'anticorps aspergillaires (augmentation, décroissance, stabilité) semblent évoluer parallèlement à la pathologie aspergillaire. Comme évoqué précédemment dans ce mémoire, Baxter *et al.* a étudié les variations de 2 EIAs (ELISA Bio-Rad et Phadia ImmunoCap fluorezymoimmunoassay) en les comparant aux variations de CIE [15]; cependant aucun argument clinique ni thérapeutique n'a été pris en compte.

5.4. Autres marqueurs d'aspergilloses allergiques

Dans le cas des aspergilloses allergiques, il est important de rechercher des marqueurs, bien que non spécifiques, évocateurs d'hypersensibilité, tels qu'une hyperéosinophilie, une élévation du taux des IgE totales ou encore la recherche d'IgE spécifiques anti-*Aspergillus*.

5.4.1. IgE totales

Le taux d'IgE totales dans le sérum est un test très utile pour le diagnostic et le suivi des ABPA; le taux d'IgE totales figurant parmi les critères diagnostiques de l'ABPA [12,47]. Les patients en exacerbation d'ABPA présentent des taux élevés d'IgE totales [114]. Un traitement par corticoïdes peut toutefois normaliser le taux d'IgE totales chez un patient

avec ABPA. Lorsque le taux d'IgE totales double chez un patient, cela marque la rechute de l'ABPA [48].

5.4.2. IgE spécifiques anti-*Aspergillus fumigatus*

Les patients atteints d'ABPA présentent des signes d'hypersensibilité, avec notamment la présence d'IgE spécifiques anti-*A. fumigatus* [114].

Chez les patients atteints de mucoviscidose, le diagnostic d'ABPA reste difficile, compte tenu de la détérioration des fonctions respiratoires. Néanmoins, on observe chez ces patients une élévation des taux d'IgE totales, d'IgE spécifiques anti-*A. fumigatus* et d'IgG anti-*A. fumigatus* [115].

Les IgE spécifiques d'*A. fumigatus* retrouvées chez les patients avec une ABPA sont dirigées contre les protéines Asp f2, Asp f4 et Asp f6 [49,116].

5.4.3. Tests cutanés

Pour détecter la sensibilisation à *Aspergillus* spp., les tests utilisés peuvent être soit un kit commercial ou « maison » utilisant des antigènes d'*Aspergillus fumigatus*, soit un prick-test cutané, soit une injection intradermique.

Le délai des réactions cutanées, 1 à 20 min versus plus de 6 h, permet de classer les réponses respectivement en type I ou type III. La réaction d'hypersensibilité immédiate de type I est caractéristique de l'ABPA et signe la présence d'anticorps IgE anti-*Aspergillus* [48].

5.5. Anatomopathologie

La démonstration histologique de filaments mycéliens septés dans des prélèvements respiratoires ou des prélèvements normalement stériles prouve l'infection par *Aspergillus* spp. D'autre part, la mise en évidence d'*Aspergillus* spp. ou de truffe aspergillaire dans des biopsies pulmonaires est également un argument en faveur d'une APC, bien que rarement réalisées (Figure 21). Les filaments mycéliens, observés après coloration argentique, Giemsa ou PAS, mesurent de 3 à 5 µm de diamètre et se dichotomisent en angles aigus; des têtes aspergillaires peuvent également être observées.



Figure 21 : Image d'aspergillome montrant une balle fongique à l'intérieur d'une cavité.
(d'après [75])

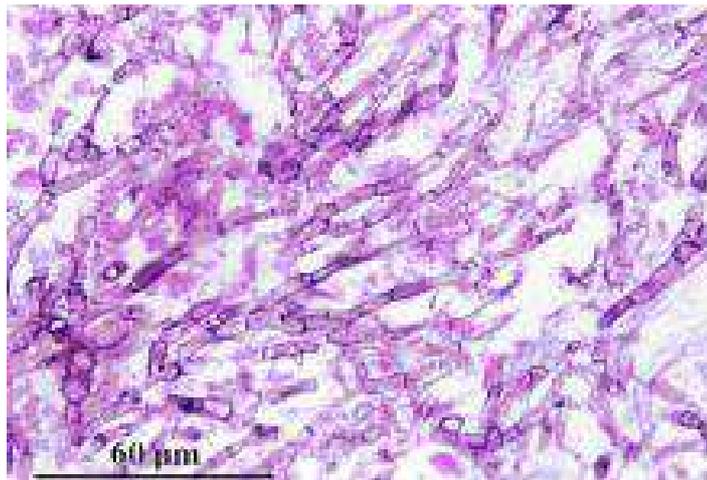


Figure 22 : Coloration de Giemsa mettant en évidence, dans une coupe de tissu pulmonaire, des hyphes septés d'*A. fumigatus* ramifiés de façon dichotomique.
(d'après [86])

6. Traitement des APC et formes d'hypersensibilité des aspergilloses

Les objectifs du traitement curatif des APC sont d'améliorer les symptômes du patient, de prévenir ou limiter les hémoptysies et de prévenir la formation de fibrose pulmonaire.

Plusieurs classes de médicaments antifongiques, ayant des mécanismes d'action différents, existent actuellement sur le marché :

- les antifongiques azolés :
 - Fluconazole (TRIFLUCAN®)
 - Itraconazole (SPORANOX®)
 - Posaconazole (NOXAFIL®)
 - Voriconazole (VFEND®)
 - Isavuconazole (CRESEMBA®)
- les polyènes :
 - Amphotéricine B (FUNGIZONE®)
 - Amphotéricine B complexe lipidique (ABELCET®)
 - Amphotéricine B liposomale (AMBISOME®)
- les échinocandines :
 - Caspofungine (CANCIDAS®)
 - Anidulafungine (ECALTA®)
 - Micafungine (MYCAMINE®)

6.1. Aspergillome

L'exérèse chirurgicale reste le traitement de référence de l'aspergillome [72,117].

Dans la plupart des cas d'aspergillome unique, la chirurgie est indiquée avec possibilité d'un traitement antifongique préopératoire et postopératoire par itraconazole ou voriconazole. L'objectif de cette thérapeutique antifongique est de limiter la charge fongique et de prévenir la diffusion du champignon dans la cavité pleurale lors du geste, qui pourrait aboutir à un empyème aspergillaire. Pour les cas complexes ou chroniques, un traitement antifongique est souvent nécessaire.

En cas de contre-indication à la chirurgie, si le patient est asymptomatique, on proposera une abstention thérapeutique et une surveillance. Si le patient est symptomatique, un

traitement antifongique peut être proposé : soit des injections intra-cavitaires d'amphotéricine B soit un traitement systémique par itraconazole ou voriconazole [117].

6.2. APCC

Les essais de résection d'APCC ont conduit à une forte morbidité et mortalité, avec d'importantes complications post-opératoires telles que des hémorragies, des fistules broncho-pleurales, des pleurésies aspergillaires; ne recommandant ainsi pas la chirurgie dans la prise en charge de l'APCC.

Les recommandations IDSA (Société Américaine des Maladies Infectieuses) pour la prise en charge de l'APCC proposent un traitement antifongique oral systémique par azolés (itraconazole ou voriconazole) sur une période prolongée [117].

6.3. APCF

L'APCF est un stade avancé des APC. Des traitements antifongiques systémiques sont recommandés (amphotéricine B ou azolés) selon l'état du patient ; cependant il est parfois difficile d'apprécier une amélioration de l'imagerie après traitement [10].

6.4. APCN

Un traitement antifongique (amphotéricine B ou voriconazole ou itraconazole) est nécessaire dans l'APCN afin d'obtenir une éradication fongique et de prévenir la destruction progressive du tissu pulmonaire [58,78,117]. L'amphotéricine B peut être administrée en intraveineuse ou en intracavitaire ; cependant l'itraconazole est préféré à l'amphotéricine B pour son efficacité, sa forme orale et sa toxicité moindre [78,117]. La durée et les doses du traitement antifongique sont à adapter en fonction de l'évolution clinique. Une surveillance radiologique et mycologique est nécessaire.

En cas d'échec thérapeutique, une exérèse chirurgicale peut être envisagée, mais est à discuter selon la fonction pulmonaire du patient et en prenant en compte les possibles complications post-opératives.

En ce qui concerne les nouveaux antifongiques azolés, l'étude de Felton *et al.* [118] a montré que le posaconazole semble être aussi efficace que les autres azolés dans le traitement des APC et avoir une bonne tolérance.

6.5. ABPA

Les patients atteints d'ABPA sont souvent colonisés par *Aspergillus* spp.

Le traitement de l'ABPA dépend du stade : les phases de rémission ne nécessitent pas de traitement alors que les phases aiguës d'exacerbation sont traitées par corticoïdes systémiques. L'objectif du traitement est de retarder l'apparition d'une bronchectasie et l'évolution vers la fibrose.

Le traitement repose donc sur l'utilisation de corticoïdes systémiques associés ou non à un antifongique [117].

Les corticoïdes sont utilisés au long cours par voie orale afin de contrôler la réponse immunitaire et d'avoir une action anti-inflammatoire [74], ce qui aboutit à une diminution du taux sérique des IgE totales et de l'éosinophilie [119]. L'utilisation de corticoïdes systémiques permet également de diminuer la production d'expectorations.

Les corticoïdes inhalés n'ont pas montré de bénéfices dans le traitement de l'ABPA et ne sont donc pas recommandés [49,120]. Ils peuvent être éventuellement utilisés pour contrôler un asthme lorsque les doses de corticoïdes oraux ont été diminuées mais ne préviennent pas des exacerbations.

Un antifongique par voie orale (itraconazole) peut être associé permettant ainsi une action synergique avec les corticoïdes [121] et une atténuation de la colonisation fongique des voies respiratoires, sans augmenter la toxicité. L'itraconazole permettrait de diminuer les doses de corticoïdes administrés, d'atténuer les symptômes, d'améliorer la fonction pulmonaire et de diminuer les concentrations d'IgE totales [121].

La conférence de Consensus de 2003 [49] a émis des recommandations concernant le traitement de l'ABPA chez les patients atteints de mucoviscidose, selon le stade d'ABPA, les symptômes cliniques et les concentrations sériques d'IgE totales.

Enfin l'omalizumab, anticorps monoclonal anti-IgE, a été utilisé chez les patients atteints de mucoviscidose et d'ABPA [122,123]. Il permettrait de diminuer les doses de corticoïdes

systémiques mais également de réduire le nombre d'exacerbations et d'améliorer la fonction pulmonaire [122,123].

L'éviction de l'allergène est également une forte recommandation pour ces patients, avec notamment une faible contamination fongique de l'habitat et de l'environnement intérieur [53].

Enfin, afin de détecter d'éventuelles rechutes ou phases d'exacerbation d'ABPA, ces patients doivent être suivis régulièrement [49].

INTRODUCTION DE LA PUBLICATION ISSUE DU TRAVAIL DE THESE :

EVALUATION PROSPECTIVE D'UN NOUVEAU KIT ELISA POUR LA DETECTION DES IgG ANTI-*ASPERGILLUS* DANS LE DIAGNOSTIC DES ASPERGILLOSES PULMONAIRES CHRONIQUES ET ALLERGIQUES

Le diagnostic des aspergilloses non invasives telles que les aspergilloses pulmonaires chroniques (APC) et les aspergilloses broncho-pulmonaires allergiques chez les patients immunocompétents pose toujours des problèmes. Il repose essentiellement sur une combinaison d'arguments cliniques, radiologiques, biologiques et mycologiques. Les anticorps IgG anti-*Aspergillus* sont d'importants biomarqueurs [1,2,4,9,12–16] et la détection des immunoprécipitines est considérée comme la méthode de référence. Cependant, à cause de son manque de praticité et de standardisation et de sa faible sensibilité, la détection des immunoprécipitines est actuellement réalisée comme test de confirmation [14,16]. Les méthodes immunoenzymatiques sont plus adaptées au dépistage. Cette étude a évalué les performances d'un nouveau kit commercial ELISA pour la détection des IgG anti-*Aspergillus* (*Aspergillus fumigatus* IgG ELISA, Bordier affinity products). Ce test associe 2 antigènes recombinants avec des antigènes somatiques et métaboliques d'*Aspergillus fumigatus*.

Une étude prospective multicentrique a été conduite dans 5 hôpitaux français universitaires (Grenoble, Rennes, Dijon, Lyon, Besançon) entre janvier 2013 et avril 2015. Un total de 436 sérums provenant de 352 patients, incluant 136 APC, 94 ABPA et 206 contrôles ont été testés. Les contrôles ont été sélectionnés parmi des patients suspects d'aspergillose non invasive, ayant eu une prescription de sérologie aspergillaire, mais ne présentant finalement aucun critère d'APC ni d'aspergillose allergique. Le kit ELISA Bordier a été comparé avec deux autres kits ELISA (Bio-Rad Platelia *Aspergillus* IgG et Virion\Serion ELISA Classic *Aspergillus fumigatus* IgG) et avec une technique "maison" d'immunoélectrophorèse (IEP) pour la détection des immunoprécipitines [17].

Les sensibilités et spécificités des kits sont de 97%, 90.3%; 91.7%, 91.3% et 86.1%, 81.5% pour Bordier, Bio-Rad et Virion\Serion respectivement. Une analyse McNemar a confirmé que la sensibilité du kit Bordier est significativement supérieure à celle du kit Bio-Rad ($p < 0.01$) qui est également significativement supérieure à celle du kit Virion\Serion ($p = 0.04$). Les kits Bordier et Bio-Rad montrent des spécificités comparables ($p = 0.8$), qui sont supérieures à la spécificité du kit Virion\Serion ($p = 0.02$ pour les 2 tests). L'analyse des aires sous la courbe ROC a confirmé la supériorité du kit Bordier comparativement au kit Bio-Rad (AUC = 0.979; 95% CI: [0.967-0.991]) et 0.945 [0.922-0.968]) respectivement, $p < 0.01$). Une analyse secondaire comprenant un sous-échantillon de 279 sérums comparant les kits Bordier et Bio-Rad avec la technique d'immunoélectrophorèse a montré que la sensibilité du test Bordier reste supérieure à celle du kit Bio-Rad et celle de l'IEP (97.7% [95.8-99.7], 93.2% [89.8-96.5] et 89.1% [85.0-93.2], respectivement, $p = 0.03$ and $p < 0.01$). La technique d'immunoélectrophorèse a montré une excellente spécificité (96.6% [92.0-100]) qui n'est pas significativement supérieure à celle du test Bio-Rad (86.4% [77.7-95.2]; $p = 0.07$) mais supérieure à celle du kit Bordier (81.4% [71.4-91.3]; $p = 0.03$). L'Index de Youden, qui analyse la combinaison sensibilité spécificité, est de 0.768, 0.705, et 0.739 pour Bordier, Bio-Rad et l'IEP, respectivement.

L'association d'antigènes recombinants avec des antigènes somatiques et métaboliques dans un même test ELISA (Bordier) permet d'améliorer les performances de cette technique de dépistage des IgG anti-*Aspergillus fumigatus*, aboutissant à un excellent test pouvant être utilisé dans le diagnostic des aspergilloses pulmonaires chroniques et allergiques.

PUBLICATION ISSUE DU TRAVAIL DE THESE :

PROSPECTIVE EVALUATION OF A NEW *ASPERGILLUS* IgG EIA FOR THE DIAGNOSIS OF CHRONIC AND ALLERGIC PULMONARY ASPERGILLOSIS

Dumollard C.^a, Bailly S.^{a,b,c}, Perriot S.^a, Brenier-Pinchart M.P.^{a,d}, Saint-Raymond C.^e, Camara B.^e, Gangneux J.P.^f, Persat F.^g, Valot S.^h, Grenouillet F.ⁱ, Pelloux H.^{a,j}, Pinel C.^a, Cornet M.^{a,k}, Grenoble *Aspergillus* Committee.

^aLaboratoire de Parasitologie-Mycologie, Institut de Biologie et Pathologie, CHU de Grenoble, Grenoble, France.

^bU823, Université Grenoble Alpes, Grenoble, France

^cUMR 1137-IAME Team 5-DeSCID, Inserm/Paris Diderot, Sorbonne Paris Cité University, Paris, France.

^dUMR 5163 CNRS, Université Grenoble Alpes, Saint Martin d'Hères, France.

^eClinique Universitaire de Pneumologie, CHU Grenoble, Grenoble, France; Université Joseph Fourier, Grenoble, France.

^fMycologie, Hôpital Universitaire de Rennes, Rennes, France.

^gLaboratoire de Parasitologie-Mycologie, Hôpital de la Croix-Rousse, Hospices Civils de Lyon, Lyon, France.

^hLaboratoire de Parasitologie-Mycologie, Hôpital du Bocage, Dijon, France

ⁱLaboratoire de Parasitologie-Mycologie, CHU de Besançon, Besançon, France.

^jLAPM

^kLaboratoire TIMC-IMAG-TheREx, UMR 5525 CNRS-UJF, Université Grenoble Alpes, Grenoble, France.

Collaborators of the Grenoble *Aspergillus* Committee

Thiebaut-Bertrand A., Maubon D., Bosseray A., Hamidfar R., Mallaret M.R., Epaulard O., Cognet O., Dard C., Garnaud C., El-Zeenni N., Murat J.B., Bartoli M., Saviuc P., Wintenberger C., Tonini J.

ABSTRACT

Anti-*Aspergillus* IgG are important biomarkers for the diagnosis of chronic pulmonary aspergillosis (CPA) and allergic broncho-pulmonary aspergillosis (ABPA). This study aimed to compare a new commercial EIA kit, which combines recombinant, somatic and metabolic antigens (Bordier affinity products), to the Bio-Rad and the Virion\Serion EIAs. Through a multicentric prospective study, 436 sera from 352 patients including 136 CPA, 94 ABPA and 206 controls, were tested. The sensitivities and specificities were 97%, 90.3%; 91.7%, 91.3%; and 86.1%, 81.5% for Bordier, Bio-Rad and Virion\Serion, respectively. The sensitivity of Bordier was higher than the one of Bio-Rad ($p < 0.01$) which was higher than the one of Virion\Serion ($p = 0.04$). The specificities of Bordier and Bio-Rad were comparable ($p = 0.8$) but higher than the one of Virion\Serion ($p = 0.02$ for both assay). The areas under the ROC curve analysis confirmed the superiority of Bordier over Bio-Rad (0.979 and 0.945, respectively; $p < 0.01$). In a subset analysis of 279 sera comparing the Bordier and Bio-Rad EIAs to an home-made immunoprecipitin (IPD) assay, Bordier preserved the highest sensitivity (97.7%, 93.2% and 89.1%, respectively; $p = 0.03$ and $p < 0.01$) but the IPD presented the highest specificity (81.4%, 86.4% and 96.6%, respectively; $p = 0.03$ and $p = 0.07$). The Youden indexes balancing sensitivity and specificity were 0.768, 0.705, and 0.739 for Bordier, Bio-Rad and IPD, respectively. The association of recombinant with somatic and metabolic antigens in a same EIA resulted in an improved compromise between sensitivity and specificity, leading to a highly suitable assay for the diagnosis of chronic and allergic aspergillosis.

INTRODUCTION

A. fumigatus is the commonest species implicated in pulmonary aspergillosis [1,2]. Aspergillosis clinical forms vary according to the patients' immune status and their underlying conditions [3,4]. Chronic pulmonary (CPA) and allergic aspergillosis occur in the immunocompetent host [4–9]. CPA usually affects patients with underlying lung disease such as mycobacterial infections, chronic obstructive pulmonary disease (COPD), allergic broncho-pulmonary aspergillosis (ABPA) and emphysema [4,10]. Patients suffering from asthma or cystic fibrosis (CF) develop sensitization to *Aspergillus* antigens resulting in ABPA, *Aspergillus*-related bronchitis or severe asthma [1,11].

The diagnosis of CPA and ABPA is still challenging and relies on a combination of clinical, radiological, biological and mycological criteria. Anti-*Aspergillus* IgG antibody detection is considered as an important criterion [1,2,4,8,11–15]. Several serological methods are available [13] and those allowing immunoprecipitin detection (IPD) are considered as the gold-standard because of their specificity. However, they are mostly performed as a confirmatory test because of their lack of standardization and of practicability [13–15]. A screening test using indirect hemagglutination, indirect immunofluorescence, immunodiffusion or ELISA (also named Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay) is often preferred. In addition, EIAs facilitate quantitative evaluation of the antibody response and automation leading to a rapid and easy routine screening [13–15].

We conducted a prospective multicenter study to evaluate the performances of a new commercial anti-*Aspergillus* IgG kit, named *Aspergillus fumigatus* IgG ELISA kit (Bordier affinity products). The novelty of this assay is based on its antigen composition. It associates two recombinant and some somatic and metabolic antigens of *A. fumigatus*. We compared it to two other commercial EIAs: the Platelia™ *Aspergillus* IgG (Bio-Rad), and the ELISA Classic™ *Aspergillus* IgG (Virion\Serion) and to an home-made IPD method [16]. The new Bordier EIA showed excellent performances in this cohort and it may be reliably used as screening test in the diagnosis of chronic or allergic aspergillosis.

MATERIALS AND METHODS

Study design, patients and sera

This prospective study was conducted in the five tertiary French University hospitals of Grenoble, Rennes, Lyon, Dijon, and Besançon. Immunocompetent patients were included between January 2013 and April 2015 on the basis of a suspicion of a noninvasive

aspergillosis and a request for anti-*Aspergillus* antibody detection. Patients were classified into six groups according to clinical, radiological and biological data (Table 1). CF patients were excluded from the group of colonized patients (group 2) because the definition of *Aspergillus* colonization remains uncertain. Additionally, it has been suggested that persistent colonization may induce IgG response in CF patients [3,11,17]. Patients with CPA were classified into groups 3, 4 or 5 as previously defined [4,9]. Finally, group 6 gathered patients with ABPA defined as previously [18,19].

Immunocompromised patients at risk of invasive aspergillosis were excluded.

Some patients (groups 3 to 6) were monitored with the Bordier EIA within the study period. The clinical features and pulmonary function assessments were analysed to categorize the patient's condition as worsened, stabilized or improved.

Laboratory methods

All sera were stored at -20°C until process. Each serum was tested with the three EIA tests: Platelia™ *Aspergillus* IgG (Bio-Rad, Marnes-la-Coquette, France), ELISA Classic™ *Aspergillus* IgG (Virion\Serion, Würzburg, Germany) and ELISA *Aspergillus fumigatus* IgG (Bordier affinity products, Crissier, Switzerland), according to the manufacturers' recommendations. If the result of at least one test was positive or equivocal, the serum was subjected to an home-made IPD confirmatory method which was centralized in the Grenoble hospital to ensure more standardization using an assay previously described [16].

ELISA *Aspergillus fumigatus* IgG. The two recombinant antigens dipeptidylpeptidase type V (chymotrypsine) and ribonuclease (mitogillin) and some home-made somatic and metabolic antigens are coated in the wells. Briefly, TBS-Tween was incubated in the wells, and then 100µl of the serum (diluted 1:200) was added and incubated. After a washing step, the conjugate was added and incubated. After another washing step, the substrate was added and 30 min later the reaction was stopped. The absorbance (OD) was measured at 405 nm using an EL808 (BioTek, USA). An index calculated as the OD of the sample/ OD of the cut-off. The cut-off corresponded to a weak positive that discriminated CPA patients from controls. The result was positive, equivocal and negative if the index was ≥ 1 , 0.8-1, and < 0.8 , respectively.

Platelia *Aspergillus* IgG. An UA titer < 5 UA/ml was considered as negative, 5-10 UA/ml as equivocal and ≥ 10 UA/ml as positive. As recommended by the manufacturer, samples > 80 UA/ml had been diluted.

ELISA Classic *A. fumigatus* IgG. The OD measured was interpreted as negative, equivocal and positive according to the OD cut-off ranges defined for each lot provided in the quality control certificate.

Immunoprecipitin detection. A double-diffusion gel-electrophoretic technique using some home-made metabolic and somatic antigens was performed [16]. Briefly, 10 μ l of antigens were distributed into the agarose wells (1%) (Agarose NA, Amersham Biosciences). After a 90 min migration, the troughs were filled with 200 μ l of serum and incubated for 24h, and then each slide was incubated in citrate 5%. After 4 washing steps, slides were wrapped into Whatman paper (GE Healthcare Life Sciences, USA). Catalase activity was detected after addition of hydrogen peroxide 20%. The precipitin lines were stained with Amidoschwarz (Merck, USA). Sera were considered positive and equivocal when ≥ 2 and 1 precipitin lines were detected respectively [16]. If the catalase activity was detected, the result was considered positive whatever the number of precipitin lines.

Statistical analysis

The baseline characteristics of patient groups were compared using the Fisher exact and Wilcoxon tests for qualitative and quantitative data, respectively.

We used the Cochran Q test followed by the McNemar post-hoc tests using a Holm correction for multiple comparisons to compare the sensitivities and the specificities of the assays. A sample size of 223 diseased and 192 controls was computed to be sufficient to show a significant difference with a power of 0.9. The Youden index (Sensitivity+Specificity -1) was computed. To avoid over estimation, a sensitivity analysis was performed after exclusion of the patients which were diagnosed on the sole criterion of the presence of anti-*Aspergillus*-specific IgG. The two best EIAs were compared by using area under ROC curve (ROC AUC). The inter-assay reproducibility (coefficient of variation (CV) and standard deviation (SD)) of the Bordier test was evaluated using 39 measures of the same sample used as internal quality control. A variation of ± 2 SD of the Bordier index was considered as significant and converted into categorical values (decrease, increase or stabilization). The Cohen's kappa coefficient and an ordinal

univariate logistic regression were calculated to assess the correlation between clinical evolution (improvement, stabilization or worsening) and Bordier EIA variations.

A p value<0.05 was considered as significant. We used SAS 9.3 (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA) to compute the statistical analysis.

RESULTS

Patients and sera

The repartition of the 436 sera is detailed in Figure 1. They were collected in the five hospitals of Grenoble, Rennes, Lyon, Dijon, and Besançon (N= 239, 74, 70, 31 and 22, respectively). The patients' median age was 58.9 years [47.0-71.5], 5% were children (age<18), and 55% were male. Among diseased patients, the commonest underlying lung conditions were cystic fibrosis (CF) (35.3%), previous *Aspergillus*-related disease (34.1%), ABPA (29.4%), COPD (22.4%), asthma (10.6%) and mycobacterial infection (10.6%). The control patients presented COPD (26.9%), asthma (21.6%), bacterial pulmonary infections (15.6%), emphysema (13.8%) and respiratory deficiency (10.8%), assessment of respiratory symptoms (12%), 18% had no underlying lung disease and 10% were subjected to a pre-transplant examination.

Test performances

The performances of the three EIAs are shown in Table 2A. Regardless equivocal results were considered positive or negative, the sensitivity of the Bordier assay (97% or 94.8%) was significantly higher than the one of Bio-Rad (91.7% or 83%) which in turn was higher than the one of Virion\Serion (86.1% or 74.3%) (McNemar p<0.05).

When equivocal results were considered positive, the specificities of the Bordier and Bio-Rad tests were comparable (90.3% and 91.3%, respectively; McNemar p=0.8) and were significantly higher than the one of the Virion\Serion assay (81.5%; McNemar p=0.02 for both assay). When equivocal results were considered negative and after correction for multiple tests, the specificity of the three EIAs was similar.

The Youden Indexes (Table 2A) showed that Bordier presented the best balance between sensitivity and specificity irrespectively of the interpretation of the equivocal results. This result was confirmed by the area under the ROC curve analysis which showed excellent performances for both Bordier and Bio-Rad assays with AUCs higher than 0.9. The AUC of Bordier assay (0.979) was even higher than the one of Bio-Rad (0.945) (p<0.01) (Figure 2).

Owing to the above results, we decided to compare only the top two EIAs (Bordier and Bio-Rad) to the IPD assay (Table 2B). Again, the best sensitivity was obtained with Bordier, whatever the classification of equivocal results (McNemar $p < 0.05$). The sensitivity of the Bio-Rad assay was higher than the one of the IPD only when equivocal results were considered as negative (McNemar $p = 0.049$). The specificity of the IPD was excellent (96.6%) when equivocal results were considered negative, and comparable to the one of Bio-Rad (86.4%) (McNemar $p = 0.07$) but higher than the one of Bordier (81.4%) (McNemar $p = 0.03$). Overall, the Youden Index was in favor of the IPD or the Bordier assay when equivocal results are considered as positive and negative, respectively.

In the confirmatory analysis performed after the exclusion of the 20 patients which were diagnosed on the sole criterion of the presence of anti-*Aspergillus*-specific IgG, the results of the comparison of the three EIAs and the AUC were unchanged and showed the same differences (data not shown). For the comparison of the IPD with the top two EIAs, we noticed a change only when the equivocal results were considered as positive. In this case, the Bordier and the Bio-Rad assays showed similar sensitivities (McNemar $p = 0.06$) and both were more sensitive than the IPD (McNemar $p < 0.01$ and $p = 0.01$, respectively).

The results of the assays are detailed in Table 3. Bordier provided significantly less equivocal results (2.8%) than Bio-Rad (6.7%), Virion\Serion (10.1%) and the IPD (11.8%) ($p < 0.01$ for each comparison with Bordier). The 7 false negative Bordier results were from patients with ABPA (4), CCPA (2) and 1 aspergilloma and two of them received antifungal drugs. Among the 13 patients with false positive Bordier results, 3 were colonized and an *Aspergillus*-related disease was ruled out, 6 presented pulmonary infections not related to *Aspergillus* spp. and 2 were subjected to a pre-transplant examination. No information was available for the two remaining patients.

Clinical correlation

The inter-assay CV of the Bordier EIA was 20% (SD 0.366). Seventy-five sera from 29 patients who were sequentially sampled during the study were tested with Bordier. Cohen's kappa coefficient equalled to 0.29 [0.12-0.46] meaning a weak agreement between clinical and Bordier EIA evolutions. However, using an ordinal logistic regression, we noticed a significant association between both evolutions ($p < 0.01$). An increase in the Bordier index was significantly associated to the worsening of the patient's clinical status (OR: 4.88 [1.45; 16.43]).

DISCUSSION

In the present study we showed that the new commercial EIA Bordier developed to detect *Aspergillus* IgG antibodies, is suitable for the diagnosis of CPA and ABPA in immunocompetent patients. In this large prospective multicentric cohort of 352 patients, it showed high sensitivity (97%) and specificity (90%) and the AUC value of 0.979 was excellent. As compared to two other EIAs used in routine clinical practice and to the IPD, considered as the reference method, this new assay showed higher sensitivity than all the Bio-Rad, the Virion\Serion and the home-made IPD assays. Its specificity was comparable and higher than the one of the Bio-Rad and the Virion\Serion assays, respectively, but lower than the one of the IPD. Overall, the best Youden Index that balances the contrary effects of sensitivity and specificity was obtained with the Bordier assay. The Virion\Serion was clearly less reliable than the two others EIAs.

Bio-Rad and Virion\Serion EIAs have been previously compared in a large retrospective study [15]. The sensitivities and specificities were 90.6%-93.8% and 87.3%-89.6% for Bio-Rad and 85.9%-90.6% and 75.7%-84.4% for Virion\Serion, respectively. We confirmed the superiority of the Bio-Rad assay as compared to the Virion\Serion. Another recent study compared two EIAs, including the Bio-Rad one, and an IPD method using commercial antigens in a prospective cohort [14]. Again, the Bio-Rad assay showed a good sensitivity (93%), but a weak reproducibility with an inter-assay CV of 33% which, according to the authors, precluded its use for the patient's monitoring. Another drawback of this test is the necessity to dilute and retest all the samples with a titer higher than 80 UA/ml.

In our study, we showed that the performances of the new Bordier EIA were higher than the ones of the Bio-Rad EIA. This may be explained by the association of two selected recombinant proteins and metabolic and somatic home-made antigens. The chosen recombinants showed the best performances among 8 proteins, and the purified galactomannan antigen [20]. Preliminary results obtained during the development of the assay through the distinct analysis of the two set of antigens, recombinant versus the metabolic and somatic home-made antigens, suggested that the association was beneficial in terms of both sensitivity and specificity (data not shown). Indeed, the recombinant antigens seem to detect *Aspergillus* spp. and not only *A. fumigatus* [20]. This gain in sensitivity and the parallel lost in specificity is counterbalanced by the metabolic and somatic antigens of *A. fumigatus* used in this kit. This could also explain the higher

discriminant property of the Bordier test which provided less equivocal results than the others (Table 3).

Our study confirms the high specificity (96.6%) of the IPD using some home-made antigens that we have been using for more than 20 years [16]. The specificity of the IPD was significantly higher than the one of Bordier but did not reach significance towards Bio-Rad. This is probably due to a loss of statistical power in a smaller sample. A recent study evaluated a commercial Western-Blot for the detection of anti-*Aspergillus* IgG that may be also used as a confirmatory method [21]. The authors reported sensitivity between 90.0%-93.8% in CPA or ABPA patients. The specificity was estimated at 94% using healthy blood donors as controls. We describe an even higher specificity of the IPD using the targeted population as controls.

Our results suggest that, in the situation of a two-step strategy for the detection of the anti-*Aspergillus* IgG, the EIA Bordier is suitable for the screening and to enhance sensitivity, equivocal results would preferably be considered as positive. Our study showed that the IPD is an appropriate confirmatory method and may be used to elude Bordier false positive results. In this case, equivocal results of the IPD should be considered as negative to enhance specificity. In another context where only a one-step strategy could be used, the best choice we could propose is the Bordier EIA which showed in our cohort the best balance between sensitivity and specificity when equivocal results are considered as negative (Youden Index = 0.885, Table 2A).

When we matched the evolutions of the indexes obtained with the Bordier EIA with the patients' clinical outcome, an increase in the Bordier EIA index appeared to be correlated to the clinical worsening. We could not firmly confirm such correlations because the data were not formatted for longitudinal analysis. The trends described here should be confirmed in another larger study taking into account repeated data for a same patient.

The classification of the colonized patients remains challenging. We decided to consider them as controls as in our patients the diagnosis of infection had been ruled out by the clinicians. This led to false positive EIA Bordier results in 3 patients. Conversely, *Aspergillus* spp. colonization may be considered as a prerequisite of an infection and may explain why others associated them to the diseased patients [21]. Our concern in this situation is that a positive detection of the anti-*Aspergillus* IgG may lead to over treatment in these colonized patients.

In conclusion, owing to its high balance between sensitivity and specificity, this new Bordier EIA is suitable for the detection of anti-*Aspergillus* IgG for the diagnosis of chronic and allergic pulmonary aspergillosis. Further studies are required to confirm its use for monitoring patients' clinical status. Finally, we confirmed that the detection of immunoprecipitin is appropriate as a confirmatory method to support the results of the EIA.

Acknowledgments

We thank the Pr. Renée Grillot for her support and advice which were very helpful in the development of the home-made antigens and ELISA assay that led to the design of the Bordier EIA. We thank M. Monod for the production of the recombinant antigens of *A. fumigatus*. We thank all the technicians of the laboratory of Parasitology-Mycology of the Grenoble Hospital for their technical assistance.

Transparency Declaration

Muriel Cornet has received travel grants from Gilead, Pfizer and Merck and has been paid for talks on behalf of Pfizer.

The laboratory of the CHU of Grenoble, where M. Cornet, M.P. Brenier-Pinchart, and H. Pelloux are currently working produces and sells the *A. fumigatus* somatic and metabolic antigens to Bordier Affinity Products.

Bordier Affinity Products provided the kits of the three EIAs to perform the analysis but did not participate to any phase of the study; from design to analysis of the results and conclusions herein reported and manuscript writing.

Hervé Pelloux and Muriel Cornet report having received research grants from Virion\Serion Immundiagnostica GmbH and from Bordier Affinity Products.

References

- [1] Armstead J, Morris J, Denning DW. Multi-country estimate of different manifestations of aspergillosis in cystic fibrosis. PLoS ONE 2014;9:e98502. doi:10.1371/journal.pone.0098502.
- [2] Warris A. The biology of pulmonary *Aspergillus* infections. J Infect 2014;69 Suppl 1:S36–41. doi:10.1016/j.jinf.2014.07.011.
- [3] Godet C, Philippe B, Laurent F, Cadranel J. Chronic pulmonary aspergillosis: an update on diagnosis and treatment. Respiration 2014;88:162–74. doi:10.1159/000362674.
- [4] Smith NL, Denning DW. Underlying conditions in chronic pulmonary aspergillosis including simple aspergilloma. Eur Respir J 2011;37:865–72. doi:10.1183/09031936.00054810.
- [5] Park SJ, Mehrad B. Innate Immunity to *Aspergillus* Species. Clin Microbiol Rev 2009;22:535–51. doi:10.1128/CMR.00014-09.
- [6] McCormick A, Loeffler J, Ebel F. *Aspergillus fumigatus*: contours of an opportunistic human pathogen. Cell Microbiol 2010;12:1535–43. doi:10.1111/j.1462-5822.2010.01517.x.
- [7] Dagenais TRT, Keller NP. Pathogenesis of *Aspergillus fumigatus* in Invasive Aspergillosis. Clin Microbiol Rev 2009;22:447–65. doi:10.1128/CMR.00055-08.
- [8] Schweer KE, Bangard C, Hekmat K, Cornely OA. Chronic pulmonary aspergillosis. Mycoses 2014;57:257–70. doi:10.1111/myc.12152.
- [9] Denning DW, Riniotis K, Dobrashian R, Sambatakou H. Chronic cavitary and fibrosing pulmonary and pleural aspergillosis: case series, proposed nomenclature change, and review. Clin Infect Dis 2003;37 Suppl 3:S265–80. doi:10.1086/376526.
- [10] Guinea J, Torres-Narbona M, Gijón P, Muñoz P, Pozo F, Peláez T, *et al.* Pulmonary aspergillosis in patients with chronic obstructive pulmonary disease: incidence, risk factors, and outcome. Clin Microbiol Infect 2010;16:870–7. doi:10.1111/j.1469-0691.2009.03015.x.
- [11] Baxter CG, Dunn G, Jones AM, Webb K, Gore R, Richardson MD, *et al.* Novel immunologic classification of aspergillosis in adult cystic fibrosis. J Allergy Clin Immunol 2013;132:560–6.e10. doi:10.1016/j.jaci.2013.04.007.
- [12] Kurup VP, Kumar A. Immunodiagnosis of aspergillosis. Clin Microbiol Rev 1991;4:439–56.
- [13] Persat F. [*Aspergillus* serology, from yesterday to today for tomorrow]. J Mycol Med 2012;22:72–82. doi:10.1016/j.mycmed.2012.01.004.
- [14] Baxter CG, Denning DW, Jones AM, Todd A, Moore CB, Richardson MD. Performance of two *Aspergillus* IgG EIA assays compared with the precipitin test in chronic and allergic aspergillosis. Clin Microbiol Infect 2013;19:E197–204. doi:10.1111/1469-0691.12133.

- [15] Guitard J, Sendid B, Thorez S, Gits M, Hennequin C. Evaluation of a recombinant antigen-based enzyme immunoassay for the diagnosis of noninvasive aspergillosis. *J Clin Microbiol* 2012;50:762–5. doi:10.1128/JCM.01257-11.
- [16] Fricker-Hidalgo H, Coltey B, Llerena C, Renversez J-C, Grillot R, Pin I, *et al.* Recombinant allergens combined with biological markers in the diagnosis of allergic bronchopulmonary aspergillosis in cystic fibrosis patients. *Clin Vaccine Immunol* 2010;17:1330–6. doi:10.1128/CVI.00200-10.
- [17] Moss RB. Allergic bronchopulmonary aspergillosis and *Aspergillus* infection in cystic fibrosis. *Curr Opin Pulm Med* 2010;16:598–603. doi:10.1097/MCP.0b013e32833e24a6.
- [18] Stevens DA, Moss RB, Kurup VP, Knutsen AP, Greenberger P, Judson MA, *et al.* Allergic bronchopulmonary aspergillosis in cystic fibrosis--state of the art: Cystic Fibrosis Foundation Consensus Conference. *Clin Infect Dis* 2003;37 Suppl 3:S225–64. doi:10.1086/376525.
- [19] Agarwal R, Chakrabarti A, Shah A, Gupta D, Meis JF, Guleria R, *et al.* Allergic bronchopulmonary aspergillosis: review of literature and proposal of new diagnostic and classification criteria. *Clin Exp Allergy* 2013;43:850–73. doi:10.1111/cea.12141.
- [20] Sarfati J, Monod M, Recco P, Sulahian A, Pinel C, Candolfi E, *et al.* Recombinant antigens as diagnostic markers for aspergillosis. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2006;55:279–91. doi:10.1016/j.diagmicrobio.2006.02.002.
- [21] Oliva A, Flori P, Hennequin C, Dubus J-C, Reynaud-Gaubert M, Charpin D, *et al.* Evaluation of the *Aspergillus* Western blot IgG kit for diagnosis of chronic aspergillosis. *J Clin Microbiol* 2015;53:248–54. doi:10.1128/JCM.02690-14.

Table 1 : Classification of the patients (adapted from [4,9,18])

		Inclusion criteria		
Control groups	Group 1	Patients with respiratory symptoms in whom an <i>Aspergillus</i> -related disease had been ruled out		
	Group 2 Colonized patients	Colonization defined as the recovery of <i>Aspergillus</i> spp. from respiratory specimens at least twice within a period from 10 days to one year and who did not match the criteria for CPA or ABPA diagnosis		
		Radiological criteria	Clinical manifestation	<i>Aspergillus</i> sp. evidence
CPA	Group 3 (simple aspergilloma)	One “fungus ball” : mass within a lung cavity surrounded by the "air crescent" in CT scan or radiography with no progression over ≥ 3 months	No alteration of the general condition and no haemoptysis	<i>Aspergillus</i> sp isolated from a respiratory sample AND/OR Histological evidence of <i>Aspergillus</i> sp hypha AND/OR Serum precipitins anti- <i>Aspergillus</i> positive
	Group 4 (CCPA or CFPA)	At least one cavitory lesion (CCPA) in the lung, with or without a “fungus ball”, with progression over ≥ 3 months. CFPA = Fibrotic destruction after CCPA	Alteration of the general condition (fever, weight loss, asthenia), chronic cough and/or haemoptysis progressing for ≥ 3 months	<i>Aspergillus</i> sp isolated from a respiratory sample AND/OR Histological evidence of <i>Aspergillus</i> sp hypha AND/OR Serum precipitins anti- <i>Aspergillus</i> positive

Group 5 (CNPA)	Expanding cavities, nodules, consolidations with progression over ≥ 1 month.	Mild immunodeficiency (diabetes, alcoholism, immunosuppressive drugs) Alteration of the general condition (fever, weight loss, asthenia), chronic cough and/or haemoptysis progression ≥ 1 month.	<i>Aspergillus</i> sp isolated from a respiratory sample AND/OR Histological evidence of a biopsy or surgical resection showing <i>Aspergillus</i> sp hypha AND/OR Serum precipitins anti- <i>Aspergillus</i> positive and/or positive <i>Aspergillus</i> antigen in serum
--------------------------	-----------------------------------------------------------------------------------	--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

Inclusion criteria

ABPA	Group 6	triad of acute or subacute alteration respiratory functions, presence of anti- <i>Aspergillus</i> specific IgE (RAST >0.70 kU/l) and elevated total serum IgE (> 1000 UI/ml) (children : total IgE $>$ twice the normal value depending on the age) or association of acute or subacute alteration respiratory functions, presence of anti- <i>Aspergillus</i> specific IgE (RAST >0.70 kU/l), elevated total serum IgE (> 500 UI/ml) and recent pulmonary lesions/worsening of existing lesions or <i>Aspergillus</i> sp isolated from a respiratory sample and/or serum precipitins anti- <i>Aspergillus</i> positive within 3 months
-------------	----------------	---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

CPA. Chronic Pulmonary Aspergillosis

CCPA. Chronic Cavitory Pulmonary Aspergillosis

CFPA. Chronic Fibrosing Pulmonary Aspergillosis

CNPA. Chronic Necrotizing Pulmonary Aspergillosis

ABPA. Allergic Broncho-Pulmonary Aspergillosis

Table 2 : Sensitivity and specificity (%) of (A) three anti-*Aspergillus* antibody ELISA for the detection of *Aspergillus*-related diseases (N=436 sera) and of (B) two anti-*Aspergillus* antibody ELISA compared with the reference method IPD (N=279 sera).

(A)	Equivocal	Bordier	Bio-Rad	Virion\Serion	pvalue*
Se [95% CI]	Positive [†]	97.0 [94.7 ; 99.2]	91.7 [88.2 ; 95.3]	86.1 [81.6 ; 90.1]	<.01
	Negative [§]	94.8 [91.9 ; 97.7]	83.0 [78.2 ; 87.9]	74.3 [68.7 ; 80.0]	<.01
Sp [95% CI]	Positive [†]	90.3 [86.2 ; 94.3]	91.3 [87.4 ; 95.1]	81.5 [76.3 ; 86.9]	<.01
	Negative [§]	93.7 [90.4 ; 97.0]	95.6 [92.8 ; 98.4]	89.8 [85.7 ; 93.9]	0.03
Youden Index ^l	Positive [†]	0.873	0.830	0.676	
	Negative [§]	0.885	0.786	0.641	

(B)	Equivocal	Bordier	Bio-Rad	IPD	pvalue*
Se [95% CI]	Positive [†]	97.7 [95.8 ; 99.7]	93.2 [89.8 ; 96.5]	89.1 [85.0 ; 93.2]	<.01
	Negative [§]	95.4 [92.7 ; 98.2]	84.1 [79.3 ; 88.9]	77.3 [71.7 ; 82.8]	<.01
Sp [95% CI]	Positive [†]	71.2 [59.6 ; 82.7]	76.3 [65.4 ; 87.1]	84.7 [75.6 ; 93.9]	0.14
	Negative [§]	81.4 [71.4 ; 91.3]	86.4 [77.7 ; 95.2]	96.6 [92.0 ; 100.0]	0.02
Youden index ^l	Positive [†]	0.689	0.695	0.738	
	Negative [§]	0.768	0.705	0.739	

Se: Sensitivity Sp: specificity

* Cochran Q test

[†]Equivocal results were considered as positive

[§]Equivocal results were considered as negative

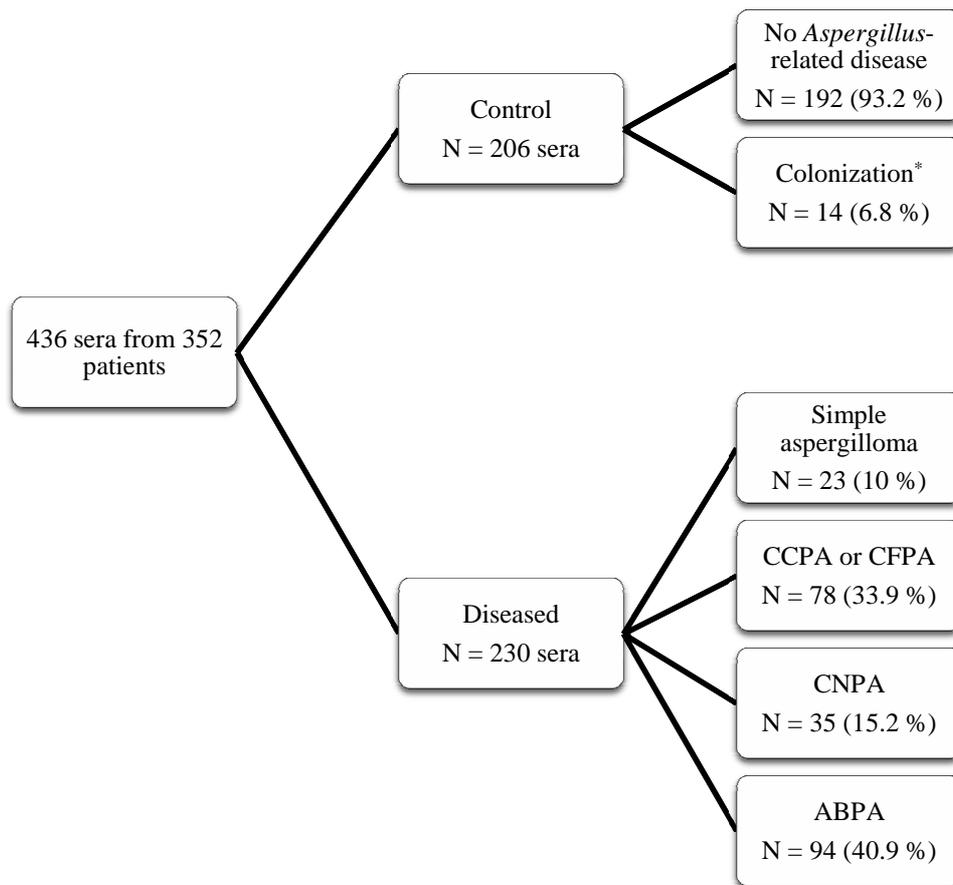
^lYouden Index = Sensitivity + Specificity - 1

Table 3 : Qualitative results for the different methods used.

Tests Results	Sera from control patients (n= 206)	Sera from diseased patients (n= 230)	All sera (n=436)
Bio-Rad			
No. negative (%)	188 (90.8)	19 (9.2)	207
No. equivocal (%)	9 (31)	20 (69)	29
No. positive (%)	9 (4.5)	191 (95.5)	200
Bordier			
No. negative (%)	186 (96.4)	7 (3.6)	193
No. equivocal (%)	7 (58.3)	5 (41.7)	12
No. positive (%)	13 (5.6)	218 (94.4)	231
Virion\Serion			
No. negative (%)	168 (84)	32 (16)	200
No. equivocal (%)	17 (38.6)	27 (61.4)	44
No. positive (%)	21 (10.9)	171 (89.1)	192
IPD*			
No. negative (%)	50 (67.6)	24 (32.4)	74
No. equivocal (%)	7 (21.2)	26 (78.8)	33
No. positive (%)	2 (1.2)	170 (98.8)	172

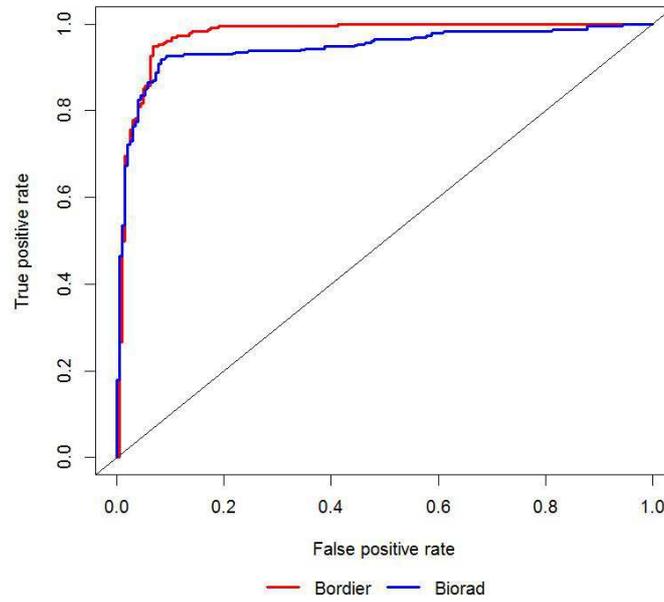
*157 sera for which IPD was not performed (negative results for both ELISA test or sera in insufficient quantity).

Figure 1 : Repartition of sera according to determined classification.



* Among colonized patients, eight patients had two respiratory samples from which *Aspergillus* sp had been isolated. In a few cases, only one respiratory sample had been sent for culture to the mycology lab.

Figure 2 : Receiver operating characteristic (ROC) analysis.



Bordier AUC = 0.979; 95% CI: [0.967-0.991]

Bio-Rad AUC = 0.945; 95% CI: [0.922-0.968]

TITRE

**EVALUATION PROSPECTIVE D'UN NOUVEAU KIT ELISA POUR LA DETECTION
DES IgG ANTI-*ASPERGILLUS* DANS LE DIAGNOSTIC DES ASPERGILLOSES
PULMONAIRES CHRONIQUES ET ALLERGIQUES**

CONCLUSION

Les aspergilloses pulmonaires chroniques (APC) et les aspergilloses allergiques sont les formes pulmonaires d'aspergillose les plus fréquentes chez l'hôte immunocompétent. Leur diagnostic est difficile et repose sur une combinaison d'arguments cliniques, radiologiques, biologiques, mycologiques et histologiques. La détection des anticorps IgG anti-*Aspergillus* est considérée comme un critère majeur dans le diagnostic des aspergilloses pulmonaires chez l'hôte immunocompétent. Plusieurs méthodes biologiques ont été utilisées au fil des années pour détecter les IgG anti-*Aspergillus*. Les techniques permettant la détection des immunoprécipitines sont considérées comme les méthodes de référence grâce à leur spécificité, mais elles manquent de standardisation et de sensibilité. Par conséquent, un test de screening choisi parmi l'hémagglutination indirecte, l'immunofluorescence indirecte, l'immunodiffusion et les techniques immunoenzymatiques (ELISA : Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay) est souvent pratiqué en première intention. La tendance actuelle est d'utiliser pour ce dépistage des tests ELISA car ils permettent une évaluation quantitative des anticorps et une réalisation d'autant plus rapide et facile qu'ils sont automatisables. L'étude présentée dans ce mémoire a évalué les performances d'un nouveau kit ELISA : Bordier affinity products (*Aspergillus fumigatus* IgG) en le comparant à deux kits commerciaux : Bio-Rad (Platelia™ *Aspergillus* IgG) et Virion\Serion (ELISA Classic™ *Aspergillus* IgG) et à une technique maison d'immunoélectrophorèse (IEP) permettant la détection des immunoprécipitines. Le kit ELISA Bordier associe deux antigènes recombinants avec des antigènes somatiques et métaboliques d'*A. fumigatus*. Ces derniers ont été mis au point dans le laboratoire de Parasitologie-Mycologie du CHU de Grenoble il y a une vingtaine d'années. Le partenariat établi entre ce laboratoire et la société Bordier a permis ensuite d'associer ces antigènes somatiques et métaboliques avec des protéines recombinantes et d'aboutir à la commercialisation de ce kit. Toutes les étapes de mise au point, de production des

antigènes et de développement du kit ont été réalisées grâce au travail et à l'expertise du Dr. Claudine Pinel, pharmacien et biologiste au laboratoire de Parasitologie-Mycologie du CHU de Grenoble. L'étude prospective et multicentrique conduite dans 5 hôpitaux français universitaires (Grenoble, Rennes, Dijon, Lyon, Besançon) entre janvier 2013 et avril 2015, a permis de tester 436 sérums provenant de 352 patients, incluant 136 APC, 94 aspergilloses broncho-pulmonaires allergiques (ABPA) et 206 contrôles.

Les sensibilités et spécificités des kits sont de 97%, 90.3%; 91.7%, 91.3% et 86.1%, 81.5% pour Bordier, Bio-Rad et Virion\Serion respectivement. Une analyse McNemar a confirmé que la sensibilité du kit Bordier est significativement supérieure à celle du kit Bio-Rad ($p < 0.01$) qui est également significativement supérieure à celle du kit Virion\Serion ($p = 0.04$). Les kits Bordier et Bio-Rad montrent des spécificités comparables ($p = 0.8$), qui sont supérieures à la spécificité du kit Virion\Serion ($p = 0.02$ pour les 2 tests). Une analyse secondaire comprenant un sous-échantillon de 279 sérums comparant les kits Bordier et Bio-Rad avec la technique d'IEP a montré que la sensibilité du test Bordier reste supérieure à celle du kit Bio-Rad et à celle de l'IEP (97.7%, 93.2% et 89.1%, respectivement, $p = 0.03$ and $p < 0.01$). La technique d'IEP a montré une excellente spécificité (96.6%) qui n'est pas significativement supérieure à celle du test Bio-Rad (86.4%; $p = 0.07$) mais supérieure à celle du kit Bordier (81.4%; $p = 0.03$), validant ainsi l'utilisation de l'IEP comme technique de confirmation et méthode de référence en sérologie aspergillaire.

L'association d'antigènes recombinants avec des antigènes somatiques et métaboliques dans un même test ELISA (Bordier) permet d'améliorer les performances de cette technique de dépistage des IgG anti-*Aspergillus fumigatus*, aboutissant à un excellent test pouvant être utilisé dans le diagnostic des aspergilloses pulmonaires chroniques et allergiques.

Vu et permis d'imprimer

Grenoble, le 31/08/2015

LE DOYEN

Pr. Christophe RIBUOT



LA PRESIDENTE DE LA THESE

Pr. Muriel CORNET

BIBLIOGRAPHIE

- [1] Armstead J, Morris J, Denning DW. Multi-country estimate of different manifestations of aspergillosis in cystic fibrosis. PLoS ONE 2014;9:e98502. doi:10.1371/journal.pone.0098502.
- [2] Warris A. The biology of pulmonary *Aspergillus* infections. J Infect 2014;69 Suppl 1:S36–41. doi:10.1016/j.jinf.2014.07.011.
- [3] Godet C, Philippe B, Laurent F, Cadranel J. Chronic pulmonary aspergillosis: an update on diagnosis and treatment. Respiration 2014;88:162–74. doi:10.1159/000362674.
- [4] Smith NL, Denning DW. Underlying conditions in chronic pulmonary aspergillosis including simple aspergilloma. Eur Respir J 2011;37:865–72. doi:10.1183/09031936.00054810.
- [5] Lortholary O, Gangneux J-P, Sitbon K, Lebeau B, de Monbrison F, Le Strat Y, *et al.* Epidemiological trends in invasive aspergillosis in France: the SAIF network (2005-2007). Clin Microbiol Infect 2011;17:1882–9. doi:10.1111/j.1469-0691.2011.03548.x.
- [6] Steinbach WJ, Marr KA, Anaissie EJ, Azie N, Quan S-P, Meier-Kriesche H-U, *et al.* Clinical epidemiology of 960 patients with invasive aspergillosis from the PATH Alliance registry. J Infect 2012;65:453–64. doi:10.1016/j.jinf.2012.08.003.
- [7] Park SJ, Mehrad B. Innate Immunity to *Aspergillus* Species. Clin Microbiol Rev 2009;22:535–51. doi:10.1128/CMR.00014-09.
- [8] McCormick A, Loeffler J, Ebel F. *Aspergillus fumigatus*: contours of an opportunistic human pathogen. Cell Microbiol 2010;12:1535–43. doi:10.1111/j.1462-5822.2010.01517.x.
- [9] Schweer KE, Bangard C, Hekmat K, Cornely OA. Chronic pulmonary aspergillosis. Mycoses 2014;57:257–70. doi:10.1111/myc.12152.
- [10] Denning DW, Riniotis K, Dobrashian R, Sambatakou H. Chronic cavitary and fibrosing pulmonary and pleural aspergillosis: case series, proposed nomenclature change, and review. Clin Infect Dis 2003;37 Suppl 3:S265–80. doi:10.1086/376526.
- [11] Guinea J, Torres-Narbona M, Gijón P, Muñoz P, Pozo F, Peláez T, *et al.* Pulmonary aspergillosis in patients with chronic obstructive pulmonary disease: incidence, risk factors, and outcome. Clin Microbiol Infect 2010;16:870–7. doi:10.1111/j.1469-0691.2009.03015.x.
- [12] Baxter CG, Dunn G, Jones AM, Webb K, Gore R, Richardson MD, *et al.* Novel immunologic classification of aspergillosis in adult cystic fibrosis. J Allergy Clin Immunol 2013;132:560–6.e10. doi:10.1016/j.jaci.2013.04.007.
- [13] Kurup VP, Kumar A. Immunodiagnosis of aspergillosis. Clin Microbiol Rev 1991;4:439–56.

- [14] Persat F. [*Aspergillus* serology, from yesterday to today for tomorrow]. *J Mycol Med* 2012;22:72–82. doi:10.1016/j.mycmed.2012.01.004.
- [15] Baxter CG, Denning DW, Jones AM, Todd A, Moore CB, Richardson MD. Performance of two *Aspergillus* IgG EIA assays compared with the precipitin test in chronic and allergic aspergillosis. *Clin Microbiol Infect* 2013;19:E197–204. doi:10.1111/1469-0691.12133.
- [16] Guitard J, Sendid B, Thorez S, Gits M, Hennequin C. Evaluation of a recombinant antigen-based enzyme immunoassay for the diagnosis of noninvasive aspergillosis. *J Clin Microbiol* 2012;50:762–5. doi:10.1128/JCM.01257-11.
- [17] Fricker-Hidalgo H, Coltey B, Llerena C, Renversez J-C, Grillot R, Pin I, *et al.* Recombinant allergens combined with biological markers in the diagnosis of allergic bronchopulmonary aspergillosis in cystic fibrosis patients. *Clin Vaccine Immunol* 2010;17:1330–6. doi:10.1128/CVI.00200-10.
- [18] Latgé J-P. *Aspergillus fumigatus* and Aspergillosis. *Clin Microbiol Rev* 1999;12:310–50.
- [19] Cornillet A, Camus C, Nimubona S, Gandemer V, Tattevin P, Belleguic C, *et al.* Comparison of epidemiological, clinical and biological features of invasive aspergillosis in neutropenic and nonneutropenic patients: a 6-year survey. *Clin Infect Dis* 2006;43:577–84. doi:10.1086/505870.
- [20] Site internet : *Aspergillus* & Aspergillosis Website. URL : <http://www.aspergillus.org.uk/>, consulté en juillet 2015.
- [21] Sharma TN, Gupta PR, Mehrotra AK, Purohit SD, Mangal HN. Aspergilloma with ABPA due to *Aspergillus niger*. *J Assoc Physicians India* 1985;33:748.
- [22] Akiyama K, Takizawa H, Suzuki M, Miyachi S, Ichinohe M, Yanagihara Y. Allergic bronchopulmonary aspergillosis due to *Aspergillus oryzae*. *Chest* 1987;91:285–6.
- [23] Laham MN, Allen RC, Greene JC. Allergic bronchopulmonary aspergillosis (ABPA) caused by *Aspergillus terreus*: specific lymphocyte sensitization and antigen-directed serum opsonic activity. *Ann Allergy* 1981;46:74–80.
- [24] Yahyaoui G, Tlamçani I, Benjelloun S, Atwani M, Errami M. Aspergillose pulmonaire chronique nécrosante à *Aspergillus niger* chez un patient tabagique et ancien tuberculeux. *Pan Afr Med J* 2014;17. doi:10.11604/pamj.2014.17.93.3631.
- [25] Micheli PA. *Nova plantarum genera* 1729.
- [26] Bennett JH. XVII. On the Parasitic Vegetable Structures found growing in Living Animals. *Earth and Environmental Science Transactions of the Royal Society of Edinburgh* 1844;15:277–94. doi:10.1017/S0080456800029963.
- [27] Hinson KFW, Moon AJ, Plummer NS. Broncho-pulmonary aspergillosis; a review and a report of eight new cases. *Thorax* 1952;7:317–33.
- [28] Denning DW. Invasive aspergillosis. *Clin Infect Dis* 1998;26:781–803; quiz 804–5.

- [29] Klich MA. Identification of Common *Aspergillus* Species. Amer Society for Microbiology; 2002.
- [30] Chabasse D, Bouchara J-P, De Gentile L, Brun S, Cimon B, Penn P. Les moisissures d'intérêt médical. Bioforma n°25. Paris; 2002.
- [31] Ren P, Jankun TM, Belanger K, Bracken MB, Leaderer BP. The relation between fungal propagules in indoor air and home characteristics. *Allergy* 2001;56:419–24.
- [32] Yamamoto N, Bibby K, Qian J, Hospodsky D, Rismani-Yazdi H, Nazaroff WW, *et al.* Particle-size distributions and seasonal diversity of allergenic and pathogenic fungi in outdoor air. *ISME J* 2012;6:1801–11. doi:10.1038/ismej.2012.30.
- [33] Dagenais TRT, Keller NP. Pathogenesis of *Aspergillus fumigatus* in Invasive Aspergillosis. *Clin Microbiol Rev* 2009;22:447–65. doi:10.1128/CMR.00055-08.
- [34] Amanianda V, Latgé J-P. Fungal hydrophobins form a sheath preventing immune recognition of airborne conidia. *Virulence* 2010;1:185–7. doi:10.4161/viru.1.3.11317.
- [35] Latgé J-P. The cell wall: a carbohydrate armour for the fungal cell. *Mol Microbiol* 2007;66:279–90. doi:10.1111/j.1365-2958.2007.05872.x.
- [36] Latgé J-P, Beauvais A. Functional duality of the cell wall. *Curr Opin Microbiol* 2014;20:111–7. doi:10.1016/j.mib.2014.05.009.
- [37] Hogan LH, Klein BS, Levitz SM. Virulence factors of medically important fungi. *Clin Microbiol Rev* 1996;9:469–88.
- [38] Morin O. *Aspergillus* et aspergillose : biologie. EM-Consulte 2003.
- [39] Lewis RE, Wiederhold NP, Chi J, Han XY, Komanduri KV, Kontoyiannis DP, *et al.* Detection of gliotoxin in experimental and human aspergillosis. *Infect Immun* 2005;73:635–7. doi:10.1128/IAI.73.1.635-637.2005.
- [40] Müllbacher A, Waring P, Eichner RD. Identification of an agent in cultures of *Aspergillus fumigatus* displaying anti-phagocytic and immunomodulating activity in vitro. *J Gen Microbiol* 1985;131:1251–8.
- [41] Bennett JW, Klich M. Mycotoxins. *Clin Microbiol Rev* 2003;16:497–516.
- [42] Latgé J-P, Steinbach WJ. *Aspergillus fumigatus* and Aspergillosis. ASM Press; 2009.
- [43] Beauvais A, Fontaine T, Amanianda V, Latgé J-P. *Aspergillus* cell wall and biofilm. *Mycopathologia* 2014;178:371–7. doi:10.1007/s11046-014-9766-0.
- [44] Abad A, Fernández-Molina JV, Bikandi J, Ramírez A, Margareto J, Sendino J, *et al.* What makes *Aspergillus fumigatus* a successful pathogen? Genes and molecules involved in invasive aspergillosis. *Rev Iberoam Micol* 2010;27:155–82. doi:10.1016/j.riam.2010.10.003.
- [45] Guinea J, Peláez T, Alcalá L, Bouza E. Outdoor environmental levels of *Aspergillus* spp. conidia over a wide geographical area. *Med Mycol* 2006;44:349–56. doi:10.1080/13693780500488939.

- [46] Schaffner A, Douglas H, Braude A. Selective protection against conidia by mononuclear and against mycelia by polymorphonuclear phagocytes in resistance to *Aspergillus*. Observations on these two lines of defense in vivo and in vitro with human and mouse phagocytes. *J Clin Invest* 1982;69:617–31.
- [47] Agarwal R, Chakrabarti A, Shah A, Gupta D, Meis JF, Guleria R, *et al.* Allergic bronchopulmonary aspergillosis: review of literature and proposal of new diagnostic and classification criteria. *Clin Exp Allergy* 2013;43:850–73. doi:10.1111/cea.12141.
- [48] Agarwal R. Allergic bronchopulmonary aspergillosis. *Chest* 2009;135:805–26. doi:10.1378/chest.08-2586.
- [49] Stevens DA, Moss RB, Kurup VP, Knutsen AP, Greenberger P, Judson MA, *et al.* Allergic bronchopulmonary aspergillosis in cystic fibrosis-state of the art: Cystic Fibrosis Foundation Consensus Conference. *Clin Infect Dis* 2003;37 Suppl 3:S225–64. doi:10.1086/376525.
- [50] Shah A, Panjabi C. Allergic aspergillosis of the respiratory tract. *Eur Respir Rev* 2014;23:8–29. doi:10.1183/09059180.00007413.
- [51] Kurup VP, Zacharisen MC, Fink JN. Hypersensitivity pneumonitis. *Indian J Chest Dis Allied Sci* 2006;48:115–28.
- [52] Kaltreider HB. Hypersensitivity pneumonitis. *West J Med* 1993;159:570–8.
- [53] Denning DW, Pashley C, Hartl D, Wardlaw A, Godet C, Del Giacco S, *et al.* Fungal allergy in asthma-state of the art and research needs. *Clin Transl Allergy* 2014;4:14. doi:10.1186/2045-7022-4-14.
- [54] Oren I, Haddad N, Finkelstein R, Rowe JM. Invasive pulmonary aspergillosis in neutropenic patients during hospital construction: before and after chemoprophylaxis and institution of HEPA filters. *Am J Hematol* 2001;66:257–62. doi:10.1002/ajh.1054.
- [55] Segal BH, Walsh TJ. Current approaches to diagnosis and treatment of invasive aspergillosis. *Am J Respir Crit Care Med* 2006;173:707–17. doi:10.1164/rccm.200505-727SO.
- [56] Oliva A, Flori P, Hennequin C, Dubus J-C, Reynaud-Gaubert M, Charpin D, *et al.* Evaluation of the *Aspergillus* Western blot IgG kit for diagnosis of chronic aspergillosis. *J Clin Microbiol* 2015;53:248–54. doi:10.1128/JCM.02690-14.
- [57] Uffredi ML, Mangiapan G, Cadranel J, Kac G. Significance of *Aspergillus fumigatus* isolation from respiratory specimens of nongranulocytopenic patients. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2003;22:457–62. doi:10.1007/s10096-003-0970-y.
- [58] Binder RE, Faling LJ, Pugatch RD, Mahasaen C, Snider GL. Chronic necrotizing pulmonary aspergillosis: a discrete clinical entity. *Medicine (Baltimore)* 1982;61:109–24.
- [59] Nicolle M-C, Bénet T, Thiebaut A, Bienvenu A-L, Voirin N, Duclos A, *et al.* Invasive aspergillosis in patients with hematologic malignancies: incidence and description of 127

- cases enrolled in a single institution prospective survey from 2004 to 2009. *Haematologica* 2011;96:1685–91. doi:10.3324/haematol.2011.044636.
- [60] Cornet M, Fleury L, Maslo C, Bernard J-F, Brücker G, Invasive Aspergillosis Surveillance Network of the Assistance Publique-Hôpitaux de Paris. Epidemiology of invasive aspergillosis in France: a six-year multicentric survey in the Greater Paris area. *J Hosp Infect* 2002;51:288–96.
- [61] Pagano L, Caira M, Candoni A, Offidani M, Fianchi L, Martino B, *et al.* The epidemiology of fungal infections in patients with hematologic malignancies: the SEIFEM-2004 study. *Haematologica* 2006;91:1068–75.
- [62] Bitar D, Lortholary O, Le Strat Y, Nicolau J, Coignard B, Tattevin P, *et al.* Population-based analysis of invasive fungal infections, France, 2001-2010. *Emerging Infect Dis* 2014;20:1149–55. doi:10.3201/eid2007.140087.
- [63] Denning DW, Pleuvry A, Cole DC. Global burden of chronic pulmonary aspergillosis as a sequel to pulmonary tuberculosis. *Bull World Health Organ* 2011;89:864–72. doi:10.2471/BLT.11.089441.
- [64] Agarwal R, Denning DW, Chakrabarti A. Estimation of the Burden of Chronic and Allergic Pulmonary Aspergillosis in India. *PLoS One* 2014;9. doi:10.1371/journal.pone.0114745.
- [65] Geller DE, Kaplowitz H, Light MJ, Colin AA. Allergic bronchopulmonary aspergillosis in cystic fibrosis: reported prevalence, regional distribution, and patient characteristics. Scientific Advisory Group, Investigators, and Coordinators of the Epidemiologic Study of Cystic Fibrosis. *Chest* 1999;116:639–46.
- [66] Mastella G, Rainisio M, Harms HK, Hodson ME, Koch C, Navarro J, *et al.* Allergic bronchopulmonary aspergillosis in cystic fibrosis. A European epidemiological study. *Epidemiologic Registry of Cystic Fibrosis. Eur Respir J* 2000;16:464–71.
- [67] Mroueh S, Spock A. Allergic bronchopulmonary aspergillosis in patients with cystic fibrosis. *Chest* 1994;105:32–6.
- [68] Bergeron A, Porcher R, Sulahian A, de Bazelaire C, Chagnon K, Raffoux E, *et al.* The strategy for the diagnosis of invasive pulmonary aspergillosis should depend on both the underlying condition and the leukocyte count of patients with hematologic malignancies. *Blood* 2012;119:1831–7; quiz 1956. doi:10.1182/blood-2011-04-351601.
- [69] Bargon J, Dauletbaev N, Köhler B, Wolf M, Posselt H-G, Wagner TOF. Prophylactic antibiotic therapy is associated with an increased prevalence of *Aspergillus* colonization in adult cystic fibrosis patients. *Respiratory Medicine* 1999;93:835–8. doi:10.1016/S0954-6111(99)90270-6.
- [70] Jubin V, Ranque S, Stremmer Le Bel N, Sarles J, Dubus J-C. Risk factors for *Aspergillus* colonization and allergic bronchopulmonary aspergillosis in children with cystic fibrosis. *Pediatr Pulmonol* 2010;45:764–71. doi:10.1002/ppul.21240.

- [71] Stevens DA, Melikian GL. Aspergillosis in the “nonimmunocompromised” host. *Immunol Invest* 2011;40:751–66. doi:10.3109/08820139.2011.614307.
- [72] Brik A, Salem AM, Kamal AR, Abdel-Sadek M, Essa M, Sharawy M El, *et al.* Surgical outcome of pulmonary aspergilloma. *Eur J Cardiothorac Surg* 2008;34:882–5. doi:10.1016/j.ejcts.2008.06.049.
- [73] Kosmidis C, Denning DW. The clinical spectrum of pulmonary aspergillosis. *Thorax* 2015;70:270–7. doi:10.1136/thoraxjnl-2014-206291.
- [74] Soubani AO, Chandrasekar PH. The clinical spectrum of pulmonary aspergillosis. *Chest* 2002;121:1988–99.
- [75] Chabi ML, Goracci A, Roche N, Paugam A, Lupo A, Revel MP. Pulmonary aspergillosis. *Diagn Interv Imaging* 2015. doi:10.1016/j.diii.2015.01.005.
- [76] Burke PS, Coltman CA. Multiple pulmonary aspergillomas in acute leukemia. *Cancer* 1971;28:1289–92. doi:10.1002/1097-0142(1971)28:5<1289::AID-CNCR2820280530>3.0.CO;2-6.
- [77] Izumikawa K, Tashiro T, Tashiro M, Takazono T, Kosai K, Morinaga Y, *et al.* Pathogenesis and clinical features of chronic pulmonary aspergillosis - is it possible to distinguish CNPA and CCPA clinically? *J Infect Chemother* 2014;20:208–12. doi:10.1016/j.jiac.2013.10.016.
- [78] Saraceno JL, Phelps DT, Ferro TJ, Futerfas R, Schwartz DB. Chronic necrotizing pulmonary aspergillosis: approach to management. *Chest* 1997;112:541–8.
- [79] Gefter WB, Weingrad TR, Epstein DM, Ochs RH, Miller WT. “Semi-invasive” pulmonary aspergillosis: a new look at the spectrum of *Aspergillus* infections of the lung. *Radiology* 1981;140:313–21. doi:10.1148/radiology.140.2.7255704.
- [80] Germaud P. «*Aspergillus*» et système respiratoire. EMC - Traité de médecine AKOS 2006;1:1–9. doi:10.1016/S1634-6939(05)34192-5.
- [81] Denning DW. Chronic forms of pulmonary aspergillosis. *Clin Microbiol Infect* 2001;7 Suppl 2:25–31.
- [82] Pepys J, Riddell RW, Citron KM, Clayton YM, Short EI. Clinical and immunologic significance of *Aspergillus fumigatus* in the sputum. *Am Rev Respir Dis* 1959;80:167–80.
- [83] Greenberger PA, Patterson R. Diagnosis and management of allergic bronchopulmonary aspergillosis. *Ann Allergy* 1986;56:444–8.
- [84] Patterson R, Greenberger PA, Radin RC, Roberts M. Allergic bronchopulmonary aspergillosis: staging as an aid to management. *Ann Intern Med* 1982;96:286–91.
- [85] Katzenstein AL, Sale SR, Greenberger PA. Allergic *Aspergillus* sinusitis: a newly recognized form of sinusitis. *J Allergy Clin Immunol* 1983;72:89–93.
- [86] Site internet : *Aspergillus fumigatus* | INSPQ - Institut national de santé publique du Québec URL : <https://www.inspq.qc.ca/moisissures/fiches/Aspergillus-fumigatus>, consulté en août 2015.

- [87] Kahn FW, Jones JM, England DM. The role of bronchoalveolar lavage in the diagnosis of invasive pulmonary aspergillosis. *Am J Clin Pathol* 1986;86:518–23.
- [88] Fraczek MG, Kirwan MB, Moore CB, Morris J, Denning DW, Richardson MD. Volume dependency for culture of fungi from respiratory secretions and increased sensitivity of *Aspergillus* quantitative PCR. *Mycoses* 2014;57:69–78. doi:10.1111/myc.12103.
- [89] Odabasi Z, Mattiuzzi G, Estey E, Kantarjian H, Saeki F, Ridge RJ, *et al.* Beta-D-glucan as a diagnostic adjunct for invasive fungal infections: validation, cutoff development, and performance in patients with acute myelogenous leukemia and myelodysplastic syndrome. *Clin Infect Dis* 2004;39:199–205. doi:10.1086/421944.
- [90] Marty FM, Koo S, Bryar J, Baden LR. (1->3)beta-D-glucan assay positivity in patients with *Pneumocystis (carinii) jiroveci* pneumonia. *Ann Intern Med* 2007;147:70–2.
- [91] Nomenclature des actes de biologie médicale 2014.
- [92] Persat F, Ranque S. Intérêts et limites du sérodiagnostic fongique. *La Lettre de l'infectiologue* 2009;Tome XXIV.
- [93] Patterson R, Wang JL, Roberts M, Zeiss CR. [Comparison of radioimmunoassay techniques in the detection of IgE and IgG antibody activity against *Aspergillus fumigatus* antigens]. *J Immunol* 1978;120:66–71.
- [94] Sarfati J, Monod M, Recco P, Sulahian A, Pinel C, Candolfi E, *et al.* Recombinant antigens as diagnostic markers for aspergillosis. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2006;55:279–91. doi:10.1016/j.diagmicrobio.2006.02.002.
- [95] Weig M, Frosch M, Tintelnot K, Haas A, Gross U, Linsmeier B, *et al.* Use of recombinant mitogillin for improved serodiagnosis of *Aspergillus fumigatus*-associated diseases. *J Clin Microbiol* 2001;39:1721–30. doi:10.1128/JCM.39.5.1721-1730.2001.
- [96] Hearn VM, Wilson EV, Mackenzie DWR. *Aspergillus fumigatus* antigens used in the serodiagnosis of aspergillosis. *Zentralblatt Für Bakteriologie, Mikrobiologie Und Hygiene Series A: Medical Microbiology, Infectious Diseases, Virology, Parasitology* 1986;261:496–502. doi:10.1016/S0176-6724(86)80082-7.
- [97] Gugnani HC, Reijula KE, Kurup VP, Fink JN. Detection of IgG and IgE antibodies to *Aspergillus fumigatus* in human sera by immunogold assay. *Mycopathologia* 1990;109:33–40.
- [98] Dee TH. Detection of *Aspergillus fumigatus* serum precipitins by counterimmunoelectrophoresis. *J Clin Microbiol* 1975;2:482–5.
- [99] Sheehan D. *Physical Biochemistry: Principles and Applications*. John Wiley & Sons; 2009.
- [100] Warnock DW. Detection of *Aspergillus fumigatus* precipitins: a comparison of counter immunoelectrophoresis and double diffusion. *J Clin Pathol* 1977;30:388–9.
- [101] Pinon JM, Gorse JP, Dropsy G. Exploration de l'immunité humorale dans l'aspergillose : Intérêt de l'E.L.I.E.D.A. *Mycopathologia* 1977;60:115–20.

- [102] Site internet : ROCKLAND antibodies & assays. URL : <http://www.rockland-inc.com/elisa.aspx>, consulté en juillet 2015.
- [103] Virion\Serion. Mode d'emploi SERION ELISA Classic *Aspergillus fumigatus* IgG 2012.
- [104] BIORAD. Notice PLATELIA *Aspergillus* IgG BIORAD 2009.
- [105] Van Toorenenbergen AW. Between-laboratory quality control of automated analysis of IgG antibodies against *Aspergillus fumigatus*. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2012;74:278–81. doi:10.1016/j.diagmicrobio.2012.07.002.
- [106] Fumouze Diagnostics. Notice Aspergillose Fumouze 2009.
- [107] Tönder O, Rödsæthier M. Indirect haemagglutination for demonstration of antibodies to *Aspergillus fumigatus*. *Acta Pathol Microbiol Scand B Microbiol Immunol* 1974;82:871–8.
- [108] Cornet M, Botterel F, Dumont C, Romand S, Bourée P. Évaluation de la technique d'hémagglutination indirecte pour le dépistage des anticorps dans le diagnostic des aspergilloses. *Journal de Mycologie Médicale* 2000;10:87.
- [109] Kurup VP. Enzyme-linked immunosorbent assay in the detection of specific antibodies against *Aspergillus* in patient sera. *Zentralbl Bakteriell Mikrobiol Hyg A* 1986;261:509–16.
- [110] Bernstein JA, Zeiss CR, Greenberger PA, Patterson R, Marhoul JF, Smith LL. Immunoblot analysis of sera from patients with allergic bronchopulmonary aspergillosis: correlation with disease activity. *J Allergy Clin Immunol* 1990;86:532–9.
- [111] LDBIO. Notice d'utilisation Western-Blot *Aspergillus* IgG 2013.
- [112] Brun S, Bekhechi Z, Uzunhan Y, Mantelet S, Suzanne P, Nicolas P, *et al.* Comparaison du Western Blot et de l'immunoélectrophorèse pour le diagnostic sérologique des aspergilloses chroniques. *Journal de Mycologie Médicale* 2015;25:e108.
- [113] Grenouillet F, Cabrolier N, Grenouillet F, Roussel S. Sérologie aspergillaire : corrélation immunoélectrophorèse-Western Blot *Aspergillus*. *Journal de Mycologie Médicale* 2015;25:e109.
- [114] Brémont F, Rittié JL, Rancé F, Juchet A, Recco P, Linas MD, *et al.* Aspergillose bronchopulmonaire allergique chez l'enfant. *Archives de Pédiatrie* 1999;6, Supplement 1:s87–93. doi:10.1016/S0929-693X(99)80253-X.
- [115] Skov M, Koch C, Reimert CM, Poulsen LK. Diagnosis of allergic bronchopulmonary aspergillosis (ABPA) in cystic fibrosis. *Allergy* 2000;55:50–8.
- [116] Cramer R, Hemmann S, Ismail C, Menz G, Blaser K. Disease-specific recombinant allergens for the diagnosis of allergic bronchopulmonary aspergillosis. *Int Immunol* 1998;10:1211–6.
- [117] Walsh TJ, Anaissie EJ, Denning DW, Herbrecht R, Kontoyiannis DP, Marr KA, *et al.* Treatment of aspergillosis: clinical practice guidelines of the Infectious Diseases Society of America. *Clin Infect Dis* 2008;46:327–60. doi:10.1086/525258.

- [118] Felton TW, Baxter C, Moore CB, Roberts SA, Hope WW, Denning DW. Efficacy and safety of posaconazole for chronic pulmonary aspergillosis. *Clin Infect Dis* 2010;51:1383–91. doi:10.1086/657306.
- [119] Natarajan S, Subramanian P. Allergic bronchopulmonary aspergillosis: A clinical review of 24 patients: Are we right in frequent serologic monitoring? *Ann Thorac Med* 2014;9:216–20. doi:10.4103/1817-1737.140130.
- [120] Inhaled beclomethasone dipropionate in allergic bronchopulmonary aspergillosis. Report to the Research Committee of the British Thoracic Association. *Br J Dis Chest* 1979;73:349–56.
- [121] Stevens DA, Schwartz HJ, Lee JY, Moskovitz BL, Jerome DC, Catanzaro A, *et al.* A randomized trial of itraconazole in allergic bronchopulmonary aspergillosis. *N Engl J Med* 2000;342:756–62. doi:10.1056/NEJM200003163421102.
- [122] Van der Ent CK, Hoekstra H, Rijkers GT. Successful treatment of allergic bronchopulmonary aspergillosis with recombinant anti-IgE antibody. *Thorax* 2007;62:276–7. doi:10.1136/thx.2004.035519.
- [123] Tillie-Leblond I, Germaud P, Leroyer C, Tétu L, Girard F, Devouassoux G, *et al.* Allergic bronchopulmonary aspergillosis and omalizumab. *Allergy* 2011;66:1254–6. doi:10.1111/j.1398-9995.2011.02599.x.



Serment de Galien



« Je jure en présence des Maîtres de la Faculté, des Conseillers de l'Ordre des Pharmaciens et de mes condisciples :

D'honorer ceux qui m'ont instruit(e) dans les préceptes de mon art et de leur témoigner ma reconnaissance en restant fidèle à leur enseignement.

D'exercer, dans l'intérêt de la santé publique, ma profession avec conscience et de respecter non seulement la législation en vigueur, mais aussi les règles de l'honneur, de la probité et du désintéressement.

De ne jamais oublier ma responsabilité et mes devoirs envers le malade et sa dignité humaine ; en aucun cas, je ne consentirai à utiliser mes connaissances et mon état pour corrompre les mœurs et favoriser des actes criminels.

Que les hommes m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses. Que je sois couvert(e) d'opprobre et méprisé(e) de mes confrères si j'y manque ».

Evaluation prospective d'un nouveau kit ELISA pour la détection des IgG anti-*Aspergillus* dans le diagnostic des aspergilloses pulmonaires chroniques et allergiques

Les IgG anti-*Aspergillus* sont d'importants biomarqueurs pour le diagnostic des aspergilloses pulmonaires chroniques (APC) et des aspergilloses broncho-pulmonaires allergiques (ABPA). Cette étude compare un nouveau kit ELISA (Bordier affinity products) aux kits Bio-Rad et Virion\Serion. Avec cette étude prospective et multicentrique, 436 sérums provenant de 352 patients, incluant 136 APC, 94 ABPA et 206 contrôles, ont été testés. Les sensibilités et spécificités sont de 97%, 90.3%; 91.7%, 91.3% et 86.1%, 81.5% pour Bordier, Bio-Rad et Serion respectivement. Une analyse de McNemar confirme la sensibilité supérieure de Bordier par rapport à Bio-Rad ($p < 0.01$) et Serion ($p = 0.04$). Les ELISA Bordier et Bio-Rad ont montré des spécificités comparables ($p = 0.8$), qui sont supérieures à celle de Serion ($p = 0.02$ pour chaque test). Dans une analyse secondaire incluant 279 sérums et comparant Bordier et Bio-Rad à l'immunoélectrophorèse (IEP) maison, la sensibilité de Bordier reste supérieure à celle de Bio-Rad et de l'IEP (97.7%, 93.2% et 89.1% respectivement, $p = 0.03$ et $p < 0.01$). L'IEP a montré une spécificité de 96.6% qui n'est pas significativement supérieure à celle de Bio-Rad (86.4%; $p = 0.07$) mais supérieure à celle de Bordier (81.4%; $p = 0.03$). L'association de recombinants avec des antigènes somatiques et métaboliques dans un même ELISA (Bordier) aboutit à un excellent compromis entre sensibilité et spécificité, conduisant à un test performant pour le diagnostic des aspergilloses chroniques et allergiques.

Mots-clés : sérologie, ELISA Bordier, aspergillose pulmonaire chronique, ABPA

Filière : Biologie médicale

Prospective evaluation of a new *Aspergillus* IgG EIA for the diagnosis of chronic and allergic pulmonary aspergillosis

Anti-*Aspergillus* IgG are important biomarkers for the diagnosis of chronic pulmonary aspergillosis (CPA) and allergic broncho-pulmonary aspergillosis (ABPA). This study aimed to compare a new EIA kit (Bordier affinity products) to the Bio-Rad and the Virion\Serion EIAs. Through a multicentric prospective study, 436 sera from 352 patients, including 136 CPA, 94 ABPA and 206 controls, were tested. The sensitivities and specificities were 97%, 90.3%; 91.7%, 91.3; and 86.1%, 81.5% for Bordier, Bio-Rad and Virion\Serion, respectively. A McNemar analysis confirmed the higher sensitivity of Bordier as compared to Bio-Rad ($p < 0.01$) and of the latter as compared to Virion\Serion ($p = 0.04$). The Bordier and Bio-Rad EIAs showed comparable specificities ($p = 0.8$), which were higher than the specificity of the Virion\Serion one ($p = 0.02$ for both assay). In a subset analysis of 279 sera comparing the Bordier and Bio-Rad EIAs to an home-made immunoprecipitin (IPD) assay, the sensitivity of Bordier remained higher than the ones of Bio-Rad and IPD (97.7%, 93.2% and 89.1%, respectively, $p = 0.03$ and $p < 0.01$). The IPD showed a specificity of 96.6% which was not significantly higher than the one of Bio-Rad (86.4%; $p = 0.07$) but higher than Bordier (81.4%; $p = 0.03$). The association of recombinant with somatic and metabolic antigens in a same EIA (Bordier) resulted in an improved balance between sensitivity and specificity, leading to a test that is highly suitable for the diagnosis of chronic and allergic aspergillosis.

Keywords : serology, ELISA Bordier, chronic pulmonary aspergillosis, ABPA

Subject : Medical biology