

**UNIVERSITE DE NANTES
FACULTE DE PHARMACIE**

ANNEE 2006

N°56

**MEMOIRE
DU DIPLOME D'ETUDES
SPECIALISEES DE BIOLOGIE MEDICALE**

Soutenu devant le Jury interrégional

Le 24 octobre 2006

Par M. Jean-Philippe ROBERT

Conformément aux dispositions de l'arrêté

du 23 janvier 2003 tient lieu de

**THESE
POUR LE DIPLOME D'ETAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE**

**Intérêt de la détection des IgG anti-aspergillaires par Elisa
pour la prise en charge de l'Aspergillose Bronchopulmonaire
Allergique**

Président : Mme Berthe-Marie IMBERT, Professeur de Virologie - Pharmacie

Membres : M. Edmond CHAILLEUX, Professeur de Pneumologie - Médecine

M. Patrick GERMAUD, Praticien Hospitalier Pneumologie

M. Jean DEUNFF, Professeur de Parasitologie et Mycologie Médicale

M. Patrice LE PAPE, Professeur de Parasitologie et Mycologie Médicale

(Directeur de thèse)

SOMMAIRE

INTRODUCTION	6
RAPPELS BIBLIOGRAPHIQUES	8
I. LE GENRE ASPERGILLUS.....	9
I.1. Agent pathogène.....	9
I.2. Caractères culturels.....	10
I.3. Habitat du champignon.....	13
I.4. Facteurs de pathogénicité.....	13
I.4.1. Rappels sur les mécanismes de défense de l'hôte.....	14
I.4.2. <i>Aspergillus</i> , pathogène opportuniste.....	15
II. LES MALADIES ASPERGILLAIRES.....	20
II.1. Atteintes aspergillaires de l'immunodéprimé.....	21
II.1.1. Aspergillose invasive.....	21
II.1.2. Aspergillose pulmonaire semi-invasive.....	22
II.1.3. Bronchite aspergillaire.....	23
II.1.4. Aspergillose trachéobronchique nécrosante.....	23
II.2. Atteintes aspergillaires de l'immunocompétent.....	23
II.2.1. Aspergillome.....	23
II.2.2. Aspergilloses ORL et ophtalmologiques.....	24
II.2.3. Asthme aspergillaire.....	25
II.2.4. Alvéolite allergique extrinsèque.....	25
II.2.5. Aspergillose bronchopulmonaire allergique (ABPA).....	26
III. L'ASPERGILLOSE BRONCHOPULMONAIRE ALLERGIQUE.....	26
III.1. Définition – Epidémiologie.....	26
III.2. Physiopathologie de l'ABPA.....	27
III.3. Diagnostic de l'ABPA.....	29
III.3.1. Caractéristiques cliniques.....	29
III.3.2. Signes radiologiques.....	30
III.3.3. Examens biologiques.....	32
III.3.4. Epreuves fonctionnelles respiratoires.....	39
III.3.5. Critères diagnostiques.....	39
III.4. Traitement de l'ABPA.....	42
III.4.1. Objectifs du traitement.....	42
III.4.2. Thérapeutiques utilisées.....	42
MATÉRIELS ET MÉTHODES	47
I. OBJECTIFS DES TRAVAUX.....	48
II. MÉTHODES SÉROLOGIQUES.....	49
II.1. Hémagglutination indirecte (HAI).....	49
II.2. Immunoélectrophorèse (IE).....	49
II.3. Technique Elisa IgG <i>Aspergillus fumigatus</i> (Mycobiotics®).....	50
RÉSULTATS ET DISCUSSION	53
I. ETUDE DE PERFORMANCE DE LA TROUSSE ELISA MYCOBIOTICS®.....	54
I.1. Population étudiée.....	54
I.2. Répétabilité et reproductibilité.....	54
I.3. Corrélation Elisa-Immunoélectrophorèse.....	54
I.4. Sensibilité et spécificité.....	55

II. ETUDE DE L'INTÉRÊT DE LA TROUSSE ELISA DANS L'APPROCHE DIAGNOSTIQUE ET PRONOSTIQUE DE L'ABPA	55
<i>II.1. Population étudiée</i>	56
<i>II.2. Résultats des trois techniques sérologiques</i>	56
II.2.1. Résultats de l'hémagglutination.....	56
II.2.2. Résultats des dosages en Elisa	57
II.2.3. Résultats de l'immunoélectrophorèse	57
<i>II.3. Concordance des résultats IE-Elisa</i>	59
<i>II.4. Analyse clinico-biologique par patient</i>	61
II.4.1. Madame C. Marie-Madeleine (70 ans)	62
II.4.2. Monsieur D. Marcel (66 ans)	64
II.4.3. Madame R. Madeleine (84 ans)	66
II.4.4. Madame M. Thérèse	67
II.4.5. Monsieur C. Bernard (71 ans)	69
II.4.6. Monsieur G. Dominique (46 ans).....	70
II.4.7. Madame B. Yvonne (68 ans).....	71
II.4.8. Madame G. Chantal (45 ans)	76
II.4.9. Madame D. Sylvette (52 ans).....	78
II.4.10. Monsieur B. René (70 ans).....	80
II.4.11. Monsieur R. Pierre.....	81
II.4.12. Monsieur R. Joël.....	82
II.4.13. Madame N. Lucienne (74 ans)	84
II.4.14. Madame B. Géraldine (42 ans)	86
II.4.15. Madame M. Annie (58 ans)	88
II.4.16. Madame G. Nadine (43 ans)	89
<i>II.5. Place de l'Elisa dans l'approche diagnostique et pronostique de l'ABPA</i>	91
II.5.1. Un nouveau critère de diagnostic ?	91
II.5.2. Place de l'Elisa lors des exacerbations	94
II.5.3. Quelle place dans l'évaluation de la réponse au traitement ?	98
II.5.4. Place de l'Elisa dans un suivi régulier de la maladie	102
CONCLUSION	107
ANNEXE 1	109
ANNEXE 2	111
BIBLIOGRAPHIE	113

Liste des figures

Figure 1 : Appareil reproducteur des <i>Aspergillus</i>	12
Figure 2 : Têtes aspergillaires en microscopie optique à l'objectif 20	12
Figure 3 : Différentes formes cliniques des aspergilloses bronchopulmonaires (Germaud, 2005)	21
Figure 4 : Formule chimique de l'itraconazole.....	45
Figure 5: Répartition par patient des sérologies aspergillaires positives en HAI	58
Figure 6 : Répartition par patient des sérologies aspergillaires positives en Elisa.....	58
Figure 7 : Répartition par patient des sérologies aspergillaires positives en IE	58
Figure 8 : Pourcentage des différents cas de figure dans l'analyse de concordance	60
Figure 9 : Evolution de l'IE et de l'Elisa chez Mme C. Marie-Madeleine	63
Figure 10 : Evolution de l'IE et de l'Elisa chez M. D. Marcel	65
Figure 11 : Evolution de l'IE et de l'Elisa chez Mme R. Madeleine	67
Figure 12 : Evolution de l'IE et de l'Elisa chez Mme M. Thérèse	68
Figure 13 : Evolution de l'IE et de l'Elisa chez M. C. Bernard	70
Figure 14 : Evolution de l'IE et de l'Elisa chez M. G. Dominique.....	71
Figure 15 : Evolution de l'IE et de l'Elisa chez Mme B. Yvonne (1)	72
Figure 16 : Evolution de l'IE et de l'Elisa chez Mme B. Yvonne (2)	73
Figure 17 : Evolution de l'IE et de l'Elisa chez Mme B. Yvonne (3)	75
Figure 18 : Evolution de l'IE et de l'Elisa chez Mme G. Chantal	78
Figure 19 : Evolution de l'IE et de l'Elisa chez Mme D. Sylvette	79
Figure 20 : Evolution de l'IE et de l'ELISA chez M. B. René	81
Figure 21 : Evolution de l'IE et de l'Elisa chez M. R. Pierre.....	82
Figure 22 : Evolution de l'IE et de l'Elisa chez M. R. Joël.....	83
Figure 23 : Evolution des sérologies chez Mme N. Lucienne.....	85
Figure 24 : Evolution de l'IE et de l'Elisa chez Mme B. Géraldine	87
Figure 25 : Evolution de l'IE et de l'Elisa chez Mme M. Annie	89
Figure 26 : Evolution de l'IE et de l'Elisa chez Mme G. Nadine	90
Figure 27 : Nombre de cas contributifs au diagnostic d'exacerbation pour chaque marqueur	97
Figure 28 : Evolution de l'IE et de l'Elisa lors des traitements avec évolution favorable	100
Figure 29 : Comparaison Elisa, IE et IgE t lors d'un traitement avec évolution favorable	100
Figure 30 : Répartition qualitative (positif-négatif) des sérums ayant un index stable	103

Liste des tableaux

Tableau I : Caractères différentiels des espèces aspergillaires d'intérêt médical.....	11
Tableau II : Stades cliniques de l'aspergillose bronchopulmonaire allergique	30
Tableau III : Principaux antigènes recombinants décrits dans la littérature	36
Tableau IV : classification semi-quantitative des taux d'IgE spécifiques.....	37
Tableau V : Les critères de diagnostic dans l'ABPA	40
Tableau VI : Comparaison des résultats qualitatifs en Elisa et en IE (n=97)	60
Tableau VII : Résultats des sérologies aspergillaires chez Mme C. Marie-Madeleine.....	63
Tableau VIII : Résultats des sérologies aspergillaires chez M. D. Marcel.....	65
Tableau IX : Résultats des sérologies aspergillaires chez Mme R. Madeleine	67
Tableau X : Résultats des sérologies aspergillaires chez Mme M. Thérèse	68
Tableau XI : Résultats des sérologies aspergillaires chez M. C. Bernard	70
Tableau XII : Résultats des sérologies aspergillaires chez M. G. Dominique	71
Tableau XIII : Résultats sérologiques aspergillaires chez Mme B. Yvonne (1)	72
Tableau XIV : Résultats sérologiques chez Mme B. Yvonne (2).....	73
Tableau XV : Résultats des sérologies aspergillaires chez Mme B. Yvonne (2).....	75
Tableau XVI : Résultats des sérologies aspergillaires chez Mme G. Chantal	78
Tableau XVII : Résultats des sérologies aspergillaires chez Mme D. Sylvette.....	79
Tableau XVIII : Résultats des sérologies aspergillaires chez M. B. René	81
Tableau XIX : Résultats des sérologies aspergillaires chez M. R. Pierre	82
Tableau XX : Résultats des sérologies aspergillaires chez M. R. Joël.....	83
Tableau XXI : Résultats des sérologies aspergillaires chez Mme N. Lucienne	85
Tableau XXII : Résultats des sérologies aspergillaires chez Mme B. Géraldine	87
Tableau XXIII : Résultats des sérologies chez Mme M. Annie	89
Tableau XXIV : Résultats des sérologies aspergillaires chez Mme G. Nadine	90
Tableau XXV : Comportement de 4 techniques sérologiques lors du diagnostic d'ABPA	92
Tableau XXVI : Comportement des marqueurs biologiques pour chaque épisode d'exacerbation	95
Tableau XXVII : Etude chez six patients d'une période avec un index Elisa stable et négatif	104
Tableau XXVIII : Etude chez cinq patients d'une période avec un index Elisa stable et positif	105
Tableau XXIX : Différentes dilutions obtenues dans la techniques d'HAL	109

Introduction

La gravité des maladies aspergillaires est, aujourd'hui, majoritairement représentée par l'aspergillose pulmonaire invasive. Elle survient essentiellement chez des patients souffrant d'hémopathies malignes et sévèrement immunodéprimés. Chez les sujets immunocompétents, les affections liées aux *Aspergillus* restent rares. Cependant, une forme particulière d'aspergillose concerne les sous-populations touchées par l'asthme ou la mucoviscidose : l'Aspergillose Bronchopulmonaire Allergique (ABPA).

Il s'agit d'une pathologie inflammatoire respiratoire chronique dont la physiopathologie associe une hypersensibilité aux *Aspergillus* et une colonisation bronchique par ce même champignon ubiquitaire. Cette affection évolue par épisodes d'exacerbations et de rémissions. La fibrose pulmonaire et l'insuffisance respiratoire chronique signent la gravité de la maladie. L'évolution vers ce stade ultime n'est cependant pas inéluctable puisqu'elle est régie par la fréquence des exacerbations et par la précocité de leur prise en charge.

L'un des problèmes de l'ABPA réside donc dans le dépistage et le traitement des exacerbations qui doivent être les plus précoces possible. Les marqueurs utilisés actuellement pour le suivi de la maladie ne permettent pas toujours d'anticiper les signes clinico-radiologiques de ces poussées. Il serait donc intéressant de disposer d'un marqueur biologique d'exacerbation précoce permettant une prise en charge thérapeutique plus rapide. Il serait également important pour les cliniciens de pouvoir évaluer l'efficacité thérapeutique.

Notre travail porte sur une trousse Elisa de dosage des IgG anti-aspergillaires et se compose de deux études distinctes : valider la technique dans le diagnostic des aspergilloses de l'immunocompétent, puis établir son intérêt pour la prise en charge de l'ABPA.

Après quelques rappels bibliographiques et l'étude plus précise de l'ABPA, nous définirons la mise en place méthodologique des deux études. Les résultats obtenus seront ensuite exposés et discutés afin d'essayer de répondre aux questions suivantes : l'utilisation de la technique Elisa est-elle possible dans le diagnostic des aspergilloses de l'immunocompétent ? Dans le contexte de l'ABPA, le dosage des IgG anti-aspergillaires par Elisa peut-il être utilisé comme un nouveau marqueur d'exacerbation et de réponse au traitement ?

Rappels bibliographiques

I. Le genre Aspergillus

I.1. Agent pathogène

Les aspergillus sont des organismes eucaryotes appartenant au règne des champignons. La plupart des espèces du genre *Aspergillus* est regroupée dans le phylum des *Deuteromycotina* ou champignons imparfaits (*Fungi imperfecti*). Ce phylum, très hétérogène, englobe toutes les espèces se multipliant sur le mode asexué. Cependant, pour certaines espèces d'aspergillus, une reproduction sexuée a été identifiée permettant de classer ces espèces dans le phylum des *Ascomycotina*.

Les *Deuteromycotina* sont divisés en trois classes, les aspergillus appartenant à la classe des Hyphomycètes. Cette classe regroupe tous les champignons filamenteux à thalle septé dont les cellules conidiogènes sont libres. Les aspergillus possèdent un thalle hyalin ou clair, ce qui caractérise leur famille : les Moniliaceae (ou Hyalohyphomycètes)

Du point de vue morphologie, en microscopie, le genre *Aspergillus* est caractérisé par un thalle végétatif (ou mycélium) formé de filaments mycéliens (ou hyphes) hyalins, de diamètre fin et régulier, septés et ramifiés. A partir des hyphes végétatifs, prennent naissance des filaments spécialisés, non cloisonnés appelés conidiophores. Ces derniers, de longueur variable, se terminent par une vésicule sur laquelle s'insèrent les organes fructifères en forme de bouteille appelés phialides. A l'apex de ces phialides prennent naissances par bourgeonnement des spores ou conidies qui restent accolées les unes aux autres en chaînes non ramifiées basipètes (la spore la plus jeune étant à la base). Pour la plupart des espèces d'*Aspergillus* rencontrées en pathologie humaine, il existe des structures intermédiaires situées entre la vésicule et les phialides : les métules. L'ensemble constitué de la vésicule (plus ou moins métules), des phialides et des conidies correspond à la tête aspergillaire caractéristique du genre *Aspergillus* (Figure 1).

De nombreuses espèces d'*Aspergillus* ont été décrites mais seules quelques unes ont un réel pouvoir pathogène chez l'homme. Ainsi, *Aspergillus fumigatus*, est responsable de 80 à 90 % des aspergilloses humaines. Parmi les autres espèces impliquées, citons par ordre décroissant : *A. flavus*, *A. niger*, *A. terreus*, *A. nidulans* (Chabasse *et al.*, 2002).

I.2. Caractères cultureux

Les différentes espèces d'*Aspergillus* se développent sur les milieux classiques de mycologie comme le milieu de Sabouraud additionné d'antibiotiques (chloramphénicol ou gentamicine) mais également sur gélose au sang. Par contre, la plupart des espèces d'intérêt médical est sensible au cycloheximide (Actidione®).

L'incubation des géloses est réalisée à 37°C et à 25°C afin de permettre l'isolement des espèces ayant un optimum thermique inférieur à 37°C. C'est le cas d'*A. versicolor*, mais qui n'est pas responsable d'aspergilloses profondes.

En règle générale, la croissance est assez rapide : en 24-48 heures, de petites colonies blanches apparaissent puis, secondairement, elles se pigmentent au bout de 3 à 4 jours.

Nous avons déjà vu que la mise en évidence des têtes aspergillaires à l'examen microscopique permet le diagnostic de genre (Figure 2). Le diagnostic d'espèce sera porté sur un ensemble de critères macroscopiques et microscopiques (Tableau I). On peut également noter que la mise en évidence de ces critères peut être plus aisée après repiquage sur milieu de Czapek (milieu de référence pour les aspergillus).

- Critères macroscopiques

- vitesse de pousse.
- aspect des colonies : surface (duveteuse, poudreuse,...), relief, couleur au recto et au verso.

- Critères microscopiques

- taille du conidiophore, présence ou non d'une pigmentation, d'échinulations.
- vésicule (taille et forme).
- aspect général de la tête aspergillaire (en colonne ou radiée).
- présence ou non de métules.
- aspect des conidies.
- existence ou non d'une reproduction sexuée (présence ou non de cléistothèces et de cellules en noisette ou Hülle cells).

Tableau I : Caractères différentiels des espèces aspergillaires d'intérêt médical

	<i>A. fumigatus</i>	<i>A. flavus</i>	<i>A. niger</i>	<i>A. nidulans</i>	<i>A. terreus</i>
Culture	Poudreuse vert foncé puis gris noirâtre	Duveteuse à poudreuse vert jaune	Granuleuse noire	Duveteuse à poudreuse vert foncé, jaunâtre pour les souches productrices de cléistothèces	Duveteuse à poudreuse beige
Conidiophore	Lisse et court	Long avec des aspérités	Lisse et très long	Lisse, court et brun	Lisse, court et sinueux
Vésicule	En massue	Sphérique	Sphérique et très grosse	Sphérique	Globuleuse
Phialides et métules	Disposition en colonne, jamais de métules (tête unisériée)	Disposition radiaire avec +/- des métules (tête uni- ou bisériée)	Disposition radiaire, tête bisériée et noire à maturité	Disposition en colonne courte, tête bisériée	Disposition en colonne évasée, tête bisériée
Caractères particuliers	Espèce thermophile pouvant pousser à jusqu'à 57°C			Présence de cléistothèces contenant des ascospores et entourés de Hülle cells	

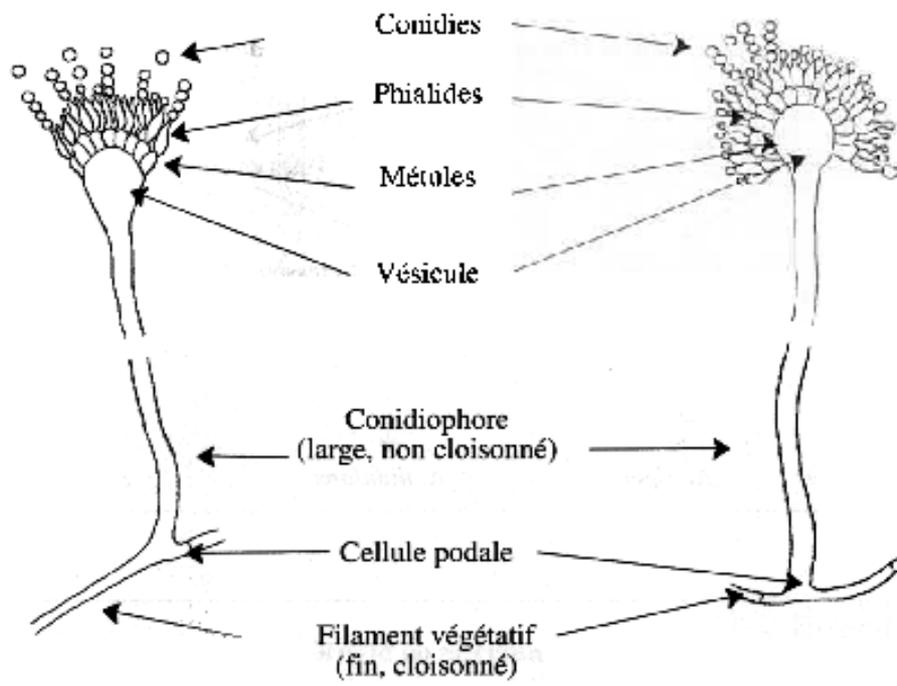


Figure 1 : Appareil reproducteur des *Aspergillus*

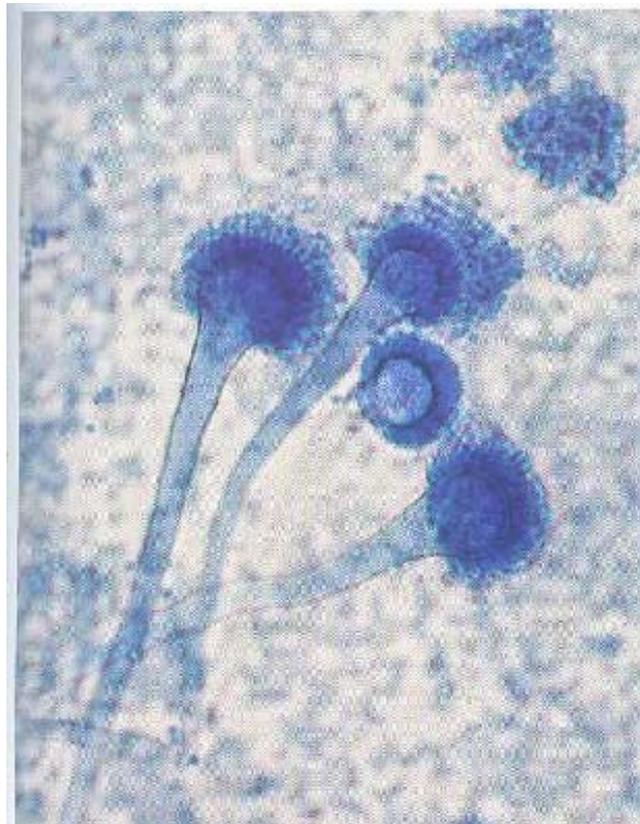


Figure 2 : Têtes aspergillaires en microscopie optique à l'objectif 20

I.3. Habitat du champignon

Les aspergillus sont des champignons cosmopolites et ubiquitaires. Ses spores sont retrouvées en grande quantité dans le milieu extérieur, notamment au niveau de débris organiques en décomposition qui fournissent au champignon le carbone nécessaire à sa croissance. On les rencontre ainsi aussi bien en milieu rural (silos à grains, foin, paille tassée et humide, céréales et fruits moisissés...) qu'en milieu urbain. Véhiculées par les courants d'air, on trouve des spores d'*Aspergillus* à l'extérieur mais également à l'intérieur des habitations (poussières, conduits d'aération, plantes en pots...).

Les différentes études aéromycologiques montrent que les spores aspergillaires se situent au 4^e rang des spores fongiques de l'air (après les spores d'*Alternaria*, de *Cladosporium* et de *Penicillium*) (Mullins *et al.*, 1984). De plus, la contamination de l'air est variable selon le climat, les saisons, les mouvements d'air (ce qui peut avoir un impact chez les immunodéprimés, notamment lors de travaux dans les hôpitaux) (Germaud, 2005).

I.4. Facteurs de pathogénicité

Nous sommes donc exposés en permanence à une atmosphère riche en spores aspergillaires et des études environnementales indiquent que chaque être humain inhale en moyenne plusieurs centaines de conidies par jour. Ces spores sont habituellement éliminées, d'une part par l'action du tapis muco-ciliaire et d'autre part par les défenses immunitaires de l'organisme. Cependant, l'existence de facteurs locaux broncho-pulmonaires favorisant ou d'un déficit immunitaire peuvent permettre aux spores aspergillaires inhalées de se développer dans l'appareil respiratoire. Les différentes maladies aspergillaires sont donc toutes définies du point de vue physiopathologique par l'inhalation de spores d'*Aspergillus* et par la présence chez l'hôte de modifications immunitaires ou d'altérations broncho-pulmonaires.

I.4.1. Rappels sur les mécanismes de défense de l'hôte

La porte d'entrée des spores d'*Aspergillus* est essentiellement aérienne. En effet, le revêtement cutané représente une barrière infranchissable pour les conidies. Après inhalation, elles peuvent facilement pénétrer jusqu'au niveau broncho-alvéolaire (leur diamètre n'excède en effet pas 3,5 μm) où elles déclenchent alors les systèmes de défense de l'organisme.

- **Le système muco-ciliaire**

Il s'agit du premier système de défense de l'organisme, situé au niveau de l'épithélium bronchique. Dans un premier temps, le mucus sécrété permet de capter les conidies d'*Aspergillus*. Puis les cils vibratiles de l'épithélium bronchique rejettent ce mucus en direction des voies aériennes supérieures où, elles sont soit expulsées vers l'extérieur grâce au réflexe de la toux, soit dégluties puis digérées au niveau de l'estomac.

- **La réponse inflammatoire**

Elle permet de lutter contre la faible fraction de spores inhalées ayant échappé au système muco-ciliaire et qui est donc susceptible d'atteindre les parties bronchoalvéolaires profondes. Il s'agit donc d'un système de défense primordial de l'infection aspergillaire.

Trois types de cellules interviennent :

- **Les macrophages alvéolaires** assurent la destruction des spores et évitent leur germination. Ils agissent par phagocytose sur les conidies mais leur intervention ne nécessite pas la présence de facteurs opsoniques (complément, immunoglobulines) qui favorisent habituellement la phagocytose. Ce système permet d'éliminer jusqu'à 90 % des spores durant les 24 premières heures. De plus, il est à noter que la capacité des

macrophages à détruire les conidies dépend de leur origine anatomique. Ainsi, contrairement aux macrophages alvéolaires, les macrophages péritonéaux sont incapables d'éliminer les spores d'*Aspergillus* (Latge, 1999).

- **Les polynucléaires neutrophiles (PNN)**, contrairement aux macrophages alvéolaires, agissent également sur les filaments mycéliens, produits de la germination des spores non éliminées par les macrophages. L'élimination des hyphes se fait grâce à la synthèse par les polynucléaires de dérivés oxygénés toxiques mais aussi par les divers constituants des granules des polynucléaires (Latge, 1999).
- **Les monocytes** détruisent également les filaments mycéliens par l'intermédiaire de dérivés oxygénés et d'enzymes. De plus, ils agissent comme agent chimioattractif des polynucléaires grâce à la production d'interleukine-8.

1.4.2. *Aspergillus*, pathogène opportuniste

Les moyens de défense de l'hôte contre une agression par des spores d'*Aspergillus* permettent donc d'éviter le développement d'une maladie aspergillaire. Ainsi, pour qu'il y ait pathogénicité des aspergillus, il est impératif d'observer la présence d'un ou plusieurs facteurs favorisant chez l'hôte. Il existe également des facteurs environnementaux, qui peuvent augmenter le risque d'infection fongique chez un individu aux défenses altérées et des facteurs de pathogénicité propre au champignon.

- **Facteurs favorisant liés à l'hôte**

Les aspergillus sont donc des agents responsables d'infections opportunistes favorisées soit par des causes locales, soit par une défaillance des défenses immunitaires. Des mécanismes de sensibilisation peuvent également intervenir dans la survenue de certaines maladies aspergillaires.

Facteurs généraux

La diminution des défenses immunitaires est déterminante dans le développement des formes invasives d'aspergilloses. La neutropénie post-chimiothérapie profonde (inférieure à 500 PNN/ μ L) et prolongée (supérieure à 12 à 15 jours) semble être le facteur le plus important expliquant la fréquence des aspergilloses invasives chez les patients traités pour des hémopathies sévères, les allogreffés de moelle étant les personnes les plus exposées. D'autres facteurs sont également incriminés : la corticothérapie prolongée, les réactions du greffon contre l'hôte (GvH), les diverses thérapies immunosuppressives lors des transplantations d'organe (Latge, 1999).

Facteurs locaux

Les facteurs locaux prédominent en l'absence d'immunodépression. Ainsi, toute altération du tapis muco-ciliaire va favoriser la colonisation de l'arbre trachéo-bronchique. Cette colonisation est fréquente au cours de la mucoviscidose, plus rare dans les dilatations des bronches, les broncho-pneumopathies chroniques obstructives, l'asthme chronique, le tabagisme. Il s'agit généralement d'une colonisation asymptomatique ou beaucoup plus rarement d'une bronchite aspergillaire (Germaud; 2004).

D'autre part, la colonisation par *Aspergillus* peut se faire au niveau d'une cavité pulmonaire, bronchique voire pleurale et être responsable d'un aspergillome. Ces cavités préexistantes sont de nature variable : il peut s'agir d'une ancienne caverne tuberculeuse (50 % des cas), de bulles d'emphysème, de bronchectasies, de cavités récentes dues à des abcès à pyogènes... Après colonisation, les spores aspergillaires se développent au sein de cette cavité (qui n'est pas fermée mais en communication avec le système bronchique) et donnent des filaments mycéliens enchevêtrés appelés truffe aspergillaire.

Facteurs allergiques

Les spores d'*Aspergillus* possèdent des structures antigéniques pouvant déclencher des réactions d'hypersensibilité au niveau des voies aériennes (dysrégulation de la réponse inflammatoire). S'il s'agit d'une hypersensibilité de type I classique du sujet

atopique, on parle d'asthme bronchique aspergillaire. Par contre, chez le sujet non atopique et en présence de quantités très importantes et répétées de spores d'*Aspergillus*, des hypersensibilités de type III ou IV peuvent intervenir et on parle alors d'alvéolite allergique extrinsèque.

La conjonction d'un terrain atopique et d'une hyperviscosité des sécrétions bronchiques (cas des patients asthmatiques chroniques ou atteints de mucoviscidose) peut être à l'origine d'une forme particulière de la pathologie allergique aspergillaire : l'aspergillose broncho-pulmonaire allergique (ABPA). Nous reviendrons sur la physiopathologie de cette maladie ultérieurement.

- **Facteurs environnementaux**

Le risque d'infection aspergillaire est fonction de la densité locale des spores dans l'atmosphère, cette concentration étant influencée par la saison (pics au printemps et en automne), le climat. Mais l'élément le plus important est la mise en suspension des spores dans l'atmosphère, en particulier lors de la réalisation de travaux de construction et de rénovation qui peuvent être responsables de réelles épidémies de formes invasives d'aspergilloses dans les services d'Hématologie chez les patients sévèrement immunodéprimés (Nolard, 1994).

Par contre, dans l'ABPA, il n'y a pas de relation clairement établie entre le degré d'exposition aux spores d'*Aspergillus* et le risque de survenue d'ABPA chez un patient (Tillie-Leblond et Tonnel, 2005). Cependant, un haut degré d'exposition pourrait être associé aux exacerbations des ABPA (Radin *et al.*, 1983).

- **Facteurs liés au champignon**

Nous venons donc de rappeler que l'apparition d'une pathologie aspergillaire dépend de la présence chez l'hôte de facteurs favorisants avec un risque généralement augmenté avec le degré de contamination de l'air par les spores. Néanmoins, toutes les espèces d'*Aspergillus* ne sont pas pathogènes pour l'homme et moins d'une dizaine sur pratiquement 200 espèces répertoriées représente un réel risque

infectieux pour l'être humain (avec une responsabilité de 90 % pour le seul *Aspergillus fumigatus* (Latge, 1999)). Ainsi, il est indispensable pour le champignon de posséder des caractères physico-morphologiques adaptés à la colonisation, des facteurs d'adhérence aux cellules pulmonaires et enfin des facteurs de virulence permettant d'exprimer à des degrés divers un pouvoir pathogène.

Caractères physico-morphologiques

La petite taille des spores aspergillaires (2 à 3,5 μm de diamètre) permet leur pénétration dans les voies respiratoires profondes et les territoires alvéolaires sachant qu'il est admis que seules les particules ayant un diamètre inférieur à 5 μm peuvent atteindre les alvéoles pulmonaires.

La thermotolérance des souches aspergillaires favorise la colonisation de l'arbre trachéo-bronchique (ils se développent très bien à 37°C, *A. fumigatus* pouvant supporter des températures supérieures à 45°C). De plus la capacité de certaines espèces à filamenter *in vivo* permet leur développement.

Capacités d'adhésion

Seules les moisissures pathogènes présentent la capacité d'adhérer à l'épithélium bronchique. Les études faites chez *A. fumigatus* ont mis en évidence des protéines de surface (hydrophobines) jouant un rôle primordial dans l'interaction des conidies avec l'hôte. Ces protéines (et notamment la protéine RodA) ont une structure dite en rodlet leur conférant des propriétés hydrophobes leur permettant de se lier avec les composants hydrophobes de l'épithélium bronchique (Latge, 1999).

D'autres études ont également décrit la présence sur les conidies de récepteurs pour la laminine et pour le complément capables de se lier à différentes protéines des cellules de l'hôte (fibrinogène, complément, laminine...). Des cellules épithéliales endommagées (la laminine, protéine de la membrane basale, devient alors accessible) associées à une réaction inflammatoire (qui met en jeu notamment du fibrinogène et le complément) créent les conditions propices à l'adhésion cellulaire (Chabasse *et al.*, 1995).

Facteurs de virulence

Lors de la multiplication fongique, divers métabolites toxiques sont produits par le champignon. Ces toxines peuvent donc jouer un rôle potentiellement pathogène chez l'hôte.

La gliotoxine, qui a été très étudiée, possède des propriétés toxiques mais aussi des propriétés immunosuppressives.

Une RNase de 18 kDa, connue sous le nom de Asp f1 ou restrictocine, intervient également dans la virulence du champignon.

Une hémolysine est également produite par *A. fumigatus*. Son rôle exact n'est pas encore bien défini mais elle pourrait être un des facteurs de pathogénicité des *Aspergillus*.

Enzymes

Les différentes enzymes produites par le champignon interviennent dans l'invasion tissulaire de l'hôte. De nombreuses études ont démontré une pathogénicité plus importante chez les souches d'*Aspergillus* productrices de protéases telles des élastases ou des collagénases (l'élastine et le collagène étant deux des principaux composants de la matrice pulmonaire). On peut citer parmi ces protéases : des sérine-protéases de type subtilisine, des metalloprotéases... Cependant, certaines études ont remis en cause le rôle central de ces protéases dans l'invasion tissulaire (Latge, 1999).

Les catalases jouent également un rôle important notamment de détoxification des peroxydes d'hydrogènes produits par les diverses cellules immunitaires de défense de l'hôte. Il existe trois types de catalases : l'une est produite par les conidies mais ne joue aucun rôle protecteur vis-à-vis des composés oxygénés, les deux autres sont d'origine mycélienne et offrent une protection partielle contre l'activité des leucocytes (Paris *et al.*, 2003).

Propriétés immunomodulatrices

Ces propriétés sont dues à la production de métabolites, aussi bien par les spores que par le mycélium d'*A. fumigatus*.

La substance la plus étudiée est la gliotoxine. D'origine mycélienne, elle inhibe la phagocytose par les macrophages. Cette endotoxine inhibe également la toxicité médiée par les lymphocytes T cytotoxiques, cellules qui ont un rôle prépondérant dans l'ABPA.

Les spores d'*A. fumigatus* peuvent également résister à la phagocytose en produisant un composé de bas poids moléculaire (<14 kDa). Celui-ci inhiberait la synthèse des dérivés oxygénés par les PNN et les macrophages avec une action plus rapide que la gliotoxine (Latge, 1999).

II. Les maladies aspergillaires

Les aspergillus sont à l'origine de pathologies très variées mais qui touchent préférentiellement le système respiratoire (Figure 3). La sévérité de l'aspergillose est fonction de plusieurs facteurs parmi lesquels le plus important est l'état du système immunitaire de la personne infectée.

Après avoir rappelé brièvement les atteintes aspergillaires de l'immunodéprimé puis celles de l'immunocompétent, nous nous intéresserons plus particulièrement à l'aspergillose broncho-pulmonaire allergique (ABPA) qui survient chez des sujets immunocompétents mais présentant des facteurs de risque locaux tels l'asthme ou la mucoviscidose.

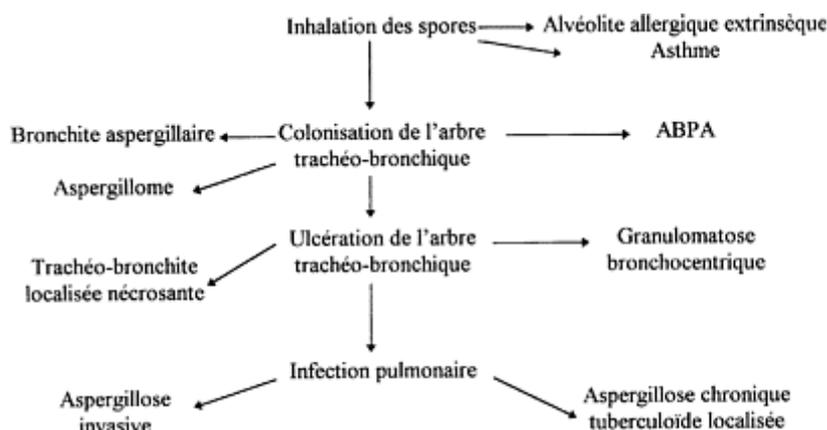


Figure 3 : Différentes formes cliniques des aspergilloses bronchopulmonaires (Germaud, 2005)

II.1. Atteintes aspergillaires de l'immunodéprimé

II.1.1. Aspergillose invasive

Ces formes d'aspergilloses touchent essentiellement les sujets atteints d'une immunodépression sévère et notamment les patients présentant une neutropénie profonde et prolongée (aplasie post-chimiothérapie lors du traitement d'une hémopathie maligne, aplasie après greffe de moelle allogénique voire autologue). Les transplantés d'organe et les patients atteints d'un SIDA évolué peuvent également développer une aspergillose invasive.

Le tableau clinique classique est celui d'une pneumopathie aiguë infectieuse résistante à l'antibiothérapie à large spectre : on parle d'aspergillose pulmonaire invasive (API). Elle se caractérise généralement par une fièvre supérieure à 38,5°C, une toux, une dyspnée, des douleurs thoraciques, des hémoptysies. Initialement localisé au poumon (parfois, l'atteinte primitive peut être sinusienne), l'aspergillus peut ensuite disséminer par voie hématogène vers différents organes (atteintes cérébrale, cardiaque, cutanée, osseuse, du tube digestif...). Si l'atteinte touche deux organes ou plus, on parle d'aspergillose disséminée.

Le diagnostic est posé face à un faisceau d'arguments cliniques, radiologiques, biologiques et histologiques. Au laboratoire, les examens réalisés sont d'ordre mycologique et immunologique. Le diagnostic mycologique se fait sur des

prélèvements obtenus par fibroscopie bronchique qui sont les plus contributifs (lavage broncho-alvéolaire, brossage endobronchique...) voire après biopsie pulmonaire. L'examen direct du prélèvement permettra de rechercher des filaments mycéliens puis la mise en culture permettra l'obtention du champignon et l'identification de l'espèce. Le diagnostic immunologique est basé essentiellement sur la recherche d'antigènes circulants du fait de l'immunodépression quasi constante (la recherche d'anticorps est donc peu contributive).

Le traitement repose sur l'utilisation d'antifongiques. Les molécules administrées seules ou en bithérapie sont : l'amphotéricine B en intraveineux (FUNGIZONE®) ou les formes lipidiques moins toxiques (ABELCET®, AMBISOME®), le voriconazole (VFEND®), la caspofungine (CANCIDAS®). L'itraconazole (SPORANOX®), actif également sur *Aspergillus*, n'est pratiquement plus utilisé dans ce cadre là.

II.1.2. Aspergillose pulmonaire semi-invasive

Cette forme clinique est aussi appelée aspergillose pulmonaire chronique nécrosante (APCN) ou par les anapathologistes, aspergillose pulmonaire chronique tuberculoïde localisée. Il s'agit d'une pathologie rare, survenant chez des patients souvent âgés dans un contexte d'immunodépression modérée (diabète, éthylisme, corticothérapie prolongée...).

Il s'agit d'une pneumonie évoluant insidieusement sur plusieurs mois avec des patients présentant une toux, de la fièvre, une altération de l'état général.

Le diagnostic est posé sur l'examen anatomopathologique d'une biopsie pulmonaire ou sur la mise en évidence du champignon sur des prélèvements respiratoires (expectoration, lavage bronchoalvéolaire), dans un contexte clinique et radiologique évocateur (infiltration au niveau des lobes supérieurs des poumons).

L'amphotéricine B constitue le traitement de référence, associée parfois à une chirurgie d'exérèse.

II.1.3. Bronchite aspergillaire

Il s'agit d'une infection rare qui correspond au développement du champignon au niveau de la muqueuse bronchique sans pénétration dans l'endothélium. Elle touche le plus souvent des sujets immunodéprimés (transplantés pulmonaires, bronchopneumopathies chroniques obstructives sous corticoïdes, SIDA). Elle se caractérise par une toux, une dyspnée, une hyperthermie. Le diagnostic repose sur une opacification radiologique et sur la présence de filaments mycéliens dans les crachats.

II.1.4. Aspergillose trachéobronchique nécrosante

Il s'agit d'une infection de la muqueuse plus ou moins invasive survenant dans un contexte d'immunodépression (transplantés pulmonaires, SIDA, hémopathies) et pouvant se compliquer d'une aspergillose pulmonaire invasive, d'obstructions bronchiques par des pseudomembranes... Les signes révélateurs sont la fièvre, la toux, les hémoptysies, la dyspnée. L'endoscopie met en évidence des lésions bronchiques nécrotiques, hémorragiques, recouvertes de pseudomembranes. Le pronostic, souvent favorable, dépend de la précocité du traitement, de l'importance de l'immunodépression et de l'extension des lésions (Germaud, 2005).

II.2. Atteintes aspergillaires de l'immunocompétent

II.2.1. Aspergillome

L'aspergillome est dû à la colonisation par *Aspergillus* d'une cavité intra-pulmonaire ou pleurale pré-existante, résultant d'une tuberculose ancienne, d'une infection pulmonaire à pyogènes, d'une sarcoïdose, d'un infarctus pulmonaire, de bronchectasies...

L'aspergillome peut être asymptomatique ou favoriser des surinfections bactériennes, une altération de l'état général, des hémoptysies, une aggravation de l'insuffisance respiratoire (Germaud, 2005).

Le diagnostic est évoqué devant la modification radiologique d'une cavité montrant une masse opaque de quelques centimètres surmontée d'un croissant clair (aspect caractéristique en "grelot"). De plus, la sérologie aspergillaire est le plus souvent positive. Par contre, l'isolement d'*Aspergillus* dans l'expectoration ou dans les prélèvements endobronchiques est inconstant (50 % des cas) (Germaud, 2005).

L'évolution de la maladie est souvent imprévisible : guérison spontanée (10 %), stabilisation (25 %), ou complications pouvant être mortelles telles les hémoptysies. Le traitement est préconisé seulement en cas d'hémoptysie grave : il s'agit d'un traitement chirurgical avec exérèse, en général une lobectomie. En cas de contre-indication chirurgicale, des traitements alternatifs médicaux sont proposés. L'itraconazole permet une réduction des symptômes mais pas l'élimination du champignon.

II.2.2. Aspergilloses ORL et ophtalmologiques

- **Sinusite aspergillaire**

La symptomatologie est peu caractéristique, elle mime une sinusite chronique banale. Par contre, chez l'immunodéprimé, elle est très sérieuse et peut évoluer vers une aspergillose invasive.

Le diagnostic repose sur l'identification du champignon dans les liquides biologiques ou sur les biopsies provenant des sinus ainsi que sur l'examen tomodensitométrique. La thérapeutique peut faire appel à l'Amphotéricine B à fortes doses mais la chirurgie est préconisée car elle permet d'éliminer le champignon et de se rendre compte de la localisation du foyer d'infection et de l'étendue des dommages tissulaires.

- **Otite externe aspergillaire**

Consécutives à une otite externe banale traitée par antibiothérapie ou corticothérapie, elles sont souvent provoquées par *Aspergillus niger*. Elles se caractérisent par un prurit associé à un écoulement et à des lésions érythémato-squameuses avec un tympan non endommagé.

- **Aspergilloses oculaires**

Ces pathologies peu fréquentes peuvent se situer à différents niveaux. L'atteinte de l'orbite est très souvent secondaire à une atteinte sinusienne. L'affection de la cornée résulte de l'administration de collyres contenant des corticoïdes ou des antibiotiques. Les voies lacrymales, la conjonctive et les paupières peuvent également être touchées à la suite d'un traumatisme. Une atteinte intra-oculaire peut être consécutive à une inoculation traumatique ou à une aspergillose invasive.

II.2.3. Asthme aspergillaire

Il s'agit d'un asthme classique de type I du sujet atopique où les structures antigéniques d'*Aspergillus* se comportent comme un pneumallergène. Cet allergène est plus fréquent dans les asthmes du milieu agricole. Le diagnostic repose sur la clinique, la réaction immédiate au test cutané et l'élévation des IgE spécifiques (Germaud, 2005). Par contre, la sérologie aspergillaire reste négative.

II.2.4. Alvéolite allergique extrinsèque

L'alvéolite allergique extrinsèque, aussi appelée "poumon du fermier", survient généralement chez des sujets non atopiques après inhalation de quantités importantes et répétées de spores aériennes d'*Aspergillus*. De plus, il existe probablement un facteur génétique, cette affection ne touchant qu'une partie des gens exposés (Germaud, 2005).

Les formes aiguës sont caractérisées par un syndrome pseudogrippal avec toux sèche, dyspnée. Le tableau subaigu est marqué par l'apparition d'une asthénie, d'un amaigrissement, d'une toux chronique, d'une dyspnée se majorant et d'un syndrome interstitiel. Enfin, le tableau chronique est consécutif à la répétition des expositions et se traduit par une insuffisance respiratoire chronique puis une fibrose pulmonaire.

Le diagnostic est porté sur l'aspect radiologique, sur les modifications des explorations fonctionnelles et sur la sérologie aspergillaire qui est positive.

II.2.5. Aspergillose bronchopulmonaire allergique (ABPA)

Cette pathologie est l'objet de notre étude et sera décrite dans le paragraphe suivant.

III. L'Aspergillose bronchopulmonaire allergique

III.1. Définition – Epidémiologie

L'aspergillose bronchopulmonaire allergique, aussi appelée maladie de Hinson et Pepys, est une maladie inflammatoire respiratoire d'hypersensibilité qui fait partie des étiologies du poumon à éosinophile. En effet, il existe un état inflammatoire de la muqueuse bronchique avec épaissement et présence d'infiltrats lymphocytaires et éosinophiliques.

L'ABPA se manifeste généralement à l'adolescence ou, plus couramment, chez le jeune adulte. Son incidence est plus élevée en Europe du Nord (notamment dans les régions agricoles) qu'aux Etats-Unis mais la prévalence de la maladie reste difficile à évaluer : en effet, les chiffres que l'on peut révéler dans les différentes publications donnent des écarts importants.

Cette pathologie survient essentiellement chez des patients souffrant d'asthme allergique chronique et ayant une sensibilité accrue aux pneumallergènes et aux trophallergènes communs (Tillie-Leblond *et al.*, 2005). L'ABPA peut également survenir chez des patients porteurs de mucoviscidose (touche de 1 à 10 % des malades en fonction des études), de fibrose pulmonaire ou d'autres maladies bronchopulmonaires. De plus, il semblerait que la mutation du gène CFTR ait une implication dans le développement de l'ABPA en l'absence du diagnostic de toute mucoviscidose (Marchand *et al.*, 2001).

III.2. Physiopathologie de l'ABPA

D'un point de vue physiopathologique, l'ABPA peut être définie par la coexistence, d'une part, de la colonisation puis du développement d'*Aspergillus* au niveau bronchique (*A. fumigatus* étant le plus fréquemment en cause) et, d'autre part, par une réaction d'hypersensibilité de l'organisme face aux antigènes fongiques. La plupart des patients atteints d'ABPA présente un asthme chronique ou une mucoviscidose constituant ainsi les deux principaux facteurs de risques propices au développement de l'aspergillus au niveau bronchique.

De plus, la présence de HLA-DR2, HLA-DR5 est un facteur de susceptibilité pour l'ABPA alors que HLA-DQ2 pourrait conférer une protection vis-à-vis de l'ABPA (Tillie-Leblond *et al.*, 2002).

Aspect infectieux de l'ABPA

Nous avons déjà vu que les anomalies du système muco-ciliaire (retrouvées dans l'asthme chronique, dans la mucoviscidose) tenaient une place importante dans la colonisation bronchique par les aspergillus. Ceux-ci, non éliminés par le système muco-ciliaire défaillant, sécrètent des produits qui altèrent les cellules épithéliales bronchiques et dépriment les défenses immunitaires.

Fraser puis Knutsen ont ainsi décrit le rôle des enzymes protéolytiques sécrétées par *A. fumigatus* (Fraser, 1993) (Knutsen *et al.*, 2002). Elles activent les cellules épithéliales bronchiques à l'origine d'une meilleure adhérence des spores et d'une meilleure pénétration des antigènes aspergillaires dans les cellules (Knutsen *et al.*, 2002). D'autre part, cette activation induit la sécrétion d'IL-6 et d'IL-8, cytokines pro-inflammatoires, l'afflux de polynucléaires neutrophiles, et favorise également la desquamation de l'épithélium respiratoire (Tomee *et al.*, 1997). Ainsi, la colonisation fongique est facilitée par les conditions locales de l'hôte mais elle met également en place tous les facteurs propices à sa chronicité (ce qui implique une stimulation antigénique continue).

Nous pouvons également rappeler que le développement du champignon dans l'arbre bronchique intervient sur les défenses immunitaires grâce à la synthèse de métabolites pouvant jouer sur la phagocytose, sur la production de radicaux libres par les cellules de l'immunité ou sur l'activité des lymphocytes cytotoxiques.

Les preuves de l'aspect infectieux de l'ABPA sont données par l'existence d'anticorps précipitants sériques de type IgG, et par la présence de spores voire de filaments mycéliens dans les expectorations des patients (Tillie-Leblond *et al.*, 2002).

Aspect immunologique de l'ABPA

En réponse à la pénétration des spores aspergillaires, le système immunitaire de l'organisme augmente la synthèse de lymphocytes T CD4 de type TH2 qui produisent de l'IL-5 à l'origine d'un afflux de PN éosinophiles et d'IL-4, d'IL-13 et de GM-CSF induisant une réponse humorale avec synthèse d'IgG, d'IgA et d'IgE spécifiques par les lymphocytes B.

De plus, les spores d'*Aspergillus* jouent le rôle de pneumallergènes qui peuvent être impliquées dans trois types de réactions d'hypersensibilité :

- une réaction de type I ou réaction d'hypersensibilité immédiate. Cette réaction est caractérisée par la présence d'IgE et est associée à la survenue de la crise d'asthme chez le patient exposé aux spores. Elle explique également la réaction cutanée positive à 20 minutes (test immédiat) et le taux élevé d'IgE totales et spécifiques chez les patients atteints d'ABPA.
- une réaction de type III ou réaction d'Arthus. Cette réaction est médiée par les IgM ou les IgG avec formation d'immuns complexes entre ces immunoglobulines et les structures antigéniques d'*Aspergillus*. Ceux-ci précipitent et se déposent au niveau des parois vasculaires et des tissus provoquant l'activation du système du complément et la prolifération des cellules inflammatoires. La répétition de ces phénomènes inflammatoires est à l'origine des lésions bronchiques, des infiltrats pulmonaires et l'existence d'un test cutané positif à 6 heures (test semi-retardé) peut être rattachée à cette réaction de type III.
- une réaction de type IV ou réaction d'hypersensibilité retardée. Cette réaction, médiée par des lymphocytes sensibilisés, reste discutée dans cette pathologie.

Longtemps considéré comme prépondérant dans la survenue de l'ABPA, l'aspect immunologique est actuellement plutôt perçu comme étant la conséquence d'un contact prolongé entre le champignon et l'hôte suite au développement de la moisissure au niveau bronchique grâce à des facteurs favorisants (asthme chronique, mucoviscidose).

III.3. Diagnostic de l'ABPA

Le diagnostic de l'aspergillose bronchopulmonaire allergique est difficile car aucun signe n'est spécifique de la maladie. Le contexte clinique et l'histoire du patient permettront d'évoquer le diagnostic. Celui-ci est fondé sur un ensemble de critères cliniques, radiologiques et biologiques.

III.3.1. Caractéristiques cliniques

Le tableau clinique classique est celui d'un asthme évoluant depuis plusieurs années et devenant résistant au traitement avec apparition d'une corticodépendance (Couturaud, 2003). L'épisode aigu survient habituellement en hiver et se traduit par des signes généraux et pulmonaires peu spécifiques et inconstants : altération de l'état général, fièvre, bronchospasme sévère, douleurs thoraciques, toux avec expectoration de moules bronchiques blancs ou bruns (appelés "plugs"), hémoptysies de faible abondance. Il s'agit d'une maladie évoluant par poussées d'exacerbations difficilement prévisibles et responsables de séquelles : broncheectasies, fibrose pulmonaire (Germaud, 2005).

Ainsi, un asthme qui s'aggrave sous traitement, notamment s'il s'accompagne d'une hyperéosinophilie sanguine et d'anomalies radiologiques chez un sujet atopique, doit amener à rechercher une aspergillose bronchopulmonaire allergique. Cependant, de rares cas d'ABPA sans asthme ont été rapportés (Glancy *et al.*, 1981).

L'évolution clinique, biologique et radiologique de l'ABPA se fait en cinq stades décrits dans le tableau II ci-dessous (Patterson *et al.*, 1982).

Tableau II : Stades cliniques de l'aspergillose bronchopulmonaire allergique

Stades	Clinique	IgE totales	Radiologie
Stade I - Aigu	Fièvre, toux, douleurs thoraciques, hémoptysies, expectorations	IgE t élevées (et éosinophiles)	Infiltrats pulmonaires
Stade II - Rémission	Asymptomatique	Baisse des IgE t et des éosinophiles	Régression des infiltrats
Stade III - Exacerbation	Asymptomatique ou idem stade I	IgE t élevées (doublement)	Infiltrats pulmonaires
Stade IV – Asthme corticodépendant	Asthme sévère persistant	IgE t élevées	Variable
Stade V - Fibrose	Cyanose, dyspnée sévère	IgE t variables	Fibrose, extension des bronchectasies

Au stade final, l'évolution ressemble à celle observée chez les sujets atteints de mucoviscidose. Ces patients souffrent d'une destruction extensive des bronches, d'une colonisation de l'arbre bronchique par notamment *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*. A ce stade, la réponse à la corticothérapie est mauvaise. Cependant, l'évolution du stade I au stade V est évitable et l'évolution du stade IV au stade V est particulièrement rare (Tillie-Leblond et Tonnel, 2005). En effet, la mise en place précoce d'un traitement permet de limiter les exacerbations, d'éviter l'évolution marquée par la destruction et donc d'éviter les séquelles : bronchectasies proximales, fibrose (Germaud, 2005) (Tillie-Leblond *et al.*, 2002).

III.3.2. Signes radiologiques

Deux types d'images sont habituellement retrouvés et répertoriés : ce sont des images labiles et des images permanentes.

Ces images peuvent être mises en évidence sur des radiographies thoraciques standards mais l'examen tomodensitométrique du thorax précise mieux les anomalies et s'avère plus sensible notamment sur les bronchectasies (Tillie-Leblond *et al.*, 2002).

- **Les images labiles**

- Les infiltrats parenchymateux

Ces infiltrats sont transitoires, uni- ou bilatéraux et atteignent principalement les lobes supérieurs. Leur aspect n'est pas spécifique de l'ABPA et peut même simuler des adénopathies pouvant faire évoquer une tuberculose.

- Les opacités

Elles peuvent prendre différents aspects et sont segmentaires ou lobaires. Il s'agit en fait d'atélectasies consécutives à l'obstruction bronchique par des bouchons muqueux. Les opacités en doigts de gants correspondent à des impactions mucoïdes dans une bronche dilatée.

Ces images disparaissent soit après corticothérapie soit après bronchoaspiration du bouchon muqueux mais la réexpansion est obtenue plus facilement et plus rapidement après corticothérapie.

Par contre, la persistance de ces mucosités serait à l'origine des bronchectasies proximales.

Ces lésions transitoires sont donc le reflet d'une poussée évolutive de la maladie.

- **Les images permanentes**

Elles apparaissent plus tardivement mais il est essentiel de porter le diagnostic avant la constitution de ces lésions irréversibles.

Les images obtenues sont variées et peu spécifiques de l'ABPA . Il s'agit d'atteintes du parenchyme pulmonaire donnant de l'emphysème, des atélectasies des lobes supérieurs, une fibrose pulmonaire caractérisant alors le stade V de la maladie, de bronchectasies de tous types.

Par contre, la présence de bronchectasies proximales est un des critères majeurs de l'ABPA. Les bronchectasies apparaissent là où existaient des infiltrats pulmonaires.

III.3.3. Examens biologiques

- **Les tests cutanés**

Ces tests sont utilisés afin de confirmer le terrain atopique en montrant des réactions d'hypersensibilité immédiate ou semi-retardée envers *A. fumigatus*.

Ces tests consistent en l'injection soit de solution antigénique pure d'*Aspergillus fumigatus*, soit de mélanges mixtes associant plusieurs espèces d'*Aspergillus*.

Deux techniques sont utilisées :

1. Prick-test
2. L'intradermoréaction

La lecture du test est immédiate avec mise en évidence d'une papule 10 à 15 minutes après l'injection (réaction d'hypersensibilité de type I) ou semi-retardée à partir de la 6^{ème} heure (réaction d'hypersensibilité de type III).

Les différents auteurs considèrent le test cutané en lecture immédiate comme indispensable au diagnostic même s'il semble acquis qu'il y a un grand nombre de réponses positives au test en dehors de tout diagnostic d'ABPA. En effet, il est retrouvé chez près de 40 % des patients asthmatiques atopiques (Malo *et al.*, 1977).

Par contre, un test positif en lecture semi-retardée n'est pas considéré comme un critère majeur du diagnostic, ce test n'étant en effet retrouvé que de façon inconstante.

- **Les IgE totales**

Nous avons déjà vu que la synthèse d'IgE lors de l'ABPA était liée à une hypersensibilité de type I, réaction immunologique qui caractérise la maladie. Ainsi, le dosage des IgE totales présente un intérêt diagnostique indéniable, leur élévation étant quasi constante dans une aspergillose bronchopulmonaire allergique (Ricketti

et al., 1984). Il est intéressant de noter que cette élévation ne concerne pas uniquement les IgE dirigées spécifiquement contre *Aspergillus fumigatus* mais l'ensemble de la classe des IgE (Patterson *et al.*, 1977).

Cependant, ce critère n'est pas du tout spécifique de l'ABPA et une élévation des IgE totales peut être observée chez la majorité des sujets atopiques.

Le dosage des IgE totales est également utile dans la surveillance de la maladie : en effet, de nombreux auteurs notent une élévation rapide et importante des IgE totales lors des exacerbations de la maladie qui sont donc un bon outil du suivi de l'activité de la maladie (Rosenberg *et al.*, 1977). Ainsi, il est recommandé de doser les IgE totales toutes les 6 à 8 semaines pendant la première année suivant le diagnostic afin de déterminer une valeur de base pour chaque patient. Un doublement des IgE totales par rapport à cette ligne de base indique que le patient présente un haut risque d'exacerbation (Tillie-Leblond et Tonnel, 2005).

De même, une diminution de leur taux est généralement observée après un traitement par corticoïdes (Ricketti *et al.*, 1984). Certains auteurs considèrent même qu'il serait possible d'ajuster le traitement en fonction du taux d'IgE totales (Imbeau *et al.*, 1978).

Le principe du dosage des IgE totales est basée sur des techniques immunoenzymatiques. La révélation se fait par des anticorps qui reconnaissent la chaîne lourde ϵ des immunoglobulines E, couplés à un substrat pouvant être chromogène ou à l'origine d'un produit fluorescent.

Les résultats sont rendus en UI/mL ou en ng/mL (1 UI/mL = 2,4 ng/mL).

- **La détection des immunoglobulines spécifiques d'*Aspergillus fumigatus***

Préalablement à la mise au point de techniques immunologiques pour le sérodiagnostic des aspergilloses de l'immunocompétent, il est indispensable d'identifier les antigènes majeurs d'*Aspergillus fumigatus* afin d'assurer une bonne spécificité à ces tests.

1. Les antigènes

Plusieurs équipes ont étudié la richesse antigénique d'*A. fumigatus*. Il s'avère qu'il existe une importante variabilité sur la composition des extraits du champignon en antigènes pouvant s'expliquer par l'intervention de plusieurs facteurs : temps d'incubation pour la culture du champignon, composition du milieu de culture, méthode d'extraction.... Il semble cependant que les meilleures préparations antigéniques soient obtenues pendant la phase active de croissance du champignon (24 heures à 37°C). Il faut également noter qu'il existe des différences entre les antigènes exprimés lors d'une culture *in vitro* et ceux retrouvés lors de la colonisation des tissus de l'hôte.

Au total, une centaine de protéines ou glycoprotéines pouvant lier les immunoglobulines humaines a été identifiée par Western-Blot après leur séparation par électrophorèse en fonction de leur poids moléculaire. Mais seule une douzaine a pu être réellement clonée et caractérisée après l'étude de leur fonction biochimique et de leur gène codant (Latge, 1999).

Parmi les antigènes les plus étudiés, les différentes catalases ont fait l'objet de plusieurs publications. Outre leur activité enzymatique protégeant le champignon contre les défenses de l'hôte, les catalases jouent également un rôle antigénique, notamment par l'intermédiaire d'une protéine tétramérique dont l'unité a un poids moléculaire de 90 kDa et qui est associée à la catalase 1. Lopez-Medrano et al. ont décrit cette protéine et ont montré que cet antigène pouvait être reconnu par 90,3 % des sérums de patients atteints d'aspergillome (Lopez-Medrano *et al.*, 1995).

Une dipeptidylpeptidase de 88 kDa joue également un rôle important dans le sérodiagnostic des aspergilloses de l'immunocompétent. Cet antigène est associé à l'activité chymotrypsine des aspergillus qui a avait été mise en évidence dès 1967 (Biguet et al., 1967).

Une RNase de 18 kDa est également décrite comme un antigène et un allergène majeur d'*A. fumigatus*. Dénommé restrictocine ou Asp f1, cet antigène appartient à la famille des mitogillines et possède plusieurs épitopes au niveau de sa région N-terminale susceptibles de se lier spécifiquement aux IgE et au IgG du patient. L'épitope P1, notamment, montrerait une plus grande spécificité de liaison aux IgE et

aux IgG spécifiques que l'antigène standard de diagnostic (mélange d'allergènes et d'antigènes obtenu à partir d'extraits d'*A. fumigatus*) (Madan *et al.*, 2004).

Pour détecter les anticorps spécifiques anti-*Aspergillus fumigatus*, les techniques immunologiques de sérodiagnostic peuvent utiliser les antigènes du champignon de trois façons différentes :

- utilisation d'un mélange antigénique d'*Aspergillus fumigatus*. La préparation de ces extraits est issue de source naturelle. Cependant, les conditions de l'isolement et de l'extraction peuvent altérer la composition antigénique du mélange.
- utilisation d'un ou plusieurs antigènes purifiés par diverses procédures biochimiques et/ou immunologiques, le but étant d'obtenir des mélanges antigéniques permettant de détecter de façon plus spécifique les anticorps anti-*Aspergillus fumigatus*.
- utilisation d'antigènes recombinants obtenus par des techniques de biologie moléculaire. Le but des différentes études est de trouver chez les patients atteints d'ABPA des IgG, des IgE, des IgM voire des IgA dirigées spécifiquement contre ces allergènes recombinants et surtout de montrer la spécificité de la réaction. De nombreux antigènes recombinants ont été synthétisés puis purifiés pour la mise au point de techniques de sérodiagnostic (Tableau III). Par exemple, une protéine recombinante de 18 kDa de la famille des mitogillines a été utilisée pour développer une technique Elisa. Les résultats de cette étude montrent une sensibilité de 100 % chez les patients atteints d'aspergillome (mais seulement de 64 % dans le cadre d'une aspergillose invasive) et une spécificité de 95 % (Weig *et al.*, 2001). Cependant, il n'existe actuellement aucune technique commerciale utilisant un antigène recombinant.

Tableau III : Principaux antigènes recombinants décrits dans la littérature

Masse moléculaire en kDa	Fonction biochimique	Références
18	RNase (Asp f1)	(Longbottom, 1986)
19	Peroxisomal protein	(Cramer, 1998)
19	Superoxide dismutase	(Hamilton <i>et al.</i> , 1995)
27	Superoxide dismutase	(Cramer, 1998)
33	Serine protease	(Reichard <i>et al.</i> , 1990)
38	Aspartic protease	(Reichard <i>et al.</i> , 1994)
40	Metalloprotease	(Monod <i>et al.</i> , 1993)
82	Metalloprotease	(Ibrahim-Granet et D'Enfert, 1997)
88	Dipeptidyl peptidase	(Beauvais <i>et al.</i> , 1997)
90	Catalase	(Hearn <i>et al.</i> , 1992)
94	Dipeptidyl peptidase	(Beauvais <i>et al.</i> , 1997)

2. Détection des IgE spécifiques

Le dosage est effectué actuellement par des techniques immunoenzymatiques appelées immunocap. Des extraits antigéniques d'*A. fumigatus* sont fixés dans le fond des « cap » avec une révélation identique à celle des IgE totales. Les résultats sont exprimés en unités arbitraires (U_A/mL) car il n'existe pas de standard OMS permettant de transposer les résultats d'une trousse de réactif à une autre. Ces résultats peuvent ensuite être exprimés de manière semi-quantitative (Tableau IV).

Il est à noter que l'ancienne méthode de RAST (méthode utilisant des radioéléments) n'est aujourd'hui pratiquement plus utilisée du fait du coût qu'elle engendre et des précautions qu'elle nécessite. Cependant, le terme de "RAST" est encore utilisé à tort pour désigner le dosage des IgE spécifiques.

Les IgE spécifiques sont utilisées comme un outil diagnostique de l'ABPA. Des études ont montré que les taux d'IgE spécifiques d'*Aspergillus fumigatus* étaient plus élevés chez les patients souffrant d'ABPA que dans les autres populations (asthmatiques atopiques, sujets avec des tests cutanés positifs à *A. fumigatus*, sujets témoins) (Malo *et al.*, 1977). Les IgE spécifiques sont donc un des critères diagnostiques majeurs de la maladie. Par contre, leur intérêt dans le suivi de la

maladie n'est pas primordial. En effet, les taux d'IgE spécifiques ne semblent pas varier de façon significative dans le temps et ni l'évolution de la maladie, ni le traitement n'auraient eu un impact significatif sur leur taux (Rosenberg *et al.*, 1978). Ainsi, une élévation des IgE anti-*Aspergillus fumigatus* peut persister plusieurs mois après un infiltrat, contrairement aux IgE totales (Ricketti *et al.*, 1984).

Tableau IV : classification semi-quantitative des taux d'IgE spécifiques

Classe	Résultat quantitatif (UA/mL)	Interprétation
0	0-0,35	Taux indétectables
1	0,35-0,70	Taux faibles
2	0,70-3,50	Taux modérés
3	3,50-17,50	Taux élevés
4	17,50-50	Taux très élevés
5	50-100	Taux très élevés
6	>100	Taux très élevés

3. Les immunoglobulines détectées en Mycologie médicale

Il faut distinguer les méthodes de dépistage des méthodes de confirmation. Ces dernières regroupent toutes les techniques d'immunoprécipitation qui restent les méthodes de référence (Bessières *et al.*, 2004).

Méthodes de dépistage

- La réaction d'hémagglutination indirecte (HAI) est une technique d'exécution facile et rapide, décrite par Senet (Senet et Brisset, 1973). Elle utilise des hématies sensibilisées constituées d'hématies de mouton recouvertes d'un mélange antigénique d'*Aspergillus fumigatus*. Les performances du test indiquées par le laboratoire Fumouze® montrent une

sensibilité de 80 % et une spécificité de 98 % (pour un titre d'anticorps hémagglutinants $\geq 1/640$). Elle permet la détection des anticorps hémagglutinants.

- Les techniques immunoenzymatiques n'ont une application commerciale que depuis peu de temps et leur place dans le diagnostic de l'ABPA (et des autres aspergilloses de l'immunocompétent) n'est pas encore bien définie. Les laboratoires IBL[®] et Virion[®] utilisent un mélange d'antigènes somatiques et métaboliques obtenu après culture du champignon (et sans purification préalable). Le laboratoire Mycobiotics[®] commercialise une technique (qui est l'objet de notre étude) développée dans l'unité de recherche de Parasitologie et Mycologie médicale UPRES EA 1155 de l'UFR de Pharmacie de Nantes. Après identification par Western-Blot des antigènes majeurs et de ceux supportant les réactions croisées, les antigènes d'intérêt ont été purifiés par chromatographie d'affinité. A ces antigènes semi-purifiés, a été ajoutée la catalase d'*Aspergillus fumigatus*.

Méthodes de confirmation

La confirmation sérologique repose sur des techniques d'immunoprécipitation qui constituent les méthodes de référence : ce sont donc les techniques les plus utilisées. Le principe repose sur l'observation d'arcs de précipitation correspondant à la réaction antigène-anticorps précipitants en milieu gélosé.

La double diffusion en gélose (technique d'Ouchterlony) et l'électrosynérèse sont de moins en moins utilisées ainsi que l'immunoélectrophorèse qui est une méthode longue (4 jours). De plus en plus de laboratoires utilisent aujourd'hui la technique d'immunoélectrophorèse rapide qui permet une lecture en quelques heures. La présence d'arcs de précipitation doit être complétée par la révélation d'arcs à support d'activité enzymatique spécifiques d'*Aspergillus fumigatus* : l'arc catalasique (fraction J) et/ou l'arc chymotrypsique (fraction C), sachant que l'arc catalasique est de révélation extrêmement facile (apparition de bulles d'oxygènes après avoir recouvert la lame d'eau oxygénée) (Bessières *et al.*, 2004).

La présence d'au moins deux arcs de précipitation ou du seul arc catalasique est en faveur du diagnostic d'aspergillose.

- **Eosinophilie sanguine**

Il est classiquement observé une hyperéosinophilie sanguine chez les patients non traités ou lors des épisodes d'exacerbation mais elle peut être masquée par la corticothérapie (Tillie-Leblond *et al.*, 2002).

- **Isolement en culture d'*Aspergillus***

Une culture de crachat positive avec isolement et identification d'un *Aspergillus* peut aider au diagnostic mais n'est pas pathognomonique de l'ABPA (Tillie-Leblond *et al.*, 2002).

III.3.4. Epreuves fonctionnelles respiratoires

Elles permettent d'évaluer le retentissement fonctionnel de l'ABPA. Lors de ces épreuves, plusieurs paramètres peuvent être déterminés : les capacités vitales (CV), le volume expiratoire maximal (VEMS), la diffusion du monoxyde de carbone (DLCO)...

III.3.5. Critères diagnostiques

- **Cas classiques d'ABPA**

Des critères majeurs ont été établis (Rosenberg *et al.*, 1977) mais certains ne sont pas essentiels au diagnostic tels l'existence ancienne ou actuelle d'infiltrats pulmonaires ou l'hyperéosinophilie sanguine qui peuvent n'être présents qu'à la phase aiguë de la maladie ou lors des exacerbations (Tillie-Leblond et Tonnel, 2005). Par contre, la présence de bronchectasies proximales est un bon critère avec une valeur prédictive positive excellente mais qui n'est pas toujours observable au moment du diagnostic.

D'autres critères dits mineurs peuvent également être pris en compte : expectorations d'impactions mucoïdes (ou moules bronchiques), présence d'*aspergillus* dans les expectorations (Tableau V).

Tableau V : Les critères de diagnostic dans l'ABPA

Critères majeurs	Critères mineurs
Asthme	Présence d' <i>A. fumigatus</i> dans les expectorations
Bronchectasies proximales	Expectorations d'impactions mucoïdes
Test cutané positif envers <i>A. fumigatus</i> en lecture immédiate	Test cutané positif envers <i>A. fumigatus</i> en lecture retardée
IgE totales élevées (>417 UI/mL)	
Présence d'anticorps précipitants envers <i>A. fumigatus</i>	
Hyperéosinophilie sanguine	
Infiltrats pulmonaires	
Elévation des IgE et/ou des IgG anti- <i>A. fumigatus</i>	

Pour poser un diagnostic d'ABPA, Greenberger propose en 2002 un minimum de 5 critères. Ainsi, chez les patients asthmatiques (1) présentant des bronchectasies proximales (2), la positivité du test cutané en lecture immédiate (3), des IgE totales élevées (4) et la présence d'IgE et/ou d'IgG spécifiques (5) suffisent au diagnostic (Greenberger, 2002).

Cependant, les bronchectasies proximales peuvent manquer. En effet, Greenberger décrit des patients avec bronchectasies centrales (ABPA-CB) et des patients qui satisfont tous les critères de l'ABPA exceptée la bronchectasie centrale. Ces derniers sont classés parmi les ABPA-S (séropositifs) (Greenberger *et al.*, 1993). Il s'agit de patients qui consultent à un stade précoce de la maladie ou qui présentent une forme modérée de la maladie.

- **Cas de l'ABPA dans la mucoviscidose**

Le diagnostic d'ABPA chez un malade atteint de mucoviscidose est beaucoup plus complexe. En effet, la plupart des critères utilisés dans le diagnostic de l'ABPA sont déjà des manifestations communes de la mucoviscidose. Lors des exacerbations de leur maladie, ces patients peuvent présenter une obstruction bronchique avec des infiltrats pulmonaires et des bronchectasies et ce, en dehors de tout diagnostic d'ABPA. De même, il est possible d'observer une augmentation de leur titre en anticorps anti-aspergillaires (IgE totales et spécifiques, IgG) en l'absence d'ABPA.

Dernièrement, la « Cystic Fibrosis Fondation » a proposé de nouveaux critères pour le diagnostic de l'ABPA dans le cadre de la mucoviscidose (Stevens *et al.*, 2003) :

- Détérioration clinique aiguë ou subaiguë sans autre étiologie (aggravation de la toux, de la dyspnée, augmentation des expectorations, dégradation des fonctions pulmonaires, asthme induit par l'exercice physique).
- IgE totales > 1000 UI/mL en l'absence d'une corticothérapie par voie systémique.
- Hypersensibilité immédiate envers *A. fumigatus* (test cutané positif en lecture immédiate) en l'absence d'un traitement par antihistaminique OU présence dans le sérum d'IgE spécifique envers *A. fumigatus*.
- Présence d'anticorps précipitants envers *A. fumigatus* (type IgG).
- Aspects radiologiques anormaux (infiltrats pulmonaires, présence de bouchons muqueux ou modifications inexplicables des clichés radiologiques par rapport à ceux attendus) OU présence de bronchectasies centrales ne disparaissant pas après antibiothérapie.

La présence des trois premiers critères (une concentration des IgE totales > 500 UI/mL peut suffire) associée à l'un des deux derniers critères est indispensable au diagnostic.

Le dépistage systématique de l'ABPA chez les patients atteints de mucoviscidose se fait à partir de six ans (l'ABPA est très rare avant cet âge) une fois par an ou plus si

la clinique le suggère (notamment si l'état du patient n'est que très peu amélioré, ou même pas du tout, après traitement antibiotique d'une infection bronchique bactérienne).

La surveillance est annuelle par un dosage des IgE totales. Si leur concentration est supérieure à 500 UI/mL, il est recommandé de réaliser un test cutané avec une lecture immédiate ou de déterminer la présence d'IgE spécifiques d'*A. fumigatus*.

III.4. Traitement de l'ABPA

III.4.1. Objectifs du traitement

Le traitement de l'ABPA a pour but de traiter les exacerbations de la maladie mais aussi de prévenir leur apparition (Stevens *et al.*, 2000). Nous avons, en effet, déjà vu que les exacerbations étaient à l'origine des complications de la maladie et notamment de l'évolution vers le stade final de l'ABPA caractérisée par les bronchectasies proximales et la fibrose pulmonaire. Il est donc primordial de limiter le nombre d'exacerbations chez un malade pour éviter l'évolution vers la destruction.

Le traitement de l'ABPA nécessite l'utilisation de deux types de molécules. D'une part, la corticothérapie doit permettre de limiter l'inflammation et la réponse immunologique (Vlahakis et Aksamit, 2001). D'autre part, l'utilisation de molécules antifongiques a pour but d'atténuer la prolifération d'*Aspergillus fumigatus* mais également de limiter l'inflammation des bronches (Wark *et al.*, 2003).

III.4.2. Thérapeutiques utilisées

- **La corticothérapie orale**

La corticothérapie est à l'heure actuelle le traitement de référence de l'ABPA. L'action anti-inflammatoire des corticoïdes permet une diminution des symptômes respiratoires (atténuation du bronchospasme), des signes radiologiques (disparition des infiltrats pulmonaires), des IgE totales et des éosinophiles. Les corticoïdes systémiques représentent le traitement le plus efficace des phases aiguës et des exacerbations de la maladie. Il n'existe pas d'effet inhibiteur direct sur *Aspergillus*

mais l'action anti-inflammatoire des corticoïdes limiterait les conditions favorables au développement d'*Aspergillus* (Fink, 2000).

Au stade I : La dose initiale préconisée est de 0,5 mg/kg/jour pendant 15 jours, suivie d'une diminution progressive de la posologie durant les 6 à 8 semaines suivantes en fonction de l'amélioration clinique et biologique (Tillie-Leblond et Tonnel, 2005). La prednisone réduit les symptômes et les signes d'asthme, minimise ou stoppe les expectorations, réduit les IgE totales d'au moins 33 % en quatre à six semaines et les éosinophiles sanguins significativement. Les examens radiologiques mettent en évidence une disparition progressive des infiltrats. Par contre, si les infiltrats persistent, il est conseillé d'augmenter les doses de corticoïdes jusqu'à 60 mg par jour pendant deux semaines.

Au stade II : si dans les 6 mois suivants le patient ne présente pas de nouvelles poussées d'exacerbations (caractérisées par de nouveaux infiltrats pulmonaires et par un doublement des IgE totales du patient par rapport à son taux de base), celui-ci est considéré en rémission (stade II). Un traitement de fond de l'asthme est alors proposé et peut inclure des corticoïdes inhalés et/ou des β_2 -mimétiques. La durée de la rémission est très variable d'un patient à l'autre et le suivi de la maladie (évolution clinique, dosage des IgE totales, examens radiologiques) doit permettre de traiter précocement les exacerbations. Il est à noter que le taux d'IgE totales sériques n'a plus beaucoup d'importance (celui-ci reste généralement élevé mais stable et est très variable d'un patient à l'autre) : c'est l'évolution de ce taux qu'il faut surveiller.

Au stade III : le terme d'exacerbation est employé quand le patient présente un nouvel infiltrat associé à un doublement des IgE totales. En tous cas, une brutale augmentation des IgE totales doit faire suspecter une phase active de la maladie. Le traitement par la prednisone est alors réinstauré comme au stade I. L'identification et le traitement précoce de ces exacerbations est primordial afin d'éviter l'évolution vers la fibrose pulmonaire.

Au stade IV : si l'état clinique du patient (asthme persistant) nécessite la poursuite d'un traitement par corticoïdes per os, le patient peut être classé en stade IV (asthme corticodépendant) (Greenberger, 2002). A ce stade là, la corticothérapie est

maintenue au long cours et à doses faibles (7,5 mg/jour de prednisone) mais de nouvelles exacerbations peuvent quand même survenir. Il est nécessaire de déterminer la dose minimale de corticoïdes à utiliser pour stabiliser le malade. Les traitements préventifs des complications de la corticothérapie au long cours doivent alors être proposés au patient.

L'utilisation de corticoïdes au long cours en systématique n'est pas recommandée pour plusieurs raisons. Tout d'abord, il n'a pas été prouvé qu'une corticothérapie de longue durée prévienne la destruction bronchique progressive. De plus, des exacerbations ont été décrites chez des patients recevant des doses élevées de corticoïdes par voie orale (Salez *et al.*, 1999). Enfin, exposer tous les patients aux effets secondaires de la corticothérapie (diabète, ostéoporose, syndrome de Cushing,...) n'est pas justifié car seule une minorité d'entre eux sont susceptibles d'avoir des lésions pulmonaires évolutives.

Au stade V: le pronostic est mauvais : les patients présentent une fibrose pulmonaire se traduisant par une atteinte irréversible de leurs fonctions respiratoires. Les examens radiologiques montrent une bronchectasie centrale ainsi que de nouveaux infiltrats attribuables à des surinfections bactériennes (notamment à *Pseudomonas*) traitées par antibiothérapie. Le patient reste sous corticoïdes par voie orale mais ses effets sont peu satisfaisants (Tillie-Leblond et Tonnel, 2005).

Il est important de noter que la progression vers le stade V est évitable pour la majorité des patients à condition que le diagnostic d'ABPA soit porté précocement et que les exacerbations soient traitées efficacement.

- **La corticothérapie inhalée**

L'utilisation de corticoïdes par voie inhalée reste discutée. Si certaines études notent un impact des corticoïdes inhalés à faible dose sur un arrêt ou un sevrage plus rapide de la corticothérapie orale (Germaud et Tuchais, 1995) (Hitton et Chatterjee, 1975), d'autres ne notent aucune action sur les exacerbations cliniques ou radiologiques de l'ABPA (Balter et Rebeck, 1992). En fait, il semblerait que les corticoïdes inhalés soulagent les symptômes de l'asthme mais n'atténuent pas les

mécanismes inflammatoires de l'ABPA. L'utilisation à forte dose de ces médicaments pourrait présenter un plus grand intérêt dans le traitement de l'ABPA (Imbeault et Cormier, 1993) mais les observations ne portaient que sur deux patients.

- **L'itraconazole et les autres antifongiques**

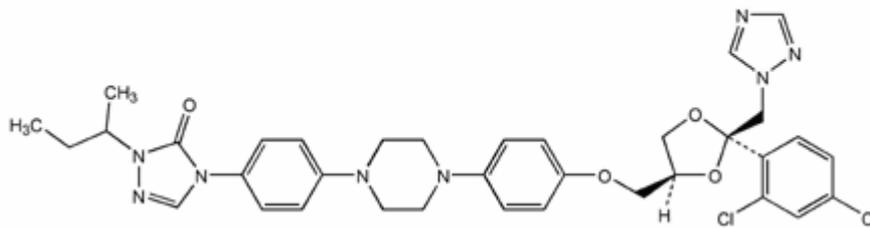


Figure 4 : Formule chimique de l'itraconazole

Plusieurs études concernant l'utilisation des antifongiques par voie orale ou inhalée ont été réalisées (Leon et Craig, 1999). Leur action a pour but de limiter la colonisation bronchique, donc la stimulation antigénique et ainsi réduire la réponse inflammatoire. Ils réduiraient sur le long terme la progression de la maladie (Stevens *et al.*, 2003).

Les antifongiques ayant une efficacité connue sur les aspergillus sont l'amphotéricine B et les azolés comme le kétoconazole et l'itraconazole. L'utilisation d'amphotéricine B est limitée par sa toxicité et par son coût. L'itraconazole (Figure 4) est la molécule la plus prometteuse : molécule hautement active sur l'aspergillus, elle présente moins d'effets secondaires que le kétoconazole (bien qu'elle puisse provoquer des nausées et des vomissements dose-dépendants). Ce triazolé a une action spécifique sur une enzyme à cytochrome P450 : la 14- α -déméthylase qui intervient dans la transformation du lanostérol. Le blocage de ce système enzymatique se traduit par une déplétion en ergostérol, composant essentiel de la membrane fongique. De plus, l'accumulation de dérivés méthylés du lanostérol est également toxique pour la cellule fongique.

Plusieurs études sur de petites séries ont montré l'intérêt du traitement par l'itraconazole en association avec la corticothérapie voire en monothérapie. Une

diminution du nombre d'exacerbations, une amélioration des paramètres biologiques et des épreuves fonctionnelles ont été observées. Ces améliorations ont même permis de réduire les doses de corticoïdes voire même de sevrer une partie des patients (Salez *et al.*, 1999). De plus, l'itraconazole aurait un effet anti-inflammatoire dans l'ABPA (Wark *et al.*, 2003).

L'usage de l'itraconazole est préconisé comme alternative thérapeutique à la corticothérapie orale en cas d'échec (fréquentes exacerbations) ou d'intolérance aux corticoïdes à la dose de 200 mg par jour pendant une durée d'au moins six mois. Il peut également être utilisé pour son action synergique à la corticothérapie pour diminuer les doses de corticoïdes (Germaud *et al.*, 2001)

Matériels et méthodes

I. Objectifs des travaux

Nos travaux portent sur l'évaluation d'une trousse de diagnostic *in vitro* de type Elisa de chez Mycobiotics® et destinée à doser les IgG anti-*Aspergillus fumigatus*. Notre approche est composée de deux études bien distinctes avec des objectifs différents :

- une première étude de performance dont l'objectif principal est de valider le coffret Elisa dans le diagnostic des aspergilloses de l'immunocompétent en comparaison à la technique de référence représentée par l'immunoélectrophorèse et à l'autre technique de sérologie aspergillaire utilisée en routine au laboratoire de Mycologie médicale : l'hémagglutination indirecte. La sensibilité sera testée sur des patients atteints d'aspergillose possédant au moins l'arc catalasique en immunoélectrophorèse. L'étude des réactions croisées (spécificité) sera faite sur une population souffrant de candidoses, de pathologies à l'origine de désordre immunologique et sur des sujets sains.
- une deuxième étude, qui constitue l'essentiel de notre travail, aura pour but de démontrer l'intérêt de la technique Elisa dans l'ABPA. Elle sera comparée à l'immunoélectrophorèse et à l'hémagglutination indirecte. La population étudiée concernera exclusivement des patients atteints d'ABPA et suivis au CHU de Nantes en Pneumologie. Cette étude sera rétrospective et prospective et portera sur la période 2001-juin 2006.

II. Méthodes sérologiques

II.1. Hémagglutination indirecte (HAI)

Le test Aspergillose FUMOUIZE® permet la détermination quantitative des anticorps sériques dirigés contre *Aspergillus fumigatus* par hémagglutination indirecte (Annexe 1).

La présence d'anticorps sériques spécifiques entraîne une agglutination des hématies sensibilisées (hématies de mouton recouvertes par un antigène d'*Aspergillus fumigatus*) qui se traduit par un voile rouge/marron tapissant le fond de la cupule. En l'absence d'anticorps spécifiques, ces hématies sédimentent au fond de la cupule sous forme d'un anneau.

Les sérums des patients, les témoins positif et négatif sont testés à différentes dilutions (1/80, 1/160, 1/320...) dans les cupules de la microplaque. La lecture se fait après un contact de deux heures de chacune des dilutions avec des hématies sensibilisées par l'antigène aspergillaire.

Le titre est donné par la dernière dilution où une réaction d'hémagglutination peut être observée (c'est à dire la première dilution où un anneau large et périphérique est observé). Un titre strictement supérieur à 1/320 est en faveur d'une aspergillose profonde.

II.2. Immunoélectrophorèse (IE)

Le technique Paragon de chez BECKMAN® permet de mettre en évidence la présence d'anticorps sériques précipitants dirigés contre *Aspergillus fumigatus*.

Le principe de la technique est basé sur la migration successive par électrophorèse d'un mélange antigénique d'*Aspergillus fumigatus* et du sérum du patient. La présence d'anticorps précipitants dirigés contre différents épitopes des antigènes aspergillaires se caractérise par des arcs de précipitation au point de rencontre entre l'antigène et l'anticorps.

La réaction se fait sur un gel d'agarose sur lequel est déposée la fraction antigénique (composée d'antigènes somatiques et métaboliques) fournie par PASTEUR®. Une électrophorèse permet la séparation et la migration des différents antigènes

contenus dans la fraction. Puis, le sérum du patient est distribué sur ce même gel d'agarose. Les anticorps potentiellement présents dans le sérum vont rencontrer les différents antigènes après une incubation permettant leur immunodiffusion. La réaction antigène-anticorps se caractérise alors par une précipitat qui est mis en évidence par coloration.

Dans le cadre de l'aspergillose, il est important de rechercher la présence d'un arc catalasique, très spécifique des *Aspergillus*. Pour cela, on immerge les gels où un ou plusieurs arcs de précipitation sont observés dans de l'eau oxygénée. La présence de bulles au niveau d'un arc signe une activité catalasique.

La présence d'au moins deux arcs de précipitation ou du seul arc catalasique est en faveur d'une aspergillose évolutive.

II.3. Technique Elisa IgG *Aspergillus fumigatus* (Mycobiotics[®])

Il s'agit d'un test immunoenzymatique pour la détection des anticorps IgG dirigés contre *Aspergillus fumigatus* dans le sérum humain. Cette trousse est conservée à une température comprise entre 2°C et 8°C à l'abri de la lumière.

➤ Principe

Le kit est composé d'une plaque de 96 puits contenant une fraction semi-purifiée d'*Aspergillus fumigatus*, composée de protéines d'origines somatique et métabolique, et enrichie par la catalase d'*Aspergillus fumigatus*.

Les sérums des patients et les contrôles dilués sont incubés dans les puits pour permettre à tout anticorps spécifique présent de réagir avec l'antigène. Les puits sont lavés pour éliminer les composants non spécifiques de l'échantillon. Le conjugué est ensuite ajouté à chaque puits pour se fixer au complexe antigène-anticorps formé. Après un lavage pour éliminer le conjugué en excès, un substrat chromogène est ajouté aux puits pour permettre le développement de la coloration. Après addition de la solution d'arrêt, le changement de coloration est mesuré au spectrophotomètre par lecture de la densité optique. L'intensité de la couleur développée est proportionnelle à la concentration en anticorps dans les échantillons et les contrôles de référence. Le

résultat obtenu avec l'échantillon est comparé à celui obtenu avec le calibrateur (seuil ou cut-off) pour interpréter l'analyse. Les résultats des contrôles de référence (négatif et positif) valident le test.

➤ Préparation des réactifs, des contrôles et des échantillons

Le flacon réactif n° 5 est dilué au 1/10 avec de l'eau distillée ce qui constituera le tampon de lavage.

Chaque contrôle (positif, négatif et calibrateur) nécessite une dilution au 1/11 dans le diluant prêt à l'emploi.

Chaque échantillon de sérum est dilué au 1/101 dans le même diluant.

Les dilutions des contrôles et des sérums sont effectuées dans des tubes à hémolyse.

➤ Mode opératoire

La première étape consiste à incuber les sérums et contrôles dilués dans les puits de la plaque Elisa. Après avoir distribué 100 µL de chaque contrôle dilué et 100 µL de chacun des sérums à tester, les puits sont recouverts avec une bande adhésive et la plaque est mise à incuber 1 heure à 37°C.

La deuxième étape est une étape de lavage. Le contenu des puits est vidé et du tampon de lavage est rajouté dans chacun des puits. Après quelques secondes de contact, le tampon est éliminé. Cette opération est répétée trois fois.

Lors de la troisième étape, 100 µL du Conjugué sont distribués dans les puits qui sont recouverts d'une bande adhésive et mis à incuber 1 heure à 37°C.

La quatrième étape est une étape de lavage identique à la deuxième étape.

Lors de la cinquième étape, 100 µL de substrat sont rajoutés dans chaque puits. La plaque Elisa est recouverte d'une bande adhésive et mise à incuber 15 minutes à 37°C à l'abri de la lumière.

Pour stopper la réaction (sixième étape), 100 µL de solution d'arrêt sont ajoutés dans tous les puits (la couleur des puits positifs vire du bleu au jaune).

Lors de la dernière étape, la densité optique (DO) est mesurée immédiatement après l'arrêt de la réaction à l'aide d'un spectrophotomètre réglé à la longueur d'onde de 450 nm (la longueur d'onde de référence étant de 620 nm).

➤ Interprétation des résultats

Pour chaque sérum testé et pour les contrôles positif et négatif, un index est calculé :

$$\text{Valeur de l'index} = \text{DO du contrôle ou de l'échantillon} / \text{DO du calibrateur}$$

Il existe plusieurs critères de validation du test Elisa Mycobiotics°. Tout d'abord, la densité optique du calibrateur doit être comprise entre 0,4 et 1,0. Ensuite, la valeur index du contrôle positif doit être supérieure à 1,5. Enfin, la valeur index du contrôle négatif doit être inférieure à 0,5.

Une valeur index supérieure à 1,1 indique un résultat positif (présence d'anticorps IgG spécifiques anti-*Aspergillus fumigatus*).

Une valeur index inférieure à 0,9 indique un résultat négatif (absence d'anticorps anti-*Aspergillus fumigatus*).

Un index \geq à 0,9 mais \leq à 1,1 est considéré comme un résultat douteux.

Résultats et discussion

I. Etude de performance de la trousse Elisa Mycobiotics[®]

Une première étude a visé à évaluer la trousse Elisa IgG *Aspergillus fumigatus* dans le cadre d'une démarche diagnostique de l'aspergillose chez l'immunocompétent. Ce nouveau test sera comparé avec les outils utilisés en routine par le laboratoire de Mycologie médicale : l'hémagglutination indirecte et l'immunoélectrophorèse.

I.1. Population étudiée

Les sérums testés provenaient du service de Parasitologie, Mycologie médicale de l'Institut de biologie du CHU de Nantes. Au total, 194 sérums provenant de 156 sujets ont été testés. Ils sont répartis de la manière suivante : patients atteints d'aspergillose (ABPA, aspergillome, aspergillose pleurale) (n=33), candidoses (6), paludisme (6), patients présentant un terrain et des signes cliniques compatibles avec une aspergillose mais avec IE et HAI négatives (25) et 71 sujets sains.

I.2. Répétabilité et reproductibilité

- La répétabilité : cinq sérums ont été évalués 8 fois dans la même série. Les coefficients de variation ne dépassent jamais 10 %.
- La reproductibilité inter-série : les cinq sérums ont été étudiés dans 4 séries distinctes. Les coefficients de variation ne dépassent jamais 15 %.

I.3. Corrélation Elisa-Immunoélectrophorèse

Il existe une corrélation ($r=0.92$, $p<0.0001$) entre le nombre d'arcs de précipitation en immunoélectrophorèse PARAGON[®] et l'index obtenu en Elisa.

I.4. Sensibilité et spécificité

La sensibilité de la trousse Elisa IgG a été évaluée sur 33 sérums d'aspergillose possédant au moins l'arc catalasique en IE. Deux sérums ont un index négatif mais uniquement l'arc catalasique en IE.

Les 71 sujets sains sont négatifs, de même que les 6 sujets atteints d'une candidose et les 6 atteints d'un paludisme. Parmi les 25 sérums de patients présentant un terrain et des signes cliniques compatibles avec l'aspergillose (mais sérologiquement négatifs en IE et en HAI), 2 sérums ont un index faiblement positif.

Sur l'ensemble de l'étude, la sensibilité, la spécificité, les valeurs prédictives négative et positive du test Elisa *Aspergillus* IgG s'élèvent respectivement à 95.8, 98.1, 98.1 et 95.8 %. L'étude montre que ce test pourrait contribuer efficacement au diagnostic de l'aspergillose de l'immunocompétent. Toutefois, il s'agit là d'une étude sur des sérums isolés qui ne prend donc pas en compte l'aspect longitudinal d'un suivi de patient.

II. Etude de l'intérêt de la trousse Elisa dans l'approche diagnostique et pronostique de l'ABPA

Tout d'abord, nous pouvons rappeler que les complications de l'ABPA, et notamment la fibrose pulmonaire, sont liées au nombre et à la sévérité des exacerbations de la maladie. La bonne prise en charge du malade passe donc par un suivi régulier permettant de dépister puis traiter rapidement les épisodes d'exacerbation. L'idéal serait de pouvoir les détecter précocement avant l'apparition des signes cliniques et radiologiques qui sont déjà le reflet d'une destruction au niveau pulmonaire. Notre étude se positionne dans cette optique. De plus, après la mise en place d'un nouveau traitement (ou d'une nouvelle cure de traitement), il est important de pouvoir évaluer son efficacité. Notre étude essaiera également d'évaluer l'intérêt de la trousse Elisa dans ce contexte.

II.1. Population étudiée

Cette seconde étude porte sur des patients dont le diagnostic d'ABPA a été posé sur un terrain autre que la mucoviscidose. En effet, sur ce terrain, la colonisation bronchique par *Aspergillus fumigatus* est très fréquente ce qui peut se traduire notamment par des sérologies aspergillaires positives en IE en dehors de tout contexte d'ABPA. Du fait de la difficulté de différencier ABPA d'une simple colonisation bronchique, les patients atteints de mucoviscidose ont été exclus de notre étude.

Une première liste regroupant tous les patients atteints d'une ABPA (hors mucoviscidose) et suivis au CHU de Nantes m'a été transmise par le service de Pneumologie. Cette liste regroupe 34 patients mais pour trois d'entre eux, le diagnostic d'ABPA n'est pas certain : ils ont donc été exclus de notre étude. Un autre patient, qui a été perdu de vue depuis 2002, n'a également pu être inclus dans notre étude. D'autre part, six personnes, qui sont suivies (ou qui ont été suivies) régulièrement au CHU de Nantes, n'ont pas eu de bilan sérologique depuis 2002, soit du fait d'un suivi sérologique effectué dans un laboratoire autre que celui du CHU de Nantes, soit du fait d'une ABPA non évolutive cliniquement ne nécessitant pas un suivi des sérologies aspergillaires.

Au final, 23 patients ont été inclus dans notre étude (68 % des patients de la liste primaire) qui se répartissent en 11 hommes (48 %) et 12 femmes (52 %). Cette étude porte sur les sérums des années 2001 à 2006 pour un total de 115 sérums et une moyenne de 5 sérums par patient.

Les sérums des patients seront récupérés soit au niveau du site de La Chevrolière dans une chambre froide à -80°C (années 2002 et 2003), soit sur le plateau technique de l'Hôtel Dieu (années 2004, 2005, 2006) dans des congélateurs à -20°C .

II.2. Résultats des trois techniques sérologiques

II.2.1. Résultats de l'hémagglutination

L'HAI est considérée comme positive pour un titre supérieur à 1/320 et la réaction est douteuse pour un titre égal à 1/320. Dans ces conditions, seuls 3 sérums sur 114

sont positifs et 5 sérums sont douteux ce qui représente des pourcentages de 2,6 % et 4,4 % respectivement (Figure 2). Ainsi, 93 % des sérums issus de patients atteints d'ABPA ont une sérologie aspergillaire négative en HAI.

II.2.2. Résultats des dosages en Elisa

Certains sérums n'ont pu être dosés par la technique Elisa de Mycobiotics®. Tout d'abord, les sérums de l'année de 2001 avaient déjà été détruits au moment du début de notre étude. Ensuite, certains sérums des années 2002 à 2006 n'ont pu être retrouvés dans les différentes sérothèques (les raisons peuvent être multiples : quantité insuffisante pour une congélation, sérum déjà utilisé dans une autre étude...). Au total, le dosage des IgG anti-*Aspergillus fumigatus* a été effectué sur 97 sérums.

Nous avons déjà précisé que la sérologie aspergillaire était positive en Elisa pour des index supérieurs à 1,1 et douteuse pour des index compris entre 0,9 et 1,1. Nous avons ainsi un nombre de sérums positifs en Elisa de 66 ce qui correspond à 68 % des sérums de patients atteints d'ABPA. Une réaction est rendue douteuse dans 6 cas soit 6,1 % des sérums (Figure 3).

II.2.3. Résultats de l'immunoélectrophorèse

En considérant que l'immunoélectrophorèse est positive dès la présence de deux arcs de précipitation ou d'un seul s'il s'agit de l'arc catalasique, une sérologie aspergillaire positive en immunoélectrophorèse a été observée pour 81 sérums sur les 115 de l'étude, soit 70,4 % des prélèvements (Figure 4).

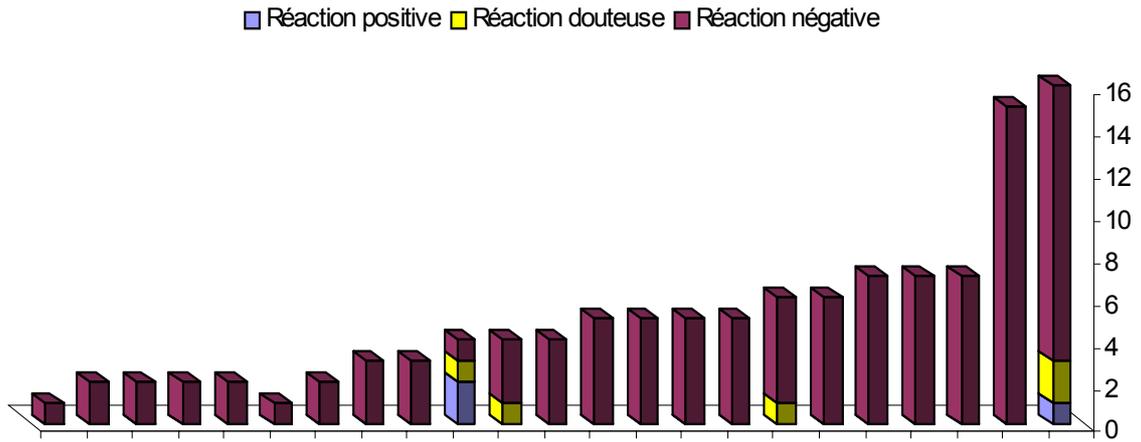


Figure 5 : Répartition par patient des sérologies aspergillaires positives en HAI



Figure 6 : Répartition par patient des sérologies aspergillaires positives en Elisa

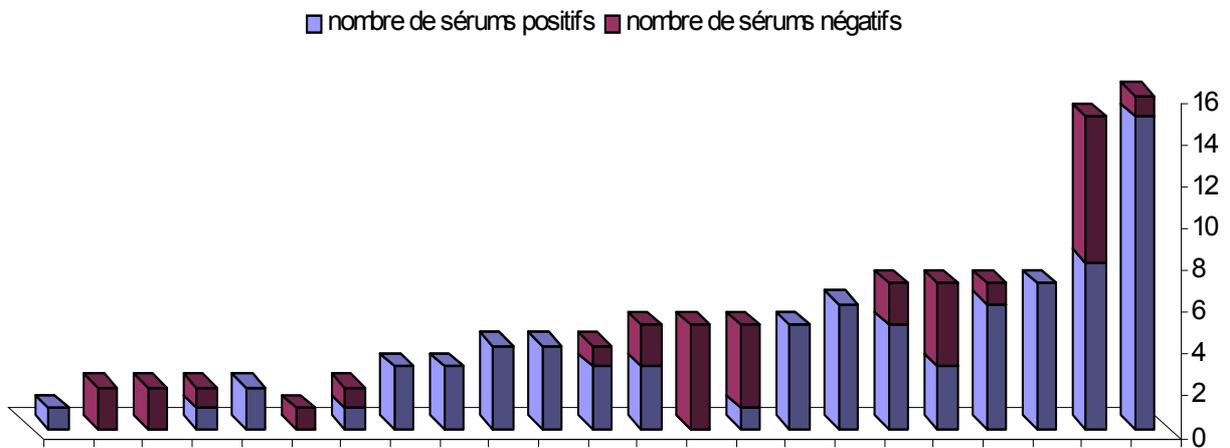


Figure 7 : Répartition par patient des sérologies aspergillaires positives en IE

Ces premiers résultats révèlent tout d'abord la très faible sensibilité de l'HAI dans l'ABPA. Utilisée comme technique de dépistage au laboratoire de Parasitologie-Mycologie du CHU de Nantes, nous pouvons donc remettre en cause son intérêt dans l'ABPA. Cependant, le diagnostic d'aspergillose chez un sujet immunocompétent doit comprendre une technique de dépistage et une technique de confirmation. Trois techniques de dépistage sont actuellement disponibles sur le marché : l'HAI (technique la plus ancienne) et deux techniques Elisa récentes (commercialisées par Virion[®] et IBL[®]) pour lesquelles il n'existe aucune étude dans la littérature et dont l'évaluation au CHU de Nantes n'a pas été concluante.

Les résultats obtenus avec l'Elisa Mycobiotics[®] dans l'ABPA montrent le plus grand intérêt de cette technique par rapport à l'HAI. Reste maintenant à montrer que, dans le contexte de l'ABPA, il existe une concordance suffisante entre l'Elisa et la technique de référence : l'IE.

II.3. Concordance des résultats IE-Elisa

Nous avons comparé les résultats obtenus en immunoélectrophorèse à ceux de la technique Elisa (Tableau VI). Les résultats sont pris en compte de façon qualitative (positif, négatif voire douteux pour l'Elisa). Il est ainsi possible de distinguer trois groupes :

- Un premier groupe où il existe une **concordance** entre les résultats obtenus dans les deux techniques et qui concerne un total de 66 sérums soit 68 % des prélèvements. Au sein de ce groupe, 54 sérums sont positifs en IE et en Elisa (82 % des sérums concordants) et 12 sérums sont négatifs dans chaque technique (18 % des sérums concordants) (Figure 8).
- Un deuxième groupe où est observée une **discordance** de résultats entre les deux techniques, concernant 25 sérums soit 26 % des sérums. Deux cas peuvent être alors envisagés : pour 12 sérums, seule la technique Elisa est positive (48 % des sérums discordants) mais pour 13 sérums, seule l'IE est positive (52 % des sérums discordants).
- Enfin, nous avons déjà vu que 6 sérums étaient douteux en Elisa avec une IE positive dans 3 cas et négative pour les 3 autres.

Tableau VI : Comparaison des résultats qualitatifs en Elisa et en IE (n=97)

		Elisa	
		Positive	Négative
IE	Positive	54	13
	Négative	12	12

Remarque : 6 cas douteux en Elisa non comptabilisés

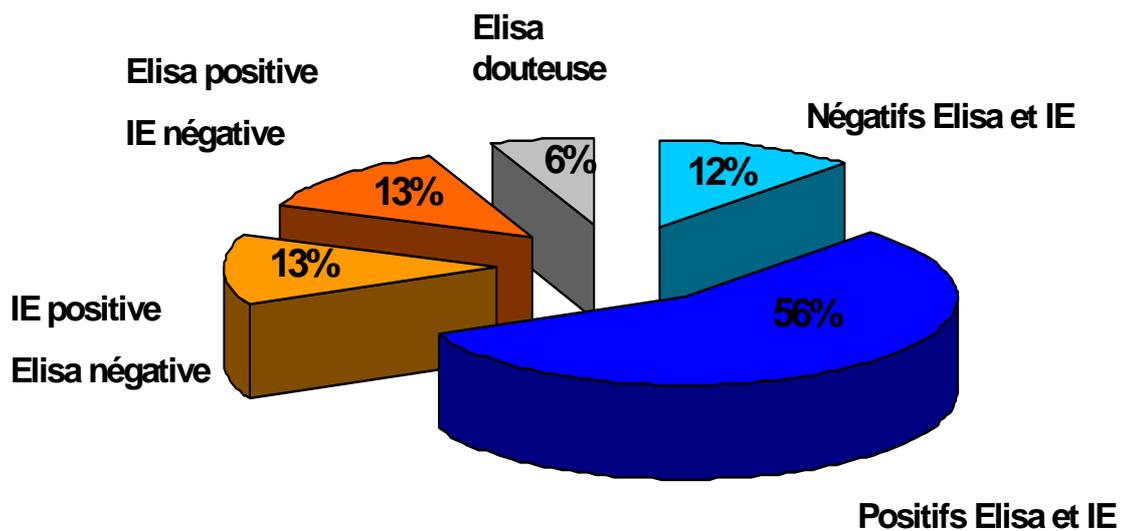


Figure 8 : Pourcentage des différents cas de figure dans l'analyse de concordance

Bien que ces deux techniques détectent des IgG, la concordance des résultats n'est pas aussi élevée que celle qu'on pourrait attendre. Deux explications :

- L'Elisa, qui utilise la protéine A comme conjugué, détecte certains isotypes d'IgG ainsi que les IgM avec une très faible affinité. L'IE détecte des IgG précipitantes donc potentiellement des isotypes différents.

- Il existe des différences entre les deux techniques en fonction des stades de l'ABPA.

Ces résultats visent à évaluer la possibilité d'utiliser l'Elisa comme technique de dépistage dans l'ABPA. En pratique, cela signifie que la technique de confirmation (l'immunoélectrophorèse) ne serait réalisée que dans le cas d'une Elisa positive. D'un point de vue biologique, une technique de dépistage doit être le plus sensible possible afin d'éviter la non détection de cas positifs. Par conséquent, dans notre étude, les cas concordants (68 %) de même que les cas montrant une Elisa positive non confirmée par l'IE (13 %) ne posent pas de problème. De plus, dans le cadre d'un dépistage, les 6 % de résultats douteux en Elisa doivent être considérés comme positifs afin que la technique de confirmation soit réalisée. Par contre, 13 % des sérums posent problème : il s'agit des sérums montrant une Elisa négative alors que l'IE avait été rendue positive. Biologiquement parlant, il n'est donc pas raisonnable d'utiliser l'Elisa seule comme technique de dépistage de l'ABPA.

Cependant, l'interprétation des résultats de façon globale dans une maladie comme l'ABPA est biaisée. En effet, cette pathologie se caractérise par l'alternance de poussées d'exacerbation et de période de rémission rendant nécessaire une interprétation des résultats au cas par cas.

II.4. Analyse clinico-biologique par patient

Après avoir envisagé les résultats de façon globale, nous allons nous intéresser aux résultats de l'immunoélectrophorèse, de l'HAI et de l'Elisa patient par patient. Le but est de mettre en relation différents critères de diagnostic et de suivi dans l'ABPA avec le contexte clinique. Nous allons notamment étudier l'évolution de l'index Elisa en parallèle avec celle du nombre d'arcs en immunoélectrophorèse avec pour objectif d'estimer l'impact des différents épisodes (exacerbations, rémissions) et de la prise en charge thérapeutique sur ces deux techniques de dosage des anticorps IgG anti-aspergillaires. Nous avons retenu pour cette étude 16 patients pour lesquels nous avons un minimum de 3 dosages en Elisa sur la période 2002-2006.

II.4.1. Madame C. Marie-Madeleine (70 ans)

En 1994, une aspergillose bronchopulmonaire allergique est diagnostiquée chez cette patiente qui souffre d'asthme depuis l'enfance.

Après une exacerbation en janvier 2001 ayant conduit à un traitement par itraconazole (jusqu'en septembre 2001), la patiente se trouve dans un bon état général en avril 2001 et la radiographie montre une régression des opacités.

En **novembre 2001**, une nouvelle exacerbation est suspectée face à des expectorations brunâtres, une asthénie, un infiltrat au niveau du lobe supérieur gauche et des éosinophiles à 1,3 G/L. Un traitement par corticoïdes est débuté seul puis associé avec de l'itraconazole à partir de janvier 2002.

En mars 2002, l'état général et respiratoire est bon avec une régression des images pulmonaires et des éosinophiles à 0,6 G/L. Les corticoïdes sont arrêtés mais le Sporanox[®] est maintenu.

En **septembre 2002**, la patiente est bien cliniquement mais on observe des opacités, les IgE t sont à 3388 UI/mL (contre 1129 en mai) et les éosinophiles remontent à 1,4 G/L. Le diagnostic d'exacerbation est retenu et une nouvelle corticothérapie orale est mise en place.

En mai 2003, on observe une amélioration mais la régression des signes cliniques et radiologiques n'est pas satisfaisante : les corticoïdes sont poursuivis. Malgré quelques expectorations en août, l'évolution est favorable et le traitement est arrêté en novembre 2003.

En **janvier 2004**, nouvelle exacerbation retenue malgré un état clinique stable (des expectorations brunâtres sont tout de même notées) : la radio montre une accentuation des opacités para-hilaires et les éosinophiles sont à 3,4 G/L.

Depuis, l'évolution est favorable cliniquement et biologiquement (éosinophiles < 0,5 G/L et IgE totales stables entre 1600 et 2000 UI/mL). Par contre, la patiente est toujours sous Sporanox[®] du fait ses récurrences rapprochées (Tableau VII ; Figure 9).

Tableau VII : Résultats des sérologies aspergillaires chez Mme C. Marie-Madeleine

Date	IE	HAI	Elisa
Avril 2001	0	80	ND
Novembre 2001	0	<80	ND
Mars 2002	0	<80	ND
Mai 2002	0	<80	0,6
Septembre 2002	0	<80	1,2
Décembre 2002	1 arc	80	ND
Mai 2003	1 arc, C+	<80	0,6
Août 2003	0	<80	0,7
Janvier 2004	2 arcs, C+	<80	1,3
Avril 2004	2 arcs, C+	<80	ND
Octobre 2004	1 arc, C+	<80	0,6
Décembre 2004	1 arc, C+	<80	0,7
Juillet 2005	1 arc, C+	<80	0,6
Octobre 2005	1 arc, C+	<80	0,5
Février 2006	1 arc, C+	<80	0,4

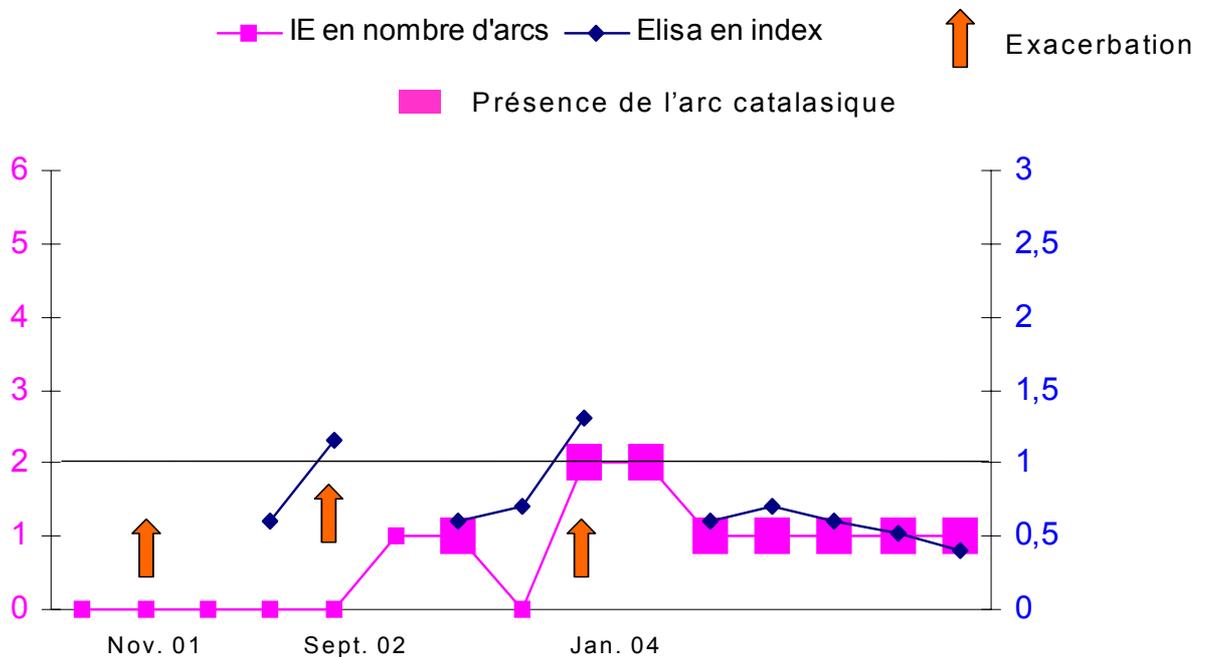


Figure 9 : Evolution de l'IE et de l'Elisa chez Mme C. Marie-Madeleine

Observations :

- Lors de la première exacerbation de novembre 2001, l'IE reste négative avec aucun arc de précipitation. Le dosage en Elisa n'a pu être réalisé, les sérums de 2001 ayant déjà été détruits.
- En septembre 2002, le diagnostic d'exacerbation est porté sur la radiologie et la biologie. Pourtant, l'IE ne montre aucun arc de précipitation à la différence de l'Elisa dont l'index passe de 0,6 en mai à 1,2 en septembre.
- En mai 2003, l'évolution clinique et radiologique de l'exacerbation de septembre est favorable mais lente. L'IE est cette fois-ci positive (1 seul arc mais il s'agit de l'arc catalasique) tandis que l'index en Elisa est à un taux de 0,6.
- Lors de l'exacerbation de janvier 2004, l'IE (2 arcs dont la catalase) et l'Elisa (index à 1,3) se positivent.
- Par contre, après le traitement instauré à partir du mois d'avril, seule une diminution significative du titre Elisa est observée (0,6 en octobre) alors que l'on détecte toujours l'arc catalasique d'octobre 2004 à février 2006.
- L'HAI n'est jamais positive.

II.4.2. Monsieur D. Marcel (66 ans)

Le diagnostic d'ABPA est porté chez ce patient au début de l'année 1992 sur un terrain de dilatation des bronches (DDB) depuis l'enfance.

En juin 2004, il présente une exacerbation de sa maladie conduisant à un traitement par itraconazole jusqu'à fin février 2005.

En **juin 2005**, malgré un état clinique satisfaisant, la biologie est en faveur d'une nouvelle exacerbation (IgE totale = 3589 UI/mL contre 1910 UI/mL à l'arrêt du Sporanox® en février, éosinophiles = 1,54 G/L). De plus, on retrouve de l'*Aspergillus fumigatus* dans les crachats du patient. En juillet, un nouveau traitement par itraconazole est institué.

En octobre 2005, l'état clinique et radiologique est bon, les IgE totales sont redescendues à 3122 UI/mL et les éosinophiles à 0,7 G/L.

En février 2006, l'état général est stable. IgE totales et éosinophiles continuent de décroître avec respectivement des taux de 2224 et 0,5 (Tableau VIII ; Figure 10).

Observations :

- Lors de l'exacerbation de juin 2005, l'IE (2 arcs dont la catalase) et l'Elisa (index à 2,2) sont toutes les deux positives.
- Après l'instauration du traitement en juillet, on observe une stagnation du nombre d'arc en IE et une diminution progressive de l'index en Elisa (mais qui reste positif) alors que l'état clinique du patient est bon.
- L'HAI n'est jamais positive.

Tableau VIII : Résultats des sérologies aspergillaires chez M. D. Marcel

Date	IE	HAI	Elisa
Juin 2005	2 arcs, C+	160	2,2
Octobre 2005	3 arcs	160	1,9
Février 2006	2arcs, C+	160	1,5

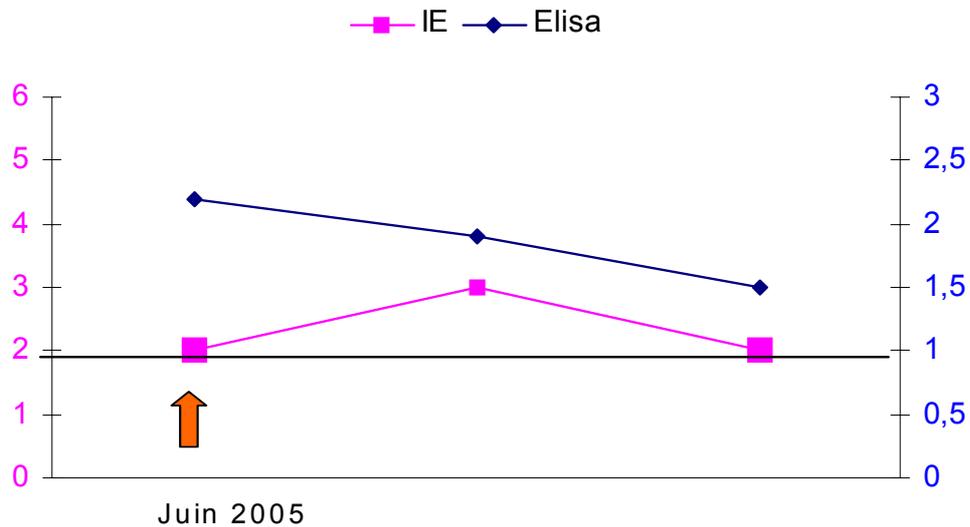


Figure 10 : Evolution de l'IE et de l'Elisa chez M. D. Marcel

II.4.3. Madame R. Madeleine (84 ans)

Le diagnostic d'ABPA est posé en 1983 chez cette patiente qui souffre d'asthme atopique sévère. On relève deux épisodes d'exacerbation en octobre 2003 et en février 2004 (bilan biologique effectué en ville : IgE totales=2656 UI/mL, éosinophiles=0,7 G/L et immunoélectrophorèse à 3 arcs).

En mars 2004, l'état général et respiratoire de la patiente est bon. Les IgE t sont à 1866 UI/mL et les éosinophiles à 0,13 G/L.

En **mai 2004**, la patiente présente une bronchite avec altération de l'état général, dyspnée et une augmentation des IgE totales à 2657 UI/mL. Un traitement par itraconazole est instauré devant ce tableau d'exacerbation relayé par des corticoïdes du fait d'un œdème des membres inférieurs dû au Sporanox[®].

Depuis, l'état de la patiente est satisfaisant mis à part une pneumopathie infectieuse traitée par antibiothérapie en février 2006 et d'évolution favorable (Tableau IX ; Figure 11).

Observations :

- En mai 2004, l'exacerbation chez cette patiente s'accompagne de l'apparition de 4 arcs dont la catalase à l'IE (aucun arc en Mars) et l'index en Elisa passe de 1,2 en mars à 1,9 en mai.
- En septembre 2004, après 3 mois de corticothérapie per os, l'Elisa n'est plus positive (index de 1) alors que l'IE diminue mais reste positive avec 2 arcs dont la catalase.
- En février 2006, l'état de la patiente reste stable (malgré une pneumopathie traitée efficacement par antibiothérapie) avec un index en Elisa de 0,7. Par contre, l'IE est positive avec la présence de l'arc catalasique.
- L'HAI n'est jamais positive.

Tableau IX : Résultats des sérologies aspergillaires chez Mme R. Madeleine

Date	IE	HAI	Elisa
Mars 2004	0	<80	1,2
Mai 2004	4 arcs, C+	<80	1,9
Septembre 2005	2 arcs, C+	<80	1
Novembre 2005	0	80	1
Février 2006	1 arc, C+	<80	0,7

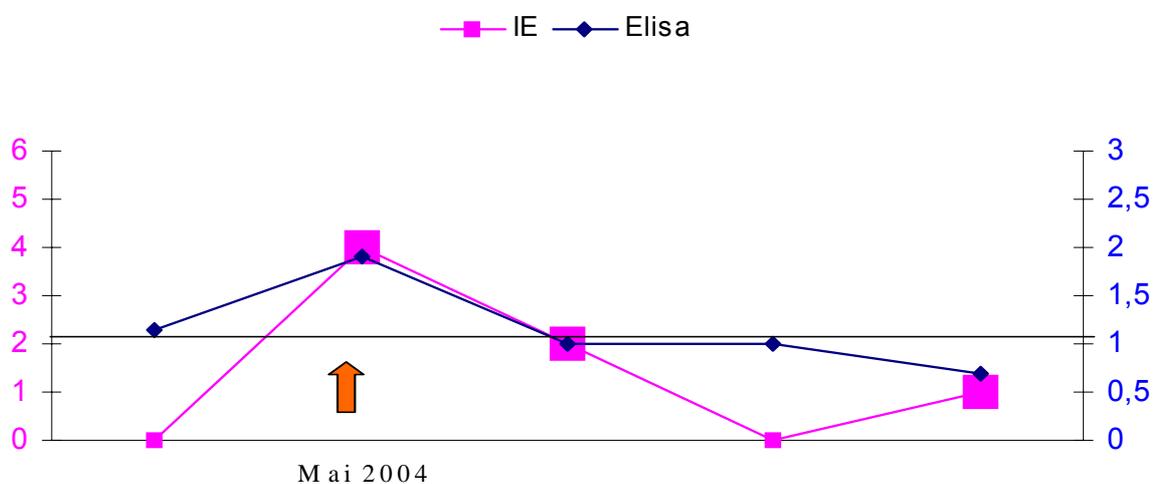


Figure 11 : Evolution de l'IE et de l'Elisa chez Mme R. Madeleine

II.4.4. Madame M. Thérèse

Cette patiente, qui souffre d'asthme depuis l'enfance compliqué d'une dilatation des bronches, développe à partir de 1994 une aspergillose bronchopulmonaire allergique.

En décembre 2003, son état respiratoire est stable depuis 1 an avec des IgE t à 259 UI/mL et des éosinophiles à 0,09 G/L.

En **janvier 2005**, on observe une dégradation clinique avec altération de l'état général, la présence d'opacités de la base gauche à la radio pulmonaire et des IgE t augmentées à 622 UI/mL. Elle est mise sous Sporanox[®] à partir de mars mais son état clinique continue de se dégrader avec une fibrose pulmonaire associée. En juillet, elle présente des hémoptysies, du *Pseudomonas aeruginosa* et de

Aspergillus fumigatus sont retrouvés dans ces crachats. Elle décède le 31 juillet 2005 (76 ans) (Tableau X ; Figure 12).

Observations :

- En décembre 2003, dans un contexte d'état respiratoire stable, l'IE montre 2 arcs dont la catalase alors que l'Elisa est à 0,9.
- En janvier 2005, on observe une importante dégradation clinique et radiologique. L'IE est alors nettement positive avec 7 arcs de précipitation ainsi que l'Elisa dont l'index monte à 2,4.
- En mai, son état respiratoire est toujours mauvais et en juillet, on observe une nouvelle détérioration avec des hémoptysies ayant entraîné le décès le 31 juillet. Pendant cette période, l'IE reste très positive et l'HAI est également positive à un titre de 1280. Il n'y a pas eu de dosage Elisa, les sérums n'ayant pu être retrouvés.

Tableau X : Résultats des sérologies aspergillaires chez Mme M. Thérèse

Date	IE	HAI	Elisa
Décembre 2003	2 arcs, C+	80	0,9
Janvier 2005	7 arcs, C+	320	2,4
Mai 2005	7 arcs, C+	1280	ND
Juillet 2005	6 arcs, C+	1280	ND

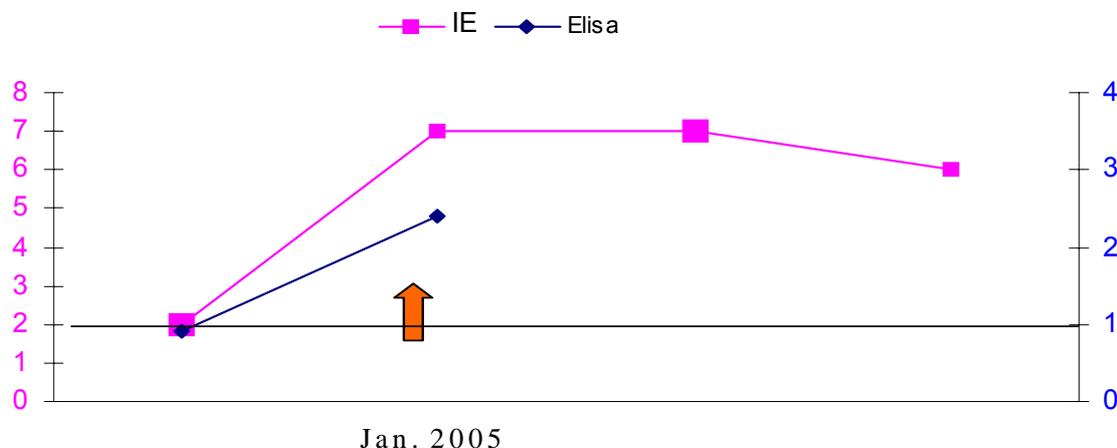


Figure 12 : Evolution de l'IE et de l'Elisa chez Mme M. Thérèse

II.4.5. Monsieur C. Bernard (71 ans)

Il s'agit d'un patient souffrant d'asthme atopique sévère depuis l'enfance. En novembre 2001, son asthme est corticodépendant et est associé à de l'emphysème pulmonaire. Malgré une immunoélectrophorèse positive, le diagnostic d'ABPA n'est pas retenu (IgE t à 246 UI/mL, absence d'IgE spécifiques).

En **juin 2004**, l'immunoélectrophorèse est toujours positive (7 arcs dont la catalase) et les IgE spécifiques *Aspergillus fumigatus* sont de classe II. Par contre, les IgE t sont toujours inférieures à 500 UI/mL et les éosinophiles sont normaux. Le diagnostic d'ABPA est quand même posé avec un tableau abâtardi par la corticothérapie au long cours. Un traitement par itraconazole est commencé.

L'état général du patient est stable jusqu'à ce jour sans amélioration de l'asthme alors que le patient est toujours sous corticoïdes et Sporanox®. Il n'y a pas de surveillance régulière des IgE t et des éosinophiles chez ce patient (Tableau XI, Figure 13).

Observations :

- Le diagnostic d'ABPA est posé en juin 2004. L'IE est alors très positive à 7 arcs de précipitation de même que l'Elisa à 2,7.
- On peut noter une très lente diminution du nombre d'arcs et de l'index Elisa entre juin 2004 et avril 2006 alors que le patient est sous itraconazole pendant toute cette période. Il est à noter que cliniquement, il n'y a aucune amélioration de l'asthme qui est corticodépendant depuis de nombreuses années.
- En juin 2006, l'IE remonte à 4 arcs (contre 2 en Avril) et l'Elisa à 2,4 (contre 1,5 en avril) alors que l'état du patient reste stable.
- L'HAI n'est jamais positive mais est douteuse en juin 2006.

Tableau XI : Résultats des sérologies aspergillaires chez M. C. Bernard

Date	IE	HAI	Elisa
Février 2004	5 arcs, C+	160	ND
Juin 2004	7 arcs, C+	80	2,7
Décembre 2004	6 arcs, C+	80	2
Mars 2005	4 arcs	160	2,4
Avril 2006	2 arcs, C+	80	1,5
Juin 2006	4 arcs, C+	320	2,4

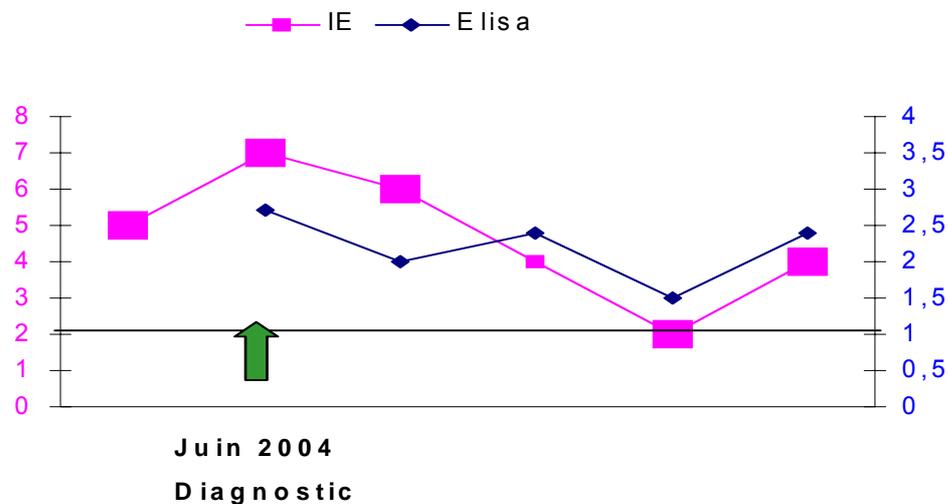


Figure 13 : Evolution de l'IE et de l'Elisa chez M. C. Bernard

II.4.6. Monsieur G. Dominique (46 ans)

Une aspergillose bronchopulmonaire allergique est diagnostiquée en 1998 chez ce patient atteint d'un asthme atopique compliqué de DDB.

Depuis décembre 2001, l'état général du patient est bon. Les IgE t fluctuent entre 3000 et 5000 UI/mL mais aucune exacerbation n'est notée. Le traitement chez ce patient se résume à celui du traitement de fond de son asthme (corticoïdes et β -mimétiques inhalés) (Tableau XII ; Figure 14).

Observations :

- Aucun épisode d'exacerbation n'est observé entre décembre 2001 et juillet 2004 et l'IE reste négative. Par contre, l'index de l'Elisa est constamment positif tout comme les IgE totales qui restent stables mais élevées (taux entre 3000 et 5000 UI/mL).

Tableau XII : Résultats des sérologies aspergillaires chez M. G. Dominique

Date	IE	HAI	Elisa
Décembre 2001	0	<80	ND
Juin 2002	0	160	2,2
Mai 2003	0	160	2,5
Décembre 2003	0	160	1,7
Juillet 2004	0	<80	1,2

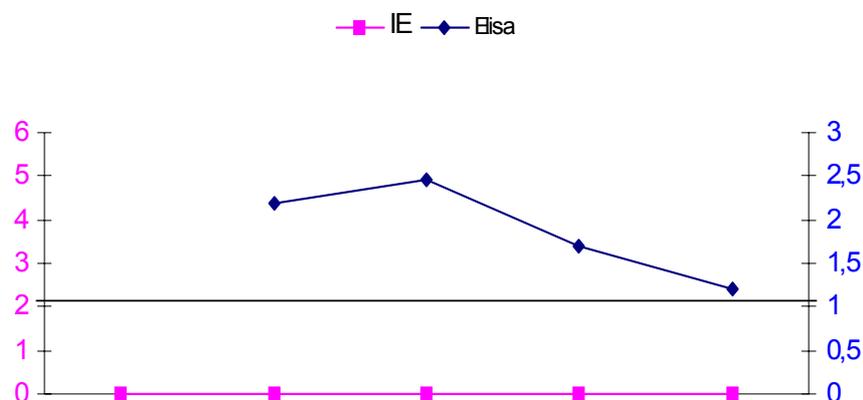


Figure 14 : Evolution de l'IE et de l'Elisa chez M. G. Dominique

II.4.7. Madame B. Yvonne (68 ans)

Le diagnostic d'ABPA est posé chez cette patiente en avril 1997 dans un contexte d'asthme ancien, stable jusqu'alors.

Sur les quatre dernières années, cette patiente a connu trois épisodes d'exacerbation que nous allons étudier séparément. Il est à noter que les IgE t gardent un taux constamment très élevé et stable supérieur à 5000 UI/mL.

Premier épisode : en janvier 2002, l'état général et respiratoire de la patiente est satisfaisant. En **juin 2002**, son état reste stable mais nous pouvons observer une modification des signes biologiques : hyperéosinophilie à 2,2 G/L, apparition de 3 arcs de précipitation à l'immunoélectrophorèse. En **septembre 2002**, la patiente expectore des bouchons muqueux et la radio pulmonaire met en évidence un infiltrat péri-hilaire gauche. Devant ce tableau d'exacerbation, un traitement par itraconazole seul est débuté pour une durée de 6 mois (pas de corticothérapie orale qu'elle supporte mal) (Tableau XIII ; Figure15).

Observations :

- En juin 2002, alors que l'état respiratoire de la patiente est stable, on observe une ascension des éosinophiles à 2,2 G/L. L'IE passe à 3 arcs de précipitation et l'Elisa voit son index largement augmenter entre janvier et juin passant de 1,2 à 2,7.
- L'HAI reste négative.

Tableau XIII : Résultats sérologiques aspergillaires chez Mme B. Yvonne (1)

<i>Date</i>	<i>IE</i>	<i>HAI</i>	<i>Elisa</i>
<i>Janvier 2002</i>	0	80	1,2
<i>Juin 2002</i>	3 arcs	160	2,7
<i>Septembre 2002</i>	2 arcs, C+	<80	2,2

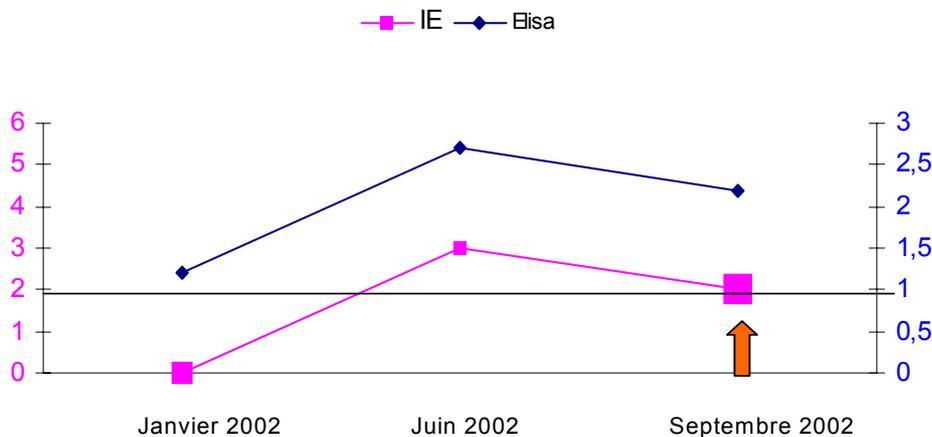


Figure 15 : Evolution de l'IE et de l'Elisa chez Mme B. Yvonne (1)

Deuxième épisode : en mars 2003, Madame B. est toujours sous Sporanox®: l'état clinique de la patiente s'est amélioré et est maintenant stable malgré des éosinophiles (1,4 G/L) et des IgE t (13000 UI/mL) qui restent élevées. En juin 2003, l'évolution de l'exacerbation de septembre est favorable sur le plan clinique et radiologique mais pas sur le plan biologique. Le traitement est quand même stoppé. En **juillet 2003**, la patiente présente un syndrome fébrile depuis quelques jours avec altération de l'état général, expectoration de moules bronchiques et une ascension des éosinophiles à 2 G/L. Cette nouvelle exacerbation nécessite la mise sous Sporanox® toujours sans corticoïdes (Tableau XIV ; Figure 16).

Tableau XIV : Résultats sérologiques chez Mme B. Yvonne (2)

Date	IE	HAI	Elisa
Mars 2003	2 arcs, C+	160	2,65
Juin 2003	2 arcs, C+	80	ND
Juillet 2003	3 arcs, C+	640	3,3

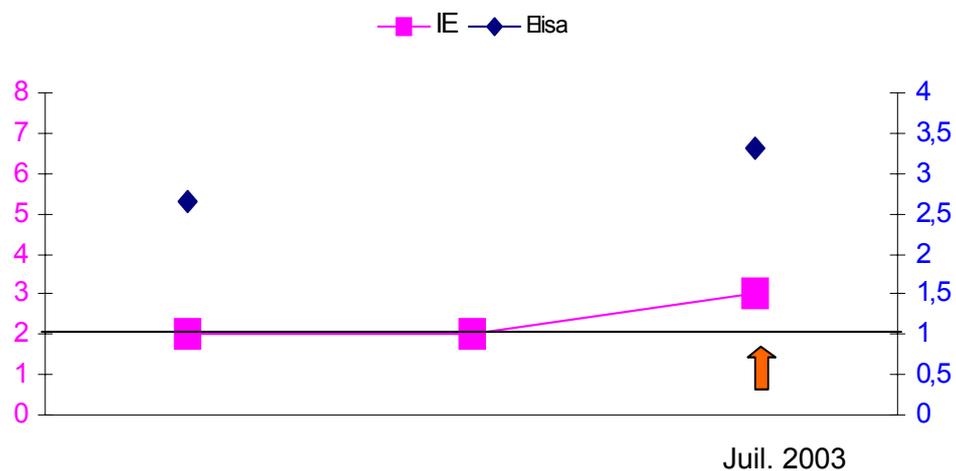


Figure 16 : Evolution de l'IE et de l'Elisa chez Mme B. Yvonne (2)

Observations :

- En mars et en juin 2003, la patiente se trouve dans un état stable du point de vue clinique et radiologique. Pourtant, les éosinophiles restent élevés (respectivement à 1,4 G/L et 1,3 G/L), l'IE est positive avec 2 arcs dont la catalase et l'index de l'Elisa est toujours élevé à 2,65 en mars.
- Après un arrêt du traitement au mois de Juin, on peut observer le mois suivant (juillet 2003) une augmentation non significative du nombre d'arcs en IE (passage de 2 à 3 arcs), un index Elisa à 3,3 (mais il n'y a pas eu de dosage Elisa sur le sérum de Juin) alors que la clinique évoquait une nouvelle poussée d'exacerbation.
- On peut noter que cette exacerbation s'accompagne d'une HAI positive avec un titre de 640.

Troisième épisode : en **mars 2004**, on observe de nouvelles expectorations de grains brunâtres associées à de la toux et à une gêne respiratoire. La patiente reprend d'elle-même de l'itraconazole. En mai 2004, après deux mois de traitement, l'état clinique est bon et le traitement est arrêté début juillet. La persistance d'une image radiologique incite cependant à une reprise du traitement fin août pour trois mois. Entre février 2005 et décembre 2005, malgré une évolution clinique favorable, on observe encore des infiltrats (en novembre et en décembre), des expectorations de moules bronchiques (avec *Aspergillus fumigatus* retrouvé dans les crachats en novembre) et une éosinophilie qui reste supérieure à 2 G/L ce qui nécessite la reprise régulière d'itraconazole. Depuis janvier 2006, l'évolution clinique, radiologique et biologique (avec des éosinophiles inférieurs à 1 G/L et une diminution du nombre d'arcs en immunoélectrophorèse) est nettement plus favorable (Tableau XV ; Figure 17).

Tableau XV : Résultats des sérologies aspergillaires chez Mme B. Yvonne (2)

Date	IE	HAI	Elisa
Mai 2004	4 arcs, C+	160	2,1
Juillet 2004	1 arc, C+	80	1,5
Octobre 2004	4 arcs, C+	80	4,4
Février 2005	4 arcs, C+	320	3,2
Juin 2005	4 arcs, C+	160	2,4
Novembre 2005	5 arcs, C+	160	2,6
Décembre 2005	5 arcs, C+	320	2,6
Janvier 2006	4 arcs, C+	160	2,7
Mars 2006	2 arcs, C+	160	1,7
Juin 2006	1 arc, C+	80	1,3

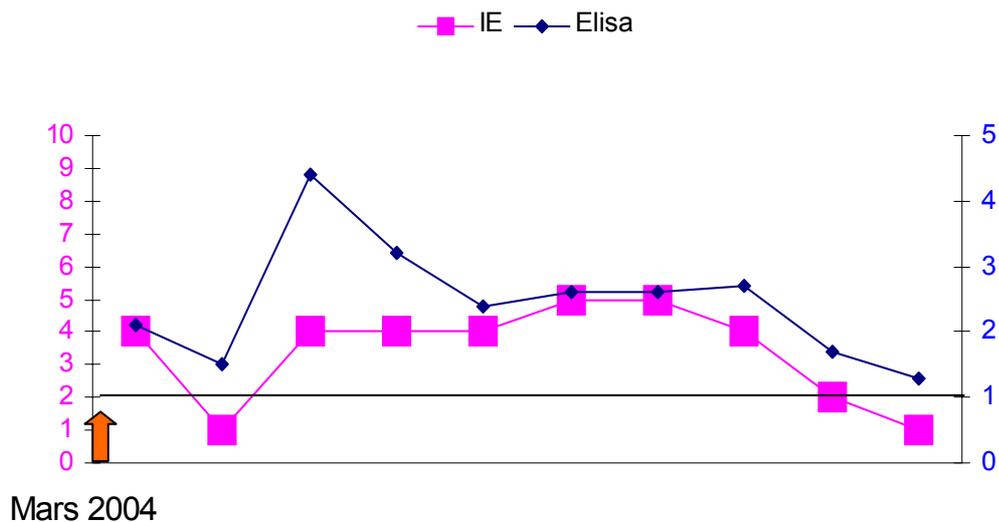


Figure 17 : Evolution de l'IE et de l'Elisa chez Mme B. Yvonne (3)

Observations :

- Après une exacerbation en mars 2004 et 2 mois de traitement par itraconazole, l'IE reste positive à 4 arcs et l'Elisa également à 2,1. En juillet, on observe une diminution de l'IE ainsi que de l'Elisa (1 arc catalasique et 1,5 en index) alors que le patiente va mieux cliniquement et que des opacités persistent à la radio.

- A partir de octobre 2004, on observe une ascension de l'IE (4 arcs dont la catalase) et de l'Elisa (4,4) sans qu'il n'y ait de dégradation de l'état clinique de la patiente. De octobre 2004 jusqu'en janvier 2006, le nombre d'arcs reste important (4 ou 5) de même que l'Elisa alors que cliniquement, la patiente va bien. Par contre, pendant cette période, ses examens radiologiques montrent régulièrement des infiltrats et l'éosinophilie sanguine reste élevée.
- En mars 2006, une diminution significative du nombre d'arcs de précipitation est observée (de 4 en Janvier, on passe à 2 en mars puis 1 en juin), de même qu'une décroissance de l'index Elisa (2,7 puis 1,7 et 1,3). Cette amélioration des paramètres biologiques s'accompagne d'une très nette amélioration clinique et d'une disparition de tous les signes radiologiques. Les éosinophiles redeviennent également normaux (< 0,5 G/L).
- L'HAI est constamment négative.

II.4.8. Madame G. Chantal (45 ans)

On retrouve chez cette patiente depuis 1987 un asthme chronique et instable avec prise régulière de corticoïdes per os. On peut noter chez cette personne une mauvaise observance des différents traitements qui lui sont prescrits et de fréquentes automédications de corticoïdes par voie orale. Le suivi de son asthme par un pneumologue est très irrégulier.

En **février 2002**, une radio pulmonaire est réalisée en systématique avant une chirurgie ORL et retrouve une opacité non excavée des lobes moyens et supérieurs du poumon droit et des adénopathies. Une tuberculose pulmonaire est évoquée mais la recherche de mycobactéries est négative. Une biopsie thoracique est pratiquée et retrouve une alvéolite macrophagique avec éosinophiles. D'autre part, la formule sanguine révèle une hyperéosinophilie à 1 G/L. Aucune étiologie n'est donc retrouvée devant ce tableau d'infiltrats pulmonaires avec hyperéosinophilie sanguine et pulmonaire dans un contexte d'asthme chronique instable. Un traitement per os de corticoïdes permet une baisse des éosinophiles (<0,5 G/L) et une disparition de l'opacité.

En **janvier 2005**, la patiente se plaint toujours d'un asthme instable. Le dosage des IgE t indique un taux élevé (1307 UI/mL) et les IgE spécifiques d'*A. fumigatus* sont de classe V (56 UI/mL). Une possible ABPA est alors envisagée confirmée par

l'immunoélectrophorèse et la présence de discrets infiltrats nodulaires à la radio pulmonaire.

En avril 2005, une corticothérapie per os de trois semaines est débutée associée à de l'itraconazole prescrit pour 6 mois (mais celui-ci n'est débuté qu'en juillet par la patiente).

En janvier 2006, il n'y a toujours pas d'amélioration de l'asthme et la radio pulmonaire montre toujours quelques opacités. Se pose la question de la bonne observance thérapeutique du Sporanox[®] par la patiente.

En juin 2006, il n'y a toujours pas de réelle amélioration clinique et biologique (par contre les infiltrats ont quasiment disparu). Une itraconazolémie est effectuée et montre des valeurs exceptionnellement basses : la prise se fait-elle bien au milieu des repas ? S'agit-il d'une mauvaise observance du traitement par la patiente ? (Tableau XVI ; Figure 18).

Observations :

- En février 2002, le diagnostic d'ABPA n'est pas encore posé avec notamment une IE négative. Par contre, l'Elisa a un index de 3,7. Ce ratio élevé s'accompagne cliniquement d'un asthme chronique et instable évoluant depuis 1987, de signes radiologiques et d'une hyperéosinophilie sanguine.
- En janvier 2005, l'IE est devenue positive avec la présence de l'arc catalasique et l'Elisa a un ratio de 2,6. Le diagnostic d'ABPA est alors évoqué puis retenu au mois d'avril.
- Entre avril 2005 et juin 2006, l'IE reste positive et stable avec une diminution significative lors du dernier bilan de juin. L'Elisa reste élevée et stable avec un index supérieur à 2,3 (le taux le plus bas étant aussi observé en juin). Durant cette période, il n'y a aucune amélioration clinique et radiologique malgré des traitements par corticoïdes et itraconazole (doutes importants sur l'observance de ces traitements). On peut également observer une disparition quasi totale des infiltrats lors de la dernière visite de juin.
- L'HAI est constamment négative.

Tableau XVI : Résultats des sérologies aspergillaires chez Mme G. Chantal

Date	IE	HAI	Elisa
Février 2002	0	<80	3,7
Mars 2002	1 arc	80	2,7
Janvier 2005	1 arc, C+	<80	2,6
Avril 2005	2 arcs, C+	160	>2,8
Octobre 2005	3 arcs, C+	80	2,6
Janvier 2006	4 arcs, C+	160	2,7
Juin 2006	1 arc, C+	<80	2,3

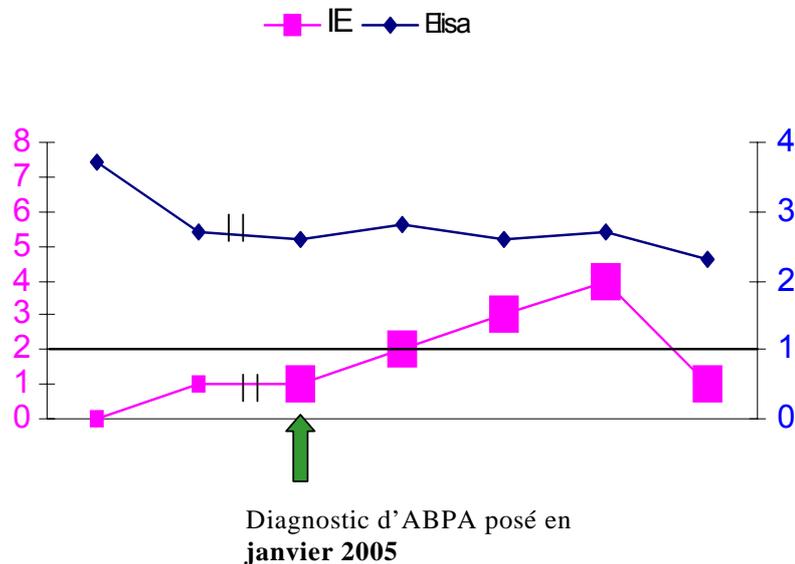


Figure 18 : Evolution de l'IE et de l'Elisa chez Mme G. Chantal

II.4.9. Madame D. Sylvette (52 ans)

Il s'agit d'une patiente qui présente un asthme atopique depuis l'enfance. En **octobre 2002**, elle signale des douleurs baso-thoraciques et une dyspnée d'effort. La radiologie montre une infiltration au niveau du lobe droit. Les examens biologiques mettent en évidence une hyperéosinophilie à 4,1 G/L, une immunoélectrophorèse positive à 6 arcs dont la catalase et des IgE spécifiques anti-*A. fumigatus* de classe V. Ces résultats sont en faveur d'une ABPA bien que les IgE t n'aient pas été réalisées. La patiente reçoit 6 mois de corticoïdes per os.

En **juin 2003**, il est fait état d'une possible exacerbation de la maladie nécessitant un traitement par Sporanox®. En juillet, les IgE t sont à 636 UI/mL et les éosinophiles normaux. Jusqu'en septembre 2005, son état clinique est stable mais la patiente est toujours sous Sporanox® (Tableau XVII ; Figure 19).

Tableau XVII : Résultats des sérologies aspergillaires chez Mme D. Sylvette

Date	IE	HAI	Elisa
Octobre 2002	6 arcs, C+	320	2,6
Juillet 2003	1 arc, C+	80	3,5
Septembre 2003	2 arcs, C+	<80	1,6
Septembre 2005	4 arcs, C+	80	1,8

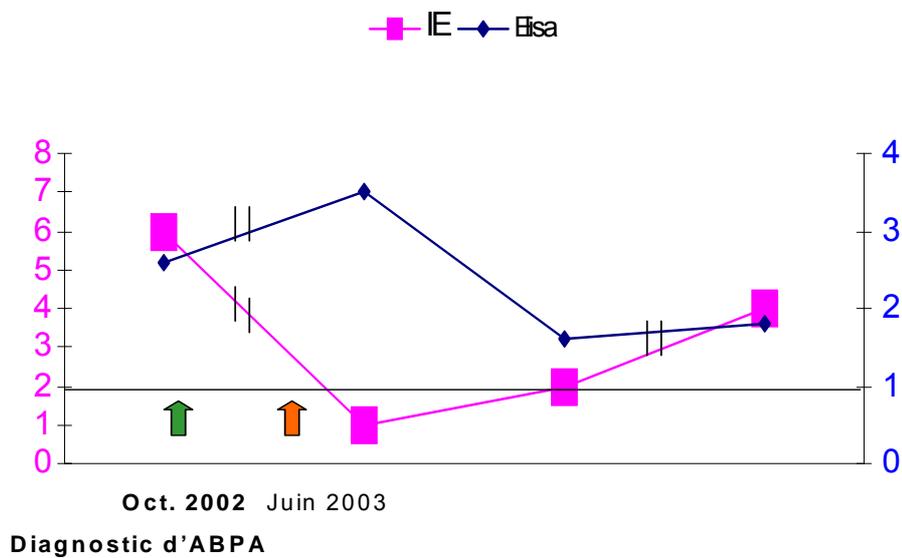


Figure 19 : Evolution de l'IE et de l'Elisa chez Mme D. Sylvette

Observations :

- Lors du diagnostic initial d'ABPA en octobre 2002, l'IE montre 6 arcs de précipitation et l'Elisa, un index de 2,6.
- En juillet 2003, l'IE est tout juste positive (arc catalasique isolé) alors qu'un épisode d'exacerbation est signalé au cours du mois de juin. Par contre, l'Elisa était franchement positive à 3,5.

- En septembre 2003, l'IE est stable (2 arcs) alors que l'Elisa a nettement diminué avec un ratio de 1,6. Cliniquement, l'amélioration est franche après 2 mois de traitement.
- En septembre 2005, on peut noter une augmentation du nombre d'arcs (4 arcs) et un index Elisa stable (1,8) en relation avec un état clinique satisfaisant.
- L'HAI est douteuse au moment du diagnostic.

II.4.10. Monsieur B. René (70 ans)

Ce patient est suivi au CHU de Nantes dans le cadre d'une aspergillose complexe avec deux mécanismes différents : d'un côté une aspergillose bronchopulmonaire allergique favorisée par un terrain asthmatique familial, diagnostiquée en 1993 et de l'autre, un aspergillome des deux apex sur des cavités anciennes de possible broncho-pneumopathie chronique obstructive. Cet aspergillome étant inopérable, il existe une charge antigénique d'*Aspergillus fumigatus* persistante. Depuis 1993, ce patient est régulièrement sous antifongique, Sporanox[®] essentiellement (essai de Voriconazole en février 2004 mais mal supporté).

Du point de vue de l'ABPA, le patient ne présente aucune exacerbation sur la période étudiée avec un état clinique satisfaisant, des IgE t restant inférieurs à 500 UI/mL et des éosinophiles normaux (Tableau XVIII ; Figure 20).

Observations :

- Depuis plusieurs années, aucun épisode d'exacerbation d'ABPA n'est observé chez ce patient. Par contre, l'IE est toujours positive et stable à 3 ou 4 arcs de précipitation de même que l'Elisa (index entre 1,5 et 1,7). D'autre part, ce patient présente également un aspergillome inopérable et seulement traité régulièrement par divers antifongiques.
- L'HAI reste négative.

Tableau XVIII : Résultats des sérologies aspergillaires chez M. B. René

Date	IE	HAI	Elisa
Mai 2005	3 arcs, C+	<80	1,5
Août 2005	3 arcs, C+	80	1,7
Octobre 2005	4 arcs, C+	160	1,7

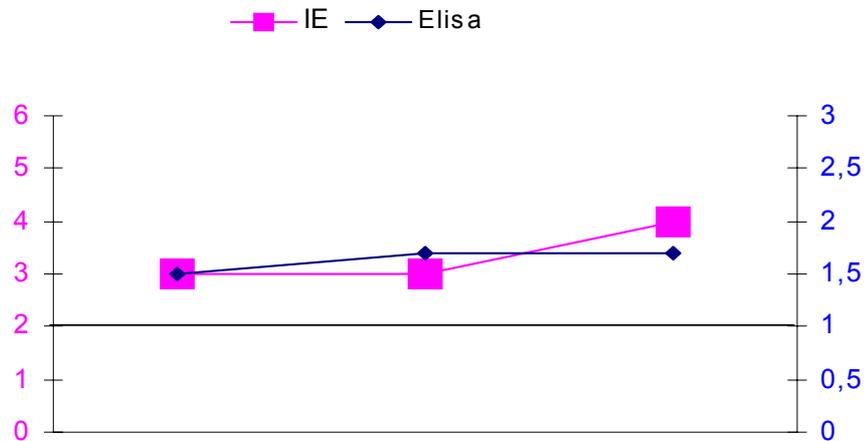


Figure 20 : Evolution de l'IE et de l'ELISA chez M. B. René

II.4.11. Monsieur R. Pierre

Ce patient a comme antécédent un asthme chronique depuis l'âge de 20 ans compliqué d'une insuffisance respiratoire chronique obstructive. D'autre part, une aspergillose bronchopulmonaire allergique est diagnostiquée en 1998 nécessitant un traitement par corticoïdes au long cours.

En février et septembre 2002, on note deux épisodes infectieux. La surinfection bronchique de septembre évolue vers la décompensation respiratoire et le décès du patient au mois d'octobre (Tableau XIX ; Figure 21).

Tableau XIX : Résultats des sérologies aspergillaires chez M. R. Pierre

Date	IE	HAI	Elisa
Février 2002	0	<80	0,9
Mai 2002	0	80	0,7
Septembre 2002	0	<80	0,9
Octobre 2002	2 arcs	80	0,8
Octobre 2002	1 arc	<80	0,7

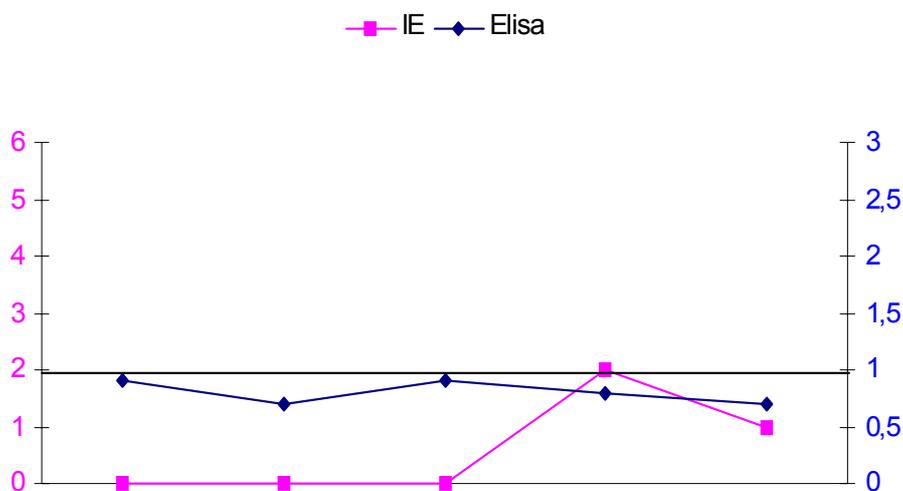


Figure 21 : Evolution de l'IE et de l'Elisa chez M. R. Pierre

Observations :

- Le suivi chez ce patient entre février 2002 et octobre 2002 des sérologies aspergillaires montre des valeurs restant négatives dans les trois techniques. Le contexte clinique est sans rapport avec sa pathologie aspergillaire puisqu'il s'agit d'une décompensation respiratoire sur surinfection bronchique bactérienne.

II.4.12. Monsieur R. Joël

Une aspergillose bronchopulmonaire allergique est diagnostiquée chez ce patient en 1991 sur un terrain d'asthme allergique depuis l'enfance. Des bronchectasies proximales sont déjà présentes au moment du diagnostic.

Du point de vue de l'ABPA, l'état du patient est stable sans exacerbation mais avec des IgE totales restant élevées (4754 UI/mL en novembre 2001, 3900 UI/mL en mars 2002). Les éosinophiles sont inférieurs à 0,5 G/L.

En **août 2002**, un glioblastome est diagnostiqué chez ce patient. Celui-ci est alors mis sous corticoïdes dans le cadre de son glioblastome à une dose de 1 mg/kg.

Monsieur R. Joël est décédé le 17/03/2003 des suites du glioblastome (Tableau XX ; Figure 22).

Tableau XX : Résultats des sérologies aspergillaires chez M. R. Joël

Dates	IE	HAI	Elisa
<i>Novembre 2001</i>	2 arcs, C+	<80	ND
<i>Décembre 2001</i>	2 arcs, C+	<80	ND
<i>Mars 2002</i>	2 arc, C+	80	3
<i>Septembre 2002</i>	1 arc, C+	<80	1,5
<i>Décembre 2002</i>	2 arcs, C+	160	1,65

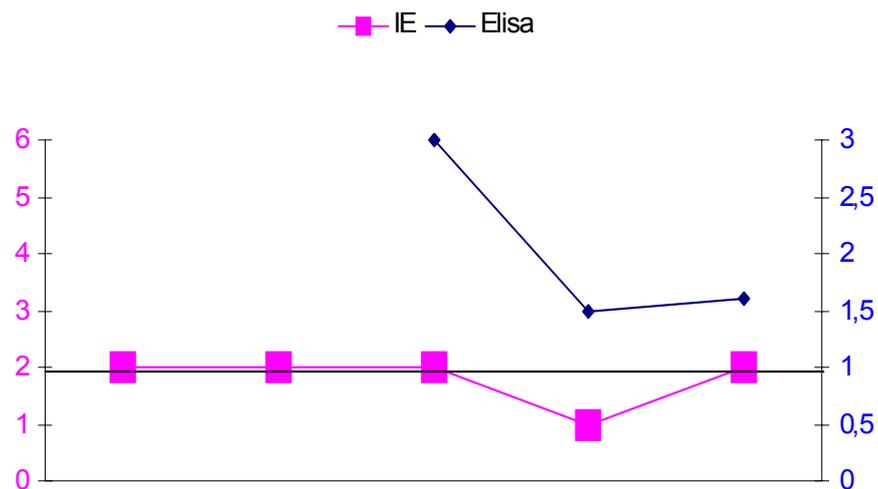


Figure 22 : Evolution de l'IE et de l'Elisa chez M. R. Joël

Observations :

- L'étude rétrospective chez ce patient porte sur les années 2001 et 2002. En IE, on peut remarquer une stabilité sur le nombre d'arcs de précipitation (1 ou 2 arcs dont la catalase). L'IE est donc positive mais sans évolution. Par contre, on peut noter en Elisa un titre élevé en mars 2002 puis une importante diminution en septembre (3 puis 1,5) confirmée au mois de décembre. Du point de vue clinique, l'ABPA chez ce patient est stable mais à un stade avancé puisque, dès 1991, des bronchectasies proximales sont observées. D'autre part, un glioblastome nécessite l'administration de corticoïdes à dose élevée à partir du mois d'août 2002.

II.4.13. Madame N. Lucienne (74 ans)

Cette patiente a comme antécédent un asthme compliqué de DDB. En **novembre 2001**, le diagnostic d'ABPA est posé (expectorations, opacités, augmentation des IgE totales et spécifiques...). Une corticothérapie associée à un traitement par itraconazole est débutée en décembre.

En mars 2002, il n'y a plus de signes radiologiques, les IgE t et les éosinophiles sont redevenus normaux par contre, il n'y a pas d'amélioration d'un point de vue clinique. En septembre 2002, la patiente est toujours sous corticoïdes (corticodépendance) et dyspnéique.

Après une exacerbation en août 2003 nécessitant la prise de Sporanox[®] et une augmentation des posologies de corticoïdes, la patiente est stable cliniquement en mai 2004 et la radiologie est normale. L'itraconazole est arrêté en juin.

Jusqu'en juin 2006, il n'y a rien à signaler d'un point de vue clinique (mis à part une surinfection bronchique en janvier 2006) et radiologique (Tableau XXI ; Figure 23).

Tableau XXI : Résultats des sérologies aspergillaires chez Mme N. Lucienne

Dates	IE	HAI	Elisa
Novembre 2001	6 arcs	<80	
Mars 2002	1 arc	80	1,7
Septembre 2002	0	<80	1,6
Mai 2004	1 arc	80	0,85
Janvier 2006	4 arcs	80	0,9
Février 2006	1 arc	<80	1
Juin 2006	5 arcs	80	1,1

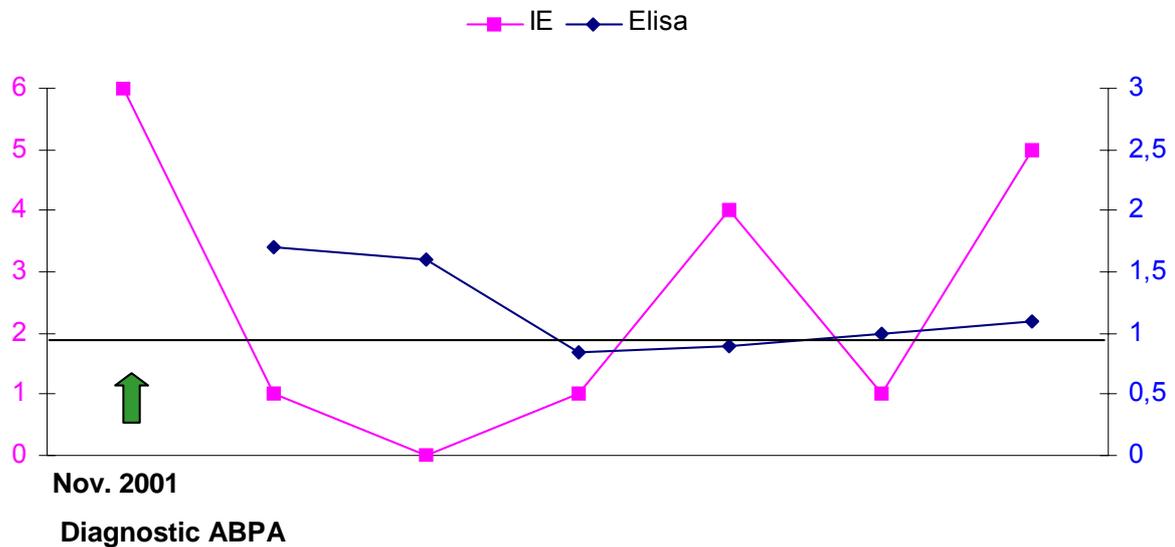


Figure 23 : Evolution des sérologies chez Mme N. Lucienne

Observations :

- En novembre 2001, lors du diagnostic initial de l'ABPA, l'IE montre 6 arcs de précipitation, l'HAI est négative et il n'y a pas eu de dosage en Elisa.
- Lors de l'année 2002, l'IE est négative mais l'Elisa reste positive avec des index de 1,7 et 1,6. Pendant cette période, il n'y a pas de franche amélioration clinique bien que les éosinophiles et les IgE t aient nettement diminué et que les examens radiologiques soient normaux.
- De mai 2004 à juin 2006, on peut observer des fluctuations importantes du nombre d'arcs en IE alors que l'index Elisa est stable au alentours de 1.

Pendant toute cette période, la patiente est stable cliniquement sans signes d'exacerbation.

II.4.14. Madame B. Géraldine (42 ans)

En **avril 2003**, cette patiente, qui a pour antécédent un asthme allergique ancien, se plaint d'une toux et de douleurs thoraciques. Les examens radiologiques révèlent des infiltrats, les IgE t sont à 3595 UI/mL et l'immunoélectrophorèse est positive à 3 arcs de précipitation. Le diagnostic d'ABPA est posé et un traitement associant itraconazole et corticoïdes lui est administré.

En octobre 2003, on note une nette amélioration d'un point de vue clinique, radiologique et biologique (IgE t à 636 UI/mL).

En **juillet 2004**, la patiente signale des signes cliniques d'exacerbation, la radiologie montre des infiltrats et les IgE t sont à 5672 UI/mL. Un traitement par Cortancyl® associé à de l'itraconazole lui est administré puis elle est revue pour un contrôle en septembre où les IgE t restent élevées à 4357 UI/ml.

En décembre 2004, l'évolution est satisfaisante (diminution des opacités, amélioration clinique et IgE t = 1198 UI/mL). Le Sporanox® est quand même maintenu jusqu'en avril 2005.

Au cours de l'année 2005 et au début de l'année 2006, l'état général de la patiente est satisfaisant et les IgE t restent inférieures à 1000 UI/mL.

Mais à partir de fin mai 2006, la patiente se plaint à nouveau de toux, de douleurs thoraciques et des infiltrats sont retrouvés. En **juin 2006**, les IgE t sont à 2504 UI/mL : il s'agit d'un nouvel épisode d'exacerbation (Tableau XXII ; Figure 24).

Observations :

- Lors du diagnostic initial, l'IE est positive avec 3 arcs de précipitation.
- Après 6 mois de traitement, il n'y a plus aucun arc alors que l'état général de la patiente est bon.
- En septembre 2004, l'IE montre 4 arcs de précipitation et l'Elisa est positive avec un index de 1,8. Ces dosages font suite à un épisode d'exacerbation dont les premiers signes sont apparus en juillet (pas de sérologies effectuées à cette date mais un traitement a été mis en place).

- En décembre 2004, on note une baisse du nombre d'arcs en IE qui reste tout de même positive et un index Elisa pratiquement normal (1,1) chez une patient dont l'état clinique évolue favorablement.
- En 2005, l'IE est toujours faiblement positive (1 ou 2 arcs dont la catalase) tandis que l'Elisa est totalement normale (0,6 et 0,5). Il n'y rien à signaler du point de vue clinique pendant cette année-là.
- En juin 2006, le nombre d'arcs a augmenté de façon significative (5 arcs contre 2 en octobre 2005) ainsi que l'index Elisa qui est passé de 0,5 à 1,9. On note cliniquement des signes d'exacerbation de la maladie dès le mois de mai.

Tableau XXII : Résultats des sérologies aspergillaires chez Mme B. Géraldine

Dates	IE	HAI	Elisa
Avril 2003	3 arcs, C+	160	ND
Octobre 2003	0	<80	ND
Septembre 2004	4 arcs, C+	80	1,8
Décembre 2004	2 arcs, C+	80	1,1
Juillet 2005	1 arc, C+		0,6
Octobre 2005	2 arcs, C+	80	0,5
Juin 2006	5 arcs, C+	160	1,9

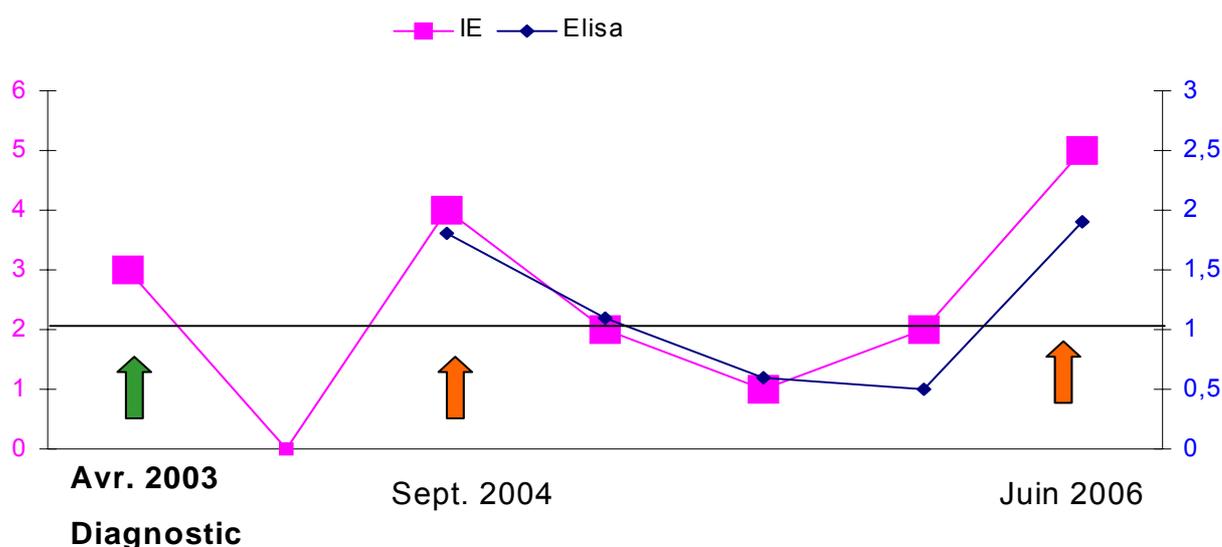


Figure 24 : Evolution de l'IE et de l'Elisa chez Mme B. Géraldine

II.4.15. Madame M. Annie (58 ans)

Cette patiente présente une insuffisance respiratoire chronique obstructive sur DDB depuis l'enfance. Une aspergillose bronchopulmonaire est diagnostiquée en 1990. D'autre part, ses bronches sont régulièrement colonisées à *Pseudomonas aeruginosa* depuis 1996, ce qui nécessite régulièrement des traitements antibiotiques. Il est donc difficile, chez cette patiente, de faire la part des choses entre surinfection bronchique à pyocyanique dans le cadre d'une DDB ou exacerbation de l'ABPA.

Ainsi, entre janvier 2002 et février 2006, on note chez cette patiente de nombreux épisodes de majoration de ses troubles respiratoires associés à la présence de bacille pyocyanique multi-résistant dans ses crachats. Mais dans le même temps, les sérologies aspergillaires restent continuellement positives, les IgE t restent à un taux élevé : la patiente reçoit également régulièrement des cures de corticoïdes et d'itaconazole. A partir de février 2005, du voriconazole est introduit ce qui a permis une amélioration transitoire de sa symptomatologie respiratoire : en effet, les surinfections bronchiques chez cette patiente restent courantes (Tableau XXIII ; Figure 25).

Observations :

- Au cours de l'année 2005, nous pouvons observer un index Elisa < 2 alors qu'une prescription récente de Voriconazole a permis d'améliorer transitoirement l'état respiratoire de la patiente.

Tableau XXIII : Résultats des sérologies chez Mme M. Annie

Dates	IE	HAI	Elisa
Janvier 2002	2 arcs	80	3,8
Mars 2002	3 arcs, C+	80	4
Septembre 2003	2 arcs, C+	<80	3,3
Décembre 2003	4 arcs, C+	160	4
Février 2005	1 arc, C+	80	1,7
Avril 2005	1 arc, C+	80	1,3
Février 2006	4 arcs, C+	80	2,2

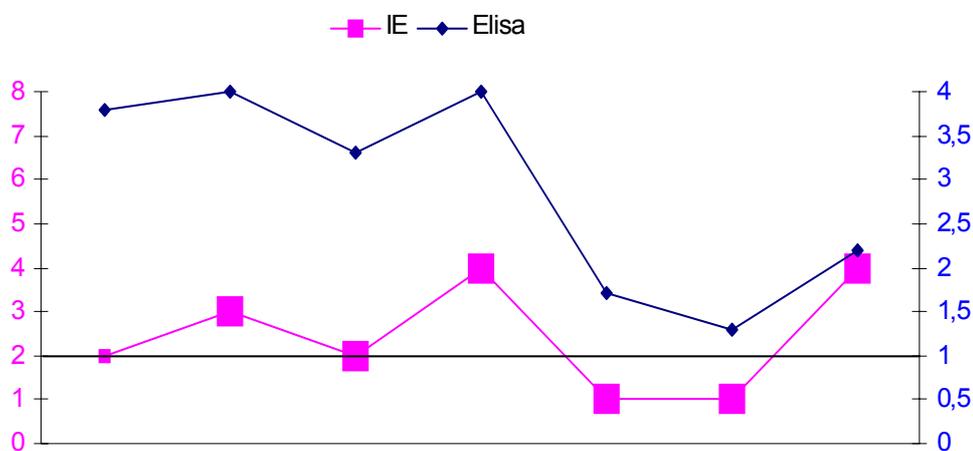


Figure 25 : Evolution de l'IE et de l'Elisa chez Mme M. Annie

II.4.16. Madame G. Nadine (43 ans)

Il s'agit d'une patiente travaillant en milieu agricole, sans antécédent d'asthme, mais exposée de façon importante aux spores aspergillaires. En 1988, elle développe dans un premier temps une bronchite asthmatiforme qui évolue ensuite en sinusite aspergillaire. Peu de temps après, un diagnostic d'aspergillose bronchopulmonaire allergique est posé. Elle reçoit régulièrement des cures de corticoïdes et d'itraconazole mais sans effet sur la dyspnée.

En octobre 2003, devant l'absence d'amélioration de l'état respiratoire de la patiente sous Sporanox[®], une résistance à l'itraconazole est envisagée. En novembre, un traitement par Voriconazole (Vfend[®]) est essayé.

En juin 2004, l'amélioration clinique est nette associée à une baisse des IgE t (276 UI/mL contre 571 en octobre).

Depuis, l'état respiratoire et général est bon mais chaque tentative d'arrêt du voriconazole se traduit par une reprise de la dyspnée. Le traitement par Vfend® se poursuit donc encore aujourd'hui (Tableau XXIV ; Figure 26).

Tableau XXIV : Résultats des sérologies aspergillaires chez Mme G. Nadine

Date	IE	HAI	Elisa
Octobre 2003	4 arcs, C+	80	
Juin 2004	1 arc	80	0,8
Novembre 2004	2 arcs, C+	<80	0,6
Mars 2006	2 arcs	80	0,9

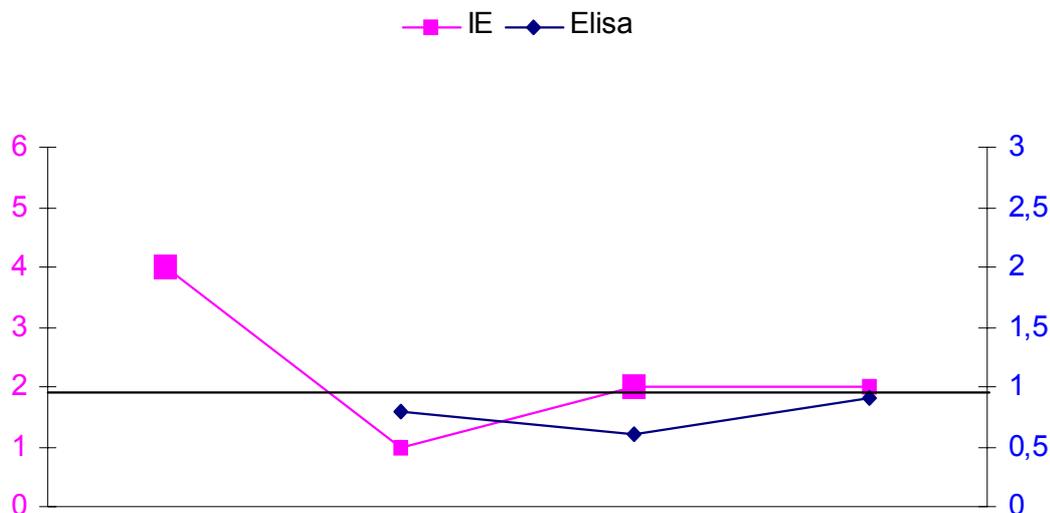


Figure 26 : Evolution de l'IE et de l'Elisa chez Mme G. Nadine

Observations :

- En octobre 2003, l'IE montre 4 arcs de précipitation alors que la patiente reste dyspnéique malgré les traitements successifs par du Sporanox®. L'Elisa n'a pas pu être réalisée, le sérum n'ayant été retrouvé.

- A partir de juin 2004, le nombre d'arcs diminue bien qu'il reste positif sur les deux derniers dosages. L'index Elisa est inférieur à 1 de juin 2004 à mars 2006. Pendant cette période la patiente est nettement mieux cliniquement grâce à l'introduction du Vfend®.
- L'HAI est constamment négative.

II.5. Place de l'Elisa dans l'approche diagnostique et pronostique de l'ABPA

II.5.1. Un nouveau critère de diagnostic ?

La détection des anticorps précipitants est un critère majeur de diagnostic de l'ABPA (Rosenberg *et al*, 1977). Cependant, Greenberger définit en 2002 les 5 critères minimaux pour poser le diagnostic d'ABPA parmi lesquels une augmentation des IgE anti-*A. fumigatus* et/ou des IgG anti-*A. fumigatus* (Greenberger, 2002), sans préciser la technique de dosage de ces IgG.

D'un point de vue biologique, les précipitines sont mises en évidence par des techniques d'immunoprécipitation : l'immunoélectrophorèse rapide est aujourd'hui la méthode utilisée par le plus grand nombre de laboratoires (dont le laboratoire de Parasitologie-Mycologie du CHU de Nantes) mais certains utilisent l'électrosynérèse (Bessières *et al.*, 2004). Cependant, le diagnostic d'aspergillose chez l'immunocompétent doit associer une technique de dépistage et une technique de confirmation par immunoprécipitation. Du fait, d'une part du peu d'études dans la littérature sur la détection des anticorps anti-*Aspergillus* et, d'autre part du peu de techniques de dépistage commercialisées, le laboratoire de Parasitologie-Mycologie du CHU de Nantes avait fait le choix de l'hémagglutination indirecte comme technique de dépistage, méthode facile et rapide de mise en place.

Un diagnostic initial d'ABPA a été posé pour cinq patients durant la période 2001-2006. Le comportement des deux techniques immunologiques de détection des anticorps anti-aspergillaires employées en routine au laboratoire (HAI, IE) va être discuté après comparaison à la technique Elisa. Les IgE spécifiques, autre critère majeur lors du diagnostic d'ABPA, seront également étudiés (Tableau XXV).

La technique d'hémagglutination n'est jamais positive. Elle ne se révèle douteuse que dans un seul cas avec un titre de 320 chez Madame D. Sylvette.

L'immunoélectrophorèse est positive dans chacun des cinq cas avec un nombre d'arcs de précipitation allant du seul arc catalasique jusqu'à 6 arcs (dont la catalase).

La recherche d'IgE spécifiques se révèle être performante puisqu' elle s'avère être positive dans chacun des cinq cas. Pour quatre cas, les IgE spécifiques sont de classe V et pour le dernier cas, elles sont de classe II mais dans un tableau abâtardi par une corticothérapie au long cours (Monsieur C. Bernard).

La technique Elisa a été effectuée sur trois sérums qui sont tous positifs avec un index supérieur à 2,5.

Tableau XXV : Comportement de 4 techniques sérologiques lors du diagnostic d'ABPA

	<i>D. Sylvette</i>	<i>B. Géraldine</i>	<i>N. Lucienne</i>	<i>G. Chantal</i>	<i>C. Bernard</i>
Ac précipitants (IE)	+	+	+	+	+
Ac totaux agglutinants par HAI	Douteuse	-	-	-	-
IgE spécifiques	Classe V	Classe V	Classe V	Classe V	Classe II
IgG spécifiques par Elisa	+	Non réalisée	Non réalisée	+	+

L'étude de ces cinq cas confirme que la présence d'anticorps précipitants et d'IgE spécifiques anti-*A. fumigatus* sont deux critères ayant une importance capitale dans le diagnostic de l'ABPA. La positivité simultanée de ces deux critères semble être un critère fort en faveur d'une ABPA, d'autant plus que le diagnostic est porté chez ces 5 patients en l'absence de bronchectasies proximales : il s'agit de cas d'ABPA-S décrits par Greenberger (Greenberger *et al.*, 1993).

Par contre, le rôle des anticorps agglutinants anti-*A. fumigatus* semble limité. Utilisée théoriquement comme technique de dépistage, nous pouvons remettre en cause l'utilité de l'HAI qui confirme son manque de sensibilité dans l'ABPA.

Concernant la technique Elisa, qui recherche les IgG spécifiques anti-*A. fumigatus*, les résultats positifs (avec un index élevé) obtenus sur trois patients concordent avec le diagnostic d'ABPA qui a été posé.

Nous pouvons discuter plus précisément le cas de Madame G. Chantal, dont le diagnostic est posé en janvier 2005. Trois ans auparavant (en février 2002), un examen radiologique, réalisé en systématique avant une chirurgie ORL, avait rapporté la présence d'opacités évoquant des adénopathies lesquelles avaient orienté le diagnostic vers la recherche infructueuse d'une étiologie tuberculeuse. Une ABPA n'avait pas été évoquée devant l'absence totale d'arcs en immunoélectrophorèse et une HAI inférieure à 80. Le dosage des IgE totales et spécifiques anti-*A. fumigatus* n'avait pas été réalisé. Nous avons réalisé en rétrospectif le dosage des IgG spécifiques anti-*A. fumigatus* en Elisa montrant un index élevé de 3,7. Dans un contexte d'asthme chronique (avec un suivi irrégulier) associé à des images radiologiques compatibles avec une ABPA, à une hyperéosinophilie sanguine (1 G/L) et à une biopsie thoracique montrant une alvéolite macrophagique avec des éosinophiles, nous pouvons nous demander s'il ne s'agissait pas du premier épisode d'ABPA. D'autant plus qu'une amélioration des images radiologiques a été observée après 20 jours de corticothérapie orale. De plus, lors du diagnostic en janvier, l'immunoélectrophorèse est positive mais seul l'arc catalasique est présent en comparaison à un index Elisa élevé (2,6). Sommes-nous en présence d'une Elisa plus sensible que l'immunoélectrophorèse en faveur d'un diagnostic d'ABPA dès février 2002 ou s'agit-il simplement d'une fausse réactivité en Elisa ?

En conclusion, l'HAI est une mauvaise technique de dépistage lors du diagnostic de l'ABPA. Elle pourrait être remplacée par la technique Elisa de dosage des IgG spécifiques anti-*A. fumigatus*. D'autre part, se pose la question de la valeur de l'Elisa comme critère diagnostique dans le cas où les précipitines ou les IgE spécifiques manqueraient. Cette technique pourrait-elle être une aide à un diagnostic plus précoce des ABPA-S ? D'autres études prospectives devront être réalisées afin d'évaluer son efficacité et son intérêt dans ce contexte.

II.5.2. Place de l'Elisa lors des exacerbations

Dans un premier temps, il est important de rappeler la nécessité d'un suivi régulier de l'ABPA pour dépister précocement les exacerbations de la maladie afin de mettre en place un traitement adéquat et ainsi éviter l'évolution de la maladie vers le stade V (Tillie-Leblond et Tonnel, 2005). Il est bien entendu qu'une détérioration clinique doit faire suspecter une exacerbation, de même que l'apparition d'images pulmonaires telles des opacités. Cependant, l'élévation de certains marqueurs biologiques peuvent être prédictifs d'un épisode d'exacerbation. Le dosage des IgE totales est très utilisé pour le suivi de la maladie : un doublement ou une augmentation importante de leur taux sont en faveur d'une exacerbation de la maladie (Patterson *et al.*, 1982). Une hyperéosinophilie sanguine est également observée lors des exacerbations (Tillie-Leblond et Tonnel, 2005). Une élévation des précipitines peut également être prise en compte comme marqueur d'exacerbation bien que de nombreux auteurs ne considèrent pas les précipitines comme un élément de surveillance de la maladie.

Nous avons répertorié 12 épisodes d'exacerbation durant la période 2002-2006, répartis sur 7 patients. En effet, chez trois patients, deux ou trois exacerbations ont pu être observées. Nous allons dans un premier temps nous intéresser au comportement des paramètres suivants au moment d'un épisode d'exacerbation : IgE totales, éosinophiles, IE, HAI et Elisa (Tableau XXVI).

Précisons tout d'abord que dans 8 cas sur 12, c'est la détérioration de l'état clinique du patient qui l'amène à consulter. Les examens biologiques viennent alors confirmer l'épisode d'exacerbation, ce qui est tout de même important car il faut pouvoir éliminer les autres complications pulmonaires (surinfection bactérienne de DDB, pneumopathies...).

Tableau XXVI : Comportement des marqueurs biologiques pour chaque épisode d'exacerbation

	IgE t	Eosinophiles	IE	HAI	Elisa
B. Yvonne (1)	Taux élevé et stable	↑	↑	Négative	↑
B. Yvonne (2)	Taux élevé et stable	Taux élevé et stable	Positive	↑	Positive
B. Yvonne (3)	Taux élevé et stable	Taux élevé et stable	Positive	Négative	Positive
M. Thérèse	×2	↑	↑	↑	↑
R. Madeleine	↑	↑	↑	Négative	↑
D. Marcel	×2	↑	Positive	Négative	Positive
C. Marie-Madeleine (1)	Taux élevé et stable	↑	Négative	Négative	Non réalisée
C. Marie-Madeleine (2)	×2	↑	Négative	Négative	↑
C. Marie-Madeleine (3)	Taux élevé et stable	↑	↑	Négative	↑
B. Géraldine (1)	×2	↑	↑	Négative	Positive
B. Géraldine (2)	×2	↑	↑	Négative	↑
D. Sylvette	↑	↑	Positive	Négative	↑

Légende : ×2 : doublement du taux

↑ : augmentation

Etudions maintenant les quatre cas où l'épisode d'exacerbation n'a pas été évoqué face à une symptomatologie clinique :

- Tout d'abord, prenons le cas de Madame B. Yvonne. Lors du premier épisode d'exacerbation, nous pouvons observer dès le mois de juin 2002 une hyperéosinophilie et l'apparition d'arcs de précipitation en immunoélectrophorèse alors que le dosage des IgE totales n'est pas contributif. C'est seulement en septembre, face à l'apparition de signes cliniques et radiologiques que la patiente est mise sous corticothérapie orale. Le dosage des IgG spécifiques par la technique Elisa, qui a été fait en rétrospectif, montre une élévation significative de l'index entre le mois de janvier 2002 et le mois de juin (de 1,2 à 2,7). Nous pouvons nous demander si l'Elisa ne pourrait pas être contributive à un diagnostic précoce d'exacerbation notamment en l'absence de signes cliniques, radiologiques et de doublement du taux d'IgE totales.
- En ce qui concerne Madame C. Marie-Madeleine, lors de la deuxième exacerbation de septembre 2002, son état clinique est satisfaisant. Par contre, biologiquement, on note une hyperéosinophilie et une élévation des IgE totales (passage de 1129 en mai à 3388 UI/mL en septembre) ainsi que des opacités à l'examen radiologique. Là aussi, le traitement est mis en route uniquement en décembre devant la persistance des signes biologiques et l'apparition d'expectorations chez la patiente. L'index Elisa montre une augmentation significative passant de 0,6 en mai 2002 à 1,2 en septembre. L'élévation de l'index Elisa est donc à nouveau antérieur aux premiers signes cliniques d'exacerbation et à la mise en place du traitement. Nous pouvons remarquer que l'IE est restée négative lors de cet épisode d'exacerbation aussi bien en septembre qu'en décembre. D'autre part, en janvier 2004, la patiente présente à nouveau des signes biologiques (hyperéosinophilie et ascension du nombre d'arc en IE) et radiologiques d'exacerbation alors qu'elle est stable cliniquement. Les IgE totales étaient élevées mais stables. Pourtant, ce n'est qu'en avril que le traitement est instauré devant la majoration de la dyspnée. Le dosage des IgG anti-aspergillaires en Elisa montrait une

ascension de l'index entre le mois d'août 2003 et le mois de janvier 2004 (0,7 et 1,3 respectivement).

- Enfin, le dernier exemple concerne Monsieur D. Marcel. Ce patient consulte en juin 2005 : son état clinique est satisfaisant par contre, biologiquement, nous pouvons noter une hyperéosinophilie (1,5 G/L), une ascension des IgE totales. L'index Elisa est à élevé à 2,2. Cependant, nous n'avons pas de sérum antérieur permettant de dire s'il s'agit d'une augmentation de l'index.

L'observation de ces quatre cas montre l'intérêt que pourrait avoir l'Elisa en complément des IgE totales, de l'éosinophilie et de l'immunoélectrophorèse dans le dépistage précoce des exacerbations avant l'apparition d'une symptomatologie clinique afin de permettre une mise en place plus rapide d'un traitement.

Nous pouvons aussi analyser les résultats de façon plus globale, en répertoriant pour chacun des cinq marqueurs le nombre de fois où celui-ci a été contributif au diagnostic d'exacerbation (Figure 27).

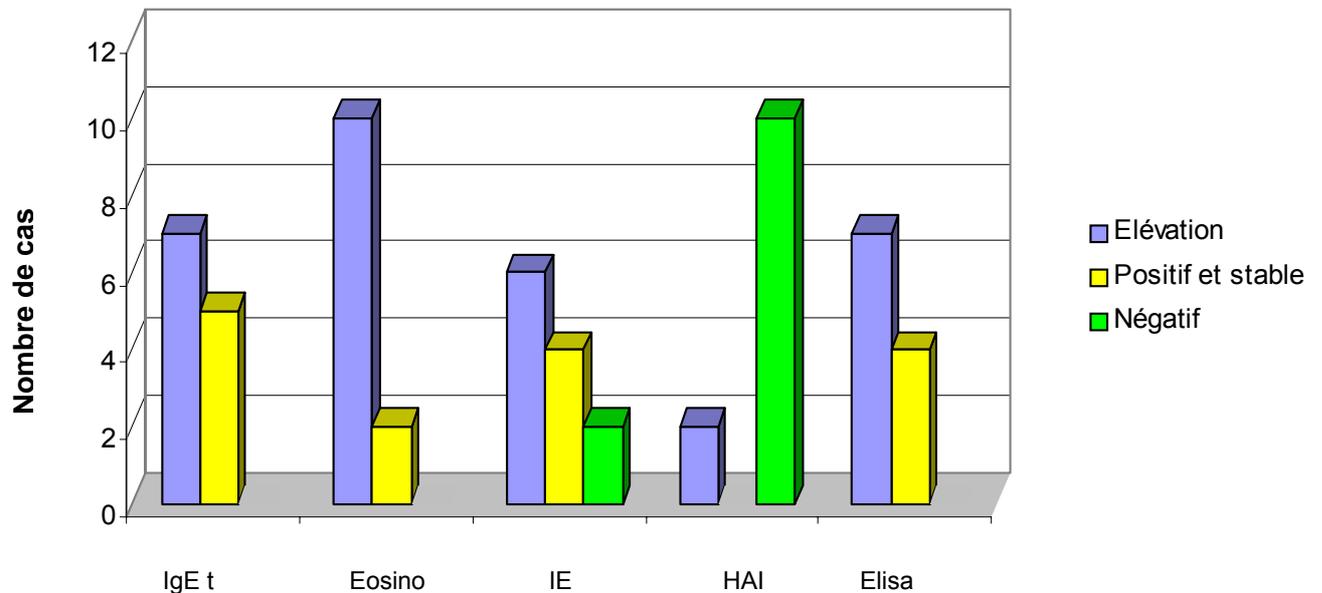


Figure 27 : Nombre de cas contributifs au diagnostic d'exacerbation pour chaque marqueur

Il ressort de ce graphique que le dosage des éosinophiles est le dosage le plus souvent contributif avec 10 cas sur 12 exacerbations. Viennent ensuite les IgE totales et le dosage des IgG spécifiques par Elisa avec une élévation significative dans 7 cas. Les IgE totales sont positives dans les cinq autres cas mais avec des taux élevés et stables. Or, c'est le doublement de leur taux (voire une élévation importante) qui est en faveur d'une exacerbation d'ABPA. Les IgE totales ne sont donc pas contributives pour cinq épisodes d'exacerbation. Par contre, pour les quatre cas répertoriés positifs en Elisa, l'absence de dosage antérieur récent ne nous permet pas de dire s'il s'agit d'une élévation de l'index ou pas. D'autre part, parmi les cinq cas où les IgE totales ne sont pas contributives, on note une élévation de l'index Elisa dans deux cas. En ce qui concerne l'immunoélectrophorèse, son apport est intéressant pour le diagnostic d'exacerbation (augmentation significative du nombre d'arcs pour 6 cas) bien que pour deux épisodes d'exacerbation, aucun arc de précipitation ne soit observé. Enfin, la technique HAI reste négative lors de 10 des 12 épisodes d'exacerbation.

Nous pouvons donc dire que les IgE totales et surtout les éosinophiles restent de très bons marqueurs d'exacerbation. La technique Elisa a des résultats très intéressants et semble se placer comme un marqueur au moins aussi efficace que les IgE totales et plus sensible que l'immunoélectrophorèse pour la surveillance biologique de l'évolution de l'ABPA. Ses résultats se montrent en tous cas nettement supérieurs à ceux de l'HAI.

II.5.3. Quelle place dans l'évaluation de la réponse au traitement ?

Il n'existe pas actuellement de consensus sur les critères d'évaluations au traitement. La résolution des infiltrats radiologiques (Stevens *et al.*, 2000) fait partie des critères proposés par Stevens *et al.*. Une normalisation des éosinophiles est généralement observée (Tillie-Leblond *et al.*, 2002). Cependant, les IgE totales semblent le marqueur le plus utilisé. En effet, une diminution du taux d'IgE totales semble habituelle après une corticothérapie orale (Ricketti *et al.*, 1984). Elle serait même d'au moins 25 % selon Stevens (Stevens *et al.*, 2000). Cependant, certains patients gardent un taux élevé en IgE totales. Il est donc intéressant d'évaluer l'Elisa afin de

déterminer si cette technique peut être utilisée comme critère de réponse au traitement.

Tous les épisodes ayant nécessité la mise en place d'une corticothérapie orale et/ou l'introduction d'itraconazole et pour lesquels un dosage Elisa a pu être réalisé ont été retenus ce qui représente au total 16 épisodes. L'administration de corticoïdes per os chez Monsieur R. Joël à partir d'août 2002 est un cas particulier : elle a été faite dans le cadre d'un glioblastome et non pour traiter sa pathologie aspergillaire. Il sera cependant intéressant de commenter l'évolution de l'Elisa chez ce patient après l'introduction des corticoïdes. Pour les 15 autres cas, le traitement a été instauré à la suite d'une exacerbation ou après le diagnostic initial d'ABPA. L'évolution clinique est favorable sous traitement dans 13 épisodes et défavorable lors de deux épisodes.

Dans un premier temps, nous allons étudier l'évolution de l'Elisa et de l'immunoélectrophorèse lors des épisodes de traitement avec évolution favorable (n =13). Une diminution significative de l'index Elisa a été observée pour 10 des 13 épisodes. Par contre, en immunoélectrophorèse, le nombre d'arcs reste positif sans diminution pour 7 des 13 épisodes.

Il convient cependant d'étudier séparément les épisodes concernant Madame B. Yvonne. Cette patiente subit trois épisodes d'exacerbation en juin 2002, en juillet 2003 et en mai 2004, soit environ un par an. Le traitement instauré après le début de chacun des épisodes permet à chaque fois d'améliorer l'état respiratoire de la patiente. Cependant, les IgE totales restent constamment élevées, l'hyperéosinophilie persiste, des images radiologiques sont régulièrement observées, le nombre d'arcs reste important et l'index Elisa reste très positif sans diminution. De plus, chaque tentative d'arrêt du traitement se traduit rapidement par l'apparition de nouveaux signes cliniques d'exacerbation. Nous pouvons donc nous demander si les différents bilans biologiques et radiologiques effectués n'étaient pas le reflet d'une ABPA non jugulée. Dans ce cas, la persistance d'un index élevé en Elisa pourrait s'expliquer.

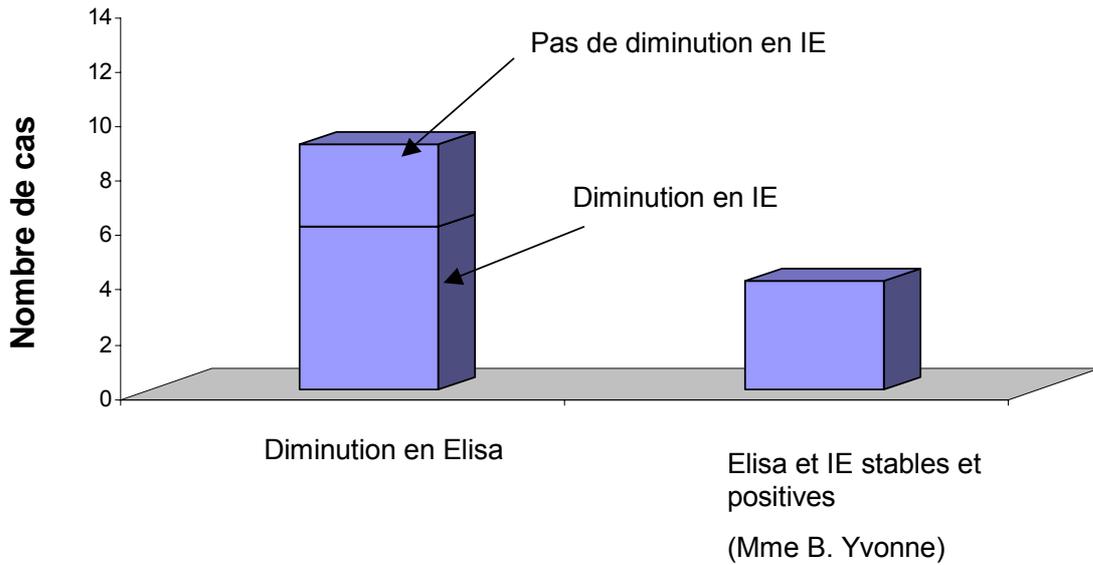


Figure 28 : Evolution de l'IE et de l'Elisa lors des traitements avec évolution favorable

Ce diagramme permet simplement de dire que l'amélioration de l'état clinique d'un patient en cours de traitement s'accompagne dans la majeure partie des cas d'une diminution de l'index Elisa.

Comparons maintenant les deux techniques sérologiques vues précédemment avec les IgE totales, qui sont très utilisées pour le suivi d'un traitement d'ABPA (Figure 29).

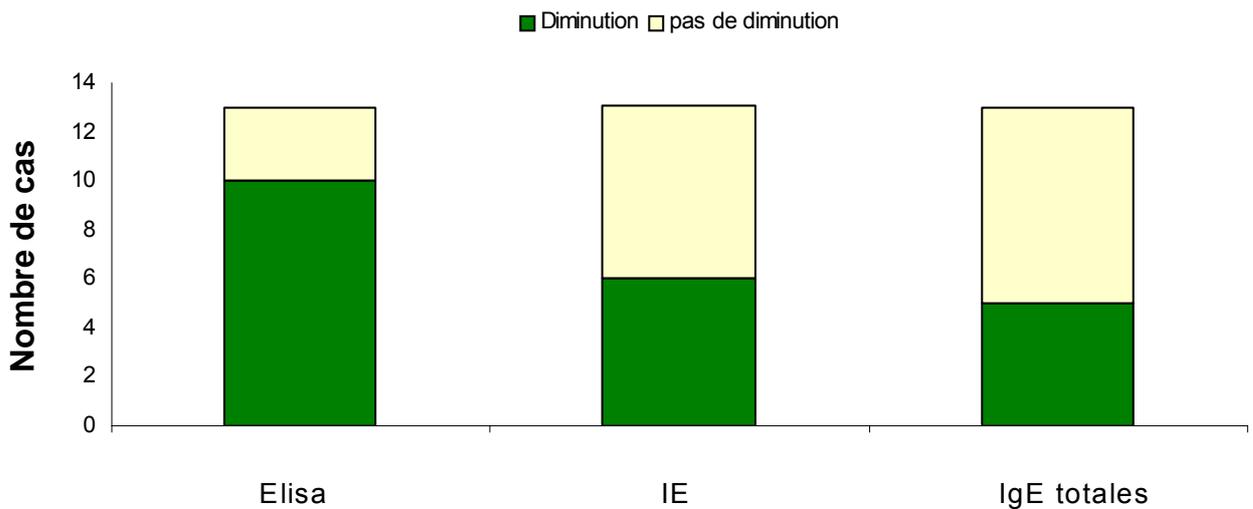


Figure 29 : Comparaison Elisa, IE et IgE t lors d'un traitement avec évolution favorable

Il est intéressant de constater que sur 13 cas, les résultats de l'Elisa semblent plus représentatif de l'efficacité du traitement de l'ABPA puisqu'une diminution est observée dans dix cas contre seulement cinq avec les IgE totales.

Etudions maintenant les deux cas où le traitement mis en place n'a pas été suivi d'une amélioration de l'état clinique du patient : il s'agit de Madame G. Chantal et de Madame N. Lucienne.

Chez Madame G. Chantal, l'observance du traitement (instauré à partir d'avril 2005) est très mauvaise. Cela se traduit par un état respiratoire restant médiocre, la persistance d'images pulmonaires, un nombre d'arcs de précipitation restant positif et stable, des IgE totales avec un taux élevé et stable (entre 1412 et 2400 UI/mL) et un index Elisa stable compris entre 2,3 et 2,8. Il y a donc une concordance entre les différents marqueurs biologiques, la radiologie et l'état clinique de la patiente.

Chez Madame N. Lucienne, le diagnostic est posé en novembre 2001 et le traitement instauré en décembre. Durant l'année 2002, il n'y a pas de franche amélioration respiratoire. Par contre, l'immunoélectrophorèse est négative et les IgE totales sont inférieures à 500 UI/mL (contre 1036 UI/mL au moment du diagnostic). L'Elisa n'avait pas été réalisée sur le sérum de novembre mais l'index des deux sérums de 2002 reste positif (1,6 et 1,7) alors qu'une diminution significative sera observée à partir de 2004 (<1) avec un état clinique plus satisfaisant et stable.

Sur les deux cas où l'évolution clinique n'est pas favorable, seule la technique Elisa montre la persistance d'anticorps spécifiques.

La technique Elisa semble avoir une bonne valeur prédictive dans le suivi du traitement. En effet, une diminution de l'index Elisa a été observée 10 fois après l'instauration d'un traitement correspondant à chaque fois à une amélioration clinique. L'index est resté positif sans diminution dans 5 cas : dans deux cas, l'évolution n'était pas favorable sous traitement. Pour les trois autres cas, il s'agit de trois épisodes concernant Madame B. Yvonne.

En définitif, les résultats de l'Elisa dans le cadre du suivi de l'efficacité du traitement de l'ABPA sont prometteurs. Il pourrait être intéressant, dans les mois qui suivent l'instauration d'un traitement, d'effectuer un dosage régulier des IgG anti-A.

fumigatus en Elisa : la cinétique des anticorps pourrait avoir une bonne valeur prédictive de la bonne efficacité ou non d'un traitement.

En ce qui concerne Monsieur R. Joël, la corticothérapie orale est instaurée dans un contexte autre qu'une exacerbation de sa pathologie aspergillaire : un glioblastome est diagnostiquée en août 2003. L'index Elisa est de 3 au mois de mars 2003 puis de 1,5 au mois de septembre 2003 soit à peine un mois après le début du traitement. Dans le même temps, l'IE reste positive et stable avec l'arc catalasique ou deux arcs de précipitation. Or, ce monsieur est à un stade évolué d'ABPA puisque dès 1991, on note des bronchectasies proximales qui favorisent la colonisation bronchique par *Aspergillus*. L'adjonction de corticoïdes a fortes doses (1 mg/kg) a peut être permis de diminuer l'inflammation des bronches et la stimulation antigénique continue par *Aspergillus* expliquant la diminution des anticorps spécifiques détectée par la technique Elisa.

II.5.4. Place de l'Elisa dans un suivi régulier de la maladie

Nous allons étudier l'apport d'un dosage régulier des IgG spécifiques en Elisa pour apprécier une stabilité clinique de l'ABPA chez un patient.

Pour cela, nous avons répertorié dans l'ensemble des dossiers toutes les périodes caractérisées par une stabilité de l'index Elisa. Nous avons pu trouver chez onze patients différents une période avec des dosages réguliers en Elisa et pendant laquelle la cinétique de l'index est stable. Nous avons séparé les périodes ayant des index Elisa positifs de celles ayant un index négatif (Figure 25).

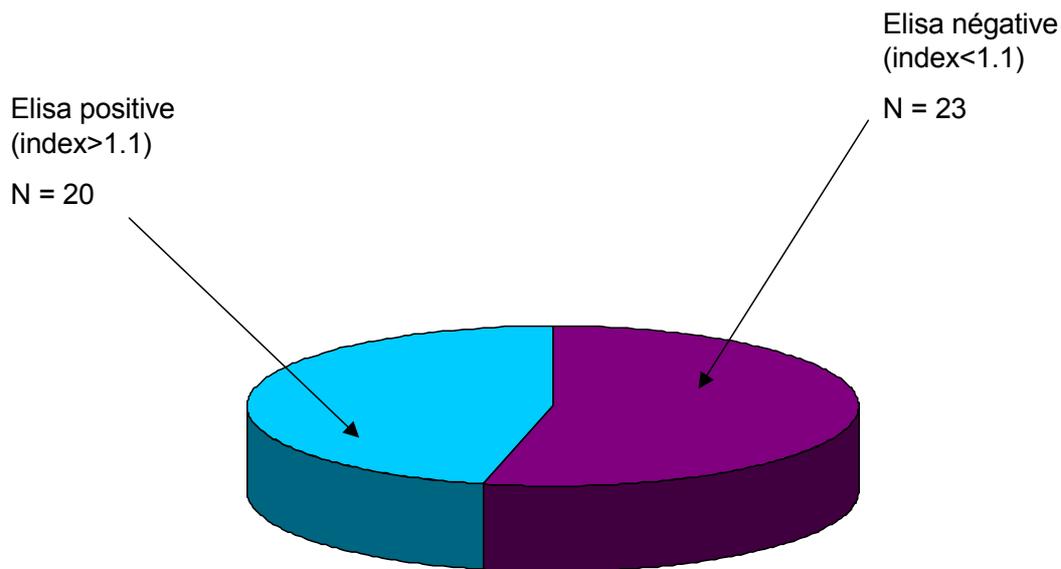


Figure 30 : Répartition qualitative (positif-négatif) des sérums ayant un index stable

Nous pouvons donc constater que près de la moitié des sérums ont un index Elisa positif, ne correspondent ni à une période d'exacerbation de la maladie, ni à un diagnostic initial d'ABPA. Il semblerait donc important de préciser qu'un index Elisa positif isolé ne préjuge en rien de l'évolution clinique actuelle ou future de l'ABPA chez le patient.

Nous allons étudier maintenant pour chacun des onze patients ces périodes de stabilité des IgG anti-*A. fumigatus* dosées par la technique Elisa.

Nous considérerons, dans un premier temps, les patients pour lesquels les IgG spécifiques sont stables et négatives (Tableau XXVII).

Tableau XXVII : Etude chez six patients d'une période avec un index Elisa stable et négatif

	Sérum 1	Sérum 2	Sérum 3	Sérum 4	Sérum 5	Sérum 6	Commentaires
C. Marie-Madeleine	0,6	0,7	0,6	0,5	0,4		Etat clinique satisfaisant
R. Pierre	0,9	0,7	0,9	0,8	0,7		Décompensation respiratoire sans rapport avec l'ABPA
G. Nadine	0,8	0,6	0,9				Etat clinique satisfaisant sous Vfend®
R. Madeleine	1	1	0,7				Bon état général
N. Lucienne	0,85	0,9	1	1,1			Etat clinique stable
B. Géraldine	1,1	0,6	0,5				Etat clinique stable

Pour les six premiers patients, l'index Elisa reste stable et négatif (ou douteux) sur toute la période. Pour chacun d'entre eux, l'état clinique est satisfaisant sans évolution. Ainsi, nous pouvons dire que la persistance à un taux bas des IgG anti-*A. fumigatus* est en faveur d'une ABPA non évolutive.

Le second groupe étudié correspond à des patients pour lesquels les IgG spécifiques sont stables mais positives (Tableau XXVIII).

Tableau XXVIII : Etude chez cinq patients d'une période avec un index Elisa stable et positif

B. René	1,5	1,7	1,7				ABPA stable et aspergillome associé
M. Annie	3,8	4	3,3	4			Nombreuses surinfections bronchiques
B. Yvonne	4,4	3,2	2,4	2,6	2,6	2,7	Etat respiratoire satisfaisant mais persistance de signes radiologiques et biologiques
G. Dominique	2,2	2,45	1,7	1,2			Etat stable avec persistance de bronchectasies surinfectées
C. Bernard	2	2,4	1,5	2,4			Etat stable sans réelle amélioration de l'asthme

Deux patientes gardent des index Elisa continuellement très élevés : Madame M. Annie et Madame B. Yvonne. Pour Madame M. Annie, de janvier 2002 à décembre 2003, nous pouvons relever chez cette patiente de très nombreux épisodes de surinfections bronchiques avec mise en évidence de bacilles pyocyaniques dans ces crachats et d'*A. fumigatus*. Ainsi, il s'agit probablement chez cette patiente d'un problème double avec des surinfections bactériennes de DDB associées à une colonisation persistante par *Aspergillus* (favorisée par les DDB). En ce qui concerne Madame B. Yvonne rappelons qu'entre mai 2004 (date de sa dernière exacerbation) et janvier 2006, malgré un état clinique favorable, il n'y avait pas eu, en fait, de réelle rémission avec la persistance d'une importante éosinophilie, la présence régulière d'infiltrats à la radiologie chez une patiente qui continue également d'expectorer des moules bronchiques.

Chez ces deux patientes, nous pouvons donc dire que la persistance de taux élevés en Elisa était corrélée soit à une absence de véritable rémission, soit à un contexte de DDB en faveur d'une colonisation persistante des bronches par *Aspergillus* (le

contexte est alors à rapprocher de celui de la mucoviscidose avec une prise en charge similaire).

Le cas de Monsieur B. René est également intéressant puisque ce patient garde un index positif stable en Elisa compris entre 1,5 et 1,7 alors qu'aucun épisode d'exacerbation de la maladie n'a été noté depuis plusieurs années. En fait, ce patient présente également un aspergillome non opérable et traité par Vfend® ou Sporanox®. L'aspergillome est à l'origine d'une charge antigénique persistante pouvant expliquer l'index stable et positif en Elisa. La stabilité de cet index est alors indicatif d'une ABPA non évolutive.

Nous pouvons également expliquer la persistance d'un index positif et stable en Elisa chez Monsieur C. Bernard par un diagnostic posé à un stade déjà évolué de la maladie puisque ce monsieur est corticodépendant depuis plusieurs années. La corticothérapie au long cours et la prise régulière d'itraconazole ne permettent pas une amélioration de l'asthme.

En définitif, un index Elisa ne doit pas être considéré isolément. Seule la cinétique d'évolution de cet index peut permettre de suivre efficacement l'évolution de la maladie et une cinétique stable semble prédictive d'une ABPA non évolutive à moyen terme. Par contre, nous avons vu qu'un index restant élevé était l'image d'une pathologie aspergillaire mal jugulée, d'une charge antigénique persistante ou d'un stade évolué de la maladie.

Seul le cas de Monsieur G. Dominique vient à l'encontre de ces conclusions puisque ce monsieur garde un index Elisa positif et même supérieur à 2 en 2002 et 2003 alors qu'aucune complication respiratoire d'ABPA n'est notée de juin 2002 à juin 2004. Ce patient présente également un taux d'IgE totales supérieur à 3000 UI/mL. Cependant, il existe chez ce patient un terrain de DDB ancien qui pourrait expliquer la persistance d'un index élevé en Elisa et d'un taux élevé en IgE totales.

Conclusion

Ce travail portait sur une nouvelle technique de dosage des anticorps anti-aspergillaires de type IgG par Elisa. L'objectif était double : d'une part il s'agissait de valider la technique dans le diagnostic des aspergilloses de l'immunocompétent, d'autre part nous avons essayé de déterminer l'intérêt de l'Elisa dans l'ABPA à travers un suivi longitudinal de patients porteurs de cette pathologie aspergillaire. Il existe peu d'études dans la littérature permettant d'évaluer conjointement les différents marqueurs biologiques de diagnostic et de suivi de la maladie et il semblait intéressant de comparer l'Elisa à ces marqueurs en reliant les résultats obtenus à l'histoire clinique de chaque patient.

L'intérêt de l'Elisa dans le diagnostic de l'ABPA semble limité. En effet, les critères diagnostiques de l'ABPA sont actuellement bien définis. Bien que l'Elisa montre des résultats intéressants, la détection des précipitines en immunoélectrophorèse reste un critère important dans le diagnostic de l'ABPA et rarement pris en défaut. Il conviendra tout de même de préciser si l'Elisa ne peut pas être une aide à un diagnostic plus précoce dans l'ABPA. Une étude prospective sur des populations à risque d'ABPA pourrait permettre d'y répondre.

Par contre, les résultats de l'Elisa comme marqueur d'exacerbation et dans l'évaluation de la réponse au traitement sont prometteurs. En effet, l'utilisation des IgE totales a des limites. Or, il est important pour les cliniciens de disposer d'un marqueur biologique qui permettrait d'anticiper les signes cliniques et radiologiques des exacerbations et de prédire l'efficacité thérapeutique. Le dosage des IgG spécifiques en Elisa pourrait être ce marqueur à condition de confirmer son efficacité sur une étude prospective.

Ce travail mérite donc d'être poursuivi afin de déterminer la place exacte de l'Elisa dans la prise en charge et le suivi du patient et sa valeur par rapport aux autres éléments de suivi qu'ils soient cliniques, radiologiques ou biologiques.

Annexe 1

Le coffret utilisé est intitulé **ASPERGILLOSE FUMOUCZE®**. Il est conservé au réfrigérateur à une température comprise entre +2°C et +8°C. Avant utilisation, il faut laisser les réactifs et les sérums revenir à température ambiante.

- Préparation de la dilution mère au 1/40^è

Cela concerne les sérums à analyser et les témoins positif et négatif contenus dans le coffret : on mélange dans un tube à hémolyse 975 µL de tampon phosphate avec 25 µL de sérum ou de contrôle.

- Réalisation du test sur microplaque

La première étape consiste à distribuer 50 µL de la solution tampon dans 7 cupules de la microplaque (une rangée horizontale par sérum à tester ou par témoin).

Puis, on distribue 50 µL de la dilution mère du sérum dans la 1^{ère} cupule que l'on mélange avec le tampon. Ensuite, on reporte 50 µL de la 1^{ère} cupule dans la 2^{ème}, de la 2^{ème} dans la 3^{ème} et ainsi de suite jusqu'à la 6^{ème} cupule incluse en rejetant 50 µL de la dernière cupule remplie (Tableau XXIX).

Tableau XXIX : Différentes dilutions obtenues dans la techniques d'HAI

1 ^{ère} cupule	2 ^{ème} cupule	3 ^{ème} cupule	4 ^{ème} cupule	5 ^{ème} cupule	6 ^{ème} cupule
1/80	1/160	1/320	1/640	1/1280	1/2560

Pour constituer le témoin sérum (dont le rôle est de détecter les agglutinines naturelles anti-mouton que peuvent contenir certains sérums), on distribue 50 µL de la dilution mère dans la 7^{ème} cupule que l'on mélange avec le tampon phosphate. 50 µL sont rejetés.

Après avoir soigneusement agité les suspensions d'hématies, une goutte d'hématies sensibilisées est déposée dans les 6 premières cupules et une goutte d'hématies non sensibilisées est déposée dans la 7^{ème} cupule (témoin sérum).

Remarque: à chaque série de test, un témoin réactif doit être réalisé afin de contrôler la validité du tampon et des hématies sensibilisées. Pour cela, on mélange dans une 8^{ème} cupule 50 µL de tampon phosphate et une goutte d'hématies sensibilisées.

Pour terminer, il est nécessaire d'homogénéiser le contenu des cupules par tapotements latéraux. La plaque est ensuite laissée à plat et à l'abri de toutes vibrations pendant deux heures au bout desquelles la lecture de la réaction pourra se faire.

- Contrôles de qualité interne

Chaque coffret contient un contrôle positif de titre connu et un contrôle négatif. Ils sont prêts à l'emploi et doivent être traités comme les sérums à analyser. Ils permettent la validité du test. Le titre du contrôle positif doit être égal au titre annoncé sur l'étiquette du flacon à plu ou moins une dilution. Le contrôle négatif doit présenter une absence d'hémagglutination.

- Lecture des résultats

La présence d'un anneau plus ou moins large au fond de la cupule correspond à une réaction négative c'est à dire qu'il y a absence d'agglutination.

La présence d'un voile rouge/marron tapissant la cupule correspond à une réaction positive c'est à dire qu'il y a présence d'agglutination.

Le seuil de positivité est indiqué par la première cupule présentant un anneau large et périphérique. Le titre est donné par l'inverse de la dilution de cette cupule.

Le témoin sérum et le témoin réactif doivent donner une réaction négative.

- Interprétation des résultats

Un titre inférieur à 320 est en faveur d'une réaction non significative ne permettant pas d'évoquer une aspergillose profonde. Par contre un titre supérieur à 320 indique une réaction positive en faveur d'une aspergillose profonde. Pour un titre égal à 320, la réaction est douteuse et le test doit être renouveler ultérieurement.

Annexe 2

Le coffret utilisé pour l'immunoélectrophorèse est le coffret **PARAGON**[®] de chez **BECKMAN**[®]. La coloration du gel d'agarose est effectuée à l'aide du coffret **Bleu de Protur**[®]. Le réactif antigénique d'*Aspergillus fumigatus* est fourni par **Pasteur**[®].

Juste avant l'utilisation, le gel est retiré avec précaution de son emballage. Les gels doivent être conservés à température ambiante (entre 18°C et 26°C) jusqu'à la date de péremption. Ces conditions doivent être impérativement respectées afin d'éviter une migration atypique.

Après avoir séché le gel avec du papier buvard fin, la matrice est appliquée sur le gel suivant les points de positionnement C figurant sur les côtés du gel (il faut presser doucement la matrice pour éliminer les bulles d'air).

L'échantillon d'antigène est ensuite distribué à raison de 3 µL. Après 10 minutes d'attente, la matrice est séchée avec un buvard fin et l'ensemble matrice-buvard est retiré en même temps. Le gel est alors plié et positionné sur le pont d'électrophorèse en respectant les polarités et l'ensemble est placé dans la cuve d'électrophorèse sous tension de 100 Volts pendant 15 minutes. Le gel est alors retiré de la cuve et séché par un buvard fin.

Dans un deuxième temps, la matrice des sérums est appliquée sur le même gel suivant les points de positionnement A (il faut presser doucement pour assurer l'adhésion complète). Chaque sérum est ensuite déposé à raison de 120 µL dans chaque rigole. Après 20 minutes d'attente, la matrice est séchée avec du buvard fin puis, l'ensemble matrice-buvard est retiré du gel. Celui-ci est alors placé dans une boîte d'incubation sur un buvard imbibé d'eau distillée et de Merseptyl[°]. La boîte est fermée et mise à incuber à température ambiante pendant 18 à 24 heures.

La période d'immunodiffusion terminée, le gel est placé dans un cadre et plongé dans une solution de citrate de sodium à 5 % pendant une heure afin d'éliminer les arcs non spécifiques dus à la Protéine C Réactive. Le gel est alors mis dans un bain de PBS pendant 10 minutes puis mis sous presse pendant 10 minutes. Cette dernière opération est répétée une autre fois.

Le gel est ensuite complètement séché à l'étuve pendant 15 à 20 minutes (ou à l'aide d'un sèche cheveux). Pour la révélation et la coloration des arcs, le gel est immergé successivement dans le Bleu Protur^o pendant 5 à 10 minutes, puis dans de l'eau distillée pendant 1 à 2 minutes et enfin dans un bain d'acide-alcool pendant 1 minute.

Une dernière étape est indispensable dans le cadre du sérodiagnostic de l'aspergillose : la recherche de l'activité catalasique. Pour cela, un bain d'eau oxygénée 10 volumes dilué au 1/3 en eau distillée. Le gel est immergé dans le bain et la présence de bulles sur certains arcs de précipitation signe une activité catalasique.

La lecture des résultats se fait en comptant le nombre d'arcs visibles sur le gel et en notant la présence ou non d'une activité catalasique.

La présence de deux arcs de précipitation ou de la seule activité catalasique est en faveur d'une aspergillose évolutive.

Bibliographie

- Balter, M. S. and A. S. Rebeck (1992). "Treatment of allergic bronchopulmonary aspergillosis with inhaled corticosteroids." Respir Med **86**(5): 441-2.
- Beauvais, A., M. Monod, J. P. Debeaupuis, M. Diaquin, K. Kobayashi and J. P. Latge (1997). "Biochemical and antigenic characterization of a new dipeptidyl-peptidase isolated from *Aspergillus fumigatus*." J Biol Chem **272**: 6238-6244.
- Beauvais, A., M. Monod, J. P. Wyniger, J. P. Debeaupuis, N. Grouzmann, J. Brakch, A. Svab, G. Hovanessian and J. P. Latge (1997). "Dipeptidyl-peptidase IV secreted by *Aspergillus fumigatus*, a fungus pathogenic to humans." Infect Immun **67**: 3042-3047.
- Bessières, M. H., M. D. Linas and S. Cassaing (2004). "Intérêt et limites du diagnostic sérologique des mycoses." Rev Fr Lab **366**: 61-67.
- Chabasse, D., J. P. Bouchara, L. De Gentile, S. Brun, B. Cimon and P. Penn (2002). Les aspergillus. Les moisissures d'intérêt médical, Bioforma. **25**: 46-67.
- Chabasse, D., B. Dupont, P. Germaud and J. L. Harousseau (1995). "Aspergillus cet inconnu." Janssen-Cilag Publi.
- Couturaud, F. (2003). "Aspergillus et poumon." Rev Fr Allergol Immunol Clin **44**: 83-88.
- Cramer, R. (1998). "Recombinant *Aspergillus fumigatus* allergens: from the nucleotide sequences to clinical applications." Int Arch Allergy Immunol **115**(2): 99-114.
- Fink, J. N. (2000). "Therapy of allergic bronchopulmonary aspergillosis." Indian J Chest Dis Allied Sci **42**(4): 221-4.
- Fraser, R. S. (1993). "Pulmonary aspergillosis: pathologic and pathogenetic features." Pathol Annu **28 Pt 1**: 231-77.
- Germaud, P. (2004). "[Pulmonary aspergillosis: diagnosis and treatment]." Rev Pneumol Clin **60**(6 Pt 2): S11-8.
- Germaud, P. (2005). ""Aspergillus" et système respiratoire." EMC-Médecine **2**: 585-595.
- Germaud, P., K. Renaudin, I. Danner, O. Morin and A. Y. De Lajarte (2001). "[Bronchopulmonary aspergillosis: new developments]." Rev Mal Respir **18**(3): 257-66.

- Germaud, P. and E. Tuchais (1995). "Allergic bronchopulmonary aspergillosis treated with itraconazole." Chest **107**(3): 883.
- Glancy, J. J., J. L. Elder and R. McAleer (1981). "Allergic bronchopulmonary fungal disease without clinical asthma." Thorax **36**(5): 345-9.
- Greenberger, P. A. (2002). "Allergic bronchopulmonary aspergillosis." J Allergy Clin Immunol **110**(5): 685-92.
- Greenberger, P. A., T. P. Miller, M. Roberts and L. L. Smith (1993). "Allergic bronchopulmonary aspergillosis in patients with and without evidence of bronchiectasis." Ann Allergy **70**(4): 333-8.
- Hamilton, A. J., M. D. Holdom and R. J. Hay (1995). "Specific recognition of purified Cu, Zn superoxide dismutase from *Aspergillus fumigatus* by immune human sera." J Clin Microbiol **33**: 495-496.
- Hearn, V. M., E. V. Wilson and D. W. Mackenzie (1992). "Analysis of *Aspergillus fumigatus* catalases possessing antigenic activity." J Med Microbiol **36**(1): 61-7.
- Hitton, A. M. and S. S. Chatterjee (1975). "Bronchopulmonary aspergillosis : treatment with beclomethasone dipropionate." Postgrad Med **51**: 98-103.
- Ibrahim-Granet, O. and C. D'Enfert (1997). "The *Aspergillus fumigatus mepB* gene encodes an 82 kDa intracellular metalloproteinase structurally related to mammalian thimet oligopeptidase." Microbiology **143**(2247-2253).
- Imbeau, S. A., D. Nichols, D. Flaherty, H. Dickie and C. Reed (1978). "Relationships between prednisone therapy, disease activity, and the total serum IgE level in allergic bronchopulmonary aspergillosis." J Allergy Clin Immunol **62**(2): 91-5.
- Imbeault, B. and Y. Cormier (1993). "Usefulness of inhaled high-dose corticosteroids in allergic bronchopulmonary aspergillosis." Chest **103**(5): 1614-7.
- Knutsen, A. P., C. Bellone and H. Kauffman (2002). "Immunopathogenesis of allergic bronchopulmonary aspergillosis in cystic fibrosis." J Cyst Fibros **1**(2): 76-89.
- Latge, J. P. (1999). "*Aspergillus fumigatus* and aspergillosis." Clin Microbiol Rev **12**(2): 310-50.
- Leon, E. E. and T. J. Craig (1999). "Antifungals in the treatment of allergic bronchopulmonary aspergillosis." Ann Allergy Asthma Immunol **82**(6): 511-6; quiz 516-9.
- Longbottom, J. L. (1986). "Antigens and allergens of *Aspergillus fumigatus*. II. Their further identification and partial characterization of a major allergen (Ag 3)." J Allergy Clin Immunol **78**(1 Pt 1): 18-24.

- Lopez-Medrano, R., M. C. Ovejero, J. A. Calera, P. Puente and F. Leal (1995). "An Immunodominant 90-Kilodalton *Aspergillus fumigatus* Antigen Is the Subunit of a Catalase." Infect. Immun. **63**(12): 4774-4780.
- Madan, T., P. Priyadarsiny, M. Vaid, N. Kamal, A. Shah, W. Haq, S. B. Katti and P. U. Sarma (2004). "Use of a synthetic peptide epitope of Asp f 1, a major allergen or antigen of *Aspergillus fumigatus*, for improved immunodiagnosis of allergic bronchopulmonary aspergillosis." Clin Diagn Lab Immunol **11**(3): 552-8.
- Malo, J. L., T. Inouye, R. Hawkins, G. Simon, M. Turner-Warwick and J. Pepys (1977). "Studies in chronic allergic bronchopulmonary aspergillosis. 4. Comparison with a group of asthmatics." Thorax **32**(3): 275-80.
- Malo, J. L., J. Longbottom, J. Mitchell, R. Hawkins and J. Pepys (1977). "Studies in chronic allergic bronchopulmonary aspergillosis. 3. Immunological findings." Thorax **32**(3): 269-74.
- Marchand, E., C. Verellen-Dumoulin, M. Mairesse, L. Delaunois, P. Brancaleone, J. F. Rahier and O. Vandenplas (2001). "Frequency of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator gene mutations and 5T allele in patients with allergic bronchopulmonary aspergillosis." Chest **119**(3): 762-7.
- Monod, M., S. Paris, K. Sanglard, K. Jatton-Ogay, J. Bille and J. P. Latge (1993). "Isolation and characterization of a secreted metalloprotease of *Aspergillus fumigatus*." Infect Immun **61**: 4099-4104.
- Mullins, J., P. S. Hutcheson and R. G. Slavin (1984). "Aspergillus fumigatus spore concentration in outside air: Cardiff and St Louis compared." Clin Allergy **14**(4): 351-4.
- Nolard, N. (1994). "Les liens entre les risques d'aspergillose et la contamination de l'environnement. Revue de la littérature." Pathol Biol **43**: 706-710.
- Paris, S., D. Wyson, J. P. Debeaupuis, K. Shibuya, B. Philippe, R. D. Diamond and J. P. Latge (2003). "Catalases of *Aspergillus fumigatus*." Infect. Immun. **71**(6): 3551-3562.
- Patterson, R., P. A. Greenberger, R. C. Radin and M. Roberts (1982). "Allergic bronchopulmonary aspergillosis: staging as an aid to management." Ann Intern Med **96**(3): 286-91.
- Patterson, R., M. Rosenberg and M. Roberts (1977). "Evidence that *Aspergillus fumigatus* growing in the airway of man can be a potent stimulus of specific and nonspecific IgE formation." Am J Med **63**(2): 257-62.
- Radin, R. C., P. A. Greenberger, R. Patterson and A. Ghory (1983). "Mould counts and exacerbations of allergic bronchopulmonary aspergillosis." Clin Allergy **13**(3): 271-5.

- Reichard, U., H. Büttner, H. Eiffert, F. Staib and R. Röchel (1990). "Purification and characterization of an extracellular serine proteinase from *Aspergillus fumigatus* and its detection in tissue." J Med Microbiol **33**: 243-251.
- Reichard, U., H. Eiffert and R. Röchel (1994). "Purification and characterization of an extracellular aspartic proteinase from *Aspergillus fumigatus*." J Med Vet Mycol **32**: 427-436.
- Ricketti, A. J., P. A. Greenberger and R. Patterson (1984). "Serum IgE as an important aid in management of allergic bronchopulmonary aspergillosis." J Allergy Clin Immunol **74**(1): 68-71.
- Rosenberg, M., R. Patterson, R. Mintzer, B. J. Cooper, M. Roberts and K. E. Harris (1977). "Clinical and immunologic criteria for the diagnosis of allergic bronchopulmonary aspergillosis." Ann Intern Med **86**(4): 405-14.
- Rosenberg, M., R. Patterson and M. Roberts (1977). "Immunologic responses to therapy in allergic bronchopulmonary aspergillosis: serum IgE value as an indicator and predictor of disease activity." J Pediatr **91**(6): 914-7.
- Rosenberg, M., R. Patterson, M. Roberts and J. Wang (1978). "The assessment of immunologic and clinical changes occurring during corticosteroid therapy for allergic bronchopulmonary aspergillosis." Am J Med **64**(4): 599-606.
- Salez, F., A. Brichet, S. Desurmont, J. M. Grosbois, B. Wallaert and A. B. Tonnel (1999). "Effects of itraconazole therapy in allergic bronchopulmonary aspergillosis." Chest **116**(6): 1665-8.
- Senet, J. M. and C. Brisset (1973). "The diagnostic of aspergillosis by passive hemagglutination." Biomedecine **19**: 365-368.
- Stevens, D. A., V. L. Kan, M. A. Judson, V. A. Morrison, S. Dummer, D. W. Denning, J. E. Bennett, T. J. Walsh, T. F. Patterson and G. A. Pankey (2000). "Practice guidelines for diseases caused by *Aspergillus*. Infectious Diseases Society of America." Clin Infect Dis **30**(4): 696-709.
- Stevens, D. A., R. B. Moss, V. P. Kurup, A. P. Knutsen, P. Greenberger, M. A. Judson, D. W. Denning, R. Cramer, A. S. Brody, M. Light, M. Skov, W. Maish and G. Mastella (2003). "Allergic bronchopulmonary aspergillosis in cystic fibrosis--state of the art: Cystic Fibrosis Foundation Consensus Conference." Clin Infect Dis **37 Suppl 3**: S225-64.
- Stevens, D. A., H. J. Schwartz, J. Y. Lee, B. L. Moskovitz, D. C. Jerome, A. Catanzaro, D. M. Bamberger, A. J. Weinmann, C. U. Tuazon, M. A. Judson, T. A. Platts-Mills and A. C. DeGraff, Jr. (2000). "A randomized trial of itraconazole in allergic bronchopulmonary aspergillosis." N Engl J Med **342**(11): 756-62.
- Tillie-Leblond, I., A. Scherpereel and C. Iliescu (2002). "L'aspergillose bronchopulmonaire allergique." Rev Fr Allergol Immunol Clin **42**: 231-240.

- Tillie-Leblond, I. and A. B. Tonnel (2005). "Allergic bronchopulmonary aspergillosis." Allergy **60**(8): 1004-13.
- Tomee, J. F., A. T. Wieranga, P. S. Hiemstra and H. K. Kauffman (1997). "Proteases from *Aspergillus fumigatus* induce release of proinflammatory cytokines and cell detachment in airway epithelial cell lines." J Infect Dis **176**: 300-303.
- Vlahakis, N. E. and T. R. Aksamit (2001). "Diagnosis and treatment of allergic bronchopulmonary aspergillosis." Mayo Clin Proc **76**(9): 930-8.
- Wark, P. A., M. J. Hensley, N. Saltos, M. J. Boyle, R. C. Toneguzzi, G. D. Epid, J. L. Simpson, P. McElduff and P. G. Gibson (2003). "Anti-inflammatory effect of itraconazole in stable allergic bronchopulmonary aspergillosis: a randomized controlled trial." J Allergy Clin Immunol **111**(5): 952-7.
- Weig, M., M. Frosch, K. Tintelnot, A. Haas, U. Grob, B. Linsmeier and J. Heesemann (2001). "Use of Recombinant Mitogillin for Improved Serodiagnosis of *Aspergillus fumigatus*-Associated Diseases." J Clin Microbiol **39**(5): 1721-17

ROBERT, Jean-Philippe, Charles, Paul

Titre de la thèse : Intérêt de la détection des IgG anti-aspergillaires par Elisa pour la prise en charge de l'Aspergillose Bronchopulmonaire Allergique.

L'Aspergillose Bronchopulmonaire Allergique (ABPA) est une pathologie respiratoire chronique et évolutive. Le suivi du patient y est primordial car il permet de dépister les exacerbations qui sont à l'origine des complications de la maladie. Les outils utilisés aujourd'hui ont montré certaines limites rendant nécessaire de disposer d'un nouveau marqueur de dépistage des exacerbations et d'évaluation de l'efficacité thérapeutique. Notre étude a visé à évaluer le dosage des IgG anti-aspergillaires en Elisa avec un objectif double : valider la technique dans le diagnostic des aspergilloses de l'immunocompétent et définir son intérêt dans l'ABPA. Les résultats obtenus sont prometteurs, notamment dans le suivi des patients : les IgG Elisa semblent être un marqueur corrélé à l'activité de la maladie, efficace dans le dépistage précoce des exacerbations et utile pour établir la réponse thérapeutique.

Il est cependant nécessaire de confirmer ces résultats par des études prospectives et de déterminer la place exacte de l'Elisa dans la prise en charge de l'ABPA.

MOTS-CLES : ABPA ; EXACERBATIONS ; IGG ANTI-ASPERGILLAIRES ; ELISA ; SUIVI DES PATIENTS

JURY

Président : Mme Berthe-Marie IMBERT, Professeur de Virologie
UFR de Pharmacie de Nantes

Assesseurs : M. Edmond CHAILLEUX, Professeur de Pneumologie
UFR de Médecine de Nantes

M. Patrick GERMAUD, Praticien Hospitalier
Service de Pneumologie, CHU de Nantes

M. Jean DEUNFF, Professeur de Parasitologie et Mycologie Médicale
UFR de Pharmacie de Rennes

M. Patrice LE PAPE, Professeur de Parasitologie et Mycologie Médicale
UFR de Pharmacie de Nantes

Adresse de l'auteur : 68, rue du Moulin-Soline 44115 BASSE-GOULAINÉ