

UNIVERSITE D'AIX-MARSEILLE

ECOLE DOCTORALE 62 : Sciences de la vie et de la santé

Laboratoire de parasitologie-mycologie/VITROME

Thèse présentée pour obtenir le grade universitaire de docteur

Discipline : Biologie

Spécialité : Microbiologie

Raphaël PIARROUX

Développement de tests de diagnostic in vitro appliqués au
sérodiagnostic des infections fongiques par western blot et
immunochromatographie

Development of in vitro diagnostic tests for serological diagnosis of
fungal infections by western blotting and immunochromatography

Soutenue le 19/12/2018 devant le jury :

Pr Frédéric GRENOUILLET	Université de Franche-Comté	Rapporteur
Pr Christophe HENNEQUIN	Assistance publique – Hôpitaux de Paris	Rapporteur
Pr Joana VITTE	Aix-Marseille Université	Examineur
Dr Florence PERSAT	Hospices Civils de Lyon	Examineur
Pr Stéphane RANQUE	Aix-Marseille Université	Directeur de thèse

Thèse Cifre N° 2015/0963
Thèse N° 2018AIXM0763/198ED62

Résumé

Le champignon microscopique *Aspergillus fumigatus* provoque un nombre important de maladies graves. Parmi elles, l'aspergillose pulmonaire chronique (APC) et l'aspergillose broncho-pulmonaire allergique (ABPA) affectent 3 et 4,8 millions de personnes dans le monde, respectivement.

L'APC est très souvent mortelle si elle n'est pas soignée. Elle correspond à la croissance d'*Aspergillus* dans les poumons d'un patient. Cette croissance se fait à partir de cavités apparues à la suite d'une autre maladie, comme une tuberculose ou une broncho-pneumopathie chronique obstructive. Si l'APC est présente dans le monde entier, sa prévalence est plus forte dans les pays émergents. Le principal argument diagnostique est la présence d'anticorps spécifiques d'*Aspergillus fumigatus*. Malheureusement les techniques sérologiques disponibles actuellement demandent l'utilisation d'électricité et sont trop coûteux pour être utilisés dans les pays émergents. Nous avons donc développé un test immunochromatographique ne nécessitant pas de matériel de laboratoire complexe pour la recherche des anticorps spécifiques d'*Aspergillus fumigatus* et présentons ici son évaluation, qui a porté sur 713 patients, avec une sensibilité de 89% et une spécificité de 96%. De tels résultats sont équivalents à ceux d'autres techniques déjà disponibles dans les laboratoires européens. Nous pensons donc que notre test peut permettre d'effectuer le diagnostic de l'APC dans les endroits où les techniques de laboratoire conventionnelles ne sont pas disponibles.

L'ABPA est une complication très grave de l'asthme et de la mucoviscidose. Elle est très difficile à diagnostiquer car il n'existe pas de technique permettant de la différencier de la simple sensibilisation, c'est-à-dire la présence d'immunoglobulines E spécifiques sans maladie. Nous avons donc développé un western blot permettant de différencier ces deux conditions. Nous avons évalué ses performances sur 59 patients (10 avec une ABPA, 38 avec une sensibilisation mais pas d'ABPA et 11 sans aucune des deux). La sensibilité pour la détection de la sensibilisation aspergillaire était de 92% avec une spécificité de 100%. Dans le même temps, le test a permis de correctement séparer l'ABPA et la sensibilisation dans 92% des cas (1 ABPA et 3 sensibilisations mal classifiées). Ces performances sont très supérieures à celles des autres techniques actuellement disponibles (77% de bonnes classification, 1 ABPA et 10 sensibilisations mal classifiées pour le même panel). De plus, parmi les patients sensibilisés avec un profil western blot compatible avec une ABPA, l'un des trois a développé une ABPA dans les mois qui ont suivi.

Notre travail, au travers des deux tests que nous avons mis au point, permettra donc d'améliorer la prise en charge des patients souffrant de maladie aspergillaire en permettant leur diagnostic, donc leur traitement. De plus, ces patients n'auront plus à subir des errances diagnostiques, ce qui évitera d'avoir recours à des traitements inefficaces avec les effets secondaires qu'ils entraînent.

Abstract

Microscopic fungus *Aspergillus fumigatus* is responsible of many severe diseases. Among them, chronic pulmonary aspergillosis (CPA) and allergic broncho-pulmonary (ABPA) are affecting 3 and 4.8 million persons, respectively.

CPA is often fatal if left untreated and is due to the growth of *Aspergillus* in patient's lung. This growth starts from a pre-existing lung cavitory lesion due to another disease, mostly tuberculosis or chronic obstructive pulmonary disease. If CPA is found worldwide, its prevalence is higher in low and middle income country. The main argument for a CPA is the presence of antibodies directed against *A. fumigatus*. However, serological techniques available requires stable electrical power and are too expansive for resource-poor laboratory settings. We have developed an immunochromatographic test for detection of *Aspergillus*-specific antibodies that does not require laboratory equipment. We present here its evaluation on 713 patients. The test had 89% sensitivity and 96% specificity. Such results are equivalent to those of other techniques already approved and used in European labs. We think that our test will make the diagnosis of CPA possible in settings where conventional laboratory techniques aren't available.

ABPA is a very severe complication of asthma and cystic fibrosis. As there is no technique allowing the differentiation between ABPA and *Aspergillus* sensitization (sensitization is defined by the presence of immunoglobulin E directed against *Aspergillus*), ABPA diagnosis is very complex. We have developed a western blot test that can discriminate those conditions. We have evaluated its performances on 59 patients (10 ABPA, 38 sensitization without ABPA and 11 patients without ABPA nor sensitization). Sensibility of WB was 90% and specificity 92% for the detection of Immunoglobulin E to *Aspergillus fumigatus*. In the same time, the test allowed to correctly classify 92% of the patients (1 ABPA and 3 sensitization not correctly classified). Those performances are very superior to what the others techniques can do (77% of correct classifications, 1 ABPA and 11 sensitization not correctly classified in the same panel). Of note, one of the three sensitization patient with an ABPA profile developed an ABPA in the month that followed the sampling.

With these two tests, our works will enhance the diagnosis and management of patients suffering from *Aspergillus*-related diseases. Also, patients should not suffer from as many diagnosis difficulties, avoiding unnecessary treatment, and sparing them their side effects.

Remerciements

Je tiens à remercier toutes les personnes qui m'ont entouré et soutenu pendant cette thèse.

Tout d'abord, merci au Professeur Stéphane Ranque, pour avoir accepté de diriger cette thèse et de l'avoir fait avec brio, malgré l'éloignement. Je crois qu'on a quand même réussi à mener à bien un joli projet.

Merci au Docteur Denis Limonne de m'avoir proposé cette thèse CIFRE et de m'avoir encadré au sein de son entreprise. L'aventure LDBIO continue maintenant, et je vous en suis reconnaissant. L'ICT est un monde sans fin et, comme vous dites, « y'a plus qu'à » !

Un immense merci aux Professeurs Christophe Hennequin et Frederic Grenouillet pour me faire l'honneur d'examiner ce travail et pour vos commentaires constructifs sur ce dernier. Et au Professeur Joana Vitte et au Docteur Florence Persat d'avoir accepté de faire partie de mon jury.

Merci ensuite aux personnes m'ayant aidé sur ce travail :

Merci à l'équipe LDBIO, Guillaume, Edith, Nathalie, Aurélien, Quentin, Aymeric, Isabelle, Mélanie, Jordan, Alexandre et Elona. A Guillaume je dois de nombreux coups sur les doigts pour bien présenter mes dossiers R&D et l'art de bien monter sa manip. Et de me rappeler qu'on sauve des vies, à travers notre travail, et que donc on ne peut pas faire n'importe quoi. A maman Edith, je dois beaucoup, la liste serait trop longue. A Nathalie, pour les heures passer à mettre au point nos beaux protocoles de fabrication d'antigène. Profites bien de mini-toi. A Aurélien je dois une quantité inestimable de manips réalisées parfaitement malgré l'effet de surprise et des remarques plus que pertinentes sur de nombreux protocoles. Même si on se moque parfois, l'approche ceinture-bretelles-gilet de sauvetage a du bon. A Quentin et Aymeric, mes compères d'ICT, je dois le test ICT présenté ici. On va continuer d'en faire un beau bébé ! A Elona, merci d'être venue assurer la relève dans la maison ICT. J'espère que tu vas t'y plaire. Aux « filles » de la prod, Isabelle, Mélanie et Jordan, merci de me supporter, déjà, et bravo pour les blots ! Alexandre, tu découvres le monde LDBIO depuis quelques mois, bienvenue dans la famille.

Merci à François Limonne de m'avoir initié aux arcanes de l'ICT avant de prendre une retraite bien méritée.

Merci à tous ceux qui ont participé à l'évaluation du test ICT, en collectant les données ou en réalisant les très nombreux tests. A Montpellier, merci au Professeur Laurence Lachaud. A Bordeaux, merci au Docteur Frederic Gabriel. A Toulouse, merci au (tout frais) Docteur Damien Vainqueur et au Docteur Judith Fillaux. A Rennes, merci au Professeur Jean-Pierre Gangneux. A Marseille, merci au Docteurs Thomas Romain, Aurélie Martin et une fois encore merci à Stéphane et Joana. Sans vous tous, ce travail n'aurait pas pu être fait, et le test serait resté dans son coin sur une étagère.

Merci encore une fois à Joana pour l'opportunité de travailler sur le blot IgE. Ce n'était pas prévu, mais le résultat de ce travail est très prometteur, ce sera un plaisir que de continuer à travailler dessus avec toi. Merci aussi aux Professeurs Ranque (encore une fois !), Jean Christophe Dubus et Martine Reynaud-Gaubert pour nous avoir aidés dans cette évaluation.

A tous mes amis rencontrés à la fac et qui continuent de me soutenir. En particulier à Cécile, Dan et Samichou.

Cécile. Merci à toi de m'avoir « acheté » en deuxième année. Ce fut un honneur d'être ton filleul toutes ces années d'études. On a – presque – choisi la même voie. T'as intérêt à tout gérer au labo, qu'on puisse continuer à se croiser facilement !

Dan, tu t'es perdu dans le Cantal, mais n'oublie pas que tu n'es pas loin de Lyon, c'est toi qui me l'a dit !

Samichou, on se supporte depuis le premier cours de la P1. Y'a intérêt que ça continue encore un gros tas d'années ! Vivement le prochain barbecue qu'on puisse faire les vieux à se souvenir de nos années fac !

A Anne-Cécile, ma grande sœur d'adoption.

A Aurél et Coco, à mon filleul, Auguste, ainsi que la petite dernière, Aliénor. Comme quoi l'amitié, ça dure longtemps !

A ma sœur, Julie. (Preum's)².

A mon frère, Loïc. T'as réussi à finir tes études quelques mois avant moi, tricheur.

A mon père, Renaud, pour m'avoir montré les joies de la recherche. Et pour toutes les corvées qu'implique être mon père.

A ma mère. Je suis de plus en plus persuadé que tes efforts pour faire de nous des gens convenables ont payés, même si on a tout fait pour t'en empêcher.

A tout le reste de ma famille. A vous tous, vous formez ma famille préférée, c'est bon, j'accepte de ne pas en changer.

Et pour finir, à Magalie. Avec tout mon amour.

Liste des abréviations

ABPA	Aspergillose Broncho-Pulmonaire Allergique
ABPM	<i>Allergic Broncho-Pulmonary Mycosis</i> (Mycose Broncho-Pulmonaire Allergique)
APC	Aspergillome Pulmonaire Chronique
BSA	<i>Bovine Serum Albumin</i> (Albumine Bovine sérique)
CD	Cluster de Différentiation
CFTR	<i>Cystic Fibrosis Transmembrane conductance Regulator</i> (Régulateur de la Conductance Transmembranaire de la Mucoviscidose)
CMH	Complexe Majeur d'Histocompatibilité
CRCM	Centres de Ressources et de Compétences de la Mucoviscidose
EORTC/MSG	<i>European Organization for Research and Treatment of Cancer / Invasive Fungal Infections Cooperative Group and National Institute of Allergy and Infectious Diseases Mycoses Study Group</i> (Groupe coopératif sur les infections fongiques invasives de l'organisation européenne pour la recherche et le traitement du cancer ; Groupe d'étude des mycoses de l'institut national américain des maladies infectieuses et de l'allergie)
FcεRI	Récepteur de haute affinité pour le fragment cristallisable des IgE
GINA	<i>Global Initiative for Asthma</i> (Initiative mondiale contre l'asthme)
HAI	HémAgglutination Indirecte
HLA	<i>Human Leukocyte Antigen</i> (Antigène Leucocytaire Humain)
ICT	Immunochromatographie
IEP	ImmunoÉlectroPhorèse
Ig	ImmunoGlobuline
IL	InterLeukine
LB	Lymphocyte B
LT	Lymphocyte T
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i> (Réaction en chaîne par polymérase)
PNB	PolyNucléaire Basophile
PNE	PolyNucléaire Éosinophiles
PNN	PolyNucléaire Neutrophile

Développement de tests de diagnostic in vitro appliqués au sérodiagnostic des infections fongiques par western blot et immunochromatographie

PRR	<i>Pattern Recognition Receptor</i> (récepteur de reconnaissance de motifs moléculaires)
PVDF	Polyfluorure de Vinylidène
SAFS	<i>Severe Asthma with Fungal Sensitization</i> (Asthme sévère avec sensibilisation fongique)
SDS	Sodium Dodecyl Sulfate
SDS-PAGE	<i>SDS PolyAcrylamide Gel Electrophoresis</i> (Migration en gel de polyacrylamide SDS)
SIDA	Syndrome d'ImmunoDéficiency humaine Acquis
TCR	<i>T Cell Receptor</i> (Récepteur des cellules T)
TLR	<i>Toll-Like-Receptor</i> (Récepteur de type <i>Toll</i> [génial en allemand])
VIH	Virus de l'ImmunoDéficiency Humaine
WB	Western Blot

Table des matières

Introduction générale.....	1
1. Généralités.....	3
1.1. Le système immunitaire.....	4
1.1.1. Immunité innée.....	5
1.1.2. Immunité acquise.....	8
1.1.3. Réponse immunitaire et infection fongique.....	14
1.2. L'asthme.....	18
1.3. La mucoviscidose.....	21
1.3.1. Généralités.....	21
1.3.2. Épidémiologie.....	23
1.3.3. Infections et colonisations.....	25
1.3.4. Traitement.....	27
1.4. Champignons et maladies associées.....	30
1.5. <i>Aspergillus</i> et maladies liées.....	32
1.5.1. Le genre <i>Aspergillus</i>	32
1.5.2. Les maladies liées à <i>Aspergillus</i> spp.....	34
1.5.3. Outils diagnostiques des maladies liées à <i>Aspergillus</i>	49
1.5.4. Les besoins non remplis.....	60
1.6. Le western blot.....	61
1.6.1. Historique.....	61
1.6.2. Description de la technique.....	61
1.7. L'immunochromatographie.....	65
1.7.1. Principes généraux.....	65
1.8. Objectifs des travaux.....	68
2. Diagnostic de l'ABPA par western blot.....	69
2.1.....	69
2.1. Contexte et résumé du projet.....	69
2.2. Article.....	73
2.3. Perspectives.....	86
3. Diagnostic des aspergilloses chroniques par technique d'immunochromatographie.....	87
3.1. Contexte et résumé du projet.....	87

Développement de tests de diagnostic in vitro appliqués au sérodiagnostic des infections fongiques par western blot et immunochromatographie

3.2. Article	90
3.3. Perspectives.....	110
4. Discussion – perspectives.....	111
Références bibliographiques	113

Index des figures

Figure 1. Lignée hématopoïétique.....	5
Figure 2. Phagocytose.....	7
Figure 3. Présentation des différentes immunoglobulines humaines	10
Figure 4. Réaction allergique.....	12
Figure 5. Commutation isotypique d'un lymphocyte naïf en lymphocyte producteur d'IgG1.	13
Figure 6. Voies d'activation de l'immunité adaptative par les différentes cellules de l'immunité innée pouvant être induites par les éléments fongiques.....	15
Figure 7. Réponse immunitaire Th1 et Th17 après un contact avec un élément fongique.	16
Figure 8. Protéine CFTR. CC M. Lopes-Pacheco ⁷³	21
Figure 9. Evolution des pathologies avec l'âge chez les patients atteints de mucoviscidose.	22
Figure 10. Prévalence de la mucoviscidose.....	23
Figure 11. Les six classes de mutations du gène CFTR en fonction de leur impact sur la protéine CFTR. D'après Elborn ⁹²	25
Figure 12. Pourcentage de patients français atteints de mucoviscidose et avec un prélèvement respiratoire positif en culture pour les principales bactéries retrouvées. Evolution en fonction de l'âge.	26
Figure 13. Ivacaftor. Source : Ed pour Wikimedia Commons	29
Figure 14. Lumacaftor. Source : Vaccinationist pour Wikimedia Commons	29
Figure 15. Nombre de patients infectés dans le monde pour les principales maladies fongiques.	30
Figure 16. Sections des espèces d'Aspergillus actuellement répertoriées.	32
Figure 17. Tête aspergillaire, présumée d'A. fumigatus.....	33
Figure 18. État immunitaire et type d'aspergillose rencontrée.	34
Figure 19. Mécanismes immunitaires mis en jeu dans l'ABPA.	37
Figure 20. Les sinus paranasaux.	39
Figure 21. Mucine de rhinosinusite allergique. Coloration Hématoxyline Éosine.	41
Figure 22. Continuum des maladies liées à Aspergillus spp. et chevauchement des définitions.	45
Figure 23. Aspergillomes.	50
Figure 24. Fibrose pulmonaire d'un patient atteint d'une APC.....	50
Figure 25. Signe du halo.	51
Figure 26. Broncheectasies (flèches) chez un patient atteint d'ABPA.....	51
Figure 27. Signe du croissant gazeux dans le lobe pulmonaire droit supérieur chez un patient souffrant d'une infection fongique invasive.	52
Figure 28. Scanner d'une sinusite aspergillaire allergique des sinus ethmoïdes.	52
Figure 29. Technique d'Ouchterlouny.	53
Figure 30. Immunoélectrophorèse.....	54
Figure 31. Les différentes formes d'ELISA.	56
Figure 32. (1,3) -β-D-glucan : structure.	59
Figure 33. Les différentes formes de test immunochromatographique.	65
Figure 34. Exemple d'ICT au format cassette : le test ICT mis au point dans ce travail.	66
Figure 35. Un ICT au format bandelettes à imprégner : le test rapide de recherche de l'antigène Cryptococcus IMMY.....	66
Figure 36. Composition d'une cassette immunochromatographique.....	67
Figure 37 Comparaison sur une série de sérum avec un faible taux d'IgE spécifiques.	70

Figure 38 Profil sensibilisation et ABPA.....	71
Figure 39. Exemples de WB IgE.	72

Index des tableaux

Tableau 1. Lymphocytes T et cytokines impliqués dans la commutation isotypique.	13
Tableau 2. Questionnaire ACT	19
Tableau 3. Traitement de fond de l'asthme en fonction du stade GINA.....	20
Tableau 4. Répartition des mutations du gène codant pour la protéine CFTR en France	24
Tableau 5. Incidence et impact des différentes maladies fongiques.	31
Tableau 6. Les différentes rhinosinusites fongiques.	40
Tableau 7. Principaux tests ELISA (ou apparentés) de détection des anticorps anti-Aspergillus..	57
Tableau 8. Liste des allergènes disponibles pour Aspergillus fumigatus.....	69

Introduction générale

Les maladies fongiques sont des pathologies très souvent négligées par les autorités sanitaires et la formation médicale, même si elles sont responsables de plus d'un milliard de cas dans le monde chaque année¹. Si la plupart d'entre elles sont bénignes, certaines sont en revanche mortelles, en particulier en l'absence de traitement. De très nombreuses espèces de champignons peuvent provoquer des infections, principalement des champignons microscopiques (champignons des genres *Microsporium*, *Trichophyton*, *Candida* ou *Aspergillus* pour ne citer que les plus fréquents) mais également quelques champignons macroscopiques (sinusites² et infections pulmonaires³ à *Schizophyllum commune* par exemple). De nombreuses espèces sont ubiquitaires (*Aspergillus fumigatus*, *Candida albicans*...), tandis que d'autres ne se retrouvent que dans des zones géographiques bien définies (ainsi *Coccidioides immitis* n'est retrouvé qu'en Amérique). Certaines espèces sont retrouvées dans l'environnement (*Scedosporium* spp., *Aspergillus* spp.), tandis que d'autres ont un réservoir animal comme *Microsporium canis* ou humain comme *Trichophyton interdigitale*.

Chaque espèce possède son propre spectre de maladies. Par exemple, les dermatophytes (*Microsporium canis*, *Trichophyton mentagrophytes*) sont responsables d'atteintes superficielles cutanées ou du cuir chevelu alors que le genre *Fusarium* est retrouvé dans des formes invasives profondes⁴ et des kératites⁵. Certaines espèces ont des spectres très larges. Ainsi, *Candida albicans* est une espèce commensale, mais aussi un agent responsable de mycoses buccales, de vulvo-vaginites voire de formes invasives. *Aspergillus fumigatus* est quant à lui responsable de formes allergiques, de colonisations locales (sinusites, pulmonaires), et de formes invasives.

Le genre *Aspergillus*, et en particulier *A. fumigatus*, affecte un très grand nombre de personnes dans le monde. Il est la cause d'allergies aggravant plusieurs millions de cas d'asthme, en particulier des asthmes sévères. L'infection pulmonaire chronique à *Aspergillus*, maladie souvent mortelle sans traitement, affecte également plusieurs millions de personnes dans le monde et est une complication fréquente de la tuberculose pulmonaire. Enfin, c'est également le second genre fongique le plus souvent retrouvé, après *Candida*, dans les infections systémiques de l'immunodéprimé.

En raison de la gravité et de la fréquence des maladies liées à *Aspergillus*, il est très important d'en faire le diagnostic. À cause des symptômes très variés et souvent très peu spécifiques et communs à de nombreuses autres maladies, le diagnostic ne peut pas s'appuyer sur la clinique seule. Il repose donc sur trois grands axes majeurs : la recherche directe du champignon (culture, recherche d'ADN), la recherche d'antigènes spécifiques (dans les formes invasives) ou la recherche d'une réponse immunitaire spécifique (formes chroniques et allergiques). A l'heure actuelle, toutes ces techniques présentent des limitations et de nouvelles options diagnostiques sont encore requises afin d'améliorer la prise en charge des patients atteints d'aspergillose.

C'est pourquoi notre travail s'est principalement axé sur la recherche d'une réponse immunitaire spécifique dirigée contre les champignons du genre *Aspergillus*.

Nous commencerons par présenter des données bibliographiques sur la nature de la réponse immunitaire, avec un focus sur les particularités de cette réponse face aux champignons, avant de détailler les différentes maladies causées par *Aspergillus* spp., ainsi que les moyens diagnostiques et les traitements existants. Nous compléterons cette présentation par la description des deux techniques à la base des tests que nous avons développés pour améliorer le diagnostic des maladies aspergillaires : le western blot (WB) et l'immunochromatographie (ICT).

Le WB est une technique de recherche d'immunoglobulines (Ig), considérée comme la technique de référence pour de très nombreuses pathologies⁶⁻⁹, y compris dans le cadre de la recherche d'IgG dirigées contre *Aspergillus fumigatus*^{10,11}. En revanche, son utilisation dans la recherche d'IgE aspergillaires n'a que très peu été étudiée¹², pourtant ce test devrait permettre d'apporter une meilleure efficacité dans le diagnostic des formes allergiques : en effet, la sensibilisation est fréquente, elle pourrait atteindre 30% des asthmatiques selon une méta-analyse¹³. De plus, il existe une forme très grave de sensibilisation, l'aspergillose broncho-pulmonaire allergique (ABPA), qui affecte près de cinq millions de personnes dans le monde. À l'heure actuelle, il n'existe que deux techniques de recherche des réponses allergiques à *Aspergillus* spp. : la recherche d'une réaction sous-cutanée (prick-test) et la recherche d'IgE spécifiques. Aucune de ces deux techniques ne permet de correctement différencier la sensibilisation de l'ABPA ; cette dernière repose actuellement sur un réseau de critères diagnostiques à la fois complexe et sujet à controverse, comme en témoignent les très nombreuses définitions existantes¹⁴⁻¹⁶. L'application de la technique WB au diagnostic différentiel de l'ABPA et de la sensibilisation aspergillaire fera l'objet de la seconde partie de ce travail.

L'ICT est une technologie diagnostique qui peut être utilisée dans des environnements sans électricité et avec un matériel de laboratoire minimal. Dans le cadre de la sérologie aspergillaire, l'ICT devrait permettre de répondre à la problématique de santé publique qu'est l'aspergillose pulmonaire chronique (APC). En effet, cette maladie, qui peut se présenter sous plusieurs formes (aspergillome, aspergillose pulmonaire chronique cavitaires, aspergillose pulmonaire chronique fibrosante, aspergillose pulmonaire chronique nécrosante), est très grave et souvent mortelle : la mortalité après 5 ans sans traitement serait de 80%¹⁷. Malheureusement, si les techniques diagnostiques, basées sur la recherche d'anticorps anti-*Aspergillus*, sont très efficaces et présentent des sensibilités et des spécificités supérieures à 90% pour certains tests¹⁸, elles sont aussi des techniques onéreuses et demandant un apport stable en électricité, ce que l'on ne retrouve pas forcément dans les pays émergents. Or, c'est dans ces pays que l'APC a son incidence la plus élevée, principalement comme infection consécutive à une tuberculose¹⁹. Une ICT, ne nécessitant pas d'autre appareillage qu'une centrifugeuse et une pipette, permettrait de rendre ce diagnostic accessible dans des pays où il fait défaut. La troisième partie de ce travail présentera donc le développement et l'évaluation d'une technique immunochromatographique pour la détection d'anticorps anti-*Aspergillus*.

Enfin, nous concluons ce travail en présentant des pistes de recherche pour continuer d'améliorer les réponses diagnostiques aux maladies fongiques et de permettre une meilleure prise en charge des patients atteints de ces maladies.

1. Généralités

Dans cette section, nous décrivons les grandes lignes de la réaction immunitaire ainsi que quelques maladies fongiques, en particulier celles causées par *A. fumigatus*. Nous verrons tout d'abord quels sont les mécanismes physiologiques de défense de l'organisme et comment les champignons arrivent à les contourner, avec un focus sur les deux grandes maladies fortement affectées par *A. fumigatus* : l'asthme et la mucoviscidose. Ensuite, nous nous concentrerons sur le genre *Aspergillus*, en décrivant ce genre fongique, ainsi que les principales maladies qu'il peut causer chez l'homme : les différentes formes cliniques, leurs méthodes de diagnostic, et leur traitement.

Nous ouvrirons alors notre présentation sur les besoins diagnostiques non remplis et présenterons enfin les deux techniques que nous avons adaptées pour le diagnostic des infections aspergillaires : le western blot et l'immunochromatographie.

1.1. Le système immunitaire

Le rôle majeur du système immunitaire d'un organisme vivant est de le protéger contre les agressions extérieures et intérieures (infections, cancer). Pour cela, dans les organismes complexes comme les vertébrés, divers organes et cellules coopèrent et échangent des informations pour détecter, reconnaître comme étranger et détruire les agresseurs. Avant même l'entrée dans l'organisme, plusieurs mécanismes font office de barrière pour empêcher l'entrée de pathogènes.

La première barrière contre un agresseur microbien est mécanique. Ainsi, les cellules épithéliales ont des jonctions serrées entre elles qui sont difficiles à franchir et le mucus englué les microbes et les évacue grâce aux micro-cils bronchiques.

La seconde barrière est physico-chimique. Elle repose essentiellement sur la sécrétion de divers peptides ou enzymes. À chaque interface avec l'extérieur sa panoplie : sur la peau on trouve des β -défensines et de la dermicidine, dans les bronches du lysozyme et des β -défensines, dans le tube digestif du lysozyme et des α -défensines. Pour certains de ces peptides, le mécanisme d'action est connu, mais pour d'autres, il reste à élucider²⁰. Outre ces peptides, le pH du tube digestif varie selon les sites (acide dans l'estomac, basique dans l'intestin) empêchant les micro-organismes de s'adapter facilement à ces variations. On peut également citer la température élevée due à la fièvre qui ne convient pas à certains organismes.

Enfin, la troisième barrière est compétitive. Notre microbiote normal est un milieu fortement compétitif pour les pathogènes²¹.

Ce n'est que s'il arrive à franchir ces barrières que le micro-organisme pénètre dans l'organisme et que débute l'infection. À ce moment-là, la réponse immunitaire intervient. Elle est l'objet d'un subtil équilibre entre la résistance et la tolérance : il faut en quelque sorte à la fois limiter la prolifération mais aussi éviter de créer des dommages collatéraux, que ce soit sur nos propres cellules ou sur notre microbiote commensal²².

Le système immunitaire est classiquement décrit comme formé de deux entités complémentaires : l'immunité innée et l'immunité acquise. La première assure une protection générale contre l'ensemble des agents étrangers tandis que la seconde correspond à une immunité spécifique qui se développe contre des agents étrangers déjà rencontrés. Toutefois, cette dichotomie est très schématique, la réalité fait preuve de plus de nuances : le système inné initie la réponse adaptative et la réponse adaptative possède de nombreux mécanismes de régulation de la réponse innée.

1.1.1. Immunité innée

Lorsqu'un individu rencontre pour la première fois un organisme agresseur, son immunité innée entre immédiatement en jeu.

La réponse immunitaire innée peut se décomposer en deux parties : une réponse humorale (marqueurs inflammatoires, système du complément) et une réponse cellulaire. Certaines cellules sont en effet capables de reconnaître des motifs moléculaires associés aux pathogènes ou de déterminer que l'agresseur est porteur de molécules inconnues, ou antigènes du non-soi. Les cellules impliquées sont des cellules phagocytaires comme les macrophages, les monocytes, les polynucléaires neutrophiles (PNN), les cellules dendritiques, mais aussi les cellules épithéliales ou endothéliales. Toutes ces cellules se partagent cette tâche, aidées par des molécules circulant dans le sang (complément, cytokines, etc.). Elles sont capables de détruire les agresseurs par phagocytose ou destruction de la membrane grâce à des porines (système du complément, défensines). Un autre mécanisme de neutralisation des agresseurs est l'opsonisation : la cellule étrangère est recouverte et ne peut plus agir. De plus, plusieurs molécules opsonisantes facilitent l'action des cellules phagocytaires.

Les principales cellules de l'immunité innée sont les PNN qui se développent au sein de la moelle osseuse à partir des cellules souches hématopoïétiques (Figure 1). Ils constituent 50 à 70% des leucocytes circulants. Contrairement à ce que leur nom suggère, ce sont des cellules ayant un seul noyau, mais, comme ce dernier présente de nombreux lobes, leur observation au microscope donne l'impression qu'il en existe plusieurs.

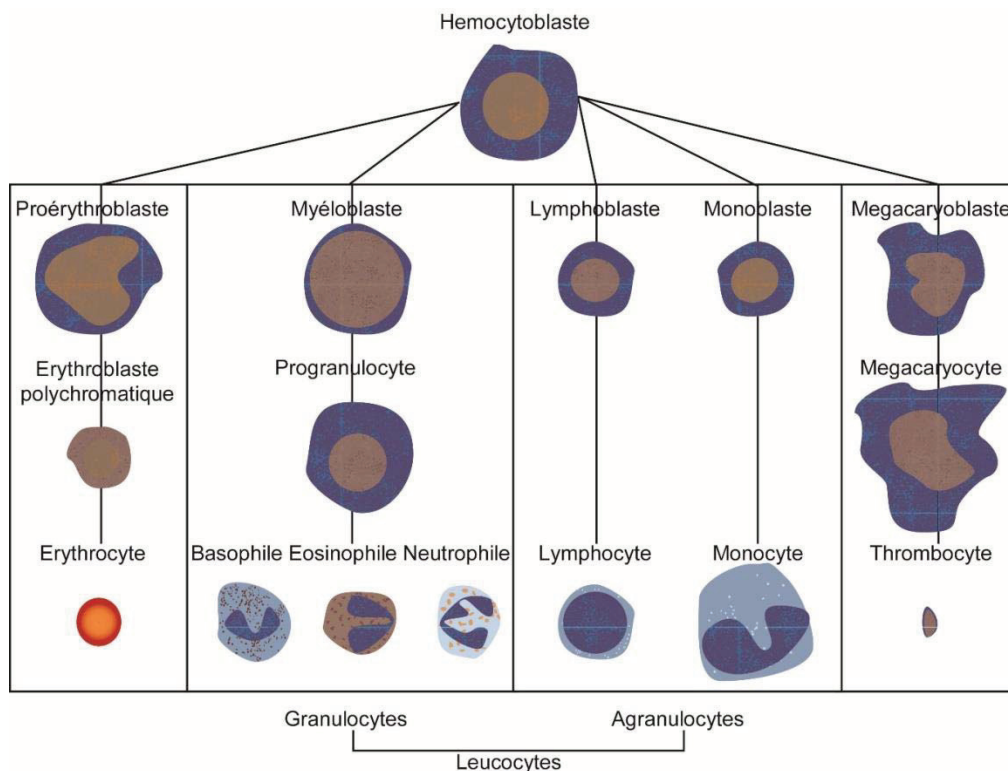


Figure 1. Lignée hématopoïétique.

Dans la moelle osseuse, l'hémocytoblaste (cellule souche hématopoïétique multipotente) se différencie en plusieurs précurseurs médullaires (proérythroblastes, myéloblastes, lymphoblastes, monoblastes ou mégacaryoblastes), qui se différencient à leur tour en se spécialisant jusqu'à obtenir les cellules sanguines (hématies ou érythrocytes, leucocytes, plaquettes ou thrombocytes). Adaptées d'après Produnis pour Wikimedia Commons.

Une fois matures, les PNN sont libérés dans la circulation où ils ne survivront que quelques heures avant d'entrer en apoptose programmée, sauf s'ils sont « activés », auquel cas ils migrent vers la lésion inflammatoire. Sur place, ils assurent une fonction de phagocytose et produisent également des substances oxydantes et des médiateurs de l'inflammation.

Pour accéder à certains organes, comme les poumons, la petitesse des capillaires oblige les PNN à se déformer activement grâce à leur cytosquelette actinique²³. La production d'oxydants par certains pathogènes perturbe ce mécanisme²⁴. La phagocytose, en particulier celle effectuée par les PNN (

Figure 2), joue un rôle important dans la lutte contre les agents étrangers. Elle se déroule en quatre grandes étapes : l'adhésion de la membrane du phagocyte à l'agent étranger, l'ingestion de cet agent étranger dans un phagosome, sa digestion dans le phagosome devenu phagolysosome en fusionnant avec des lysosomes, et la libération des composants digérés et neutralisés par exocytose. L'adhésion est facilitée par l'opsonisation du micro-organisme par le complément. La reconnaissance d'un agent étranger se fait grâce à des récepteurs de reconnaissance de motifs moléculaires (PRR – *Pattern recognition receptor*). Ces PRR peuvent être solubles, membranaires ou cytoplasmiques. Ils reconnaissent des motifs moléculaires conservés dans un grand nombre d'espèces. Il existe plusieurs familles de PRR, la plus connue étant la famille des *toll-like receptors* (TLR), comme par exemple le TLR4 qui reconnaît les lipopolysaccharides bactériens (retrouvés sur les bactéries Gram négatives).

Si l'agent étranger n'est pas reconnu par un PRR, alors la phagocytose n'a pas lieu. Certains pathogènes sont également capables d'interrompre la phagocytose une fois dans la cellule, par exemple en bloquant la fusion des lysosomes. Enfin, la digestion dans le phagolysosome est due aux nombreuses substances présentes dans les lysosomes qui induisent un stress oxydatif (dérivés réactifs de l'oxygène, *reactive oxygen species*, ROS) ou nitrique (dérivés réactifs de l'azote, *reactive nitrogen species*, RNS) sur les pathogènes : certains d'entre eux y survivent grâce à leur système antioxydant ou s'échappent du phagosome et se multiplient dans le cytoplasme.

La plupart des cellules phagocytaires, comme les PNN sont des cellules « kamikazes » : au bout d'une durée variable (de l'ordre de deux à trois jours dans les tissus pour les PNN par exemple), ces cellules entrent en apoptose et sont digérées par d'autres cellules phagocytaires, en particulier celles du système réticulo-endothélial.

Développement de tests de diagnostic in vitro appliqués au sérodiagnostic des infections fongiques par western blot et immunochromatographie

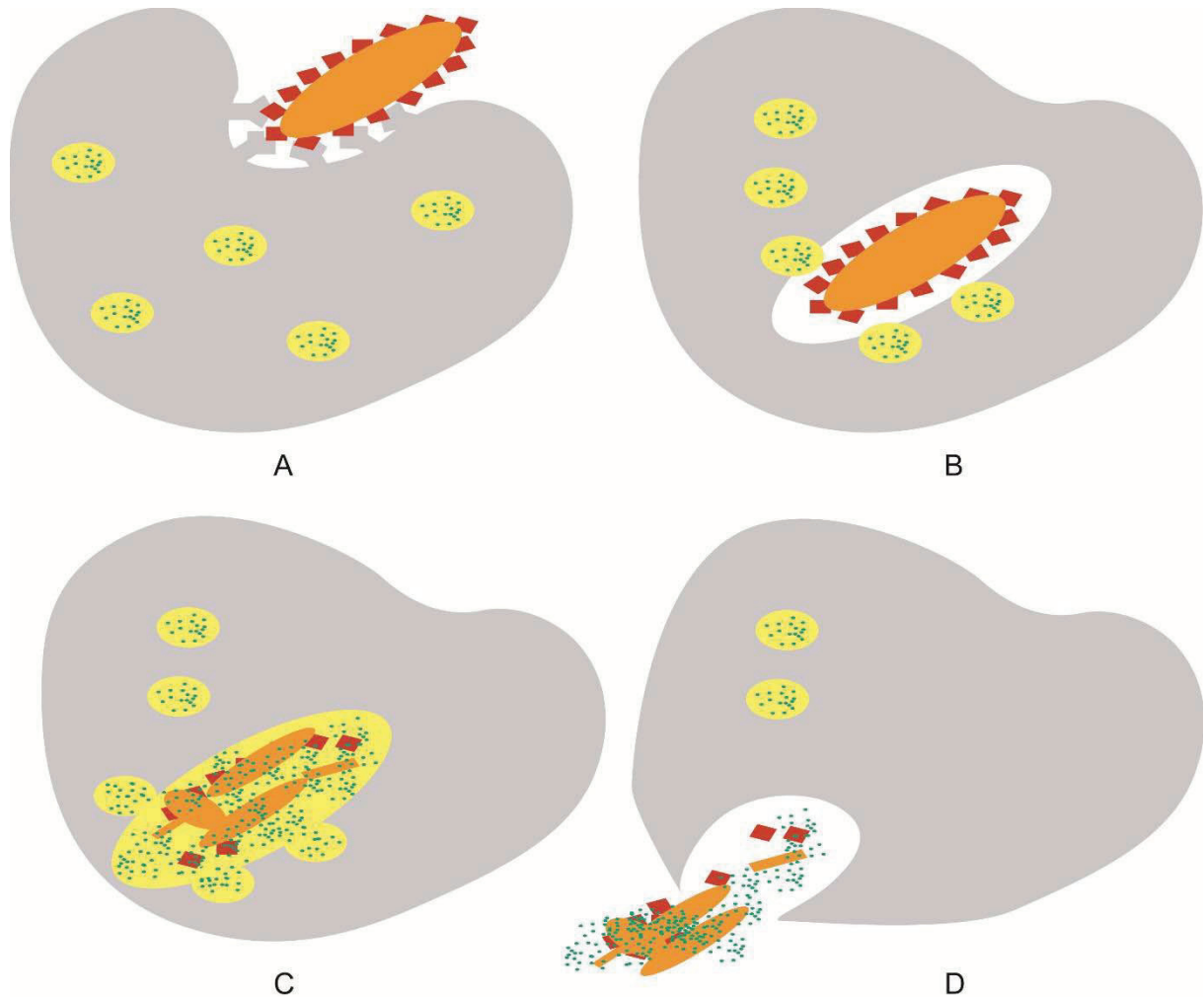


Figure 2. Phagocytose.

A) un micro-organisme est reconnu comme agent étranger par des récepteurs de surface de la cellule phagocytaire, la membrane plasmique s'invagine progressivement autour de lui (endocytose). B) Formation d'un phagosome à l'intérieur de la cellule. C) Des vésicules, les lysosomes, fusionnent avec le phagosome. Le contenu des lysosomes attaque et détruit le micro-organisme. D) Les restes digérés du micro-organisme sont expulsés par exocytose. Une partie n'est cependant pas excrétée, ce qui entraîne des dommages progressifs dans la cellule phagocytaire, qui finit par être détruite par apoptose.

En plus des PNN, deux autres types de cellules jouent un rôle important dans l'immunité innée : les polynucléaires éosinophiles (PNE) et basophiles (PNB) (Figure 1). Les PNE sont impliqués dans la résistance aux pathogènes multicellulaires, en particulier les helminthes. Ils ont une fonction sécrétoire et produisent un grand nombre de ROS ainsi que de cytokines pro-inflammatoires (interleukines, leucotriènes, etc.)²⁵. Les PNB sont des cellules phagocytaires ayant aussi la fonction de sécréter de l'héparine pour empêcher la coagulation et de l'histamine pour entraîner une puissante réponse inflammatoire locale. Les PNE et les PNB sont très fortement impliqués dans la réponse allergique. Ils ont à leur surface le récepteur de haute affinité pour les IgE (FcεRI), ce qui entraîne leur activation en cas de réponse immunitaire acquise IgE médiée²⁶.

1.1.2. Immunité acquise

Lors d'un contact prolongé, en général de l'ordre d'au moins quatre jours, ou dès la seconde rencontre, une autre réponse immunitaire, spécifique à l'agent étranger, se met en place. On parle d'immunité acquise. Si les PNN sont les cellules principales de la réponse innée, les lymphocytes sont, eux, les cellules de la réponse acquise (à l'exception des lymphocytes Natural Killer – NK, qui sont des cellules de l'immunité innée).

Les lymphocytes de l'immunité acquise sont classés en deux catégories en fonction de leur lieu de fin de maturation. On distingue donc les lymphocytes T (LT), qui se différencient dans le thymus, et les lymphocytes B (LB), qui se différencient dans la moelle osseuse. La lettre B a été choisie en référence aux bourses de Fabricius, organes lymphoïdes des oiseaux chez lesquels ils ont été identifiés pour la première fois²⁷. Parmi les lymphocytes, certains ont des fonctions de lutte (lymphocytes cytotoxiques, lymphocytes B producteurs d'anticorps), d'autres des fonctions de régulation de la réponse immunitaire et enfin certains ont une fonction de mémoire : si le même agent étranger était à nouveau en contact avec l'organisme, l'immunité acquise se mettrait immédiatement en place. La spécificité de la réaction des lymphocytes est liée au complexe majeur d'histocompatibilité (CMH).

Contrairement aux PRR, le CMH permet de différencier le soi du non-soi à l'intérieur même d'une espèce. Chez l'homme il existe deux classes de CMH : la classe I et la classe II. Le CMH-I est retrouvé dans toutes les cellules et permet à ces dernières, lorsqu'elles sont infectées, de « présenter » en surface l'antigène de l'agent les infestant. Le CMH-II est, lui, retrouvé sur les cellules présentatrices d'antigène professionnelles (macrophages, cellules dendritiques)²⁸.

Les protéines composant les CMH sont codées par plusieurs gènes, nommés HLA (*human leukocyte antigens*, antigènes leucocytaires humains). Il existe de très nombreux allèles à ces gènes, avec une fréquence d'apparition très variable. Certains sont associés à des risques accrus de maladie ou d'intolérance à des traitements. Ils sont tous retrouvés sur le chromosome 6, et il est de ce fait très rare que deux personnes aient la même séquence HLA. Toutefois, deux jumeaux homozygotes auront les mêmes gènes HLA. Au sein d'une fratrie, la probabilité d'avoir les mêmes gènes HLA est de 25%. En dehors du cercle familial, croiser une personne avec les mêmes allèles HLA est en revanche extrêmement rare, mais cela reste malgré tout possible, en particulier grâce aux registres de donneurs. L'histocompatibilité est une notion très importante dans le domaine des greffes : s'il est possible de greffer un organe solide (cœur, reins, foie...) non compatible, les greffes histocompatibles sont de meilleur pronostic²⁹. Pour les greffes de moelle, l'histocompatibilité est obligatoire : dans le cas contraire, il risque d'y avoir une réaction du greffon contre l'hôte, la moelle osseuse créant une réponse immunitaire contre les cellules de l'hôte qui n'ont pas le bon génotype HLA. Toutefois, depuis une dizaine d'années, les greffes de sang du cordon ombilical permettent d'utiliser des greffons imparfaitement compatibles.³⁰

Les cellules phagocytaires ou les lymphocytes B se comportent aussi comme des cellules présentatrices d'antigène pour les lymphocytes T en exprimant à leur surface leurs propres antigènes associés au complexe majeur d'histocompatibilité de classe I et les antigènes étrangers associés au complexe majeur d'histocompatibilité de classe II. Elles sécrètent enfin des médiateurs de la réponse inflammatoire (Interleukines, interférons, glycoprotéines membranaires jouant un rôle de signal comme le CD40)³¹.

Les lymphocytes T jouent un rôle majeur dans l'immunité cellulaire et dans la régulation de l'immunité. Les lymphocytes B sont impliqués dans l'immunité dite humorale. Au sein de ces deux groupes les lymphocytes sont identifiés en fonction de leur fonction. Pour la déterminer, on s'appuie généralement sur des glycoprotéines membranaires exprimées par ces lymphocytes : les clusters de différenciation (CD)³².

Les lymphocytes T (lymphocytes exprimant le CD3) peuvent être séparés en plusieurs groupes de fonctions différentes. Les trois principaux groupes de lymphocytes T sont :

- Les LT cytotoxiques (exprimant le CD8) : ce sont des cellules capables de détruire les cellules qui présentent des peptides étrangers sur leurs CMH-I, en utilisant des mécanismes cytotoxiques, en particulier par la sécrétion de perforine et de granzyme.
- Les LT auxiliaires (T *helper* – Th – exprimant le CD4) : ils régulent la réponse immunitaire et aident les autres lymphocytes (transformation de LT8 en LT cytotoxiques, transformation des LB en plasmocytes). Il existe plusieurs sous-types de LT auxiliaires, en fonction des cytokines qu'ils sécrètent : Th1 (interféron gamma, facteur de nécrose tumorale TNF- β), Th2 (IL4, IL5, IL13), Th17 (IL17). La réponse Th1 est associée à l'immunité cellulaire et la réponse Th2 à l'immunité humorale ; la réponse Th17 a une fonction régulatrice. La force du signal des récepteurs des lymphocytes T (signal TCR) régule la différenciation des lymphocytes en Th1 ou Th2. Un signal TCR faible favorise la différenciation en cellules Th2, tandis qu'un fort signal TCR entraîne une différenciation en cellules Th1³³.
- Les LT régulateurs (LTreg) expriment le CD4 et le CD25. Ils sont impliqués dans la tolérance immunitaire et limitent la prolifération lymphocytaire, ils permettent à la fois d'éviter l'emballement de la réponse immunitaire et de l'arrêter après la destruction ou la disparition de l'agent étranger. Ils expriment aussi le facteur FOXP3, qui empêche la réaction immunitaire contre le « soi ».

Les lymphocytes B (exprimant le CD79b) sont chargés de la synthèse d'anticorps circulants et donc de l'immunité humorale. Comme les LT, ils peuvent devenir des lymphocytes mémoire, réactivés en cas de nouveau contact avec leur cible spécifique. Lorsqu'un lymphocyte B naïf est activé, il devient un plasmocyte et se met à sécréter des anticorps^{31,32}.

Il existe cinq grandes classes, ou isotypes, d'immunoglobulines chez l'homme : les IgG, les IgM, les IgA, les IgD et les IgE. Les immunoglobulines sont également appelées anticorps. Les immunoglobulines sont composées d'un assemblage de chaînes légères et lourdes qui varient en fonction des isotypes, ces chaînes sont composées d'un domaine variable et d'un domaine constant (Figure 3).

Le domaine constant est celui permettant la relation entre les cellules immunitaires et les anticorps, au travers des récepteurs du fragment Fc (FcR). Il est retrouvé à l'identique entre les anticorps de même isotype. Le domaine variable est responsable de la reconnaissance anticorps-antigène. Il diffère entre les anticorps de même isotype, d'où son nom, et c'est à son niveau que se fait la reconnaissance anticorps-antigène. Cette variabilité est obtenue par le mécanisme de réarrangement V(D)J. En effet, lors de la synthèse d'anticorps, un épissage alternatif des gènes variables (environ 50 gènes), de diversité (environ 20 gènes) et de jonction (6 gènes) aboutit à la sélection d'un gène variable, un gène de diversité et un gène de jonction pour les chaînes lourdes et d'un gène variable et un gène de jonction pour les chaînes légères.

Développement de tests de diagnostic in vitro appliqués au sérodiagnostic des infections fongiques par western blot et immunochromatographie

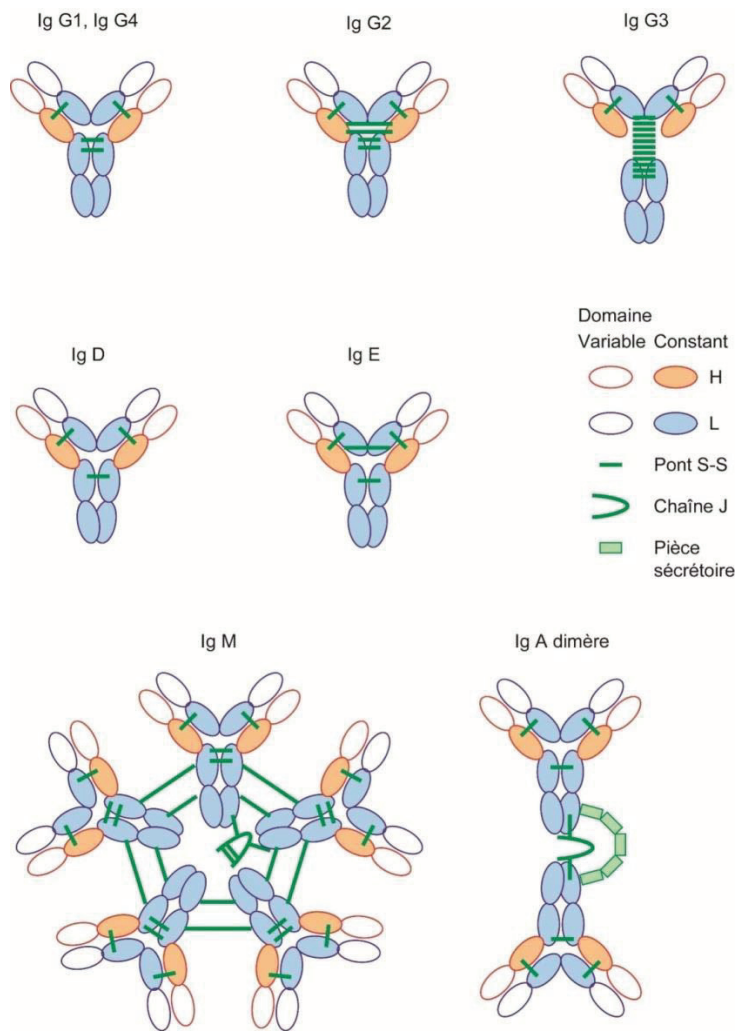


Figure 3. Présentation des différentes immunoglobulines humaines

H : chaîne lourde, L : chaîne légère ; Pont S-S : pont disulfure ; chaîne J : chaîne de jonction

Chaque classe d'Ig joue un rôle précis et possède une structure spécifique³¹ :

- Les IgM sont divisées en deux catégories : les IgM sécrétées et les IgM membranaires des lymphocytes B immatures. Ce sont à la fois les plus gros anticorps, car assemblés en structure pentamériques (1000kDa), et les plus précocement sécrétés dans la réponse immunitaire humorale. Ils représentent environ 10% des Ig sériques. Les IgM ne passent pas les barrières hémato-encéphalique ou hémato-placentaire et restent dans le sérum. Une fois activés (mécanisme de commutation isotypique, voir ci-après), les lymphocytes et plasmocytes sécrétant des IgM se transforment en sécréteurs d'IgG³⁴.
- Les IgG sont divisées en plusieurs sous types : IgG1 à IgG4. L'ordre des sous-types correspond à leur fréquence. Ce sont des molécules composées de quatre chaînes peptidiques (deux lourdes de 50 kDa et deux légères de 25 kDa pour un total de 150kDa) assemblées en Y. Les IgG représentent environ 75-85% des Ig totales, et sont réparties comme suit : 66% IgG1, 23% IgG2, 7% IgG3 et 4% IgG4. Les chaînes lourdes de ces IgG diffèrent, ce qui se traduit par des fonctions différentes : ainsi les IgG3 seraient précoces et auraient un rôle de précurseur. Les IgG1 et les IgG2 seraient ensuite synthétisées, avec une plus grande affinité pour l'antigène que les IgG3. Enfin, en cas de persistance de l'agression, des IgG4 seraient finalement synthétisées. Les IgG4 ayant une affinité moindre pour les récepteurs Fc et aucune activité d'activation du complément, elles permettraient d'atténuer la réponse inflammatoire chronique³⁵.
- Les IgA sont divisées en deux sous-classes IgA1 et IgA2, la région charnière des IgA1 étant un peu plus longue. Seules les IgA1 sont retrouvées dans le sérum, sous forme de monomères. Le rôle principal des IgA est d'assurer une fonction de barrière au niveau des muqueuses, sous forme de dimères. Les IgA n'activent que très peu le système du complément, et leur mécanisme d'action serait plus direct, par inactivation de leurs cibles³⁴.
- Les IgD sont des protéines de la paroi des lymphocytes B et ne sont pas excrétées. Leur rôle est mal connu, mais elles pourraient avoir un rôle dans l'activation des polynucléaires basophiles et donc dans les mécanismes d'allergie³⁶.
- Les IgE sont sécrétées dans le sérum sous forme de monomères. Ce sont les Ig les moins présentes en temps normal (0.05% du total des Ig), mais elles sont capables d'entraîner la réponse inflammatoire la plus importante de toutes. Elles sont normalement impliquées dans la défense contre les parasites multicellulaires, en particulier les helminthes, mais leur activation anormale est la clé de voûte de la réaction allergique. La réaction allergique se caractérise par un emballement d'une réponse des PNB et des mastocytes, qui, au travers de la liaison d'IgE à leur récepteur FcεRI, libèrent de l'histamine. L'histamine entraîne vasodilatation, œdème, bronchoconstriction, prurit. De plus, l'activation de la réponse Th2 entraîne la production d'IL4, d'IL5, d'IL13, ou encore d'interféron γ, ce qui inhibe les réponses Th1 et Treg³⁷ (Figure 4).

Seules les IgM et les IgD sont synthétisées au début d'une infection. Toutefois, il peut y avoir passage d'un isotype à un autre. Ce mécanisme, appelé commutation isotypique, est présent chez tous les vertébrés. Il trouve sa source dans un épissage alternatif de l'ADN codant pour les immunoglobulines, après réarrangement V(D)J (réarrangement entre les gènes variables, les gènes de diversité et les gènes de jonction).

Développement de tests de diagnostic in vitro appliqués au sérodiagnostic des infections fongiques par western blot et immunochromatographie

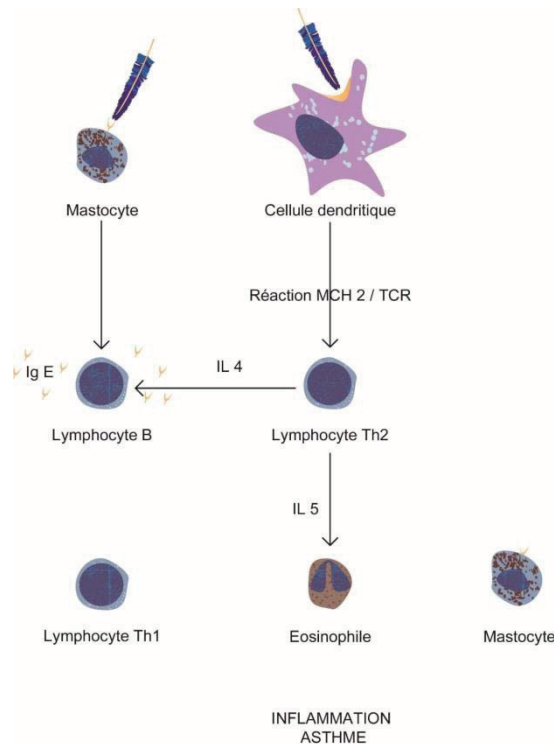


Figure 4. Réaction allergique.

La réponse Th2 et la production d'IgE entraînent l'activation des polynucléaires éosinophiles et des mastocytes, qui libèrent de l'histamine et provoquent une très forte réponse inflammatoire.

Les gènes codant pour la partie constante des chaînes lourdes μ et δ sont ceux d'abord retenus lors de l'épissage de l'ARN transcrit (qui donnera donc des IgM ou des IgD). Par la suite, le lymphocyte peut subir un épissage de son ADN réarrangé et perdre les chaînes lourdes codant pour les chaînes constantes μ et δ (Figure 5). Cet épissage est réalisé par une enzyme, l'*activation-induced cytidine deaminase*³⁸ et se fait sur des régions constantes, les régions de commutation³⁹. Le lymphocyte synthétisera alors la première chaîne lourde restante parmi les gènes de fragment constant disponibles, ce qui entrainera un changement de classe de l'immunoglobuline ainsi sécrétée. Comme il n'y a eu aucun impact sur les gènes V(D)J, il n'y a pas de modification de la fraction variable de l'anticorps, qui garde donc la même cible antigénique. De plus, il y a destruction de l'ADN codant pour les chaînes précédentes, cette commutation est donc à sens unique, dans le même ordre que les gènes codant pour le fragment constant (5'-C μ -C δ -C γ 3-C γ 1-C α 1-C γ 2-C γ 4-C ϵ -C α 2-3')⁴⁰. Cet épissage ne se fait pas au hasard et les LT et des cytokines sont impliqués (Tableau 1).

En plus de la commutation isotypique, des mécanismes de mutation (hypermutation somatique) et de sélection existent et entraînent une affinité de plus en plus forte des anticorps sécrétés, ce qui aboutit à une réponse immunitaire plus efficace. Cette affinité est parfois mesurée, comme dans le cadre du diagnostic de la toxoplasmose, où l'on parle d'avidité⁹.

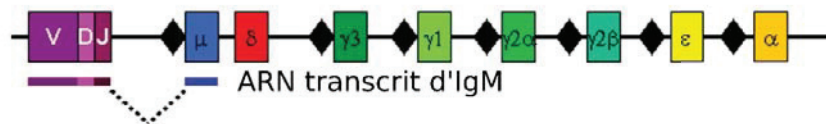
Tableau 1. Lymphocytes T et cytokines impliqués dans la commutation isotypique.

+ : favorisent la commutation ; - : défavorisent la commutation^{38,40-45}.

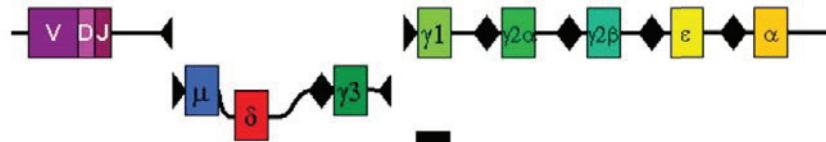
Th : lymphocyte T helper ; IL : interleukine ; IFN : interféron ; TGF : facteur de croissance transformant ; Ig : immunoglobuline

Lymphocytes T	Cytokines	Classe d'immunoglobuline					
		IgG1	IgG2	IgG3	IgG4	IgA	IgE
Th2	IL4	+		-	+		+
	IL5				+		
	IL13						+
Th1	IFN γ	-		+			-
Treg	TGF β			-		+	
	IL10	+		+			

Gènes des loci de chaîne lourde d'un lymphocyte B sécrétant des IgM



Epissage de segment d'ADN par l'action de l'enzyme AID entre des régions de commutation



Soudure non homologue des segments d'ADN au niveau des régions de commutation

Gènes des loci de chaîne lourde d'un lymphocyte B sécrétant des IgG1

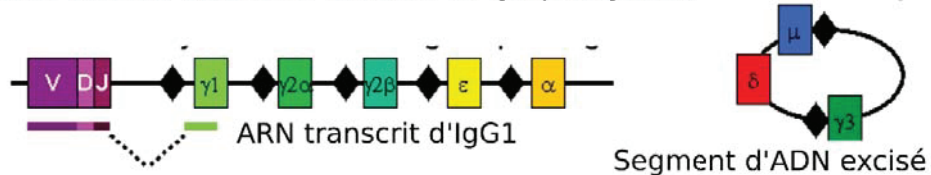


Figure 5. Commutation isotypique d'un lymphocyte naïf en lymphocyte producteur d'IgG1.

L'ADN réarrangé du lymphocyte subit, sous l'action de l'IL4 et de l'IL10, un épissage des régions codant pour le fragment cristallisable des IgM, IgD et IgG3. L'ADN du lymphocyte est dès lors traduit en ARN codant pour des IgG1.

AID : activation-induced cytidine deaminase. Traduit de Ciar pour Wikimedia commons

1.1.3. Réponse immunitaire et infection fongique

Les *fungi* font partie de notre flore commensale, la réaction de notre organisme face à un champignon est donc complexe.

Les *fungi* ont des constituants de paroi reconnus comme étrangers qui vont déclencher la réaction de phagocytose : les glucanes, polymannanes et chitines activent les cellules épithéliales ou endothéliales, les polynucléaires, les macrophages et les cellules dendritiques ; ils provoquent la production de signaux spécifiques comme les dectines ou le DC-SIGN (*Dendritic cell-specific intercellular adhesion molecule-3-grabbing non-integrin* - Non-intégrine ligand spécifique de la molécule d'adhésion intercellulaire 3)⁴⁶ et une réaction inflammatoire ; le zymosan (un glucane des levures) active le complément, ce qui provoque la production de facteurs chimiotactiques.

Une fois les barrières mécaniques et physicochimiques franchies, et la flore commensale mise en déroute, l'immunité innée joue un rôle majeur face aux infections fongiques, en particulier aux travers de certains PRR. Par exemple, TLR2 détecte le zymosan, et pentraxin 3 (PTX3) entraîne l'opsonisation des conidies d'*A. fumigatus*⁴⁷. Les récepteurs lectiniques de type C qui reconnaissent certains motifs moléculaires glucidiques fongiques permettent également la phagocytose de l'agresseur et déclenchent la réponse inflammatoire et immunitaire²².

Les cellules phagocytaires les plus impliquées dans la réponse fongique sont les PNN et les cellules dendritiques⁴⁶. Dans la quasi-totalité des cas, la seule réponse innée suffit à réguler les infections fongiques et un terrain favorisant (immunodépression locale ou générale, cavités protégées de l'immunité permettant une croissance fongique locale, etc.) ou une pénétration importante, à la suite d'un traumatisme par exemple, sont nécessaires pour qu'une infection se développe.

En cas d'infection ou de portage chronique, les réponses, innée puis adaptative, antifongiques se développent. La transition entre la réponse innée et la réponse immunitaire acquise, ainsi que les mécanismes impliqués sont détaillés dans la Figure 6.

Développement de tests de diagnostic in vitro appliqués au sérodiagnostic des infections fongiques par western blot et immunochromatographie

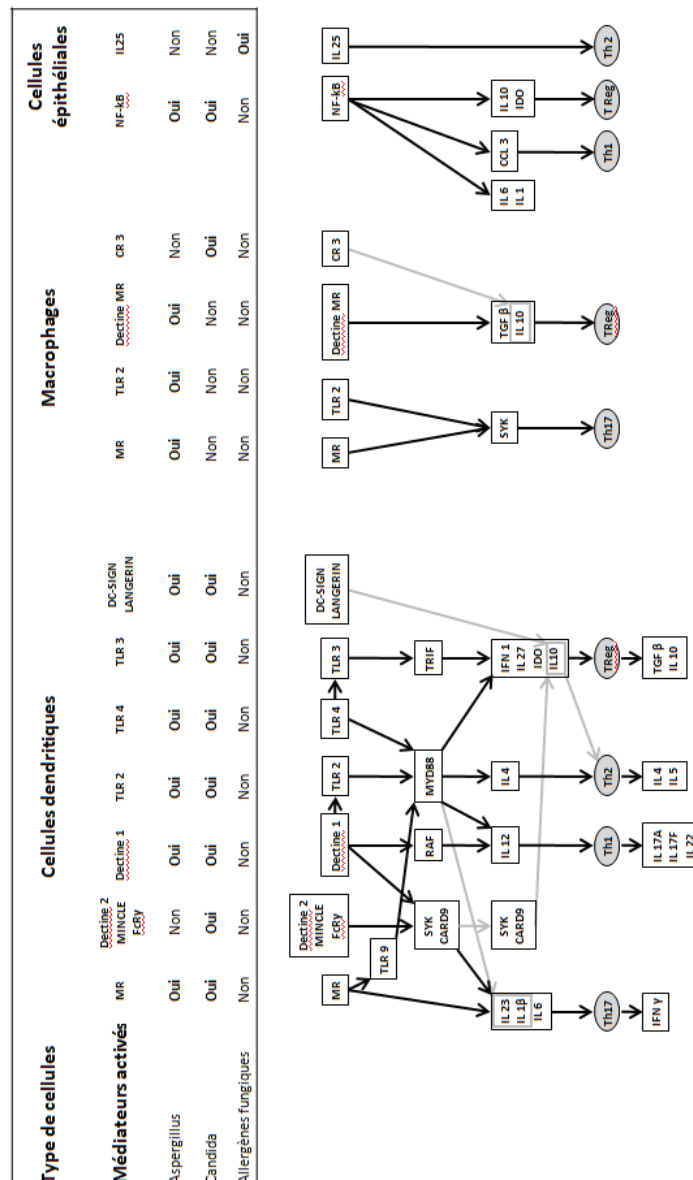


Figure 6. Voies d'activation de l'immunité adaptative par les différentes cellules de l'immunité innée pouvant être induites par les éléments fongiques.

D'après Romani²². En gris les interactions ne concernant qu'une partie du groupe de médiateur.

CARD : caspase recruitment domain-containing protein 9; CCL3 : CC - chemokine ligand 3; CR3 : complement receptor 3; DC-SIGN : DC-specific ICAM3 -grabbing non-integrin; FcR γ : Fc receptor γ -chain; GXMR : receptor (s) for the *Cryptococcus* capsular component glucuronoxylomannan; IDO : indoleamine 2,3 -dioxygenase; IFN : interferon; IL : interleukin; IRF3 : IFN-regulatory factor 3; MR : mannose receptor; MYD88 : myeloid differentiation primary response protein 88; NF - κ B : nuclear factor- κ B; SYK : spleen tyrosine kinase; TGF β : transforming growth factor - β ; TLR : Toll-like receptor; TRIF : TIR domain-containing adaptor protein inducing IFN β (also known as TICAM1) ; VLA5, very late antigen 5.*

* CARD9 : domaine de recrutement et d'activation de la caspase 9; CCL3, chémokine CC (deux cystéines) ligand 3; CR3, récepteur 3 du complément ; DC-SIGN : Non-intégrine, ligand spécifique de la molécule ICAM3 (molécule d'adhésion intercellulaire 3) ; FcR γ : chaîne γ du récepteur Fc (fragment cristallisable) ; GXMR : récepteur (s) du glucuronoxylomannane de la capsule de *Cryptococcus* ; IDO : indoleamine 2,3 -dioxygénase; IFN : interféron; IL : interleukine; IRF3 : facteur 3 de régulation de l' IFN3- ; MR : récepteur du mannose; MYD88, protéine 88 de la réponse primaire de la différenciation myéloïde ; NF- κ B : facteur nucléaire - κ B; SYK, tyrosine kinase splénique; TGF β , facteur de croissance transformant - β ; TLR : récepteur Toll-like; TRIF : TIR adaptateur ayant un domaine TIR (Toll/Interleukine-1R) induisant l'IFN β en réponse à l'activation des récepteurs Toll like (aussi appelé TICAM1) ; VLA5 : antigène très tardif 5.

Le plus souvent, la réponse prédominante est une réponse Th1 et Th17 (Figure 7), au détriment de la réponse Th2. Cette réponse Th1/Th17 joue un rôle protecteur par destruction ou phagocytose des cellules fongiques⁴⁸.

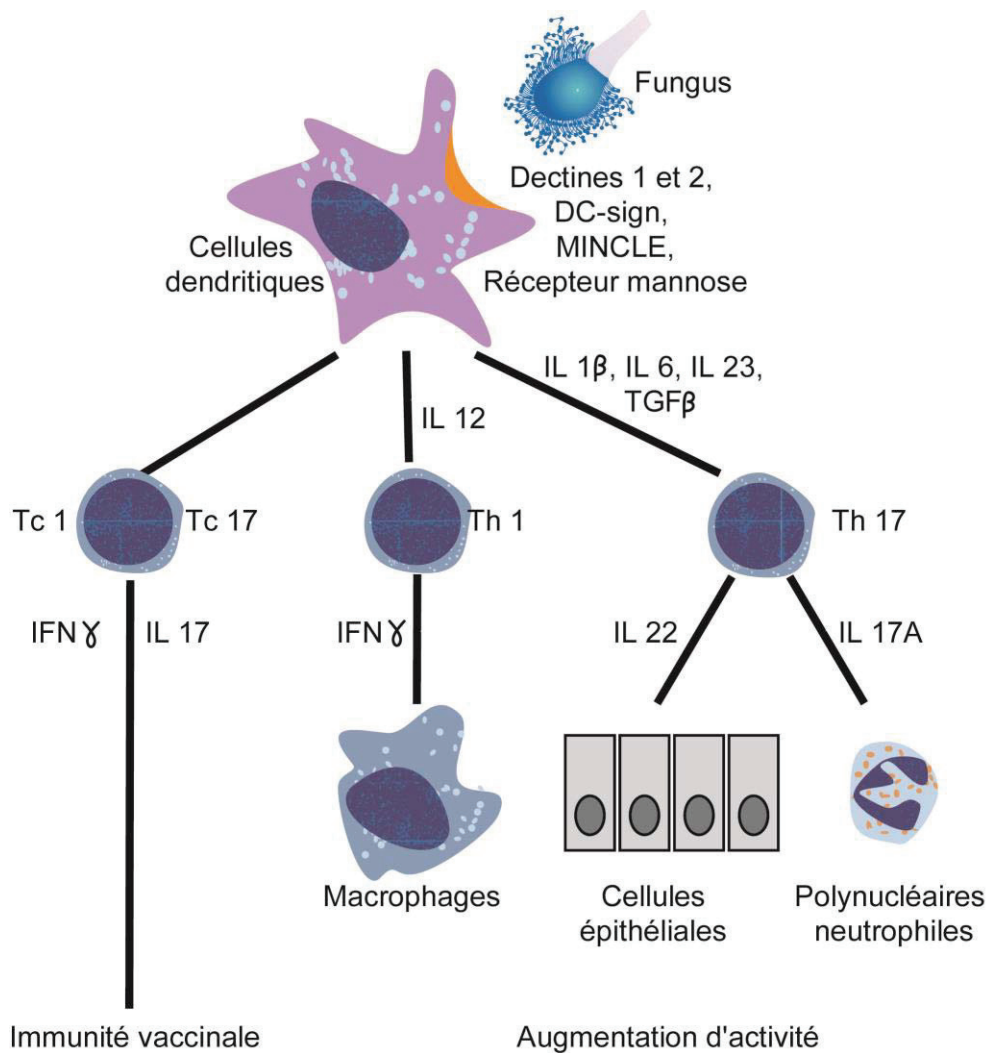


Figure 7. Réponse immunitaire Th1 et Th17 après un contact avec un élément fongique.

DC-sign : DC-specific ICAM3 -grabbing non-integrin; IFN : interféron ; MINCLE : Macrophage inducible Ca²⁺-dependent lectin receptor; IL : interleukin ; Tc : T Cell; TGF : transforming growth factor ; Th : T helper lymphocyte.¹

¹DC-sign : Non-intégrine, ligand spécifique de la molécule ICAM3 (molécule d'adhésion intercellulaire 3) ; IFN : interféron ; MINCLE : lectine de type C (Calcium-dépendante) inducible par les macrophages; IL : interleukine ; TC : cellules T ; TGF : facteur de croissance transformant ; Th : lymphocyte T *helper*

La réponse Th2 et la production d'anticorps par les LB qu'elle induit est souvent retrouvée dans les infections fongiques acquises par inhalation⁴⁸. A la quasi-exception des infections à *Pneumocystis* sp.⁴⁹, la réponse Th2 est délétère dans ce contexte. En effet, les champignons profitent de l'augmentation de la perméabilité des membranes épithéliales et du passage des cellules Th2 qui en découle. De plus, les réponses Th1 et Th2 sont en compétition, et donc une augmentation de la réponse Th2 se fait au détriment d'une réponse Th1 efficace. Enfin, il n'y a que très peu d'indices en faveur de l'existence d'anticorps protecteurs dans les infections fongiques : la plupart des anticorps sécrétés en réponse aux infections fongiques ne seraient pas protecteurs, même si quelques clones protecteurs ont été identifiés expérimentalement⁴⁸.

Les lymphocytes T régulateurs contrôlent l'intensité des réponses innées et acquises depuis la tolérance du commensal jusqu'à la destruction du pathogène.

Toutefois les espèces fongiques ont développé un grand nombre de mécanismes pour contourner les défenses immunitaires. Par exemple, l'hyphe de *Candida albicans* lui permet de dissimuler ses β -glucanes aux TLR4 et d'activer la sécrétion d'IL 10⁵⁰; la mélanine et les hydrophobines de la conidie d'*A. fumigatus* lui permettent d'échapper au système de reconnaissance innée⁵¹; *Cryptococcus neoformans* quant à lui est entièrement recouvert d'une capsule qui le masque au système de reconnaissance inné; il peut quitter le macrophage sans provoquer sa destruction : la réaction inflammatoire ne se développe pas⁴⁸. Enfin, de nombreux champignons exploitent le récepteur 3 du complément pour atténuer la réponse inflammatoire et développer une forme de parasitisme intracellulaire²².

L'équilibre entre les cellules T effectrices CD4 + et les cellules TReg a une régulation complexe et est donc susceptible d'être exploité par des champignons pour établir un commensalisme ou une infection. Ainsi *Malassezia* sp. annihile la réaction inflammatoire en provoquant la sécrétion de TGF β et d'IL-10, ce qui lui permet de vivre en commensal sur la peau normale. Par contre si la peau est lésée par une maladie chronique comme le psoriasis, ce micro-organisme exacerbe l'inflammation et aggrave la maladie⁵². Tout ce qui touche à ces régulations peut avoir des conséquences pathologiques : les métabolites du tryptophane comme l'indoleamine 2,3-dioxygénase (IDO) jouent sur la balance Treg / Th17 et la perturbent dans les infections fongiques²².

1.2. L'asthme

La *Global Initiative for Asthma* (GINA – www.ginasthma.org) définit l'asthme comme une maladie hétérogène, généralement caractérisée par une inflammation bronchique. Elle est caractérisée par un historique de symptômes inflammatoires tels que des sifflements, une sensation d'essoufflement, d'oppression thoracique ou encore de la toux. Les symptômes peuvent varier à la fois dans le temps et en intensité, et la limitation expiratoire est également variable dans le temps⁵³. Les premières mentions de l'asthme datent de la Grèce antique, et le premier ouvrage de médecine moderne sur le sujet a été écrit par John Floyer en 1698⁵⁴. Selon l'étude ISAAC, 241 millions de personnes dans le monde souffriraient d'asthme, dont 9% des enfants et 12% des adolescents⁵⁵. En France, plus de 6% des adultes seraient atteints, avec d'importantes disparités régionales et locales (villes/campagne)⁵⁶.

Il existe un très grand nombre de phénotypes d'asthme. Les phénotypes les plus fréquents sont les suivants⁵⁷ :

- L'asthme allergique. Il s'agit de l'asthme « classique ». Les symptômes se manifestent généralement dès l'enfance et sont associés à des antécédents personnels ou familiaux d'atopie : eczéma, allergies alimentaires ou respiratoires par exemple.
- Les asthmes non atopiques : ce sont des formes d'asthme qui se déclarent le plus souvent pendant la vie adulte. Le profil immunologique ne met pas en évidence d'atopie. Contrairement à la forme précédente, il n'y a souvent aucun antécédent familial. Parmi les différentes causes, on peut citer le tabagisme, mais aussi les asthmes professionnels, qui se développent après exposition à diverses substances telles que des glycoprotéines animales ou végétales ou des produits chimiques comme les sels de platine, différents colorants, des ammoniums quaternaires, de la poussière de bois et bien d'autres substances^{58,59}.

En raison du caractère très hétérogène de l'asthme, il faut faire attention à ne pas le confondre avec d'autres pathologies pouvant avoir des symptômes proches. Ces maladies varient en fonction de l'âge du patient. Par exemple, chez l'enfant, une pathologie confondante peut être la mucoviscidose, une dysplasie broncho-pulmonaire ou l'inhalation d'un corps étranger⁶⁰. Chez l'adulte, il faut envisager la broncho-pneumopathie chronique obstructive⁶¹, une maladie cardiaque sous-jacente⁵⁵ ou encore une dyskinésie des cordes vocales⁶².

La maladie asthmatique implique à la fois l'immunité innée, médiée principalement par les PNE et les PNB, et l'immunité adaptative⁶³⁻⁶⁵. Cette inflammation aboutit à des lésions obstructives chroniques des bronches pouvant évoluer vers la fibrose bronchique et l'insuffisance respiratoire. Elle est liée à une hyperréactivité bronchique, et des marqueurs génétiques favorisant ont été identifiés^{66,67}. Il existe très souvent une cause allergique. La maladie s'accompagne alors d'une élévation des IgE sériques. La maladie est divisée en trois tableaux cliniques : la crise d'asthme, l'exacerbation et l'asthme chronique.

La crise d'asthme correspond à une augmentation de la contraction des muscles lisses liée à l'exposition à un allergène, un irritant (ozone, dioxyde d'azote, dioxyde de soufre, particules fines de moins de 2.5 µm, froid, ou encore pollution liée au trafic routier⁶⁸), un effort intense ou une infection. Elle dure de quelques minutes à quelques heures. Le patient souffre d'une gêne respiratoire intense, avec une sensation d'oppression thoracique. La respiration est difficile, souvent bruyante, sibilante. Dans les formes les plus importantes de la crise d'asthme – on parle alors d'asthme aigu grave – il peut y avoir une cyanose, des troubles de la conscience, une très forte tachycardie, une hyperpnée.

L'asthme aigu grave tue 2000 personnes par an. Le traitement de la crise d'asthme fait appel à des bronchodilatateurs β -2 adrénergiques et des anticholinergiques par inhalation. Une corticothérapie *per os* ou intraveineuse doit impérativement être associée. En cas de désaturation en oxygène inférieure à 94%, une oxygénothérapie doit être mise en place⁶⁹.

L'exacerbation correspond à une aggravation transitoire – de plusieurs heures à plusieurs jours – d'un asthme chronique. En général, comme pour la crise aiguë, elle peut trouver sa cause dans une exposition à un polluant ou une infection respiratoire. Le traitement repose sur une augmentation du traitement de base de l'asthme, avec un recours aux médicaments de secours, éviction de la cause initiale et éventuellement recours à une corticothérapie orale ou des antibiotiques.

L'asthme chronique est défini par la présence d'un asthme non contrôlé sans traitement. Un asthme est dit non contrôlé si le patient a un score ACT (*asthma control test*) de 20 ou moins. Le questionnaire ACT est présenté dans le tableau 2.

Le patient est suivi trimestriellement par son médecin, et, tant que l'asthme n'est pas contrôlé, le traitement augmente par paliers. Il existe cinq paliers⁵³. Le traitement associé à chaque palier est repris dans le tableau 3.

Tableau 2. Questionnaire ACT

Au cours des quatre dernières semaines, votre asthme vous a-t-il gêné (e) dans vos activités au travail, à l'école, à l'université ou chez vous ?					Points
Tout le temps 1	La plupart du temps 2	Quelquefois 3	Rarement 4	Jamais 5	
Au cours des quatre dernières semaines, avez-vous été essoufflé (e) ?					
Plus d'une fois par jour 1	Une fois par jour 2	3 à 6 fois par semaine 3	1 ou 2 fois par semaine 4	Jamais 5	
Au cours des quatre dernières semaines, les symptômes de l'asthme (sifflements dans la poitrine, toux, essoufflement, oppression ou douleur dans la poitrine) vous ont-ils réveillé (e) la nuit ou plus tôt que d'habitude le matin ?					
4 nuits ou plus par semaine 1	2 à 3 nuits par semaine 2	Une nuit par semaine 3	1 ou 2 fois en tout 4	Jamais 5	
Au cours des quatre dernières semaines, avez-vous utilisé votre inhalateur de secours ou pris un traitement par nébulisation (par exemple, salbutamol, terbutaline) ?					
3 fois par jour ou plus 1	1 ou 2 fois par jour 2	2 ou 3 fois par semaine 3	1 fois par semaine ou moins 4	Jamais 5	
Comment évalueriez-vous votre asthme au cours des quatre dernières semaines ?					
Pas contrôlé du tout 1	Très peu contrôlé 2	Un peu contrôlé 3	Bien contrôlé 4	Totalement contrôlé 5	

Tableau 3. Traitement de fond de l'asthme en fonction du stade GINA.

CSI : corticostéroïde inhalé. Source : Vidal Recos⁶⁹

Palier 1	Palier 2	Palier 3	Palier 4	Palier 5
Éducation et contrôle de l'environnement				
β2 agoniste d'action courte à la demande				
Au choix (option préférentielle en gras) :	Au choix (option préférentielle en gras) :	Au choix (option préférentielle en gras) :	Au choix (option préférentielle en gras) :	Traitement du palier 4 + au choix :
Pas de traitement de fond	CSI dose faible	CSI dose faible + β2 agoniste d'action prolongée	CSI dose moyenne ou forte + β2 agoniste d'action prolongée	Avis spécialisé pour ajout d'un traitement additionnel (tiotropium ou omalizumab ou mépolizumab ou reslizumab)
CSI dose faible	Montélukast ou théophylline	CSI dose moyenne ou forte	CSI dose moyenne ou forte + montélukast	Corticoïde per os à la plus faible dose possible
		CSI dose faible + montélukast	CSI dose moyenne ou forte + β2 agoniste d'action prolongée + tiotropium	Avis spécialisé pour ajout d'un traitement additionnel corticoïde per os à la plus faible dose possible ou omalizumab ou mépolizumab ou reslizumab ou tiotropium
		CSI + théophylline		

Les traitements par immunothérapie sont apparus il y a quelques années. En France, le premier disponible fut l'omalizumab qui a bénéficié d'une autorisation temporaire d'utilisation nominative à partir de 2003⁷⁰. L'omalizumab est un anticorps humanisé dirigé contre les IgE humaines, qui permet donc de diminuer la réaction allergique dans un asthme où cette composante prédomine⁷¹. Depuis, deux autres immunothérapies sont disponibles, le mépolizumab et le reslizumab. Ces derniers sont dirigés contre l'IL5, et empêchent sa fixation aux PNE, ce qui limite son utilisation aux asthmes avec hyperéosinophilie⁷¹. Le coût élevé de ces traitements ainsi que leurs effets secondaires assez fréquents font qu'ils ne sont utilisés qu'en dernière ligne.

Certains champignons environnementaux sont des allergènes fréquemment impliqués comme facteurs provoquant des crises ou une exacerbation d'asthme. Les principaux genres en cause sont *Alternaria*, *Cladosporium*, *Penicillium* et *Aspergillus*. Les patients ayant un tel type d'asthme sont généralement atteints de formes plus graves que les autres. Des maladies spécifiques peuvent être liées à la sensibilisation à de tels champignons, en particulier l'aspergillose broncho-pulmonaire allergique, détaillée dans le paragraphe 1.5.2.

1.3. La mucoviscidose

1.3.1. Généralités

La mucoviscidose, en anglais *cystic fibrosis*, est une maladie autosomique récessive due à une mutation du gène codant pour la protéine CFTR (*Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator* - régulateur de la conductance transmembranaire de la mucoviscidose), situé sur le locus 7q31.2 du chromosome 7. Elle touche surtout les populations caucasiennes. La maladie a été décrite pour la première fois en 1938 par Dorothy Andersen⁷².

La protéine CFTR se trouve dans la membrane apicale des épithéliums sécrétoires exocrines (poumons, canaux hépatiques, glandes pancréatiques, glandes salivaires, glandes sudoripares, thyroïde, vésicule biliaire, sinus, intestin proximal, système génito-urinaire, etc.). Il s'agit d'un canal transportant les ions halogènes (Cl^- , Br^- , I^-) de l'intérieur vers l'extérieur de la cellule. La protéine CFTR est activée par l'adénosine triphosphate (ATP) (Figure 8).

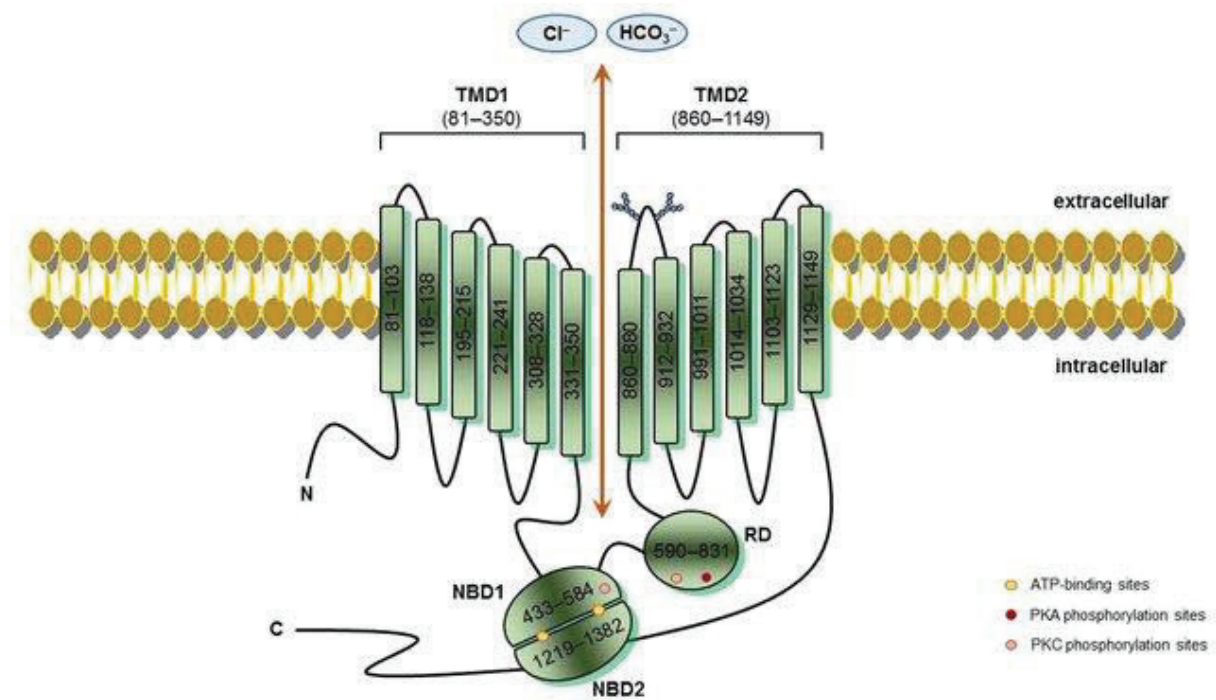


Figure 8. Protéine CFTR. CC M. Lopes-Pacheco⁷³

ATP : adénosine triphosphate ; CFTR : régulateur de la conductance transmembranaire de la mucoviscidose ; NBD : domaine de fixation des nucléotides ; PK : protéine kinase ; RD : domaine de régulation ; TMD : domaine transmembranaire.

Une mutation de la protéine CFTR entraîne une baisse de la sécrétion des ions chlorure et un excès d'absorption des ions sodium. Cela se traduit par une déshydratation et un épaissement des mucus et des sécrétions, ainsi qu'une modification de leur pH. Cet épaissement entraîne à son tour l'obstruction des canaux effecteurs ou des bronches. Au niveau digestif, les sucs pancréatiques n'arrivent pas jusqu'à l'intestin et ne neutralisent pas le pH de l'estomac, ce qui rend les enzymes pancréatiques inefficaces, et aboutit à une stéatorrhée avec une perte des vitamines liposolubles A, D, E, K et de divers oligoéléments. Une forte teneur en NaCl de la sueur est retrouvée chez 98% des patients.

Cette mutation provoque aussi une baisse de la sécrétion des bicarbonates et du glutathion, qui est un antioxydant majeur du fonctionnement cellulaire⁷⁴ ; elle occasionne donc un stress oxydatif qui participe à l'inflammation. Les patients souffrent donc de déficiences polyviscérales, avec des atteintes évolutives avec l'âge. Les principales complications retrouvées en fonction de l'âge sont résumées dans la Figure 9.

Pneumo, ORL		
Infection	ABPA* Sinusites, polypes	ABPA* Hémoptysies, pneumothorax Détrousse respiratoire Sinusites, polypes, anosmie
Gastro-intestinal		
Intestin échogène chez le fœtus Iléus méconial Insuffisance pancréatique Prolapsus rectal	Syndrome d'occlusion distale Invagination intestinale Stéatose (foie), fibrose biliaire Prolapsus rectal	Syndrome d'occlusion distale Invagination intestinale Cirrhose, fibrose biliaire Cancer digestif (adénocarcinome)
Pathologies rénales, métaboliques et autres		
Déshydratation	Calculs rénaux	Retard pubertaire, ostéoporose Calculs rénaux, insuffisance rénale Absence congénitale de canaux déférents, Ostéoarthropathie de l'hypertrophie pulmonaire, arthrite, vasculite
Hyponatrémie, hypochlorémie, alcalose métabolique	Hyponatrémie, hypochlorémie, alcalose métabolique	Hyponatrémie, hypochlorémie, alcalose métabolique
Première enfance	Enfance	Adolescence, âge adulte

Figure 9. Evolution des pathologies avec l'âge chez les patients atteints de mucoviscidose.

D'après O'Sullivan et Freedman⁷⁵

**ABPA : Aspergillose broncho-pulmonaire allergique*

Toutefois, c'est au niveau pulmonaire que les conséquences de la mutation sont les plus dramatiques^{76,77}. La mortalité est en effet principalement due à l'insuffisance respiratoire qui se développe progressivement^{78,77,79,80}. Le mucus s'accumule dans les bronchioles et les obstrue, entraînant la disparition fonctionnelle des alvéoles en amont et risquant de provoquer des atélectasies ; il favorise les infections respiratoires aux conséquences parfois lourdes et susceptibles de laisser des séquelles sur la fonction respiratoire⁸¹ ; il favorise les colonisations infectieuses chroniques, sources d'inflammation chronique par accumulation de neutrophiles et sécrétion d'IL8 et de différentes protéines inflammatoires. La dégradation progressive de la fonction pulmonaire due à la mucoviscidose nécessite à terme une transplantation (environ 100 par an en France⁸²).

De plus, les traitements anti infectieux sont moins efficaces, en partie parce qu'ils sont neutralisés par le mucus, en partie parce que ces patients souvent hospitalisés et souvent traités hébergent fréquemment des souches pathogènes multi-résistantes⁸³⁻⁸⁵.

1.3.2. Épidémiologie

En France, un dépistage néonatal systématique a été mis en place en 2002. Ce dépistage se base sur la mesure de la trypsine immunoréactive, un marqueur sanguin d'atteinte pancréatique. Ce marqueur n'est toutefois pas spécifique de la mucoviscidose et sa valeur prédictive positive n'était de que 3.5% en 2012 en France lors de sa mesure au troisième jour de la vie de l'enfant⁸⁶. Si le test est positif, il est suivi d'une recherche des mutations les plus fréquentes de la mucoviscidose (au nombre 29 depuis le 01/01/2015). En cas de détection de deux mutations, le diagnostic est posé à cette étape. En cas de refus de consentement des parents pour la recherche ADN, ou de recherche ADN négative malgré un dosage très élevé de la trypsine immunoréactive, le test de la trypsine est réalisé à nouveau à 21 jours de vie. En cas de détection d'une seule mutation, ou de positivité du test de trypsine immunoréactive à 21 jours, un test complémentaire de mesure des chlorures sudoraux (élevés en cas de mucoviscidose) est utilisé pour compléter l'analyse^{87,88}.

Les trois-quarts des nouveaux patients sont à présent diagnostiqués grâce à ce dépistage. Le registre français des mucoviscidoses a recensé 6757 patients suivis en 2016 en France; il y a eu 160 nouveau-nés atteints en 2015 et 128 en 2016, pour respectivement 800 000 et 785 000 naissances en France, soit entre 1/5000 et 1/6000 naissances (auxquelles s'ajouteront dans l'avenir quelques patients ayant échappé au dépistage)⁸². Les populations caucasiennes sont beaucoup plus affectées que les autres populations ; les populations d'Afrique ou d'Asie sont beaucoup moins touchées (entre 1/15 000 et 1/30 000 naissances). La raison de cette différence n'est pas connue à l'heure actuelle, mais pourrait être liée à la fois à une différence dans la prévalence du gène (une personne sur 25 est porteuse dans la population caucasienne contre 1/250 en Inde) mais aussi à un fort taux de non-diagnostic dans ces pays⁸⁹. Les prévalences connues de la mucoviscidose pour les pays possédant un registre sont présentées dans la Figure 10. La maladie affecterait environ 72 000 personnes dans le monde, surtout dans les populations caucasiennes^{90,91}.

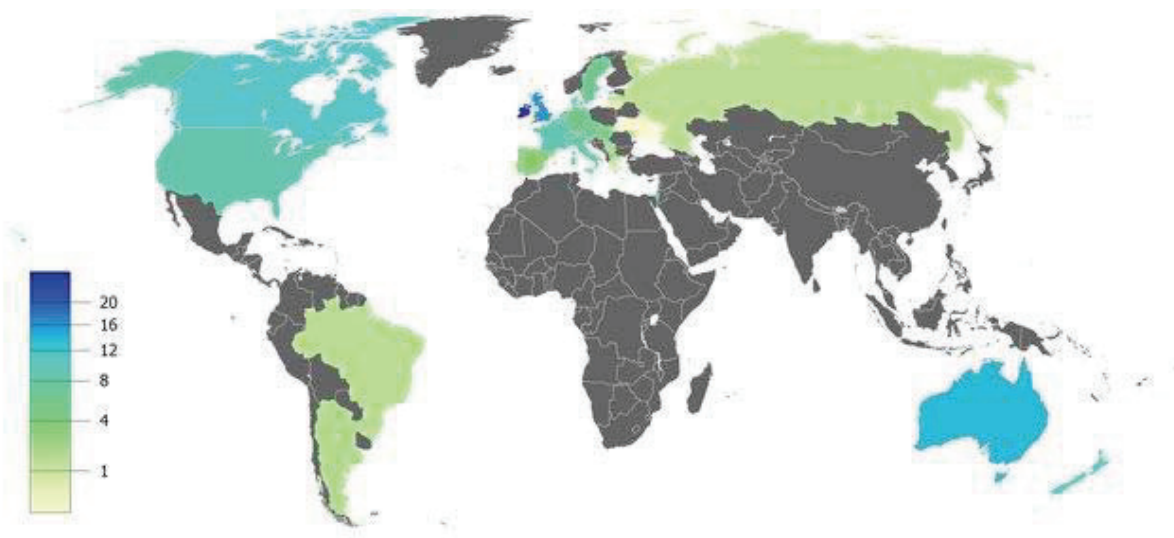


Figure 10. Prévalence de la mucoviscidose.

Échelle de couleur de blanc à bleu foncé : nombre de cas pour 100 000 habitants. En gris, pays ne possédant pas de registre de cas. CC M. Lopes-Pacheco⁷³.

Plus de 2000 mutations ont été identifiées, occasionnant différents degrés de gravité de la maladie ⁹². Toutes ont en commun une mutation de la protéine CFTR (ou son absence). La fréquence des mutations varie d'un pays à l'autre, la mutation F508del étant de loin la plus fréquente en France (Tableau 4)⁸². En fonction de l'impact sur la fonction de la protéine CFTR, les mutations sont classées en six grandes catégories (Figure 11).

Tableau 4. Répartition des mutations du gène codant pour la protéine CFTR en France

Génotype	Nombre de patients	Proportion (en %)
F508del / F508del	2817	42
F508del / Autre	2713	40.5
Autre / Autre	969	14.4
F508del / Non renseigné	72	1.1
Autre / Non renseigné	64	1
Non renseigné / Non renseigné	72	1.1
Mutations (une personne peut en posséder deux, une par chromosome)		
F508del	5602	83.5
G542X	367	5.5
N1303K	285	4.2
2789+5G->A	171	2.5
1717-1G->A	140	2.1
R117H	131	2
R553X	120	1.8
G551D	112	1.7
W1282X	93	1.4
3849+10kbC->T	91	1.4
I507del	80	1.2
3272-26A->G	77	1.1
L206W	77	1.1
Y122X	76	1.1
711+1G->T	68	1
2183AA->G	67	1
D1152H	64	1

Développement de tests de diagnostic in vitro appliqués au sérodiagnostic des infections fongiques par western blot et immunochromatographie

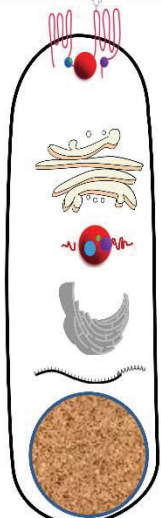
		I	II	III	IV	V	VI
	CFTR mature	Absente	Absente	Régulation du canal chlore défectueuse	Canal chlore disfonctionnel	Rare	Instable dans la membrane
	CFTR naissante	Absente	Malformée, détruite par des protéases	Présente	Présente	Rare	
	ARN m	Instable, tronqué	Longueur normale	Longueur normale	Longueur normale	Longueur normale, mélange de brins corrects et incorrects	Longueur normale
Anomalie de la protéine CFR	Aucune CFTR fonctionnelle	Défaut de migration	Défaut de régulation	Canal chlore défectueux	Synthèse réduite	Perte de stabilité	
Type de mutation	Non sens, glissement, épissage canonique	Faux sens, délétion d'acide aminé	Faux sens, Changement d'acide aminé	Défaut de l'épissage, faux sens	Faux sens, Changement d'acide aminé	Faux sens, Changement d'acide aminé	
Exemples de mutations	Gly542X Trp1282X Arg553X 621+1G->T	Phe508del Asn1303Lys Ile507del Arg560Thr	Gly551Asp Gly178Arg Gly551Ser Ser549Asn	Arg117His Arg347Pro Arg117Cys Arg334Trp	3849+10kbC->T 2789+5G->A 3120+1G->A 5T	4326delTC Gln1412X 4279insA	

Figure 11. Les six classes de mutations du gène CFTR en fonction de leur impact sur la protéine CFTR. D'après Elborn⁹².

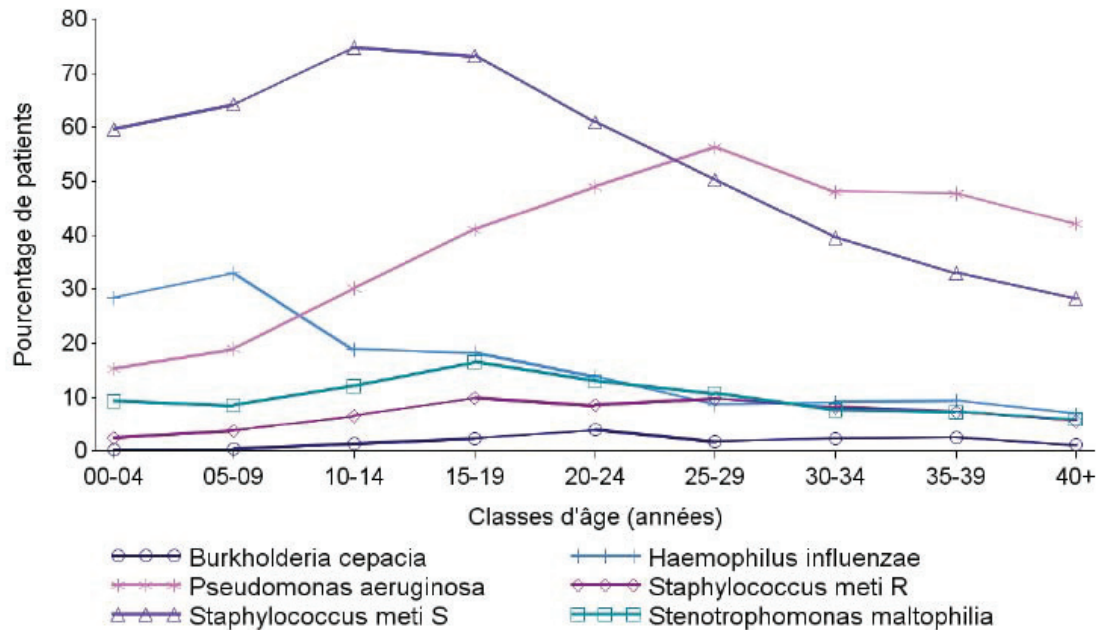
1.3.3. Infections et colonisations

Les patients atteints de mucoviscidose sont très souvent colonisés par une ou plusieurs espèces bactériennes ou fongiques. En France, les deux espèces bactériennes les plus souvent retrouvées sont *Staphylococcus aureus* (61%) et *Pseudomonas aeruginosa* (38%) (Figure 12). Les espèces bactériennes colonisantes retrouvées dans les voies respiratoires de ces patients évoluent au cours de leur vie. Ainsi, les staphylocoques laissent progressivement la place à *P. aeruginosa* avec le temps.

Pour ce qui est des espèces fongiques, de nombreux micro-organismes peuvent coloniser les voies aériennes des patients sans entraîner de pathologie, comme les levures du genre *Candida* (38 à 93% des patients selon les études⁹³⁻⁹⁷).

D'autres levures plus rares peuvent donner des pathologies sévères, comme *Trichosporon mycotoxinivorans*^{98,99} mais ce sont les champignons filamenteux, en particulier du genre *Aspergillus*, qui sont les principaux pathogènes fongiques associés à la mucoviscidose. *A. fumigatus* est le troisième micro-organisme rencontré (30%) chez les patients atteints de mucoviscidose en France en 2016⁸². Il touche surtout les adolescents et les adultes. Sa prévalence varie de 2,7% à 60% selon les études^{93,95,97,100-102}. Il s'agit le plus souvent de colonisation des voies respiratoires, avec des portages transitoires et des colonisations chroniques dus à un seul clone ou à plusieurs souches consécutives ou simultanées^{103,104}.

Développement de tests de diagnostic in vitro appliqués au sérodiagnostic des infections fongiques par western blot et immunochromatographie



Registre français de la mucoviscidose 2016

Figure 12. Pourcentage de patients français atteints de mucoviscidose et avec un prélèvement respiratoire positif en culture pour les principales bactéries retrouvées. Evolution en fonction de l'âge.

Source : registre français de la mucoviscidose 2016⁸².

Toutefois, en France, 10% des patients atteints de mucoviscidose développent une ABPA, forme grave nécessitant un traitement¹⁰². Il peut aussi se développer un aspergillome, voire une aspergillose invasive (cf. chapitre 1.5.2)¹⁰⁵. Leur prise en charge est rendue complexe par l'émergence de résistances aux azolés, en particulier en cas de traitements longs^{102,106-112}.

Le genre *Scedosporium* est le deuxième genre de champignons filamenteux le plus souvent isolé dans les voies respiratoires des patients atteints de mucoviscidose¹¹³ ; observé pour la première fois chez un patient atteint de mucoviscidose en 1991¹¹⁴, sa prévalence est d'environ 3% en France¹⁰⁰. L'impact d'une colonisation à *Scedosporium* spp. est peu documenté et les patients sont en général asymptomatiques, mais, au vu des similitudes dans les enzymes sécrétées par les champignons du genre *Aspergillus*, en particulier la présence de protéases et de superoxyde dismutases^{115,116}, on peut fortement suspecter leur implication dans la réponse inflammatoire. Dans certains cas, ils peuvent occasionner une forme allergique semblable à l'ABPA : on parle d'ABPM (*allergic bronchopulmonary mycosis*)^{97,117}. Les espèces les plus fréquemment retrouvées sont issues du complexe *S. apiospermum* : *S. apiospermum stricto sensu*, mais également *S. boydii*, *S. minutispora*, *S. aurantiacum* et *S. dehoogii*¹¹⁸. De plus, une espèce autrefois incluse dans le genre *Scedosporium*, mais maintenant séparée, *Lomentospora prolificans* est également retrouvée^{118,119}. Ces deux genres sont très proches mais aucun cas d'ABPM n'a été décrit avec *L. prolificans*¹¹⁹. *Scedosporium* sp. et *L. prolificans* ont un profil de multirésistance aux antifongiques : ces espèces sont résistantes à l'amphotéricine B, aux échinocandines et à l'itraconazole. Elles sont partiellement susceptibles au voriconazole, au posaconazole (*L. prolificans* l'est moins) et à la terbinafine. Cette dernière molécule, bien que n'ayant pas d'autorisation de mise sur le marché dans le cadre des infections fongiques profondes, a montré

des résultats encourageants sur *L. prolificans* et pourrait être utilisée en association avec le voriconazole ou le posaconazole dans ce contexte¹¹⁸.

D'autres espèces sont retrouvées, avec des fréquences moindres, comme par exemple *Exophiala dermatitidis*, *Acrophialophora fusispora*, *Alternaria alternata*, *Cladosporium* spp^{117,120}. Là encore, l'impact clinique de la colonisation n'est pas bien documenté, mais certaines de ces espèces sont des allergènes connus (*A. alternata*, *Cladosporium* spp. en particulier) et sont impliquées dans des cas d'ABPM¹²¹.

De plus, les espèces thermo-tolérantes de champignons capables de coloniser les voies respiratoires peuvent devenir des sources d'infection généralisée lors de l'immunodépression secondaire à une transplantation pulmonaire, même si des espèces bactériennes sont plus souvent en cause¹²². Les genres les plus souvent rencontrés dans ce contexte sont les genres *Candida* (en particulier *C. albicans*)¹²³, *Aspergillus* (en particulier *A. fumigatus*)¹²³, et le complexe *Scedosporium/Lomentospora*¹²⁴. D'autres espèces ont été décrites, comme par exemple le complexe d'espèces *Rasamsonia argillaceae*¹²⁵ ou encore *Pneumocystis jirovecii*¹²⁶⁻¹²⁸, même si leur fréquence dans la mucoviscidose semble relativement faible en France¹²⁹.

Enfin, *Exophiala dermatitidis* (filamenteux à 20-25° et levure à 37°) peut entraîner des infections respiratoires chez les patients atteints de mucoviscidose mais est rare en France¹¹⁷.

Ainsi, on retrouve de très nombreuses espèces de champignons dans les prélèvements respiratoires des patients ; même si certains témoignent simplement d'un portage, d'autres sont réellement à l'origine de colonisations ou d'infections. A l'heure actuelle, les colonisations semblent être pour la plupart asymptomatiques, mais pourraient avoir un rôle d'inducteur de l'inflammation ; le mycobiote respiratoire des patients atteint de mucoviscidose et son impact restent encore mal connus^{95,117,130,131}.

1.3.4. Traitement

Actuellement, il n'existe pas de traitement curatif de la maladie. Néanmoins une prise en charge symptomatique multidisciplinaire et le traitement des complications entraînées par la maladie a permis une très forte augmentation de l'espérance de vie dans cette population : alors qu'elle n'était que de quelques mois en 1938, elle dépasse maintenant 40 ans⁹² avec plus de la moitié des patients suivis en France qui sont des adultes⁸². Outre le traitement des complications de la maladie, la prise en charge s'appuie également sur l'éducation thérapeutique du patient afin d'éviter ou de retarder les complications de la maladie.

En France, la mucoviscidose est reconnue comme une affection longue durée et fait l'objet d'un programme national de diagnostic et de soin⁸⁸ et la prise en charge est assurée par un des centres de ressources et de compétences de la mucoviscidose (CRCM). Il existe 45 CRCM en France, répartis dans 33 villes (15 spécialisés en pédiatrie, 13 pour l'adulte et 17 mixtes).

L'équipe d'un CRCM est composée de nombreuses spécialités⁸² :

- Médecins : ORL, gastro-entérologue, hépatologue, diabétologue, endocrinologue, rhumatologue, néphrologue, cardiologue, gynéco-obstétricien, urologue, allergologue, pneumologue... à même de gérer avec le patient les différentes complications de la maladie.
- Une équipe de kinésithérapeutes : la kinésithérapie respiratoire est fondamentale, pour réduire la viscosité du mucus et permettre un meilleur drainage bronchique. Elle passe également par des exercices de respiration (travail du diaphragme, de la toux, des expectorations). En plus de la kinésithérapie respiratoire, une kinésithérapie musculo-squelettique est généralement requise en raison des troubles engendrés par la maladie respiratoire (cyphose dorsale, enroulement des épaules, déformation thoracique, etc.).
- Une équipe de psychologues et psychiatres : elle doit commencer dès le plus jeune âge et dès le diagnostic et concerne suivi du patient et aussi de son entourage. Elle fait partie de l'éducation thérapeutique et doit aider le patient à surmonter la maladie et ses nombreuses complications.
- Un(e) diététicien(ne) : une dégradation de l'état nutritionnel des patients a un effet important sur le pronostic respiratoire et vital. Les patients atteints de mucoviscidose doivent donc recevoir une alimentation adaptée à leur âge, et l'évolution de leur taille et de leur poids doit être suivie à chaque consultation.
- Un(e) infirmier(ère) coordinateur chargé d'organiser le passage des patients au CRCM et de la liaison avec l'équipe traitant le patient (médecin traitant, pharmacien, etc.).

Le traitement médicamenteux de la mucoviscidose repose essentiellement sur le traitement spécifique de chaque complication (infections, diabète, cirrhose...). Néanmoins il existe maintenant des traitements spécifiques de la mucoviscidose visant la protéine CFTR :

- L'ivacaftor (Figure 13), ayant obtenu l'autorisation de mise sur le marché en Europe en 2012 pour les patients ayant la mutation de classe III (défaut de régulation) G551D, homozygote ou hétérozygote. Elle a été depuis étendue à huit autres mutations de classe III, et concerne environ 5% des patients atteints de mucoviscidose. L'ivacaftor est un potentiateur du CFTR : il agit en augmentant l'activité des canaux CFTR et restaurant ainsi leur activité perdue¹³². Toutefois, il ne fonctionne qu'à condition que le patient présente une protéine CFTR fonctionnelle, ce qui en limite de fait l'usage aux patients présentant une mutation de classe III. Sur ces patients, le traitement a des effets majeurs, décuplant l'activité de la protéine CFTR, atteignant la moitié de l'activité de celle d'un sujet sain. Les essais cliniques ont montré une diminution importante des exacerbations pulmonaires des patients traités ainsi qu'une prise de poids chez ces patients en insuffisance staturo-pondérale et une amélioration de la qualité de vie¹³³. Le profil de tolérance est très bon. Le coût du traitement est de 18 500€/mois pour l'adulte⁷¹.

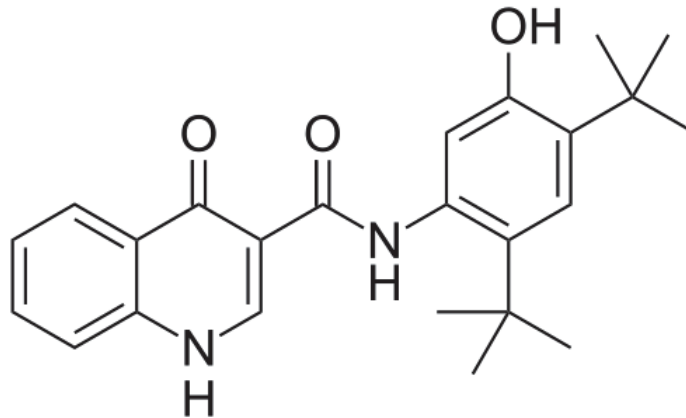


Figure 13. Ivacaftor. Source : Ed pour Wikimedia Commons

- La combinaison Lumacaftor/Ivacaftor s'adresse aux patients atteints de la mutation F508del (mutation de classe II), la plus fréquente en France. Elle a une autorisation de mise sur le marché pour les patients homozygotes pour cette mutation, ce qui représente 42% des patients en France⁸². Le Lumacaftor (Figure 14) agit comme une protéine chaperonne, permettant la bonne configuration des protéines CFTR et donc évitant leur destruction intra-cytoplasmique¹³⁴. L'Ivacaftor permet ensuite de potentialiser l'efficacité des protéines ainsi formées. Du fait du plus grand nombre de patients concernés et de l'absence d'accord entre les autorités de santé et le fabricant, ce traitement n'est pas remboursé à l'heure actuelle.

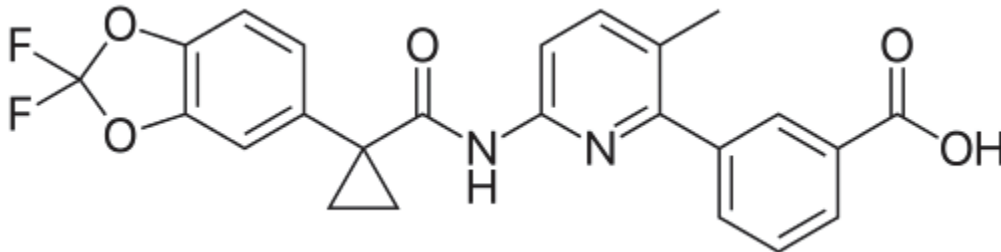


Figure 14. Lumacaftor. Source : Vaccinationist pour Wikimedia Commons

1.4. Champignons et maladies associées

Les champignons, y compris les champignons microscopiques, sont largement répandus dans notre environnement et représentent au moins 1,5 million d'espèces¹³⁵. Ils établissent des relations symbiotiques, commensales ou pathogènes avec de nombreuses plantes et de nombreux animaux dont l'homme. Ils sont dotés de nombreux mécanismes d'adaptation pour survivre dans des environnements changeants. Si de très nombreuses espèces sont saprophytes et se nourrissent donc de matière organique non vivante, certaines ont co-évolué avec leurs hôtes depuis des millions d'années et ont mis en place des mécanismes complexes de régulation immunitaire chez l'hôte. En effet, celui-ci est informé de la présence de champignons commensaux et émet des signaux pour provoquer une réponse inflammatoire ; les champignons ont donc des stratégies pour contrer cette réponse et maintenir une relation hôte-champignon stable. Ils ont ainsi développé des relations de commensalisme en modifiant les mécanismes de défense de l'hôte pour résister à ce stress¹³⁶.

Les humains sont exposés aux mycoses par contact ou par inhalation de spores ou de levures. Les champignons causent un large spectre de maladies chez les humains et les animaux, allant de l'onxyis à l'infection profonde disséminée. Dans le monde, il y aurait environ un milliard de personnes souffrant de maladies fongiques, principalement des formes cutanées ou muqueuses (teignes, intertrigos, vulvo-vaginites, etc.). En plus de ces formes superficielles, souvent socialement handicapantes, il y a également un nombre important de formes graves (environ un million de kératites, plus de dix millions de cas d'asthme fongique, trois millions d'aspergilloses pulmonaires chroniques). Enfin, avec l'accroissement de la population d'immunodéprimés (chimiothérapies, transplantations, VIH) et des maladies auto-immunes, l'incidence des formes invasives augmente (environ deux millions par an)¹. La Figure 15 et le tableau 5 détaillent l'importance de chaque maladie fongique. Ces estimations sont encore imprécises, et probablement sous-évaluées, et font l'objet de nombreux travaux actuellement, en particulier par l'organisation *Global Action Fund for Fungal Infection* (GAFFI –www.gaffi.org)¹³⁷. Outre le nombre très important de patients impactés, le coût des infections fongiques est très important : 7,2 milliards par an pour les seuls Etats-Unis¹³⁸.

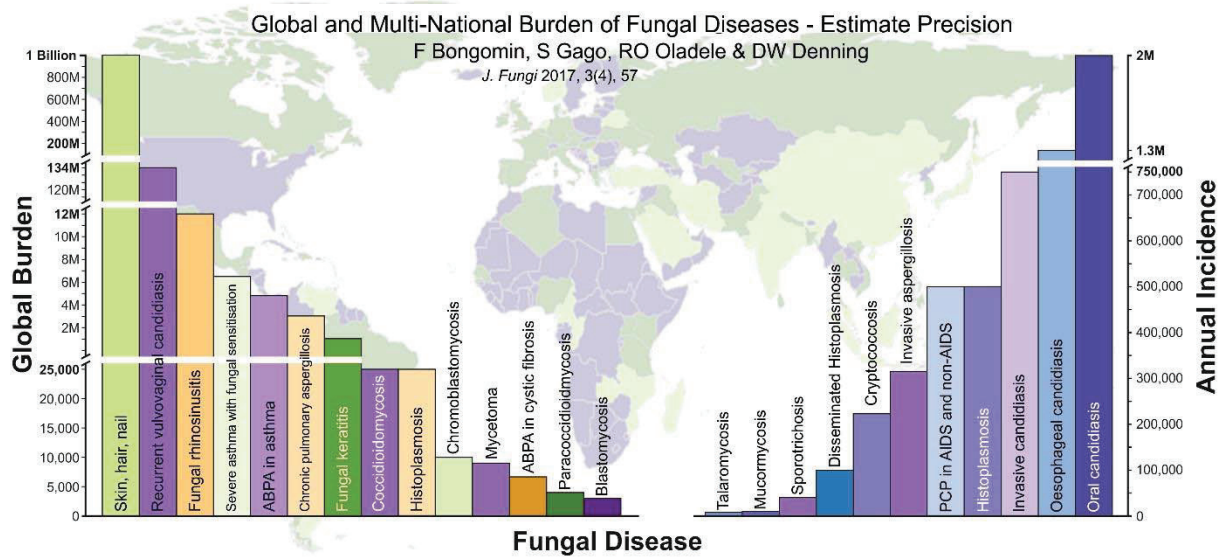


Figure 15. Nombre de patients infectés dans le monde pour les principales maladies fongiques.

À gauche, les formes chroniques. À droite les formes invasives. En fond, la carte du monde avec les pays pour lesquels une évaluation nationale a été menée (vert foncé, article publié ; vert clair, abstract disponible ; bleu, pas de données en 2017).
 CC F. Bongomin avec son autorisation¹.

Tableau 5. Incidence et impact des différentes maladies fongiques.

ABPA : Aspergillose broncho-pulmonaire allergique
Traduit de F. Bongomin et al.¹ avec son autorisation.

Maladie fongique	Incidence annuelle	Nombre de cas (monde)
Formes superficielles		
Peau, cheveux, ongles		~1 000 000 000
Kératite fongique		~1 000 000
Muqueuses		
Candidose orale	~2 000 000	
Candidose œsophagienne	~1 300 000	
Vulvo-vaginite à <i>Candida</i> (1 épisode)	~70% des femmes	
Vulvo-vaginite récurrente à <i>Candida</i>		~134 000 000
Formes allergiques		
ABPA (asthme)		~4 800 000
ABPA (mucoviscidose)		~6 675
Asthme sévère à sensibilisation fongique		~6 500 000
Rhinosinusite fongique		~12 000 000
Formes chroniques graves		
Aspergillose pulmonaire chronique		~3 000 000
Mycétome		~9 000
Chromoblastomycose		>10 000
Coccidioidomycose		~25 000
Paracoccidioimycose		~4 000
Blastomycose		~3 000
Histoplasmosse	~500 000	
Sporotrichose	>40 000	
Invasion aiguë		
Candidose aiguë	~750 000	
Aspergillose invasive	>300 000	
Pneumocystose pulmonaire	~500 000	
Cryptococcose	~223 000	
Mucormycose	>10 000	
Histoplasmosse disséminée	~100 000	
Talaromycose	~8 000	

De toutes les espèces fongiques provoquant des infections, *Aspergillus* est l'une de celles qui affectent le plus de patients, et qui présente les formes les plus graves : outre l'ABPA, l'aspergillose pulmonaire chronique (APC) et les formes invasives, c'est l'espèce la plus souvent en cause dans les asthmes sévères à sensibilisation fongique et les rhinosinusites fongiques. Au total, plus de dix millions de patients sont affectés par une forme chronique, en plus des 300 000 infections profondes.

1.5. *Aspergillus* et maladies liées

1.5.1. Le genre *Aspergillus*

Le genre *Aspergillus* est un genre de *fungi* ascomycètes (classe des *Eurotiomycetes*, ordre des *Eurotiales*, famille des *Trichocomaceae*) comportant 339 espèces (Figure 16)¹³⁹.

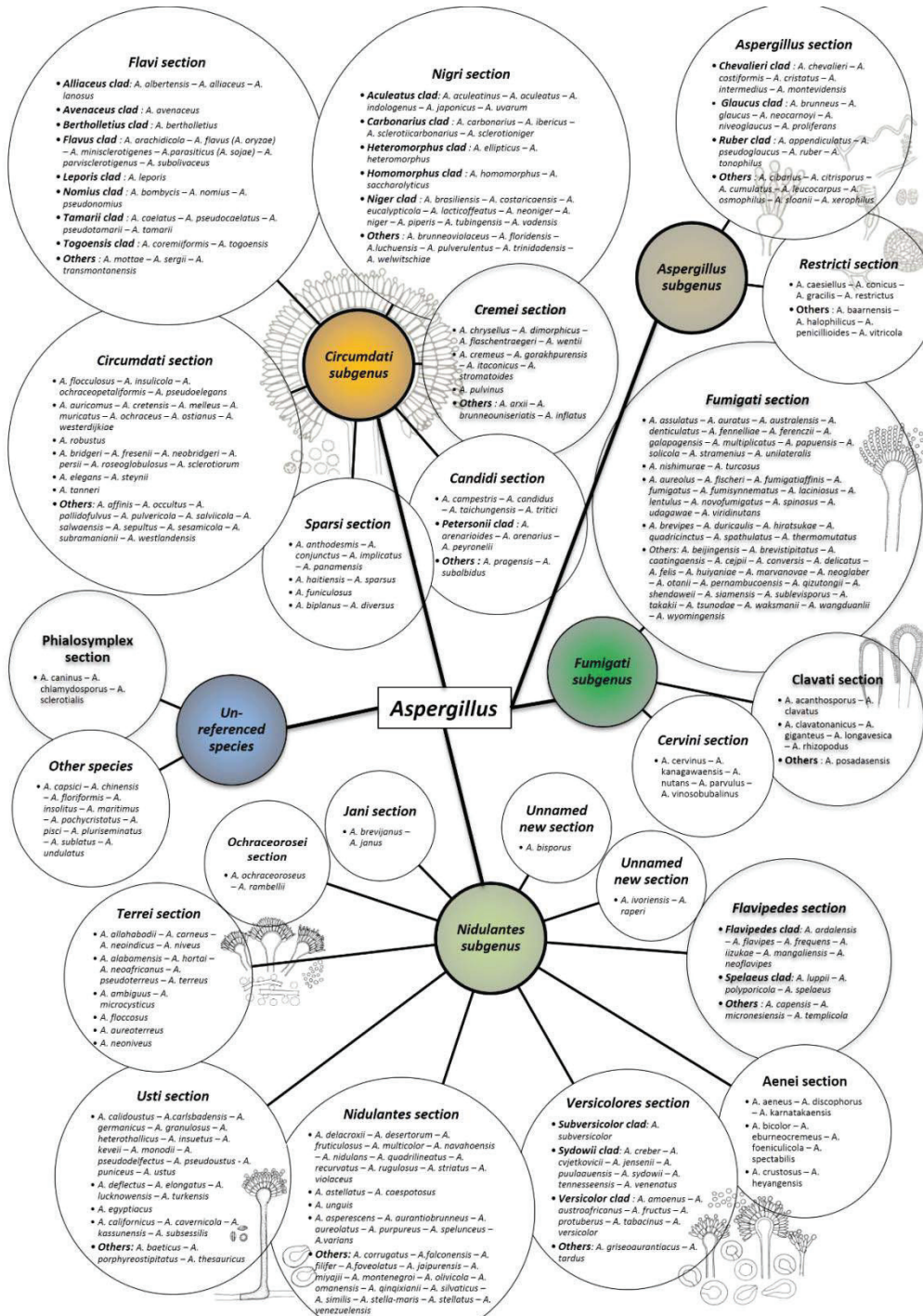


Figure 16. Sections des espèces d'*Aspergillus* actuellement répertoriées.

Les espèces sont regroupées en sections, elles-mêmes regroupées en sous-genres. Source : A-C Normand, avec son autorisation. © 2016 European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases.

Les champignons du genre *Aspergillus* sont des champignons ubiquitaires, avec une dissémination aéroportée des conidies (aussi appelées spores). La concentration en conidies varie fortement et va de quelques spores/m³ à plus de 100 dans des environnements très riches¹⁴⁰.

D'un point de vue macroscopique, l'aspect des colonies varie d'une espèce à l'autre, mais aussi en fonction du temps de pousse : ainsi *A. fumigatus* passe du blanc au vert, avant d'évoluer vers le gris-noir. D'un point de vue microscopique, les *Aspergillus* présentent un mycélium septé, avec des embranchements à 45°, et des conidiophores caractéristiques dits « têtes aspergillaires » (Figure 17). Les conidies mesurent de 2 à 4 µm. La forme et la taille des conidiophores et des spores sont les principaux critères de différenciation à l'intérieur du genre.

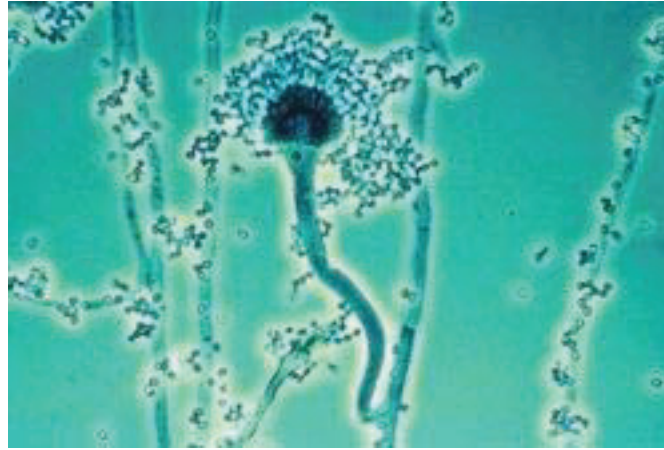


Figure 17. Tête aspergillaire, présumée d'*A. fumigatus*.

Source : US Department of Health and Human Services, Center for disease control.

L'analyse macroscopique et microscopique permet une bonne identification au genre ou à la section mais ne permet pas une identification précise de l'espèce. Le terme de section désigne des espèces très proches qu'il est pratiquement impossible de différencier sans avoir recours à des techniques d'identification moléculaires, en particulier le séquençage de gènes ou, plus récemment, par spectrométrie de masse¹⁴¹. Ainsi, de très nombreuses espèces que l'on croyait uniques se sont révélées être en réalité un regroupement de différentes espèces dites « cryptiques ».

L'identification à l'espèce au sein d'une section est utile pour la recherche de résistances aux antifongiques mais aussi pour les analyses épidémiologiques. En effet, il a été prouvé que ces espèces n'avaient pas le même profil de résistance aux antifongiques^{142,143} et certaines ont été impliquées dans des épidémies nosocomiales.

Les régions génomiques utilisées pour l'identification moléculaire sont l'*Internal Transcribed Spacer* (ITS, espaceur interne transcrit) du gène codant l'ARNr, les gènes codant la calmoduline et la bêta-tubuline et la séquence de la seconde sous-unité de la RNA polymérase (RPB2)¹³⁹.

Certaines espèces d'*Aspergillus* sont utilisées dans l'industrie agro-alimentaire ou pharmaceutique, comme par exemple *A. oryzae* pour la production de saké¹⁴⁴ ou *A. niger* pour la production de la lovastatine¹⁴⁵, une statine utilisée dans le traitement de l'hypercholestérolémie. Certaines espèces comme *A. flavus*, à l'inverse, produisent des mycotoxines, comme les aflatoxines,

qui ont un effet cancérigène en cas d'ingestion chronique^{146,147}, et provoquent des atteintes hépatiques aiguës, potentiellement mortelles en cas d'ingestion massive¹⁴⁸.

Enfin, certaines espèces peuvent provoquer des maladies chez l'homme et chez l'animal, le plus souvent sous forme d'atteintes respiratoires, mais il existe de très nombreuses formes d'infections à *Aspergillus* spp¹⁴⁹. De très nombreuses espèces, plus d'une trentaine, sont retrouvées en pathologie humaine. Les espèces retrouvées varient d'un pays à l'autre. Parmi les plus fréquentes, on peut citer en particulier *A. fumigatus*, *A. terreus*, *A. flavus* ou encore *A. niger*. Les différentes maladies causées par *Aspergillus* sont décrites plus en détail dans la section suivante.

1.5.2. Les maladies liées à *Aspergillus* spp.

L'être humain est exposé quotidiennement aux spores d'*Aspergillus*, mais ne développe pas de maladie pour autant. Le premier mécanisme de défense repose sur les macrophages pulmonaires qui phagocytent les conidies, avec une réponse inflammatoire très faible¹⁵⁰. Les polynucléaires neutrophiles sont également impliqués, puisqu'une neutropénie prolongée est un des principaux facteurs de risque de développer une forme invasive¹⁵¹. Enfin, les lymphocytes T ont aussi un rôle non négligeable à jouer, puisque le développement d'une réponse CD4-Th1 serait protecteur dans les modèles animaux alors qu'une réponse Th2 est associée aux formes allergiques¹⁴⁹.

En conséquence, les pathologies liées à *Aspergillus* spp. diffèrent chez l'hôte immunocompétent et l'hôte immunodéprimé (Figure 18).

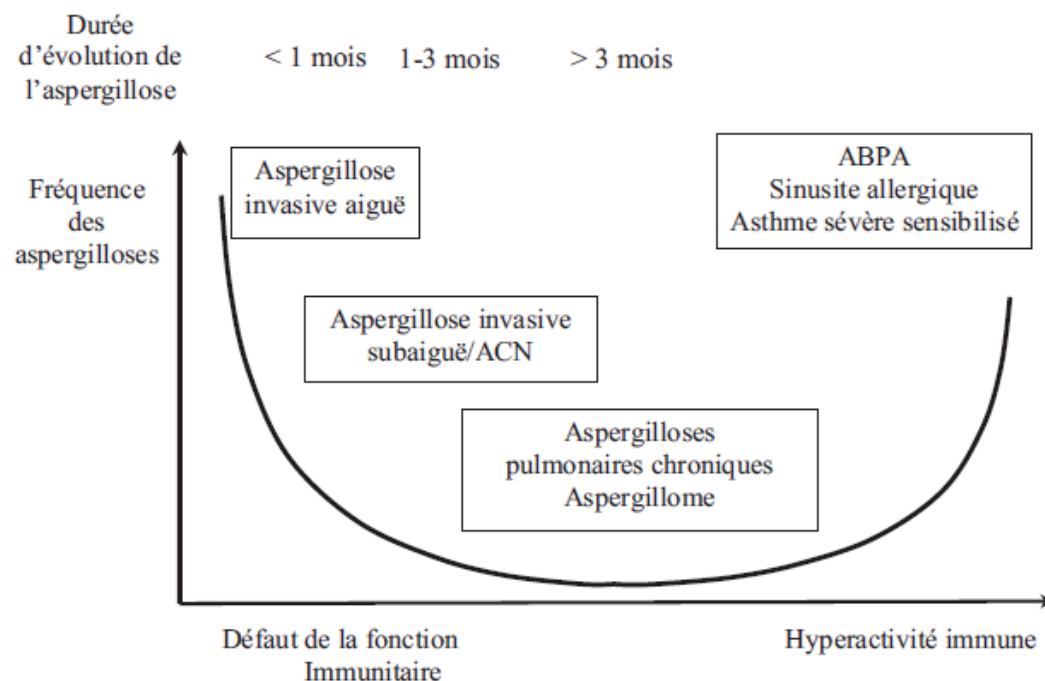


Figure 18. État immunitaire et type d'aspergillose rencontrée.

Source : F. Persat avec son autorisation¹⁵². © 2012 Elsevier Masson SAS

1.5.2.1. *Aspergillose de l'immunocompétent*

On peut classer les maladies aspergillaires en trois groupes :

- Formes allergiques ;
- Formes colonisantes de l'arbre respiratoire ;
- Autres formes localisées.

A. Formes allergiques

Les formes allergiques se caractérisent par une réponse immunitaire de type Th2, avec production de cytokines (IL3, IL5, IL13, etc.) favorisant la synthèse d'IgE et de polynucléaires éosinophiles. Cette réponse immunitaire, efficace pour lutter contre les parasites extracellulaires (helminthes en particulier), est aussi celle de la réponse allergique. Les maladies allergiques dues à *Aspergillus* affectent principalement les patients asthmatiques ou atteints de mucoviscidose.

On distingue cinq groupes de pathologies allergiques dues aux *Aspergillus* :

- Sensibilisation biologique ;
- Asthme sévère avec sensibilisation fongique (*Severe Asthma with Fungal Sensitization – SAFS*) ;
- Aspergillose broncho-pulmonaire allergique (ABPA) ;
- Sinusite allergique ;
- Alvéolite allergique extrinsèque ;

Sensibilisation biologique à *Aspergillus*

Il s'agit d'une réactivité à *Aspergillus* détectée biologiquement (présence d'IgE spécifiques) ou par prick-test. Cette sensibilisation est surreprésentée chez les patients atteints d'asthme ou de mucoviscidose par rapport au reste de la population. D'un point de vue clinique, cette sensibilisation peut être un marqueur d'une des autres formes décrites dans la suite de ce chapitre ou n'être corrélée avec aucune symptomatologie clinique particulière (sujets asymptomatiques). La présence d'une sensibilisation aspergillaire est toutefois corrélée à une diminution de la fonction respiratoire chez les patients atteints de mucoviscidose^{153,154}. C'est une situation fréquente : on estime qu'elle affecte 39% des patients atteints de mucoviscidose¹⁵⁵ et jusqu'à 25%¹⁵ des asthmatiques.

Asthme sévère avec sensibilisation fongique – SAFS

L'asthme sévère avec sensibilisation fongique a été décrit pour la première fois en 2006¹⁵⁶, mais sa définition reste floue¹⁵⁷. Le plus souvent, ce terme désigne un asthme sévère symptomatique, s'accompagnant d'une sensibilisation à une espèce fongique comme *Aspergillus*, mais ne répondant pas aux critères d'ABPA¹⁵⁶. De nombreuses espèces de champignons peuvent provoquer des SAFS, qu'elles soient thermo-tolérantes comme *Aspergillus* spp. ou qu'elles ne le soient pas, comme *Alternaria* spp. ou *Cladosporium* spp. Ces trois espèces sont le plus souvent en cause¹⁵⁶, même si la répartition des espèces causales varie d'une région à l'autre. Si les espèces non thermo-tolérantes présentent une clinique très bien corrélée à l'exposition aux spores, ce n'est pas le cas des espèces thermo-tolérantes comme *Aspergillus*, qui persistent dans le système bronchique des patients, et sont associées à des pathologies plus graves et pour lesquelles les mesures d'éviction sont plus complexes à réaliser¹⁵⁸.

Le SAFS est difficile à traiter et requiert souvent l'intégralité des options thérapeutiques de l'asthme sévère (paliers 4 à 5 de la classification GINA¹⁵⁹, tableau 3), c'est-à-dire une association de corticoïdes inhalés et de β 2-adrénergiques à longue durée d'action, une prise orale de corticoïdes, de

tiotropium, ou d'immunothérapies spécifiques (Omalizumab, Mépolizumab, Reslizumab). Les antifongiques pourraient aussi avoir une efficacité, mais moins marquée que dans l'ABPA¹⁵⁷. Dans le monde, on estime qu'il y a environ 6,5 millions de cas : la maladie affecterait un tiers des asthmes sévères¹.

Aspergillose broncho-pulmonaire allergique

L'ABPA est décrite depuis 1952¹⁶⁰. Il s'agit d'une forme d'allergie à *Aspergillus* spp. associée à une colonisation chronique des voies respiratoires par ce champignon¹⁶¹. C'est une complication de l'asthme et de la mucoviscidose, même si quelques rares cas ont été décrits en dehors de ces deux contextes, en particulier chez des atopiques présentant une toux chronique mais sans asthme¹⁶².

Dans le monde, on estime qu'il y a environ 4,8 millions de cas¹⁶³. La maladie affecterait 8,9% des patients atteints de mucoviscidose¹⁵⁵ et 2,5% des asthmatiques¹⁶³. L'ABPA est considérée comme la forme la plus grave des manifestations allergiques aspergillaires.

Cliniquement, il s'agit le plus souvent de patients avec un asthme mal contrôlé ou des patients atteints de mucoviscidose ayant une fonction respiratoire dégradée. Les symptômes généralement présents sont une toux productrice de mucus brun, des hémoptysies, une fébricule et une altération de l'état général¹⁵. Certains patients peuvent être asymptomatiques en raison de leurs traitements. Ainsi, sur 155 patients avec une ABPA, Agarwal *et al.* ont identifié 19% d'asthmes bien contrôlés¹⁶⁴.

Dans la mucoviscidose en particulier, les fréquents épisodes d'ABPA et leur cortège d'obstructions bronchiques et d'inflammation provoquent des bronchectasies (Figure 26), et aggravent la fibrose pulmonaire et les troubles ventilatoires. Un diagnostic précoce et fiable de l'ABPA permettrait d'améliorer le pronostic de ces patients.

Les premiers critères de définition ont été proposés en 1977¹⁶⁵, mais ils évoluent régulièrement et restent sujets à débat^{15,166}. L'annexe 1 montre l'évolution des critères de définition de l'ABPA dans le temps, mais également entre les différentes équipes.

Globalement, les définitions s'appuient sur la présence d'IgE totales à des taux élevés, associée à un prick-test ou des IgE positives pour *Aspergillus* ainsi que la présence de signes de colonisation aspergillaire (sérologie IgG ou précipitines positives, cultures sur crachat ou liquide de lavage broncho-alvéolaire, ou encore imagerie compatible) chez des patients asthmatiques ou atteints de mucoviscidose. Les seuils limites utilisés pour définir les IgE « élevées » varient fortement d'une définition à l'autre. Pour les IgE totales, les définitions proposent des seuils allant de 1000 µg/ml (soit 417 UI/ml) à 1000 UI/ml (soit 2400 µg/ml). Pour les IgE spécifiques, les définitions historiques parlaient d'un seuil deux fois supérieur aux IgE d'un pool de patients asthmatiques sensibilisés à *Aspergillus* mais sans ABPA¹⁶⁷. Le seuil a ensuite évolué vers une valeur fixée à 0.35 UA/ml¹⁵ correspondant à la limite de détection des techniques historiques de *radio-allergo-sorbent test*¹⁶⁶ puis à 0.1 UA/ml¹⁶⁸, la limite de détection des techniques actuelles.¹⁶⁹

D'un point de vue immunologique, *Aspergillus* libère de nombreuses enzymes et toxines qui lèsent l'endothélium bronchique et induisent la production de cytokines et chémokines (IL6 et IL8, MCP1, *monocyte chemo attractant protein* - protéine attirant chimiquement les monocytes) qui à leur tour stimulent la différenciation des lymphocytes T en Th2. Elles induisent aussi une forte activité macrophagique et un cercle vicieux inflammation / nécrose / inflammation se crée. La réponse Th2 semble promouvoir une dérégulation immunitaire, qui se traduit par des taux élevés d'IgE, une forte

production d'histamine¹⁷⁰ ainsi qu'une activité accrue des basophiles, une élévation des IL4, des IL5 et des IL13¹⁴ et une diminution de l'interféron γ . Certaines chémokines, comme CCL17, entretiennent la réaction¹⁷¹. Enfin, l'infection fongique est chronicisée par le recrutement des neutrophiles par l'IL17A.

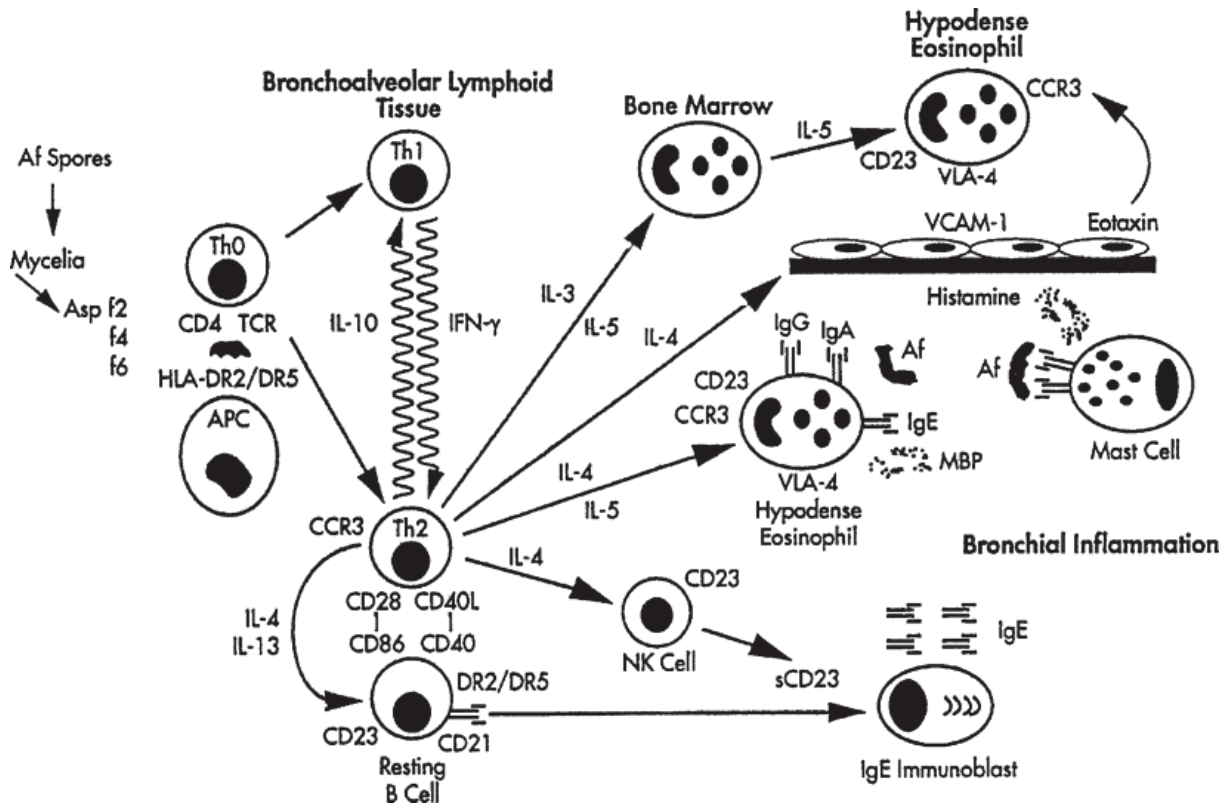


Figure 19. Mécanismes immunitaires mis en jeu dans l'ABPA.

Af, *Aspergillus fumigatus* ; APC antigen presenting cell ; CCR3, CC chemokine receptor 3 ; L, ligand ; MBP, major basic protein ; NK, natural killer ; s, soluble ; TCR, T cell receptor ; VCAM, vascular cell adhesion molecule ; VLA, very late antigen.²
Extrait de Stevens et al¹⁴, Clin Infect Dis | © 2003 Infectious Diseases Society of America.

Certaines particularités du système HLA DR2 et DR5 augmentent l'IL10 et induisent une meilleure présentation des antigènes aspergillaires et une différenciation des lymphocytes en Th2.

Néanmoins, les critères diagnostiques actuels sont insuffisants et certains auteurs comme Denning estiment que seules 30% des ABPA sont diagnostiquées¹⁶³. En effet, il est difficile de les différencier des simples sensibilisations^{170,172}. Depuis plusieurs années, de nouveaux antigènes (protéines recombinantes) sont disponibles et semblent pouvoir différencier la sensibilisation et l'ABPA. Malgré tout, leurs performances ne sont pas encore clairement établies et leur place reste encore à définir^{166,173,174}.

²APC cellule présentatrice d'antigène ; CCR3, récepteur type 3 de la chémokine CC (deux cystéines) ; L, ligand ; MBP, protéine basique majeure ; NK, lymphocyte tueur naturel ; s, soluble ; TCR, récepteur de cellule T ; VCAM, protéine d'adhésion cellulaire vasculaire ; VLA, antigène très tardif.

Le traitement de l'ABPA vise la diminution de l'hyperactivité immunitaire et de la charge fongique. L'efficacité du traitement est à considérer d'un point de vue clinique, radiologique mais aussi sérologique. Le marqueur sérologique le plus utilisé est la diminution du taux d'IgE totales, témoin d'une réduction de cette hyperactivité immune^{175,176}.

Le traitement repose actuellement sur l'utilisation de corticoïdes oraux, mais plusieurs protocoles existent, avec des durées de traitement et des doses de prednisolone variables¹⁷⁵. En effet, si l'utilisation d'une forte dose de prednisolone améliore plus rapidement les symptômes, elle est également associée à une augmentation des effets secondaires par rapport à des doses plus faibles, ce qui peut entraîner des refus de traitement. Ce traitement n'est pas curatif : 46% des patients traités par corticoïdes rechutent à l'arrêt du traitement¹⁷⁷. L'utilisation de traitements antifongiques actifs sur *Aspergillus*, en particulier l'itraconazole et le voriconazole, semble également efficace, même si les données sont encore limitées. Une étude d'Agarwal *et al.* comparant des patients traités par prednisolone (n=63) et itraconazole (n=68) a montré que la prednisolone apportait une réponse plus rapide que l'itraconazole mais que l'efficacité à trois mois et le délai avant rechute étaient similaires entre les deux groupes, avec moins d'effets secondaires chez les patients traités par itraconazole¹⁷⁸. Depuis quelques années, plusieurs cas de traitement d'ABPA par immunothérapie ont été décrits, principalement par utilisation de l'omalizumab¹⁷⁹⁻¹⁸², mais également du mepolizumab¹⁸³. Dans l'ensemble, une bonne réponse thérapeutique a été observée chez ces patients avec une amélioration des symptômes, une réduction du niveau d'IgE totales et de la fréquence des exacerbations. De plus, une amélioration de l'asthme et de la fonction respiratoire a été constatée chez les patients asthmatiques. A l'heure actuelle, aucune étude en double aveugle n'a été menée, ce qui ne permet pas de confirmer avec certitude l'efficacité de cette approche thérapeutique, qui pourrait malgré tout représenter une option pour les patients réfractaires aux traitements par corticoïdes et/ou antifongiques. Enfin, un traitement antifongique par nébulisation est actuellement testé : l'utilisation d'amphotéricine B liposomale par nébulisation a montré son efficacité sur quelques patients^{184,185} et fait maintenant l'objet d'une étude clinique de phase II en France (étude NCT02273661 sur la base clinicaltrials.org)¹⁸⁶.

Comme le montrent les différentes études visant à trouver de nouvelles approches thérapeutiques, le traitement de l'ABPA est encore insuffisamment efficace. De nouvelles voies thérapeutiques s'ouvriront certainement dans les prochaines années, basées sur une meilleure connaissance des mécanismes physiopathologiques de la maladie.

Rhinosinusites fongiques allergiques / à éosinophiles

Le premier cas de rhinosinusite fongique a été décrit en 1791 chez un jeune soldat¹⁸⁷. Depuis, plusieurs formes différentes ont été décrites. Les rhinosinusites fongiques correspondent à des atteintes des sinus paranasaux. Les sinus paranasaux sont les sinus frontaux, sphénoïdes, ethmoïdes et maxillaires (Figure 20). Les atteintes peuvent être dues à des colonisations, des invasions tissulaires locales ou encore des réactions de type allergique. La classification précise des différentes formes de rhinosinusites fongiques est encore sujette à débat¹⁸⁷⁻¹⁸⁹. Malgré tout, elles peuvent être classées en deux grandes catégories : invasives et non invasives. Le tableau 6 présente une classification plus détaillée des formes de rhinosinusites fongiques. Les différentes rhinosinusites sont reprises par la suite dans leurs sections respectives.

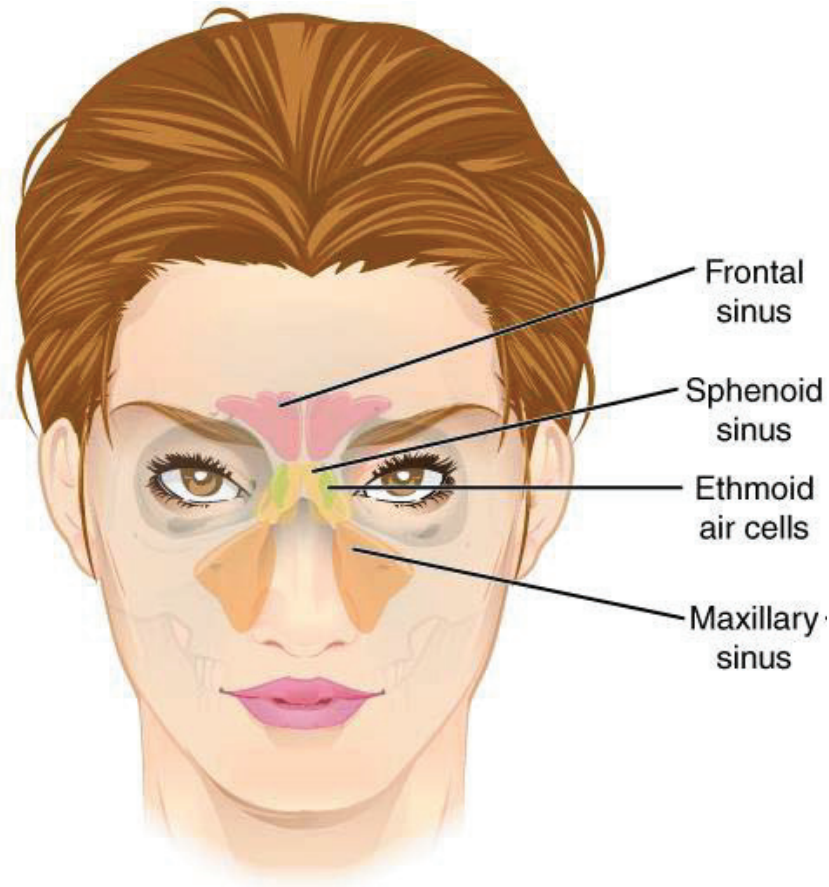


Figure 20. Les sinus paranasaux.

CC SA Open Stax College pour Wikimedia Commons

La rhinosinusite fongique allergique a été décrite pour la première fois en 1976 comme une forme particulière d'ABPA avec atteinte sinusale¹⁹⁰. Comme pour l'ABPA, il s'agit d'une réaction allergique à des éléments fongiques présents dans les sinus paranasaux des patients. Le mécanisme physiopathologique se caractérise par des réactions d'hypersensibilité de type I (immédiate, dégranulation mastocytaire d'IgE, « allergie ») et de type III (dépôt de complexes immuns).

La définition de la maladie est controversée et l'ISHAM propose actuellement de différencier trois formes¹⁸⁹ :

- rhinosinusite fongique allergique,
- rhinosinusite fongique à éosinophiles, pour laquelle une réactivité de type I n'est pas mise en évidence,
- rhinosinusite à éosinophiles productrice de mucine, similaire à la catégorie précédente, mais sans détection d'un *fungus* responsable.

De manière générale, il s'agit de rhinosinusites chroniques avec une production de mucine riche en éosinophiles et présentant souvent des cristaux de Charcot-Leyden (Figure 21). On y retrouve également des hyphes fongiques, visibles après coloration argentique (absentes dans les rhinosinusites à éosinophiles productrices de mucine).

Développement de tests de diagnostic in vitro appliqués au sérodiagnostic des infections fongiques par western blot et immunochromatographie

Tableau 6. Les différentes rhinosinusites fongiques.

ATF, antifongique ; CS, Corticostéroïdes ; DT2, diabète type 2 ; ID, immunodéprimé ; HS : hypersensibilité ; RS, rhinosinusite

Forme	Type de patients	Présentation clinique	Mécanisme	Traitement	Pronostic
Formes invasives					
RS fongique invasive aiguë	ID sévères	Ulcérations, invasion orbite, méninges (< 4 semaines)	Invasion vasculaire, nécrose	Chirurgie + ATF	Pronostic vital engagé
RS fongique invasive chronique	SIDA, DT2, ID léger	Evolution lente > 3 mois Possibles paralysies oculaires	Amas dense d'hyphes mycéliens, faible réponse inflammatoire	ATF + chirurgie	Pronostic vital parfois engagé
RS fongique granulomateuse	Venu de zone subtropicale du Moyen-Orient à l'Inde	Formation progressive d'une masse dans un sinus	Dérèglement Th17 avec détection d'A. <i>flavus</i>	Résection + ATF au long cours	En général bon, peu d'échec de traitement
Formes non invasives					
Colonisation saprophytique		Pas de symptômes	Hyphes dans le mucus sinusal	Lavage	Précurseur des balles fongiques ?
Balles fongiques		Masse dans un sinus (corps étranger fréquent)	Amas dense d'hyphes mycéliens dans un sinus	Exérèse chirurgicale	Bon, peu de rechutes
RS éosinophile productrice de mucine	Immunocompétents, Plus de 40 ans	Sinusite chronique bilatérale	HS de type III	Lavages. CS oraux et locaux.	
RS fongique à éosinophiles	Immunocompétents, jeunes, atopiques	Sinusite chronique non atopique	HS de type III	Lavages. CS oraux et locaux.	
RS fongique allergique	Immunocompétents, jeunes, atopiques	Sinusite chronique, polypes nasaux, peu à pas de douleur	HS de types I/III. Mécanisme proche de l'ABPA	Chirurgie conservatrice (endoscopie) CS oraux et locaux.	Risque élevé de récurrence, résistance aux traitements antibiotiques.

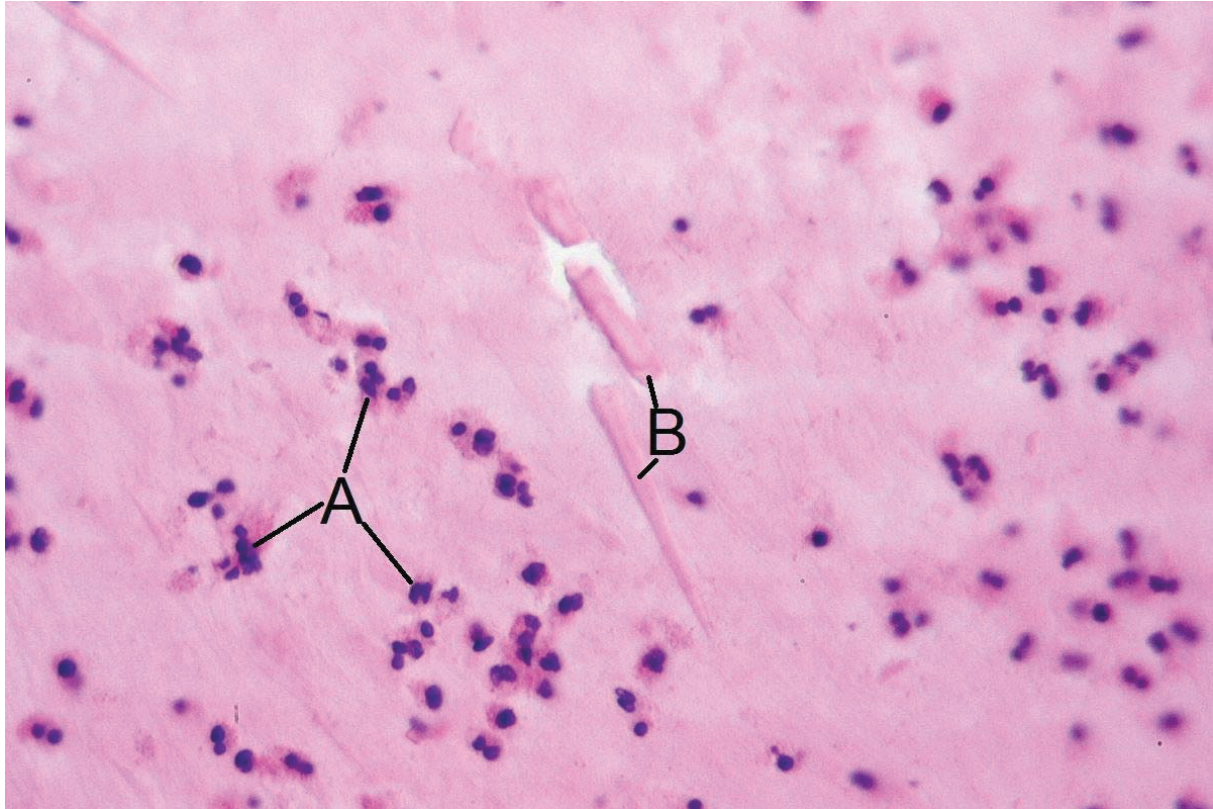


Figure 21. Mucine de rhinosinusite allergique. Coloration Hématoxyline Éosine.

A) polynucléaires éosinophiles ; B) Cristaux de Charcot-Leyden. Crédit image : CC Attribution-Share Alike d'après Patho pour Wikimedia Commons

Rhinosinusite fongique allergique

Elle survient le plus souvent chez des adultes jeunes (en moyenne entre 20 et 25 ans¹⁹¹). Certains auteurs suggèrent que ce serait une forme particulière d'ABPA, affectant les sinus plutôt que les voies aériennes basses. Ils basent leur hypothèse sur les grandes similitudes physiopathologiques entre les deux entités : une réponse Th2 avec hyperimmunité (type I et III). Comme dans l'ABPA, les marqueurs retrouvés sont l'IL4, l'IL5, l'IL10 et l'IL13. L'inflammation générée et l'accumulation de mucine entraînent une obstruction des sinus (Figure 28). La persistance des *fungi* dans la mucine, avec une invasion progressive des tissus adjacents, et la réponse inflammatoire associée entraînent une érosion osseuse¹⁹². La forte fréquence de patients souffrant à la fois d'une ABPA et d'une rhinite fongique allergique (retrouvée chez 80% des patients dans une étude incluant 75 patients¹⁹³) est un autre argument en faveur de cette hypothèse.

Rhinosinusite fongique à éosinophiles

Elle a été proposée en 1999 par Ponikau *et al*¹⁹⁴. Elle apparaît chez des patients ne présentant pas de terrain atopique ni d'hypersensibilité de type I, mais présentant une hypersensibilité de type III et l'ensemble des autres critères de rhinosinusite allergique. En particulier, une mucine riche en éosinophiles et présentant des éléments fongiques doit être retrouvée. La sinusite serait causée par l'action de la *major basic protein* (MBP, protéine basique majeure) sécrétée par les éosinophiles qui entraînerait une dégradation de l'épithélium nasal. Le mécanisme d'action pourrait donc ne pas être allergique, mais il n'est pas clairement élucidé¹⁹².

Rhinosinusite à éosinophiles productrice de mucine

Elle a été définie par Ferguson¹⁹⁵. Les patients présentent plus souvent des obstructions bilatérales et sont plus âgés que les patients atteints de formes allergiques. L'obstruction nasale y est plus rare¹⁸⁹. Cette catégorie est controversée car la non-détection de filaments dans la mucine ou par culture peut être le fait d'une réelle absence ou d'un défaut de sensibilité de la technique de détection des éléments fongiques utilisée¹⁸⁹.

Alvéolite allergique extrinsèque

Cette maladie est provoquée par l'inhalation massive et répétée de spores fongiques chez des sujets non atopiques. En règle générale, cette inhalation est due à une exposition professionnelle. La forme la plus connue en France est la maladie du poumon du fermier, mais d'autres professions sont à risque comme par exemple les ouvriers dans la fabrication du Koji, une étape de la fabrication du saké¹⁹⁶ (exposition à *A. oryzae*), les scieurs de bois (*Rhizopus* sp.) ou les fromagers (*Penicillium* sp.)¹⁹⁷.

La maladie du poumon du fermier a été décrite pour la première fois en 1958¹⁹⁸. Elle est causée par l'inhalation massive de spores fongiques lors de la manipulation des foin. Comme toutes les personnes manipulant régulièrement les foin ne sont pas affectées, des facteurs de risque génétiques et/ou environnementaux sont probablement impliqués dans la mise en place de la maladie¹⁹⁹. Deux phases sont décrites : une phase aiguë et une phase chronique²⁰⁰. La phase aiguë se caractérise par un syndrome pseudo-grippal (fièvre, frissons, fatigue, etc.) souvent associé à une toux et de la dyspnée. La phase aiguë apparaît dans les heures qui suivent l'exposition et dure quelques jours. En cas de répétition de l'exposition, la maladie évoluera ensuite vers une forme chronique, avec une atteinte respiratoire importante, entraînant une altération de l'état général. La première espèce identifiée fut *Saccharopolyspora rectivirgula*, mais de très nombreuses espèces fongiques peuvent être impliquées dans l'alvéolite allergique extrinsèque, y compris des champignons du genre *Aspergillus*, dont *A. fumigatus*²⁰¹.

Les mécanismes physiopathologiques sont de type allergique, avec une sensibilisation suite à l'inhalation massive d'antigènes fongiques. Avec la répétition de l'exposition aux antigènes, les symptômes deviennent plus intenses et sont déclenchés par des doses moindres. Les anticorps en cause sont principalement des IgG, provoquant une hypersensibilité de type III. Les complexes immuns formés par la réaction se déposent dans les alvéoles pulmonaires ce qui initie une réponse inflammatoire à son tour responsable d'une fibrose pulmonaire. Cette fibrose pulmonaire provoque à terme une dégradation irréversible de la fonction respiratoire. En plus de la réaction de type III, une hypersensibilité de type IV (cellulaire) entraîne la formation de granulomes²⁰¹.

Le traitement symptomatique repose sur l'utilisation de corticoïdes. Le traitement n'a d'effet que sur les exacerbations, mais pas sur les conséquences à long terme. Une fois le diagnostic fait, la seule solution est d'éviter l'exposition à l'allergène. Ce qui peut se faire au travers du port de masque, d'une amélioration des techniques de traitement du foin ou, idéalement, d'une reconversion professionnelle²⁰².

B. Formes colonisantes ou invasives de l'arbre respiratoire

Rhinosinusites

En plus des rhinosinusites allergiques décrites précédemment, d'autres formes peuvent se manifester chez l'immunocompétent (tableau 6). Elles correspondent à une croissance locale d'hyphes mycéliens, parfois accompagnée de destruction tissulaire. On distingue les formes suivantes :

- Formes invasives de l'immunocompétent :
 - Rhinosinusite fongique granulomateuse ;
 - Rhinosinusite fongique chronique ;
- Formes colonisantes non invasives :
 - Colonisation saprophyte ;
 - Balle fongique.

Rhinosinusite fongique granulomateuse

Il s'agit de la formation progressive d'une masse affectant les joues, le nez, les orbites ou encore les sinus paranasaux. L'évolution des symptômes s'étale sur plusieurs mois ou années. L'exophtalmie est un signe clinique fréquent chez les patients, avec une érosion osseuse à proximité des zones atteintes. L'espèce la plus souvent en cause est *Aspergillus flavus*, même si de rares cas sont décrits pour d'autres espèces, par exemple *A. alternata*²⁰³. C'est une maladie rare que l'on peut retrouver dans certaines zones subtropicales du Moyen-Orient à l'Inde¹⁸⁷. L'examen histopathologique révèle des granulomes contenant des corps étrangers et des cellules géantes de Langerhans ainsi que de la fibrose. Les mécanismes immunitaires sous-jacents sont mal connus, mais une réponse Th17 anormale semble impliquée²⁰³.

Le traitement repose sur la résection chirurgicale des tissus atteints, suivi d'un traitement long par antifongiques. Les molécules recommandées sont l'itraconazole ou le voriconazole, mais doivent être adaptées en fonction du champignon en cause et de sa sensibilité aux antifongiques²⁰⁴.

Rhinosinusite fongique invasive chronique

Cette forme est le plus souvent décrite chez des patients dans un contexte de SIDA, de diabète de type 2 ou de traitement par les corticoïdes ou tout autre contexte d'immunodépression légère, même si des cas sont parfois rapportés chez le sujet apparemment immunocompétent^{205,206}. Les sinus les plus touchés sont l'éthmoïde et le sphénoïde mais tous peuvent être atteints¹⁹². L'évolution de la maladie est lente, sur plusieurs mois (>12 semaines minimum). La maladie se traduit par une accumulation dense d'hyphes mycéliens avec une réponse inflammatoire restreinte²⁰⁷. L'invasion tissulaire peut s'étendre jusqu'aux vaisseaux sanguins, avec risque de dissémination. Chez certains patients, un syndrome de l'apex orbital (baisse de la vision et immobilité de l'œil) est observé. Il correspond à une extension de la maladie en direction de l'œil²⁰⁸.

Le traitement repose sur la chirurgie et l'utilisation d'antifongiques systémiques. Le risque d'échec de traitement et de mortalité est relativement faible mais augmente en cas d'invasion des vaisseaux ou des tissus adjacents²⁰⁷.

Colonisation saprophytique

Cette forme asymptomatique correspond à la détection d'hyphes mycéliens visibles à l'examen direct dans le mucus des sinus paranasaux de patients²⁰⁹. Il faut différencier la détection d'hyphes à l'examen direct de la détection de champignons par culture. En effet, à condition d'utiliser des méthodes de lavage et de culture assez sensibles, cette dernière est positive dans la quasi-totalité des

cas¹⁹⁴. Elle pourrait être un signe précurseur de balle fongique²⁰⁹. Le seul traitement recommandé est de laver à l'eau physiologique.

Balle fongique

Il s'agit de la présence d'un amas dense d'hyphes mycéliens dans une ou plusieurs cavités sinusales. Le plus souvent il s'agit d'un sinus maxillaire, mais tous les sinus paranasaux peuvent être touchés, et la présence simultanée de balles fongiques dans plusieurs d'entre eux peut être observée²¹⁰. L'exérèse chirurgicale de la balle fongique par endoscopie est le traitement recommandé, avec une bonne tolérance et peu de rechutes²¹¹.

Formes pulmonaires

De la même façon que pour les rhinosinusites, le spectre de maladies est très large et va de la colonisation à des formes invasives pulmonaires. Les différentes entités reconnues par l'*European Society for Clinical Microbiology and Infectious Diseases* (ESCMID, société européenne de microbiologie clinique et des maladies infectieuses) et l'*European Respiratory Society* (ERS, société européenne de pneumologie) sont les suivantes²¹² :

- Aspergillome simple ;
- Aspergillome Pulmonaire Chronique (APC) Cavitaire ;
- APC fibrosante ;
- Nodules aspergillaires ;
- Aspergillose invasive subaiguë aussi appelée aspergillose pulmonaire nécrosante.

Les formes d'APC se développent généralement sur une cavité préexistante. Les causes les plus fréquentes de cavité sont la tuberculose et la bronchopneumopathie obstructive chronique²¹², mais d'autres maladies plus rares comme la sarcoïdose peuvent également provoquer des cavités²¹³. Bien que ces formes soient définies séparément, il existe en réalité un continuum de maladies, avec des chevauchements comme montré dans la Figure 22. De plus, au décours de la maladie, un patient peut évoluer d'une forme vers une autre.

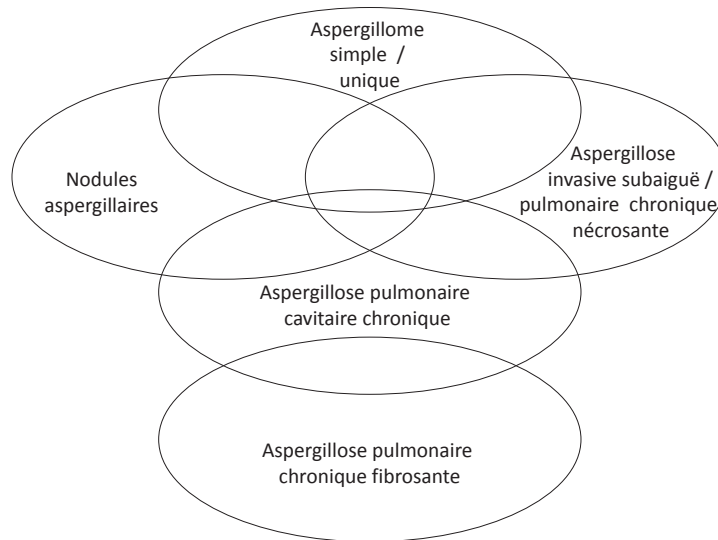


Figure 22. Continuum des maladies liées à *Aspergillus* spp. et chevauchement des définitions.

Les cercles ne sont pas proportionnels à la fréquence. D'après Denning et al.²¹²

A ces formes, il faut rajouter la colonisation pulmonaire chronique et la bronchite aspergillaire qui peuvent être retrouvées dans certaines populations particulières, comme les patients atteints de mucoviscidose.

Colonisation aspergillaire

Les spores d'*Aspergillus* étant ubiquitaires dans l'air, il semble donc normal d'en retrouver dans des prélèvements respiratoires, même en l'absence de symptômes. Néanmoins, si pour la population générale un tel isolement semble être sans gravité et ne refléter qu'un simple portage, ce n'est probablement pas le cas chez les patients atteints de mucoviscidose. En effet, chez ces derniers, *Aspergillus* est capable de coloniser l'arbre respiratoire sans pour autant provoquer de symptômes évidents, de la même façon qu'il peut coloniser le mucus des sinus. *Aspergillus* est détecté dans les prélèvements respiratoires de 24% des patients atteints de mucoviscidose en France. Cette détection est en forte hausse par rapport à 2006, avec 32% d'augmentation en dix ans⁸². Cette augmentation de l'incidence est probablement multifactorielle : amélioration des méthodes de détection et de la connaissance des biologistes d'une part, mais aussi vieillissement de la population. En effet, la colonisation à *Aspergillus* augmente avec l'âge²¹⁴.

Des études ont associé la colonisation chronique à *Aspergillus* chez les patients atteints de mucoviscidose avec une hausse des hospitalisations²¹⁵ et une moins bonne fonction respiratoire¹⁵³, même si l'on ne sait pas encore si *Aspergillus* est la cause de ces événements ou s'il s'agit d'un facteur confondant. Enfin, une colonisation à *Aspergillus* pré-transplantation chez ces patients est associée à un risque multiplié par quatre de faire une aspergillose invasive post transplantation²¹⁶.

Bronchite aspergillaire

La bronchite aspergillaire correspond à une exacerbation de la mucoviscidose chez des patients colonisés par *Aspergillus* mais ne répondant pas aux critères d'ABPA²¹⁷. Cette exacerbation est résistante aux antibiotiques mais est soignée par la prise d'antifongiques sur une durée d'au moins un mois²¹⁸.

Aspergillome simple

Il correspond à une balle fongique unique dans les poumons, se développant à l'intérieur d'une cavité préformée (Figure 23). Les symptômes doivent être absents ou minimes, avec une stabilité des images radiologiques sur au moins trois mois. La balle fongique est facilement reconnaissable à l'imagerie mais l'étiologie aspergillaire ne peut être prouvée que par biopsie, ou culture d'un prélèvement respiratoire ; une sérologie aspergillaire positive permet toutefois de la suspecter fortement.

Le traitement repose sur la résection chirurgicale de l'aspergillome²¹². Les traitements par antifongiques systémiques semblent n'avoir que très peu d'effet sur ces lésions, probablement en raison de leur très faible vascularisation²¹⁹.

Aspergillose pulmonaire chronique cavitaire

L'APC cavitaire correspond à la présence dans les poumons d'une ou plusieurs cavités affectant un ou plusieurs lobes pulmonaires. Certaines cavités peuvent contenir une ou plusieurs balles fongiques. Il peut y avoir des signes de diffusion autour de ces cavités et des signes de fibrose. La fibrose ne doit pas détruire plus d'une cavité²¹². L'évolution de la maladie doit être relativement lente, sur plusieurs mois. Contrairement à l'aspergillome simple, les patients ont souvent un tableau clinique grave avec fatigue, toux, dyspnée, hémoptysies parfois massives et potentiellement mortelles²²⁰. En l'absence de traitement, la maladie évolue progressivement vers une APC fibrosante ou une forme invasive subaiguë.

Le traitement repose principalement sur l'utilisation d'azolés tels que l'itraconazole, le voriconazole ou le posaconazole sur de très longues périodes, voire à vie. Dans certains cas, une résection chirurgicale est possible, mais elle peut être contre-indiquée en cas d'état de santé trop dégradée du patient et comporte un risque de rechute et de dissémination en cas d'introduction de matériel fongique dans la plèvre^{212,221}.

Aspergillose pulmonaire chronique fibrosante

Il s'agit d'une forme avancée d'APC dans laquelle la destruction fibrotique à partir des cavités s'est étendue à au moins deux lobes pulmonaires (Figure 24). Les patients ont une forte dégradation de la fonction pulmonaire. C'est une forme de très mauvais pronostic.

Le traitement repose sur les antifongiques (itraconazole, voriconazole, posaconazole) et permet de stabiliser le patient mais a relativement peu d'effet sur la fonction respiratoire²²².

Nodules aspergillaires

Cette forme d'APC, *a priori* rare (environ 10% des cas d'APC²²³), mais très probablement sous-diagnostiquée, correspond à la présence d'un ou plusieurs petits nodules (moins de 3 mm) dans les poumons. Elle est souvent confondue avec une autre pathologie, en particulier un carcinome pulmonaire. Le diagnostic est réalisé sur l'examen histologique d'une biopsie. Contrairement aux autres formes d'APC, les performances des tests sérologiques ne sont pas connues pour cette forme.

Le traitement recommandé par les experts repose sur la résection des nodules. S'il y a un seul nodule, elle est généralement faite au moment de la biopsie pour poser le diagnostic. Si la résection n'est pas possible, un traitement antifongique par voie orale pourrait avoir de l'efficacité. Toutefois, ces recommandations ne se basent que sur des avis d'experts, et non sur des données publiées.

Aspergillose invasive subaiguë

Cette forme peut aussi être retrouvée sous le nom d'APC nécrosante, mais le nom d'aspergillose invasive subaiguë est maintenant recommandé en raison de la proximité de cette forme de la maladie avec l'aspergillose invasive « classique »²¹². On retrouve le même tableau que pour une APC, à savoir atteinte pulmonaire (hémoptysies, toux, dyspnée), altération de l'état général et fièvre mais l'évolution est plus rapide : en général, les symptômes s'étalent sur une période de un à trois mois²²⁴. La maladie s'observe le plus souvent sur des patients fragiles (personnes âgées, dénutries, alcooliques, bronchopneumopathie chronique obstructive, radiothérapie, infection à mycobactéries), ou avec une immunodépression légère (corticoïdes, diabète de type 2, VIH)^{17,212,225-227}. Contrairement aux autres formes d'APC, de l'antigène aspergillaire ou de l'*Aspergillus* peut être détecté dans la circulation sanguine et une biopsie révélera des hyphes mycéliens envahissant le parenchyme pulmonaire. Le pronostic de la maladie est le même que celui d'une aspergillose aiguë : mortelle quasi-systématiquement sans traitement et un fort taux de mortalité sous traitement, de l'ordre de 50%²²⁸.

Le traitement doit être le même que pour l'aspergillose invasive²¹², c'est-à-dire un recours aux antifongiques systémiques (en général par perfusion, avec relai per os) à adapter en fonction de l'antifongogramme, en tenant compte des grands risques d'interaction avec les traitements déjà pris par le patient pour traiter la pathologie sous-jacente²²⁹.

C. Autres formes localisées

Endocardite à Aspergillus

L'endocardite à *Aspergillus* est l'une des deux formes d'endocardite infectieuse fongique les plus souvent retrouvées, avec les endocardites dues à *Candida* sp., même si elle reste une forme rare d'endocardite infectieuse par rapport aux endocardites bactériennes^{230,231}. Elle se produit le plus souvent chez des patients déjà opérés du cœur ou consommateurs de drogues intraveineuses. Le diagnostic est complexe car la culture est presque toujours négative^{231,232}. De ce fait, de nombreux cas ont un diagnostic retardé, ce qui participe à la très forte mortalité de cette forme (40% à 60%)^{231,233}. Une part non négligeable est même diagnostiquée à l'autopsie²³³.

Le traitement repose sur la chirurgie cardiaque, ainsi que sur les antifongiques. L'amphotéricine B et le voriconazole sont recommandés en première ligne, suivis d'un traitement à vie par l'itraconazole^{230,231,234}.

1.5.2.2. Chez l'immunodéprimé

Aspergillus est capable de provoquer des infections systémiques gravissimes chez les patients fortement immunodéprimés. On parle d'aspergilloses invasives. Même si *Aspergillus fumigatus* est l'espèce la plus souvent rencontrée, le nombre d'espèces retrouvées dans ce contexte est plus important que dans les APC^{141,143}.

Il est très difficile de définir ces aspergilloses invasives. Il existe une définition de consensus proposée par l'*European Organization for Research and Treatment of Cancer/Invasive Fungal Infections Cooperative Group* et le *National Institute of Allergy and Infectious Diseases Mycoses Study Group* (EORTC/MSG, groupe coopératif sur les infections fongiques invasives de l'organisation européenne pour la recherche et le traitement du cancer ; groupe d'étude des mycoses de l'institut national américain des maladies infectieuses et de l'allergie) qui s'appuie sur de nombreux critères pour définir des infections fongiques profondes prouvées, probables et possibles. Pour les *Aspergillus*, ces critères sont décrits ci-dessous¹⁵¹.

Aspergillose invasive prouvée

La définition d'infection fongique profonde prouvée repose sur la détection d'une espèce fongique dans un site normalement stérile et présentant des anomalies clinico-radiologiques en faveur d'une infection. Il peut s'agir d'une détection par microscopie ou par culture.

La détection par microscopie permet de visualiser des hyphes mycéliens ou des levures dans des cellules ou des tissus obtenus par aspiration à la seringue. Pour détecter les éléments fongiques, il est recommandé d'utiliser des colorants spécifiques, tels que la coloration argentique de Gomorri-Grocott ou l'acide périodique de Schiff. Dans l'idéal, des morceaux humides de la ponction devraient être colorés par fluorescence en utilisant des fluorochromes relativement spécifiques des éléments fongiques comme le calcofluor blanc ou le blankophor. Toutefois ces colorations permettent de mettre en évidence des éléments fongiques, principalement des hyphes, mais ne permettent pas d'avoir un diagnostic d'espèce ou de genre.

La détection par culture permet d'identifier l'espèce en cause mais son interprétation doit se faire en tenant compte du risque de contamination du prélèvement. En particulier, une hémoculture positive à *Aspergillus* doit être de prime abord considérée comme une contamination de l'échantillon lors du prélèvement, et non comme une preuve d'infection.

Aspergillose invasive probable

Cette définition s'appuie sur la concomitance d'un facteur d'hôte, d'une clinique compatible et d'un résultat d'analyse en faveur d'une infection fongique.

Les critères d'hôte retenus dans les définitions sont : les patients ayant une neutropénie sévère prolongée (moins de 500 PNN par mm³ durant au moins dix jours), les patients ayant reçu une allogreffe de moelle ou ayant pris au moins 0.3mg/kg/jour d'équivalent prednisone pendant au moins trois semaines (à l'exclusion des patients atteints d'ABPA) ou encore les patients ayant un traitement immunosuppresseur dirigé contre les lymphocytes T (ciclosporine, anti TNF- α par exemple) ou enfin les patients souffrant d'une immunodéficience sévère héréditaire comme la granulomatose chronique. Depuis la mise en place de la définition en 2008, d'autres critères d'hôte sont apparus comme des causes d'aspergilloses invasives. On peut citer en particulier les gripes sévères nécessitant une hospitalisation²³⁵.

Les critères cliniques compatibles avec la définition d'aspergillose invasive probable dépendent de la porte d'entrée. Dans tous les cas, il faut commencer par exclure les autres causes d'infection, en particulier d'infection bactérienne.

Ainsi les signes d'infection pulmonaire seront : une image au scanner de lésions denses avec éventuellement un signe du halo (Figure 25) ou la détection de cavité ou encore de signe du croissant gazeux (Figure 27). En cas de porte d'entrée pulmonaire, on parle d'aspergillose pulmonaire invasive.

Des plaques d'ulcération, des nodules, des pseudomembranes ou des escarres trachéobronchiques peuvent évoquer une trachéobronchite aspergillaire ; un ulcère nasal, associé à des zones ulcérées noires localisées au niveau des sinus paranasaux ou de l'œil et des signes d'érosion osseuse seront en faveur d'une porte d'entrée sinusienne (rhinosinusite invasive aiguë¹⁹²).

Des signes cutanés peuvent aussi être observés, marqueurs d'une aspergillose cutanée invasive primaire ou secondaire²³⁶. Des lésions nécrotiques cutanées²³⁷ correspondent en général à la prolifération aspergillaire au niveau d'une blessure ou brûlure (aspergillose cutanée primaire). Des lésions papulaires érythémateuses, uniques ou multiples, résultent plutôt d'une dissémination d'hyphes par voie sanguine (aspergillose cutanée secondaire).

Les critères biologiques retenus sont : soit une détection d'*Aspergillus* après culture d'un liquide de lavage broncho-alvéolaire ou d'aspiration sinusale, soit la détection d'hyphes mycéliens sur les mêmes échantillons à l'examen direct (comme pour l'histologie, cette analyse ne permet pas de poser le diagnostic d'aspergillose mais d'infection fongique), soit une détection de biomarqueur fongique compatible - antigène galactomannane ou β -D-glucane, ce dernier étant un marqueur panfongique (présent chez tous les champignons sauf *Cryptococcus spp.* et les zygomycètes²³⁸). Depuis la publication des recommandations, deux nouvelles techniques sont apparues : une technique de détection immunochromatographique et une PCR (*Polymerase chain reaction* - réaction en chaîne par polymérase). Si les évaluations sont limitées pour la détection rapide, les résultats des évaluations de la PCR et l'augmentation de la standardisation des kits font que cette technique pourrait être validée dans un futur proche²³⁹.

Aspergillose pulmonaire possible

Une aspergillose pulmonaire possible est définie par la présence des mêmes facteurs d'hôte que pour une aspergillose probable, avec les mêmes signes cliniques compatibles mais sans aucun indice mycologique. Cette définition a été mise en place pour pallier aux limites de sensibilité des techniques de diagnostic actuelles qui ne permettent pas d'établir un diagnostic d'exclusion certain.

1.5.3. Outils diagnostiques des maladies liées à *Aspergillus*

1.5.3.1. Radiologie et imagerie médicale

L'imagerie médicale est un élément important du diagnostic des aspergilloses : toutes les formes d'aspergillose pulmonaire peuvent être détectées à l'imagerie, mais les anomalies observées sont souvent peu spécifiques, retrouvées dans d'autres maladies ou difficilement différenciables de la pathologie sous-jacente. Par exemple, la bronchiectasie de l'ABPA est un signe clinique fréquent de la mucoviscidose, indépendamment de l'aspergillose. Dans cette section, nous présentons quelques images caractéristiques des aspergilloses pulmonaires chroniques et invasives (figures 24-28). Les formes compatibles avec une aspergillose sinusienne (Figure 28) sont elles aussi peu spécifiques, et parfois évocatrices d'invasion cancéreuse.

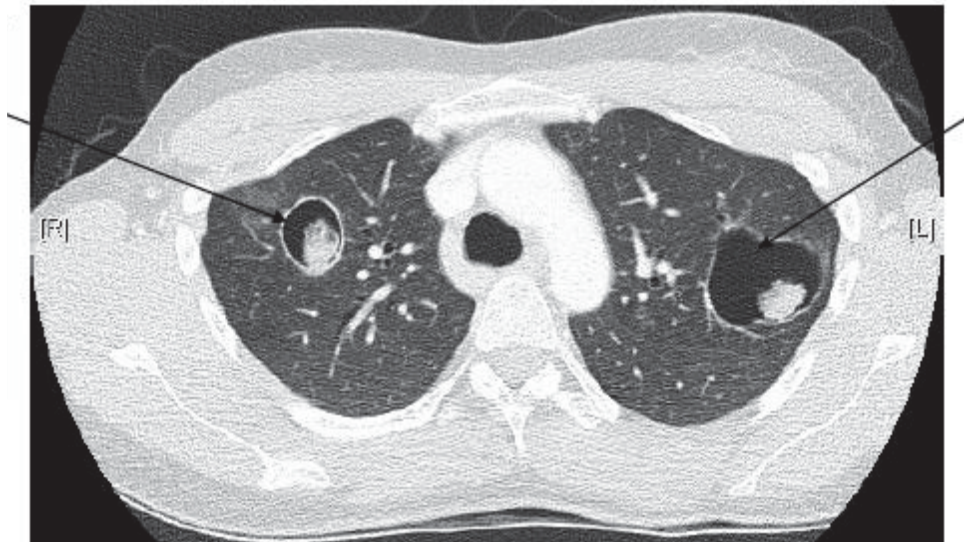


Figure 23. Aspergillomes.

Scanner thoracique montrant deux aspergillomes pulmonaires (flèches). On parle aussi d'image en grelot. Comme il y a plus d'un aspergillome, ce patient est classé en aspergillose pulmonaire chronique cavitaire, même en l'absence de signes d'extension en dehors des balles fongiques. Crédit photo : aspergillus.org.uk



Figure 24. Fibrose pulmonaire d'un patient atteint d'une APC.

Crédit photo : D. Denning

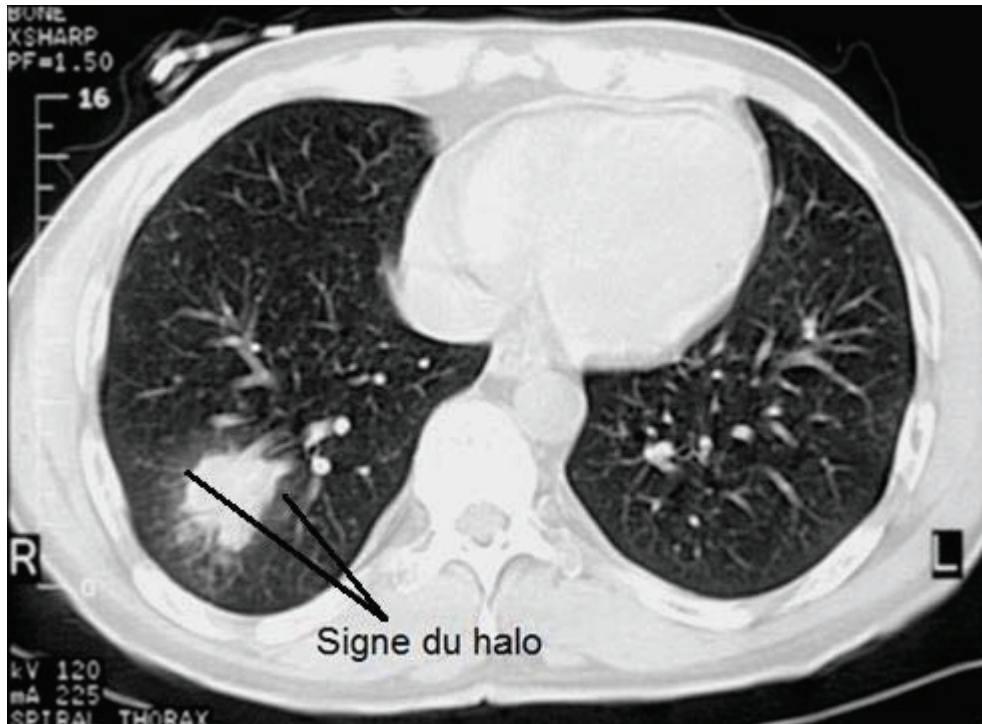


Figure 25. *Signe du halo.*

Halo autour d'un nodule aspergillaire chez un patient immunodéprimé souffrant d'aspergillose invasive. Scanner pulmonaire. Crédit photo : D. Denning

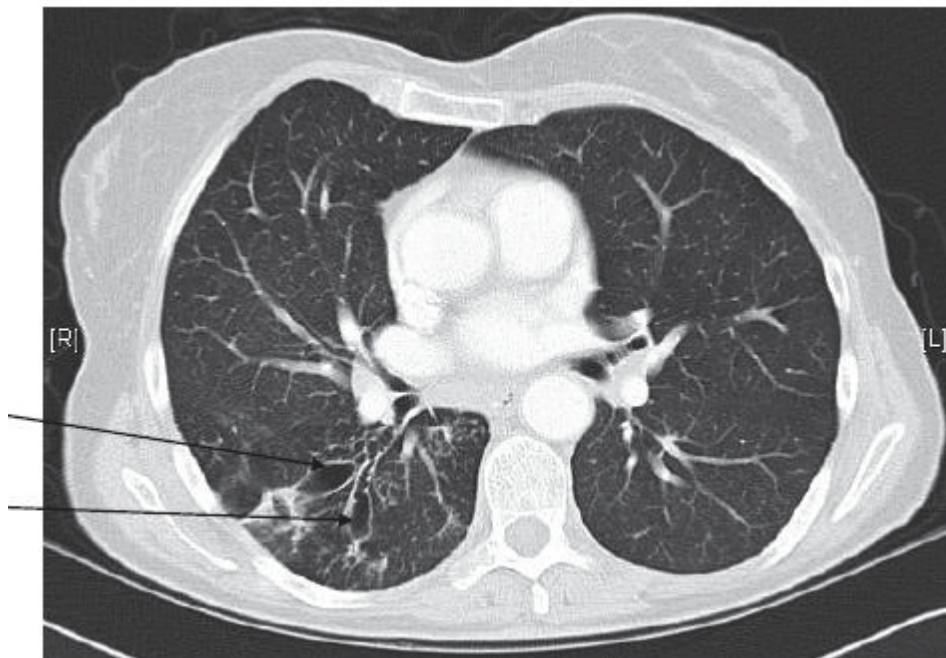


Figure 26. *Bronchiectasies (flèches) chez un patient atteint d'ABPA.*

Scanner pulmonaire. La bronchiectasie est un signe non spécifique qui peut être dû à une autre infection ou même à la mucoviscidose du patient. Elle est le témoin de l'inflammation chronique subie localement en raison d'une infection ou d'une allergie. Crédit photo : aspergillus.org.uk

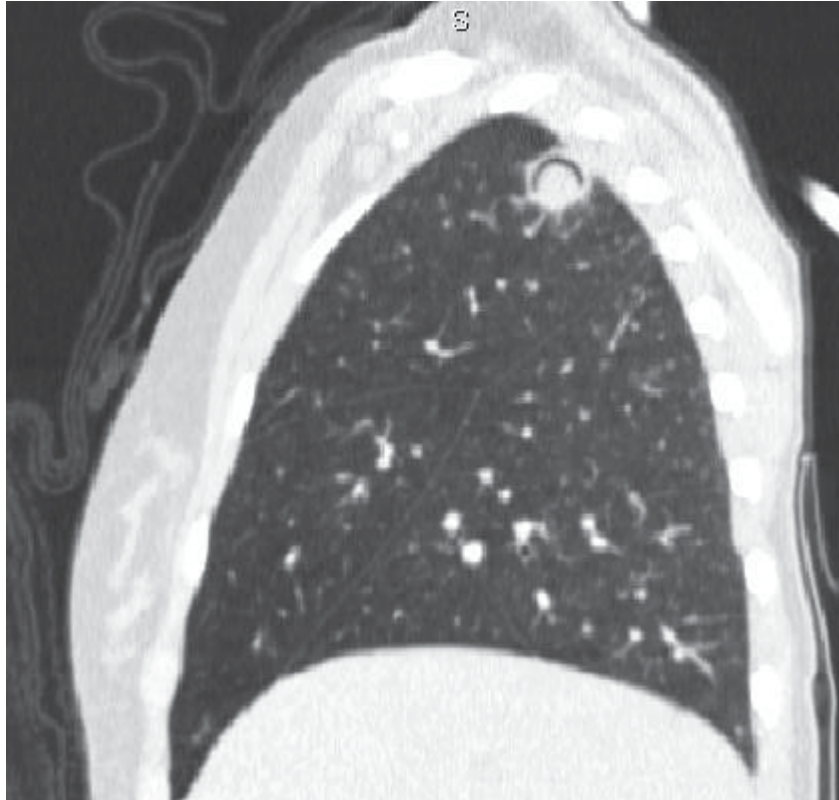
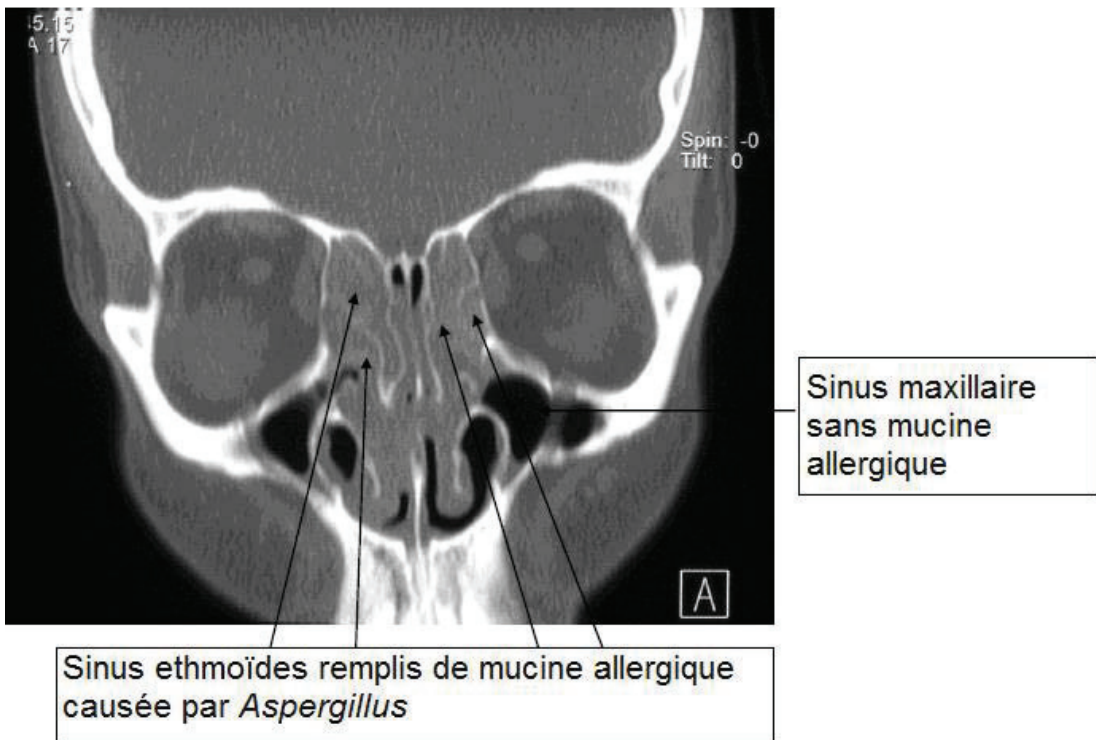


Figure 27. Signe du croissant gazeux dans le lobe pulmonaire droit supérieur chez un patient souffrant d'une infection fongique invasive.

Scanner thoracique. CC by L. Dawes pour Wikimedia commons



Sinus maxillaire sans mucine allergique

Sinus ethmoïdes remplis de mucine allergique causée par *Aspergillus*

Figure 28. Scanner d'une sinusite aspergillaire allergique des sinus ethmoïdes.

Crédit photo : aspergillus.org.uk

1.5.3.2. Recherche d'anticorps

La recherche d'anticorps est un marqueur indirect d'infection. Comme la réponse immunitaire est longue à se mettre en place, environ deux à trois semaines, la recherche d'anticorps spécifiques est surtout utile pour le diagnostic des formes chroniques de la maladie²⁴⁰. Les premières techniques sérologiques pour la recherche d'anticorps anti-*Aspergillus* ont été mises au point dans les années 50^{241,242}. Depuis, de nombreuses autres techniques ont été développées, basées sur diverses technologies. Les techniques et leurs performances sont détaillées ci-après. Si les techniques historiques recherchaient les anticorps quel que soit leur isotype, les plus récentes sont spécifiques des IgG ou IgE en fonction du type de réponse immunitaire recherchée : infection ou mécanisme allergique. Des techniques existent concernant la recherche d'autres isotypes, comme les IgM mais leurs performances sont limitées²⁴³ et de ce fait leur utilisation n'est pas recommandée²¹². En raison du caractère ubiquitaire d'*Aspergillus* spp., toutes les personnes y sont exposées et peuvent potentiellement produire des anticorps. En fonction de la technique et de l'antigène utilisé, il peut être difficile d'établir un seuil de positivité et ce seuil peut varier d'un endroit à un autre²⁴⁴. Les différentes techniques sérologiques sont détaillées dans les paragraphes suivants et leurs performances comparées dans l'annexe 2. Les performances des tests sont difficilement comparables d'une étude à l'autre en raison du choix très hétérogènes des patients et contrôles retenus pour chaque étude.

Méthode de diffusion en gel

La méthode de détection de complexes anticorps-antigène a été mise au point par Ouchterlouny à la fin des années 40²⁴⁵, et fut la première méthode utilisée pour la recherche des anticorps anti-*Aspergillus*²⁴¹. Cette technique consiste à déposer, dans un gel d'agarose, en deux puits distincts, antigène aspergillaire, d'une part, et sérum de patient, d'autre part. Les protéines du sérum, dont les anticorps, ainsi que celles présentes dans l'antigène diffusent alors dans le gel, et il se forme des complexes immuns précipitant au point de rencontre entre antigène et anticorps (Figure 29). Il y a alors formation d'arcs de précipitation, qui peuvent être visibles à l'œil nu. Ces arcs de précipitation peuvent être dus à n'importe quel type d'anticorps, mais les IgG sont le plus souvent en cause²⁴⁶.

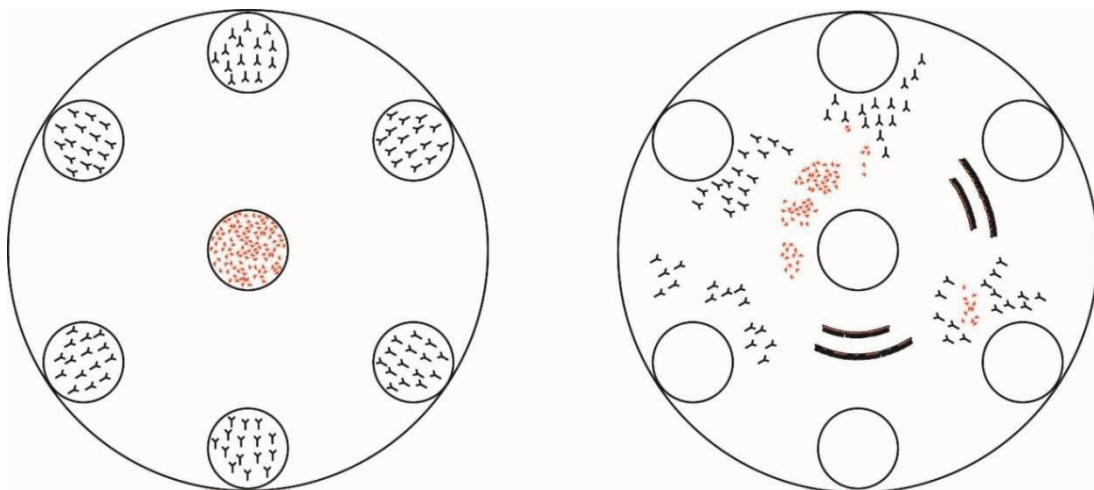


Figure 29. Technique d'Ouchterlouny.

Les anticorps (représentés en noir) des sérums de patients sont déposés dans les six puits périphériques. L'antigène (représenté en rouge) est déposé au centre. Antigène et anticorps diffusent alors dans la gélose, et forment des arcs de précipitation en cas de réaction positive.

Cette méthode est très lente : elle peut prendre jusqu'à cinq jours. De plus, elle est sujette à de nombreux facteurs de variabilité, comme par exemple la source de l'antigène utilisé, et possède de ce fait une très forte hétérogénéité inter-manipulation, inter-lot et inter-laboratoire¹⁵². En fonction des antigènes utilisés et des laboratoires, un ou plusieurs arcs détectés sont nécessaires pour définir la positivité.

Méthodes d'électrophorèse sur gel

Ces techniques ont été mises au point à partir des années 60 comme une amélioration de la méthode de diffusion en gel²⁴⁷. Elles consistent en un dépôt d'antigène dans un milieu gélosé qui sera ensuite soumis à un champ électrique. Le dépôt se fait vers la cathode. L'utilisation d'un pH basique permet d'avoir les protéines chargées positivement ; l'application d'un courant électrique entraîne donc une migration des protéines vers l'anode. Une fois la séparation électrophorétique faite, on dépose le sérum en « gouttière » (Figure 30) le long de l'antigène. On laisse ensuite anticorps et antigènes diffuser et on peut voir les arcs de précipitation à l'œil nu ou à l'aide de méthodes de coloration des protéines (Amidoschwarz, bleu de Coomassie ou cristal violet²⁴⁸). Une recherche d'activité enzymatique peut également être faite pour mettre en avant des arcs caractéristiques tels que l'arc catalase ou l'arc chymotrypsine^{249,250}.

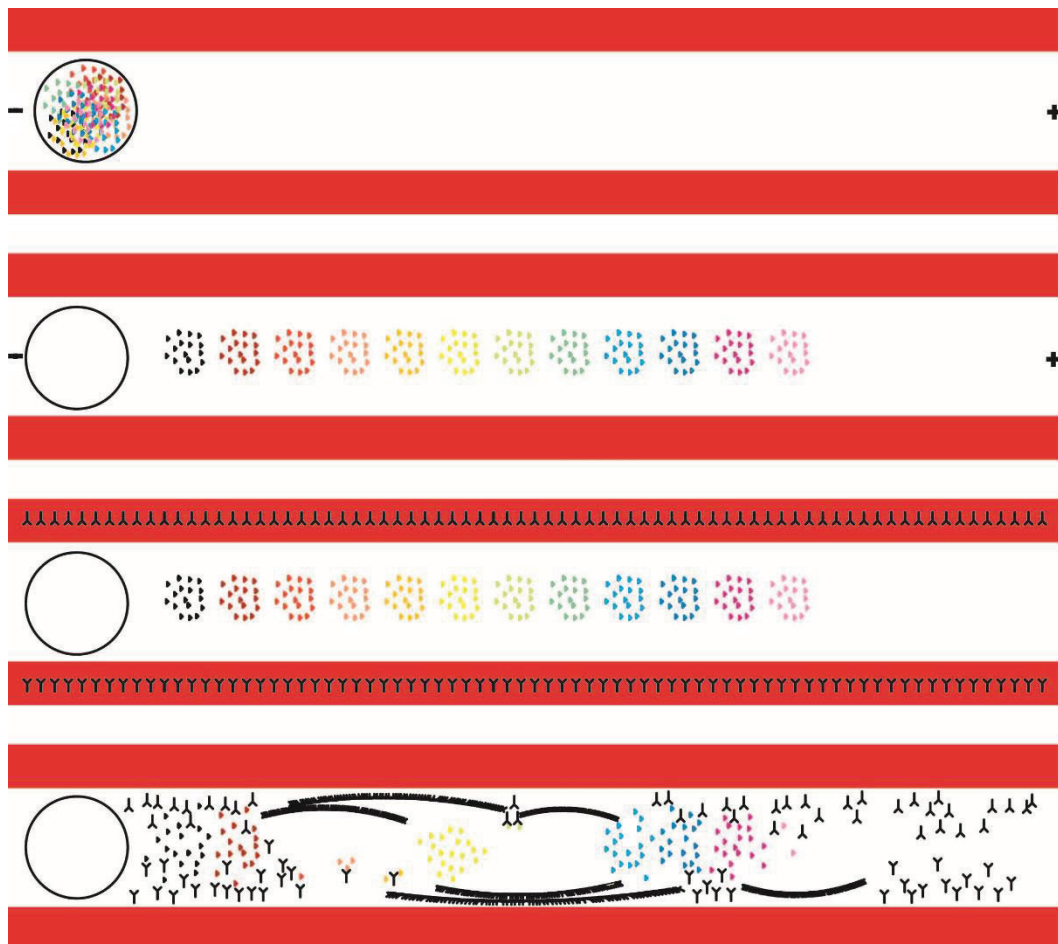


Figure 30. Immunoélectrophorèse.

Les antigènes (triangles colorés) sont déposés dans des puits, puis soumis à une migration électrophorétique. Le sérum de deux patients est alors ajouté de chaque côté, dans les gouttières. Les anticorps (Y noir) du patient et les antigènes diffusent alors dans la gélose, et des arcs de précipitation se forment en cas de réponse positive.

On parle d'immunoélectrophorèse (IEP). Cette technique est plus rapide et plus sensible que la précédente²⁴². Cette technique est aujourd'hui remise en cause en raison de sa faible sensibilité par rapport aux techniques plus récentes^{10,18}, mais reste pour l'instant considérée comme une technique de confirmation en France, en raison de sa bonne spécificité²⁵¹.

Hémagglutination indirecte

La technique d'hémagglutination indirecte (HAI) consiste à enrober des érythrocytes (de mouton par exemple) avec un antigène. La présence d'anticorps dirigé contre l'antigène entraîne la formation de complexes qui précipitent et deviennent visibles à l'œil nu. Le choix d'érythrocytes non humains permet d'éviter les réactions non spécifiques des anticorps sériques avec les antigènes de surface des érythrocytes (antigènes rhésus). Elle présente l'avantage d'être rapide (moins de deux heures) et de ne demander quasiment aucun matériel, ce qui permet d'envisager son utilisation dans un grand nombre de laboratoires. En revanche, l'HAI demande de l'entraînement pour la lecture et peut être difficile d'interprétation. L'HAI a été mise au point vers la fin des années 40²⁵² et adaptée à la recherche d'anticorps aspergillaires dans les années 70^{253,254}. Il est assez aisé de produire soi-même des kits d'hémagglutination, mais il existe également des kits commercialisés (ELITech Diagnostics, France et Biosynex, France).

Agglutination latex

L'agglutination latex repose sur le même principe que l'hémagglutination sauf qu'au lieu de fixer l'antigène à des globules rouges, on utilise des particules de latex colorées, le latex étant plus stable que les globules rouges. Comme pour l'HAI, c'est l'apparition d'une précipitation visible à l'œil nu qui permet de déterminer la positivité.

Immunofluorescence indirecte

La technique d'immunofluorescence indirecte (IFI) consiste à mettre en contact un antigène (dans le cadre d'*Aspergillus*, des broyats de culture d'*A. fumigatus*²⁵⁵ ou de reins de lapins infectés²⁵⁶) avec le sérum du patient puis de révéler la fixation de ces derniers sur l'antigène grâce à des anticorps secondaires dirigés contre les immunoglobulines humaines (en général les IgG)^{255,257}. Si les premières études d'évaluation de l'immunofluorescence font état d'excellentes performances²⁵⁵, des études ultérieures, dès 1982, remettent en question sa spécificité, comme par exemple Schönheyder *et al.* qui trouvent 22% de positifs dans une population de donneurs de sang²⁵⁸.

ELISA

L'ELISA (*enzyme linked immunosorbent assay*, dosage d'immunoabsorption par enzyme liée) est une technique de détection immunoenzymatique basée sur la réaction antigène-anticorps et sur l'activité d'une enzyme, qui, en présence d'un substrat provoque une réaction colorée ou fluorimétrique.

Il existe plusieurs types d'ELISA, en fonction de ce que l'on recherche (Figure 31) :

- ELISA direct : l'analyte d'intérêt est fixé sur une plaque puis révélé par un anticorps spécifique couplé à l'enzyme utilisée dans la réaction.
- ELISA indirect : un antigène est fixé sur la plaque, et permet aux anticorps présents dans l'analyte d'intérêt de s'y fixer. Après lavage, un anticorps marqué, spécifique des anticorps recherchés est ajouté et permet la détection de ces anticorps spécifiques de l'antigène. C'est cette technique qui est le plus souvent utilisée en sérologie aspergillaire.

- ELISA sandwich : cette technique repose sur le même principe que l'ELISA indirect, mais pour la recherche d'antigène. Des anticorps spécifiques de l'antigène sont fixés sur la plaque. L'analyte est mis à incuber avec ces anticorps, permettant la liaison antigène-anticorps. Après lavage, des anticorps spécifiques de l'antigène, couplés à une enzyme, sont ajoutés dans la solution et permettent de révéler l'antigène.
- ELISA par compétition : ici, le couple antigène-anticorps marqué est déjà formé et l'analyte d'intérêt va permettre d'entraîner la dissociation partielle de ce couple, donc une diminution du signal. C'est cette diminution du signal qui est mesurée.
-

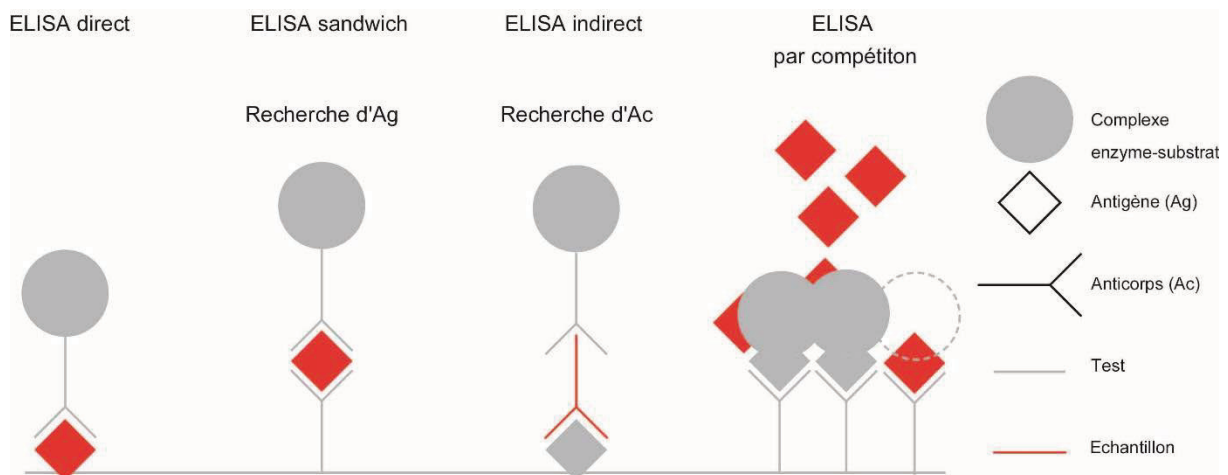


Figure 31. Les différentes formes d'ELISA.

L'ELISA direct ne peut pas être utilisé pour la recherche d'un analyte dans le sérum. Le complexe enzyme-substrat peut être remplacé par un fluorochrome ou une particule magnétique ou radiologique dans les techniques de chimiluminescence, d'immuno-analyse magnétique ou de radio-immunologie, respectivement.

Sur le même principe que l'ELISA, on peut avoir recours à des fluorochromes (chimiluminescence), des particules magnétiques ou radioactives (radio-immunologie). Par exemple, la technique de radio-allergo-sorbent test, mise au point dans les années 70, a longtemps été la technique de référence pour la recherche des IgE, avant d'être remplacée par la chimiluminescence.

L'ELISA de recherche d'anticorps anti-*Aspergillus*, contrairement aux autres techniques détaillées dans les paragraphes précédents, est compatible avec l'utilisation d'automates, ce qui en fait la technique de choix pour les laboratoires d'analyse.

Les premiers essais d'ELISA en recherche d'anticorps dans les aspergilloses remontent à la fin des années 70²⁵⁹. Depuis, la technique s'est popularisée et de très nombreux kits existent sur le marché. En raison du choix de l'antigène utilisé (Tableau 7), ces kits présentent des performances très différentes les uns des autres. Plusieurs études ont évalué ces performances et sont reprises dans l'annexe 2. De très nombreux fabricants disposent également de tests pour lesquels aucune évaluation n'est disponible.

Tableau 7. Principaux tests ELISA (ou apparentés) de détection des anticorps anti-*Aspergillus*.

Ne sont présentés que les tests pour lesquels une évaluation des performances est disponible et présentée en Annexe 2.

Nom du test ELISA <i>Aspergillus</i> / Fabricant	Type d'antigène utilisé
ELISA classic <i>Aspergillus fumigatus</i> / Serion	Extrait de culture
ImmunoCap® / Thermofisher	Extrait de culture
Immulite® / Siemens	Extrait de culture
Platelia® <i>Aspergillus</i> / Bio-Rad	Mélange de cinq antigènes recombinants
<i>Aspergillus fumigatus</i> ELISA / Bordier	Mélange d'extrait de culture et d'antigènes recombinants (chymotrypsine, mitogiline)
<i>Aspergillus fumigatus</i> / Dynamiker	Galactomannane
<i>Aspergillus</i> / Genesis	Extrait de culture

Si la plupart des ELISA sont prévus pour la recherche des IgG, certains sont également utilisables pour la recherche des IgE dans la sensibilisation aspergillaire (ImmunoCap®, Immulite®) ou des IgM (Dynamiker).

Western blot

La technique du western blot est décrite en détail dans le paragraphe 1.661.

Son application à la recherche des anticorps *Aspergillus* date de la fin des années 80 – début des années 90^{12,260,261} mais la technique était restée au stade de technique expérimentale « maison » et n'avait alors qu'un usage très limité. Depuis 2012, il existe une version commercialisée du kit pour la recherche des IgG, développée par LDBIO Diagnostics, qui a été évaluée en 2015¹⁰. Depuis, cette technique s'est progressivement implantée comme une technique de confirmation des sérologies aspergillaires en France^{251,262}.

1.5.3.3. Recherche d'une hypersensibilité par prick-test

Ce test permet la recherche d'une hypersensibilité impliquant les IgE. Il consiste à injecter dans la peau d'un patient de très faibles quantités d'allergènes. En cas d'hypersensibilité de type I (impliquant les IgE), le patient présentera des zones inflammatoires au niveau de la zone de dépôt des antigènes.

Plusieurs antigènes sont en général déposés simultanément de façon à explorer toutes les sensibilisations présumées du patient. En fonction du nombre d'antigènes à tester, cela peut se faire sur la face antérieure du bras ou le dos. Un résultat positif témoigne d'une sensibilisation à l'allergène, mais cette sensibilisation n'est pas forcément corrélée à la clinique. Pour *Aspergillus*, les antigènes utilisés sont le plus souvent des extraits de culture. Certains médicaments peuvent fausser le résultat du test. En particulier, la prise d'antagonistes H1 (antihistaminiques) peut créer des faux négatifs jusqu'à une semaine après la dernière prise. Ce test impliquant la mise en contact d'un allergène avec le patient, il doit être mené en milieu médicalisé afin de pouvoir intervenir rapidement en cas de choc anaphylactique. De ce fait, il ne s'agit pas d'un test en laboratoire, et il ne met pas formellement en évidence la présence d'IgE mais bien l'apparition d'une réaction d'hypersensibilité. Il n'est pratiquement plus utilisé en France pour le diagnostic de l'aspergillose.

1.5.3.4. Recherche d'antigènes

La recherche d'antigène aspergillaire fait partie intégrante des recommandations diagnostiques des aspergilloses invasives¹⁵¹ mais pas des APC²¹². Actuellement, deux méthodes sont reconnues : la détection d'antigène galactomannane²⁶³ et la recherche d'un marqueur panfongique le β -D-glucane²³⁸. Une autre technique a récemment été mise au point et fait actuellement l'objet d'évaluations : un test rapide de recherche d'antigène aspergillaire, visant une autre cible que le galactomannane.

Le diagnostic précoce d'une infection aspergillaire permet d'améliorer le pronostic pour les patients et d'éviter un traitement empirique²⁶³⁻²⁶⁷. Cette approche est également jugée plus rentable qu'un traitement empirique, en particulier en raison du coût élevé des traitements²⁶⁸.

Galactomannane

Le galactomannane est un composant localisé à la surface de la paroi des champignons. Les tests de recherche de galactomannane spécifiques des champignons des genres *Aspergillus* et *Penicillium* utilisent une IgM de rat monoclonal (EB-A2). Il existe deux tests : un test d'agglutination latex (Pastorex®) et un test ELISA sandwich homogène (Platelia®). Ce test ELISA est de très loin le plus utilisé des deux dans le monde, et celui sur lequel le plus d'évaluations ont été réalisées. Il s'agit à l'heure actuelle de la seule technique de recherche d'antigène reconnue dans les recommandations des sociétés savantes, faute d'un niveau de preuve suffisant concernant les autres techniques au moment de leur rédaction^{151,269}.

Une méta-analyse des performances du test ELISA publiée par la bibliothèque Cochrane a montré une sensibilité de 78% et une spécificité de 85%²⁷⁰ pour la détection des galactomannanes dans le sérum. La détection des galactomannanes sur un LBA présente un intérêt diagnostique malgré des problèmes de spécificité²⁷¹⁻²⁷⁴. Malgré tout, de très nombreux facteurs peuvent entraîner un faux résultat. Ainsi, la sensibilité du test diminue chez les patients non aplasiques²⁷⁵⁻²⁷⁹. A l'inverse, de très nombreuses situations peuvent entraîner des faux positifs, telles que la nutrition parentérale, la prise de β -lactamines hémi-synthétiques ou dans certains contextes de maladie auto-immune^{275-277,280}. Enfin, la spécificité du galactomannane pour *Aspergillus* n'est pas parfaite, et il possède des réactions croisées avec certains autres genres comme par exemple *Fusarium*⁴ ou *Histoplasma*²⁸¹. Enfin, notons que les performances du test chez les enfants sont très variables d'une étude à l'autre, ce qui en complique l'interprétation dans cette population²⁸²⁻²⁸⁴.

Test rapide de détection d'antigène aspergillaire

Un test immunochromatographique a été mis au point par Thornton en 2008²⁸⁵. Il utilise un anticorps monoclonal différent de celui utilisé dans le test du galactomannane, l'anticorps JF5, qui vise une glycoprotéine excrétée durant la phase de croissance des hyphes aspergillaires. Ce test possède un aspect prometteur car il permettrait de tester l'antigénémie aspergillaire directement au lit du malade, ou tout au moins dans l'unité de soins, ce qui pourrait permettre de raccourcir le délai de prise en charge du patient. Néanmoins, il nécessite un prétraitement du sérum avant utilisation ; les résultats discordants des premières évaluations²⁸⁶⁻²⁹⁶ ont entraînés sa récente modification.

Ce test est actuellement commercialisé par OLM Diagnostics et fait l'objet de nouvelles évaluations. Au vu des premiers résultats, il pourrait avoir des performances comparables au galactomannane et pourrait être indiqué dans l'analyse des liquides de lavage broncho-alvéolaire²⁹⁷. Les premières études menées sur ce test ont été regroupées dans une méta-analyse en 2015, avec une sensibilité et une spécificité de 68 et 87%, respectivement²⁹⁴, pour le diagnostic d'aspergillose invasive.

Ce test, dont la mise sur le marché date de 2013, ne semble pas pour l'instant en mesure de supplanter le test basé sur la détection de l'antigène galactomannane^{285,286,289-292,297,298}.

B-D-glucane

Le (1,3)- β -D-glucane (Figure 32) est un constituant majeur de la paroi des champignons ascomycètes, sa détection dans le plasma est donc associée à une maladie fongique invasive. La détection de (1,3)- β -D-glucane se fait par le facteur G (une enzyme du limule). En cela, le test diffère fortement des autres tests présentés ici, qui s'appuient sur la réaction immunitaire au travers de complexes antigènes-anticorps. Le test, commercialisé sous le nom de Fungitell® (Associates of Cape Cod) permet une limite de détection de l'ordre du pg/ml²⁹⁹. Un résultat est considéré positif à partir de 80 pg/ml. Depuis la mise sur le marché de ce test, d'autres techniques ont été mises au point : un autre test colorimétrique Fungitec G-Test MK® (Seikagaku), un test turbidimétrique β -Glucan Test Wako® (Wako Pure Chemical Industries) et un test chromogénique B-G Star® (Mahura). Les seuils de positivité de ces différentes techniques sont différents les uns des autres mais leurs performances sont considérées comme équivalentes³⁰⁰. Tous s'appuient sur des réactions enzymatiques, mais pas forcément sur le facteur G.

Le (1,3)- β -D-glucane n'étant que très peu présent chez les zygomycètes, en particulier les mucorales, et les basidiomycètes, en particulier *Cryptococcus* et *Trichosporon* spp., les tests le recherchant ne détectent donc pas les infections par ces champignons³⁰¹. De faux positifs ont été décrits à cause de la détection de (1,3)- β -D-glucan d'origine végétale issu de compresses utilisées lors d'interventions chirurgicales lourdes ou de certains filtres d'hémodialyse ; des réactions faussement positives associées à des traitement par des β -lactamines ont aussi été rapportées³⁰². Pour le diagnostic de l'aspergillose invasive, le (1,3)- β -D-glucane est plus sensible que la recherche du galactomannane, mais son absence de spécificité au sein des *fungi* en limite l'intérêt diagnostique³⁰³.

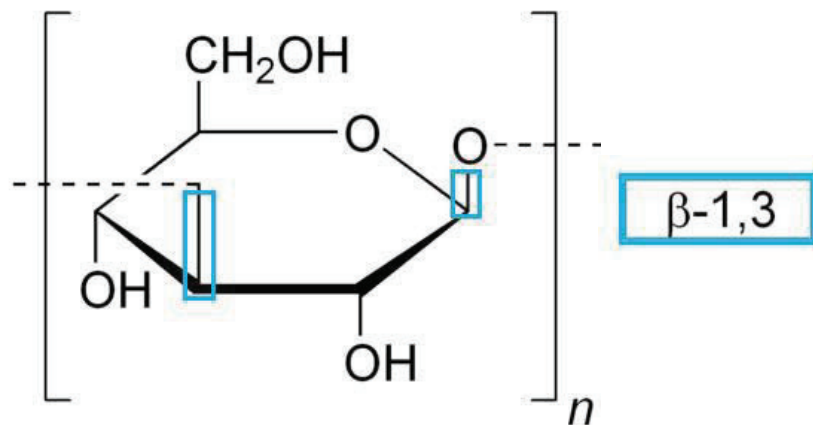


Figure 32. (1,3) - β -D-glucan : structure.

Crédit image : Jatlas2 pour Wikimedia Commons (image tronquée centrée sur la zone d'intérêt)

1.5.3.5. Recherche d'ADN

Plusieurs méthodes sont aujourd'hui proposées pour la recherche d'ADN fongique par PCR^{304,305}. Toutefois, les résultats de la PCR ne font actuellement pas partie des arguments diagnostiques mycologiques retenus par l'EORTC/MSG par manque de standardisation¹⁵¹, même si des travaux dans cette direction sont en cours^{239,304,306-309}. Il existe des kits commercialisés et des techniques « maison » visant divers régions comme le la région ITS1/5.8S ou la région codant pour l'ARN ribosomal 28S. Certaines trousse permettent de rechercher également un gène de résistance au traitement.. La PCR a récemment été intégrée aux recommandations du GEMICOMED (*Grupo de estudio de micología médica*, société hispanophone de mycologie médicale)²⁶⁹.

1.5.4. Les besoins non remplis

Actuellement, il existe donc un nombre important de techniques permettant de poser le diagnostic d'infections aspergillaires mais certains besoins sont encore à remplir. Ainsi, s'il existe des techniques très sensibles pour détecter les IgE anti-*Aspergillus*, elles présentent quelques problèmes de spécificité³¹⁰ et ne permettent pas de différencier la sensibilisation de l'ABPA¹⁶⁶. Toutes les techniques disponibles utilisant la même approche, elles présentent toutes les mêmes limitations. Une approche complémentaire, au travers d'une technique de confirmation, plus spécifique ou présentant une capacité à différencier ABPA et sensibilisation, apporterait une avancée importante dans le diagnostic et donc la prise en charge de ces patients. D'autre part, le diagnostic de l'APC repose sur un ensemble de signes d'orientation, dont la clinique, l'imagerie et la sérologie. La plupart des cas surviennent après une tuberculose, ce qui fait de l'APC une maladie plus fréquente dans les pays émergents que dans les pays développés¹⁹. Dans ces pays, les moyens à disposition sont limités. S'il est possible d'utiliser une simple radiologie des poumons comme outil d'imagerie³¹¹, les techniques de sérologie ne sont pas compatibles avec les ressources disponibles dans de nombreux laboratoires et dispensaires. Dans de tels endroits, un test rapide, au format cassette comme celui existant pour le diagnostic rapide du paludisme, serait l'outil le mieux adapté, mais un tel test n'existe pas encore, malgré des demandes d'équipes allant dans ce sens^{240,312}.

1.6. Le western blot

1.6.1. Historique

Le western blot (WB) a été mis au point de manière à peu près concomitante par plusieurs équipes en 1984, avec des membranes et des méthodes différentes^{313,314}. La technique se base sur la migration SDS-PAGE (*Sodium dodecyl sulfate – polyacrylamid gel electrophoresis*, Migration en gel de polyacrylamide sodium dodécyl sulfate) ou méthode de Laemmli³¹⁵ et s'inspire des techniques de northern³¹⁶ et Southern³¹⁷ blot mises au point quelques années auparavant. La technique se décompose en plusieurs étapes, détaillées dans le paragraphe 1.6.2. De très nombreuses techniques de révélation ont été mises au point, permettant de détecter des éléments variés. On peut citer par exemple :

- le rouge Ponceau, permettant une révélation réversible mais peu sensible des protéines ;
- les méthodes de révélation irréversibles, telles que le bleu de Coomassie ;
- la révélation immunoenzymatique ou immunoblot.

D'une utilisation initialement réservée à la recherche fondamentale pour l'identification du contenu d'un mélange de protéines, le WB est maintenant également utilisé comme technique diagnostique. En effet, la révélation immunoenzymatique permet de révéler la présence d'anticorps spécifiques aux protéines présentes sur le WB. En utilisant des protéines issues d'un pathogène, on peut ainsi obtenir un profil immunitaire du patient par rapport à ces antigènes. L'éclatement des protéines, grâce à la séparation par électrophorèse, assure une bien meilleure spécificité à la technique par rapport à celles n'ayant pas cette séparation (HAI, ELISA par exemple). L'immunoblot s'est ainsi imposé comme une technique de confirmation dans de nombreuses maladies comme le VIH⁸ mais également dans diverses pathologies parasitaires telles que la toxoplasmose^{318,319}, la cysticercose^{6,320} ou la toxocarose⁹.

1.6.2. Description de la technique

Le WB est une technique dont la fabrication demande relativement peu de matériel et qui repose encore aujourd'hui en grande partie sur des solutions à petite échelle. Une attention très importante est nécessaire pour obtenir des WB utilisables en diagnostic afin de pallier aux risques de perte de reproductibilité de la technique. Le WB se fait en quatre étapes :

- Choix et préparation de l'échantillon ;
- Électrophorèse des protéines ;
- Électro-transfert des protéines ;
- Révélation.

Choix et préparation de l'échantillon

Grâce à la séparation des protéines, le WB permet d'utiliser comme analyte des mélanges complexes. Afin d'avoir la meilleure sensibilité possible, la solution idéale est d'utiliser le pathogène tel qu'il est retrouvé dans l'organisme du patient. En parasitologie-mycologie, cela correspond donc à des situations très variées, allant de la levure au ver entier en passant par les parasites intracellulaires et les filaments mycéliens. En pratique, certaines de ces formes peuvent être trop compliquées à obtenir, soit car elles sont difficiles ou impossible à obtenir *in vitro* ou *in vivo*, soit en raison du risque infectieux lié à leur manipulation. Une autre forme du pathogène peut alors lui être préférée.

Dans tous les cas, il faut ensuite passer d'une cellule ou d'un organisme multicellulaire à une solution protéique. En effet, les cellules sont largement plus grosses que les pores des gels utilisés dans le transfert et ne pourraient pas migrer. Pour détruire les cellules et arriver à une solution protéique utilisable, il existe de très nombreuses méthodes : broyage mécanique, utilisation d'ultrasons, lyse chimique... Pour chaque échantillon, il convient de trouver une technique permettant de le solubiliser sans le détruire. De plus, il faut aussi faire attention à ne pas libérer des protéases ou alors à les inhiber de façon à ne pas perdre l'échantillon.

Une fois préparé, l'échantillon doit être utilisé à une concentration suffisamment forte pour être détectée par la méthode de révélation, mais une concentration trop forte peut perturber la migration et l'interprétation des résultats. Il peut être nécessaire de diluer l'échantillon à cette étape ou de le concentrer.

Ensuite, afin d'homogénéiser la migration dans le gel, les protéines doivent être dénaturées par ajout de SDS. Le SDS est un agent réducteur qui dénature la structure tridimensionnelle des protéines et permet de les linéariser tout en les chargeant négativement de manière homogène. Le SDS ne dénature pas les liaisons cystéine, il faut ajouter un agent réducteur (2-mercapto éthanol, dithiothreitol, tris(2-carboxyethyl)phosphine - TCEP). Toutefois, s'ils sont utiles pour une meilleure migration, SDS et agents réducteurs peuvent interférer avec la reconnaissance des épitopes antigéniques. Dans ce cas, il peut être nécessaire de ne pas utiliser l'un ou l'autre de ces produits.

Migration électrophorétique

Une fois l'antigène préparé, il faut le faire migrer. La migration se fait au travers d'un gel par SDS-PAGE. Ce gel est composé d'un mélange d'acrylamide, de N,N-méthylènebisacrylamide (ou bisacrylamide), d'ammonium persulfate, de SDS et de tétraméthyléthylènediamine (ou TEMED) ou 4-diméthylaminopyridine (ou DMAP), le tout en solution aqueuse tamponnée. La tétraméthyléthylènediamine et la 4-diméthylaminopyridine sont des catalyseurs qui vont initier la polymérisation du bisacrylamide et de l'acrylamide avec l'ammonium persulfate.

Les ratios entre les différents constituants du gel sont à déterminer pour chaque échantillon à analyser afin d'avoir la meilleure séparation. En règle générale, plus les protéines à séparer sont petites, plus il faut avoir recours à des gels concentrés en acrylamide et bisacrylamide. On exprime généralement cette teneur (ou « charge ») en acrylamide et bisacrylamide en pourcentage de la masse ou du volume. Néanmoins il faut savoir qu'un gel peu chargé (<8% d'acrylamide/bisacrylamide) sera très fragile et difficile à manipuler. En fonction des protéines à faire migrer, il est parfois nécessaire d'avoir recours à des gels en gradient, pour lesquels la concentration d'acrylamide augmente de haut en bas dans le gel. Dans la même idée, il est parfois utile de produire deux gels, un pour la séparation, précédé d'un gel de tassement qui permet de linéariser les protéines en début de migration. C'est particulièrement utile en cas de dépôt d'un volume important d'antigène.

La migration en elle-même se fait en milieu liquide, généralement un tampon tris-glycine-SDS à pH 8-8,5. Le gel est placé dans le milieu liquide, avec une électrode à chaque extrémité. L'application d'un courant à voltage constant permet ensuite la migration des protéines de l'anode vers la cathode. En fonction de l'intensité électrique et de la teneur en acrylamide/bisacrylamide choisies, la migration sera plus ou moins longue. Au bout d'un moment, les protéines finissent par sortir du gel, il faut donc arrêter la migration avant.

Une fois la migration terminée, les protéines vont progressivement diffuser, dans le gel (créant des bandes plus larges et plus floues) et en dehors (entraînant une perte de signal). Il faut donc rapidement procéder au transfert. Il est également possible d'utiliser le gel sans transfert, pour une coloration au bleu de Coomassie ou argentique par exemple³²¹. Toutefois, ces colorations détruisent les protéines et empêchent leur transfert consécutif.

Transfert

Le transfert consiste à déplacer les protéines du gel vers une membrane posée contre le gel, sous l'effet d'un courant électrique. Deux types de membranes sont utilisés : les membranes en nitrocellulose et les membranes en polyfluorure de vinylidène (PVDF). Les membranes en PVDF nécessitent un traitement initial plus complexe que les nitrocelluloses, mais ces dernières impliquent d'utiliser du méthanol lors du transfert, alors qu'avec le PVDF il n'en faut que lors du prétraitement de la membrane (pour l'activer).

Il existe plusieurs méthodes de transfert, soit en milieu liquide, soit par méthode semi-sèche. Les conditions varient d'un appareil de transfert à l'autre mais la méthode semi-sèche permet des transferts plus rapides. En revanche, elle présente un risque de mauvaise qualité du transfert qui risque de sécher ; de plus, les grosses protéines ont du mal à transférer. Que ce soit en milieu liquide ou semi-sec, le milieu de transfert est composé de tris, de glycine, de méthanol (facultatif avec une membrane PVDF) et éventuellement de SDS (0,01-0,04% masse/volume) qui facilite le transfert des grandes protéines.

En fin de transfert, il est possible de contrôler sa qualité avec une coloration du gel (Coomassie, argentique) ou une coloration du transfert au rouge ponceau. Le rouge ponceau colore de manière réversible les protéines et permet donc de les visualiser sur le transfert. Il peut ensuite être enlevé par des lavages successifs. Le transfert est alors terminé et peut être révélé.

Méthodes de révélation du transfert

La révélation du transfert se fait par utilisation d'une réaction d'affinité entre les protéines sur la membrane et celles d'un milieu liquide mis en présence. Les principaux réactifs utilisés sont :

- des anticorps, exploitant la réaction antigène-anticorps,
- des protéines fixant certaines cibles spécifiques comme par exemple des lectines, pouvant servir à détecter des glycoprotéines.

Pour éviter la fixation à la membrane des anticorps ou des lectines, qui sont des protéines, il faut la « passiver », c'est-à-dire occuper tous les sites de fixation protéique libres sur la membrane. Les solutions les plus utilisées sont le lait écrémé ou la BSA (*Bovine Serum Albumine* - albumine bovine sérique). La révélation la plus utilisée étant celle utilisant les anticorps, c'est cette méthode de révélation qui est décrite ci-après.

Les anticorps peuvent être soit des anticorps spécifiques des protéines transférées et présentes sur la membrane (si on recherche la présence d'une protéine spécifique dans un échantillon par exemple) ou un échantillon provenant d'un patient. Ces anticorps (ou cet échantillon) sont incubés avec la bandelette, sous agitation. Après un temps d'incubation défini (de quelques dizaines de minutes à toute la nuit selon les protocoles), la solution est retirée, puis le transfert est lavé. Seuls les anticorps spécifiques des protéines sur le transfert sont ainsi encore présents.

Un anticorps secondaire spécifique de la classe d'anticorps utilisée à l'étape précédente (par exemple les IgG humaines) et couplé à une enzyme est ensuite mis à incuber avec le transfert. Deux enzymes sont utilisées : la *horse-radish peroxydase* (peroxydase du raifort) et la phosphatase alcaline. Après une incubation d'une à deux heures, la solution est retirée et le transfert lavé. Des protéines ayant une affinité forte pour les anticorps, telle la protéine A, peuvent être utilisées à la place de ces anticorps secondaires pour obtenir des réactifs compatibles avec plusieurs espèces.

Dans certains cas, il existe des anticorps spécifiques de l'analyte transféré déjà couplés à une de ces enzymes et il est possible de les utiliser directement, sans avoir recours à deux anticorps successifs. Il existe également des anticorps secondaires couplés à des fluorochromes, qui, à condition d'utiliser un appareil adapté, permettent de s'affranchir de l'étape suivante.

On utilise alors une solution de révélation comportant un substrat précipitant de l'enzyme utilisée à l'étape précédente. Pour la *horse-radish peroxydase*, il en existe plusieurs, avec une sensibilité variable, mais ce sont des composés peu stables s'ils sont exposés à la lumière. Pour la phosphatase alcaline, le NBT/BCIP (chlorure de tétrazolium bleu nitré / sel de 5-bromo-4-chloro-3'-indolyphosphate p-toluidine) est utilisé. Ces substrats précipitent en présence de l'enzyme et colorent le transfert en-dessous, provoquant l'apparition de bandes.

1.7. L'immunochromatographie

1.7.1. Principes généraux

L'ICT consiste à utiliser des particules colorées pour révéler une réaction de type anticorps-antigène. On peut l'utiliser pour la détection d'anticorps ou d'antigènes. La réaction se fait par mise en contact de trois éléments : un élément réparti sur un support capable d'adsorber les protéines, un élément soluble, et un élément lié à des particules. Le support le plus utilisé est la nitrocellulose mais il peut être en nylon ou en teflon³²². Deux types de particules sont utilisés : le latex ou l'or colloïdal. Le latex, contrairement à l'or colloïdal permet un choix de couleur et une fixation covalente (l'or colloïdal ne permet qu'une adsorption passive). En revanche, le latex présente une plus forte variabilité lot à lot.

Deux types de réactions peuvent exister (Figure 33) :

- La réaction « sandwich homogène ». Elle est très utilisée pour la recherche d'antigènes, mais peut servir aussi aux anticorps : le même constituant spécifique de l'élément circulant est réparti sur la nitrocellulose et lié aux particules. Dans le cadre d'une recherche d'antigène on fixe donc un anticorps, spécifique de l'antigène recherché, aux particules et sur la nitrocellulose. Dans le cadre d'une recherche d'anticorps, on profite du pouvoir de bivalence des anticorps (ou de la pentavalence des IgM) pour fixer l'anticorps circulant à la fois à l'antigène fixé aux particules et à la nitrocellulose.
- La réaction par utilisation d'anticorps secondaires. Elle sert pour la recherche d'immunoglobulines : un antigène est fixé à la nitrocellulose, et des anticorps anti-anticorps de l'isotype recherché sont fixés aux particules. Le schéma inverse (anticorps secondaires sur la nitrocellulose, antigène sur les particules) est possible mais plus rare.

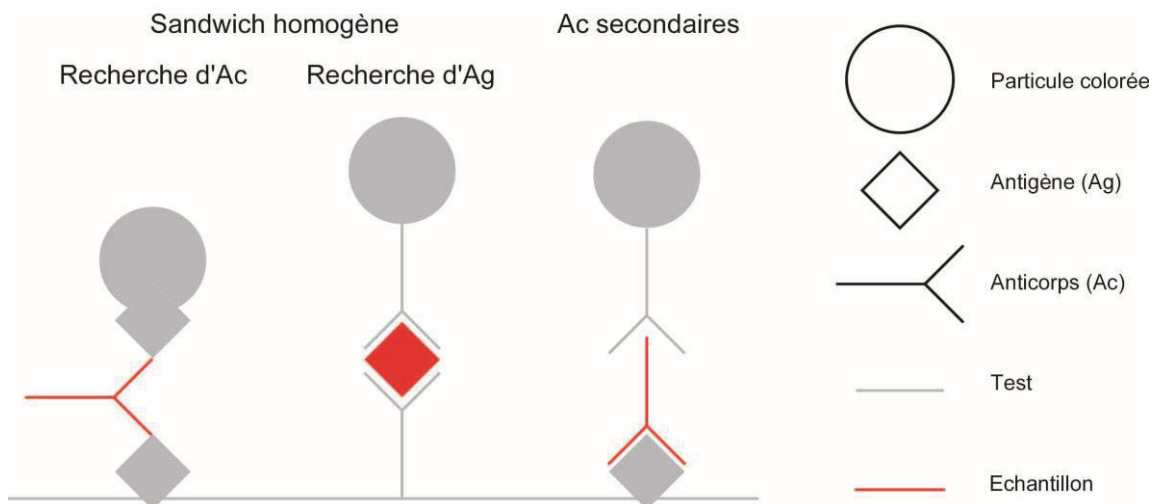


Figure 33. Les différentes formes de test immunochromatographique.

Développement de tests de diagnostic in vitro appliqués au sérodiagnostic des infections fongiques par western blot et immunochromatographie

Pour la recherche d'anticorps, la méthode par sandwich homogène est plus sensible mais plus complexe à mettre en place : il faut retravailler la liaison particule-antigène pour chaque produit, alors que la même liaison particule-anticorps peut être réutilisée dans la méthode basée sur les anticorps secondaires. De plus, la méthode par sandwich homogène ne permet pas de choisir l'isotype que l'on désire observer (tous les anticorps seront observés), contrairement aux anticorps secondaires qui permettent de détecter sélectivement les IgG par exemple.

Les tests ICT se présentent typiquement sous la forme de petites cassettes prêtes à être utilisées (Figure 34) ou sous forme de bandelettes à imprégner dans un liquide (Figure 35).

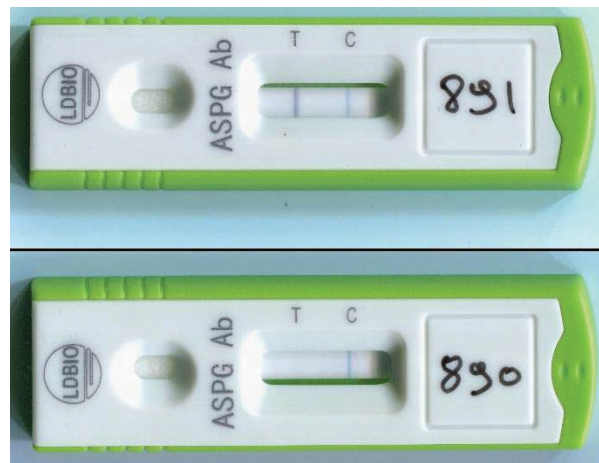


Figure 34. Exemple d'ICT au format cassette : le test ICT mis au point dans ce travail.

Crédit image : collection personnelle



Figure 35. Un ICT au format bandelettes à imprégner : le test rapide de recherche de l'antigène *Cryptococcus* IMMY.

Crédit image : IMMY (www.immy.com)

Développement de tests de diagnostic in vitro appliqués au sérodiagnostic des infections fongiques par western blot et immunochromatographie

Dans les deux cas, la composition du test est identique ; il comprend une succession de membranes se chevauchant légèrement entre elles de façon à assurer la continuité du flux de liquide, comme détaillé dans la Figure 36.

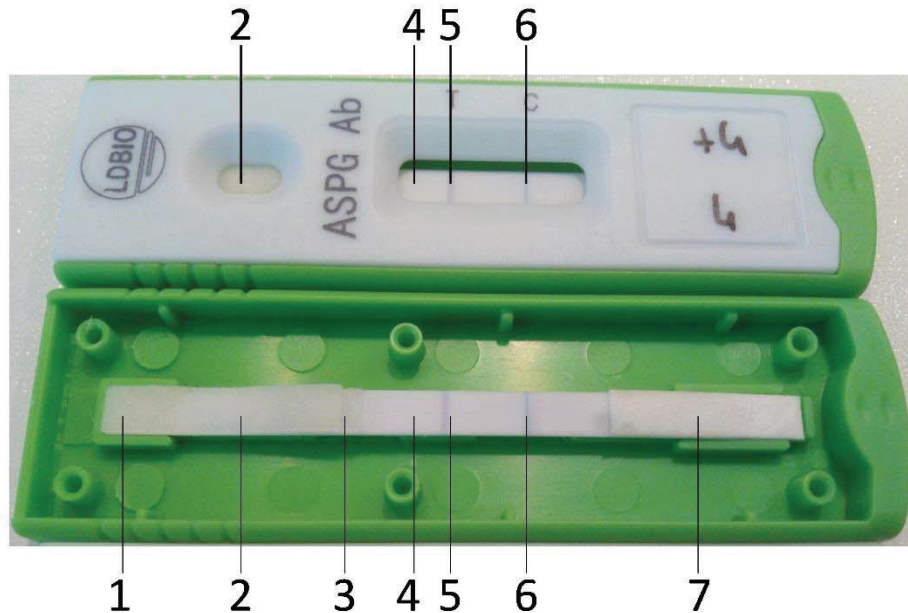


Figure 36. Composition d'une cassette immunochromatographique.

En haut, une cassette fermée.

En bas, une cassette sans la partie supérieure, permettant de visualiser l'intégralité de la bandelette.

L'échantillon est déposé dans le puits échantillon (2). L'ajout d'une solution d'éluion entraîne une migration progressive de l'échantillon du sample pad (1) (zone d'échantillon) vers le conjugate pad (3, zone du conjugué). Dans le conjugate pad, la solution remet en suspension des particules de latex colorées qui peuvent interagir avec l'échantillon en cas de correspondance antigène-anticorps. L'échantillon et les particules de latex migrent ensuite sur la bande de nitrocellulose (4). S'il existe des anticorps spécifiques de l'antigène, ils se fixent sur la bande test (5) provoquant une réaction colorée. Des latex contrôles se fixent directement sur la bande contrôle (6). Le reste de solution migre ensuite jusqu'à finalement atteindre l'absorbant pad (7, zone absorbante).

Le *sample pad* (zone d'échantillon) est généralement en coton. Il sert à recevoir l'échantillon et la solution d'éluion pour démarrer la chromatographie.

Le *conjugate pad* (zone du conjugué) est généralement en fibre de verre, avec une porosité bien plus lâche que le *sample pad*. Il contient les particules colorées couplées. La réaction immunologique commence à cette étape et se poursuit sur la bandelette de nitrocellulose.

Le support en nitrocellulose contient au moins deux bandes : une pour l'antigène testé, et une autre pour un contrôle de la réaction. Le contrôle de la réaction se fait généralement par réaction directe entre des particules colorées et un antigène ou un anticorps réparti sur la nitrocellulose.

L'*absorbant pad* (zone d'absorption) est lui aussi en coton et permet de recevoir l'excès de liquide et de maintenir la chromatographie.

1.8. Objectifs des travaux

Ce travail de thèse a porté sur le développement, la mise au point et l'évaluation de tests diagnostiques pouvant apporter des solutions concrètes et répondant à des attentes non comblées par les techniques sérologiques actuellement disponibles.

Deux tests ont ainsi pu être élaborés :

- un test western blot permettant le diagnostic des sensibilisations aspergillaires et des ABPA,
- un test immunochromatographique permettant d'effectuer le diagnostic des APC dans des laboratoires ne disposant pas des moyens ou de l'infrastructure requise pour faire de la sérologie aspergillaire avec les techniques actuellement disponibles.

Les résultats de l'évaluation de la technique WB feront l'objet de la deuxième partie de ce travail tandis que ceux de l'évaluation de l'ICT seront présentés dans la troisième partie.

2. Diagnostic de l'ABPA par western blot

2.1. Contexte et résumé du projet

Comme nous l'avons signalé dans la section 1.5.2, l'ABPA est une maladie qui affecterait au moins 4,8 millions de personnes dans le monde. Elle affecte les patients atteints d'asthme et de mucoviscidose. À l'heure actuelle, son diagnostic est complexe et repose sur un faisceau d'arguments. De très nombreuses définitions ont été proposées et sont résumées dans l'annexe 1. Pour toutes les définitions, cependant, la présence d'une sensibilisation à *Aspergillus fumigatus* est un critère obligatoire. Cette sensibilisation est actuellement recherchée au moyen d'un prick-test ou d'une recherche d'IgE spécifiques. Ces tests ne permettent pas, en revanche, de faire la distinction entre les sensibilisations et l'ABPA à proprement parler.

Pour essayer d'améliorer ce diagnostic, des antigènes recombinants, correspondant à des allergènes connus d'*Aspergillus fumigatus*, ont été mis au point. A l'heure actuelle, 5 des 23 antigènes identifiés pour *Aspergillus fumigatus* sont disponibles (Tableau 8)³²³.

Tableau 8. Liste des allergènes disponibles pour *Aspergillus fumigatus*

Nom	Poids moléculaire	Fonction
Asp f1	18 kDa	Mitogiline
Asp f2	37 kDa	Inconnue
Asp f3	19 kDa	Protéine du peroxysome
Asp f4	30 kDa	Inconnue
Asp f6	26.5 kDa	Superoxyde dismutase

Ils sont utilisés depuis la fin des années 1990^{324,325}, mais la façon optimale de les utiliser fait encore débat : Asp f1 et Asp f2 sont très fréquents chez les patients sensibilisés, à l'inverse de Asp f3, Asp f4 et Asp f6, mais cet écart ne permet pas une séparation claire^{166,173,174,325} entre sensibilisation et ABPA. De ce fait, ils ne sont toujours pas inclus dans les critères diagnostiques.

Une des raisons possibles pour ces difficultés de différenciation entre l'ABPA et la sensibilisation pourrait être liée aux antigènes disponibles : l'extrait utilisé en première ligne possède des problèmes de réactions croisées avec d'autres champignons³¹⁰. Ce manque de spécificité existe avec les antigènes Asp f3 et Asp f6¹⁶⁶. Le trop faible nombre d'allergènes différents est probablement aussi une des raisons de la difficulté à séparer ABPA et sensibilisation. C'est pourquoi, l'utilisation d'un western blot, permettant de révéler l'ensemble des antigènes d'un milieu en un seul test, devrait permettre d'obtenir une information plus riche et d'améliorer la discrimination entre ces deux stades de la maladie. Quelques essais avaient été menés en ce sens au début des années 1990, avec des résultats encourageants^{12,260}. Ces techniques manquaient cependant de reproductibilité, et la réalisation d'un western blot dans son intégralité est une procédure très lourde et peu compatible avec un diagnostic de routine. En revanche, LDBIO Diagnostics commercialise depuis 2012 un western blot de détection des IgG aspergillaires, qui, s'il était adapté à la recherche des IgE, permettrait de s'affranchir des étapes de migration et de transfert.

Notre travail a donc consisté à mettre au point l'application de la recherche des IgE aspergillaires sur les transferts produits par LDBIO Diagnostics et à en optimiser les performances. Nous avons dû

modifier le temps d'incubation pour augmenter la sensibilité du test. La Figure 37 montre la différence entre une incubation diurne, telle que conseillée dans le cadre de l'utilisation des IgG avec les WB Ldbio et une incubation nocturne, telle que mise au point dans ce travail.

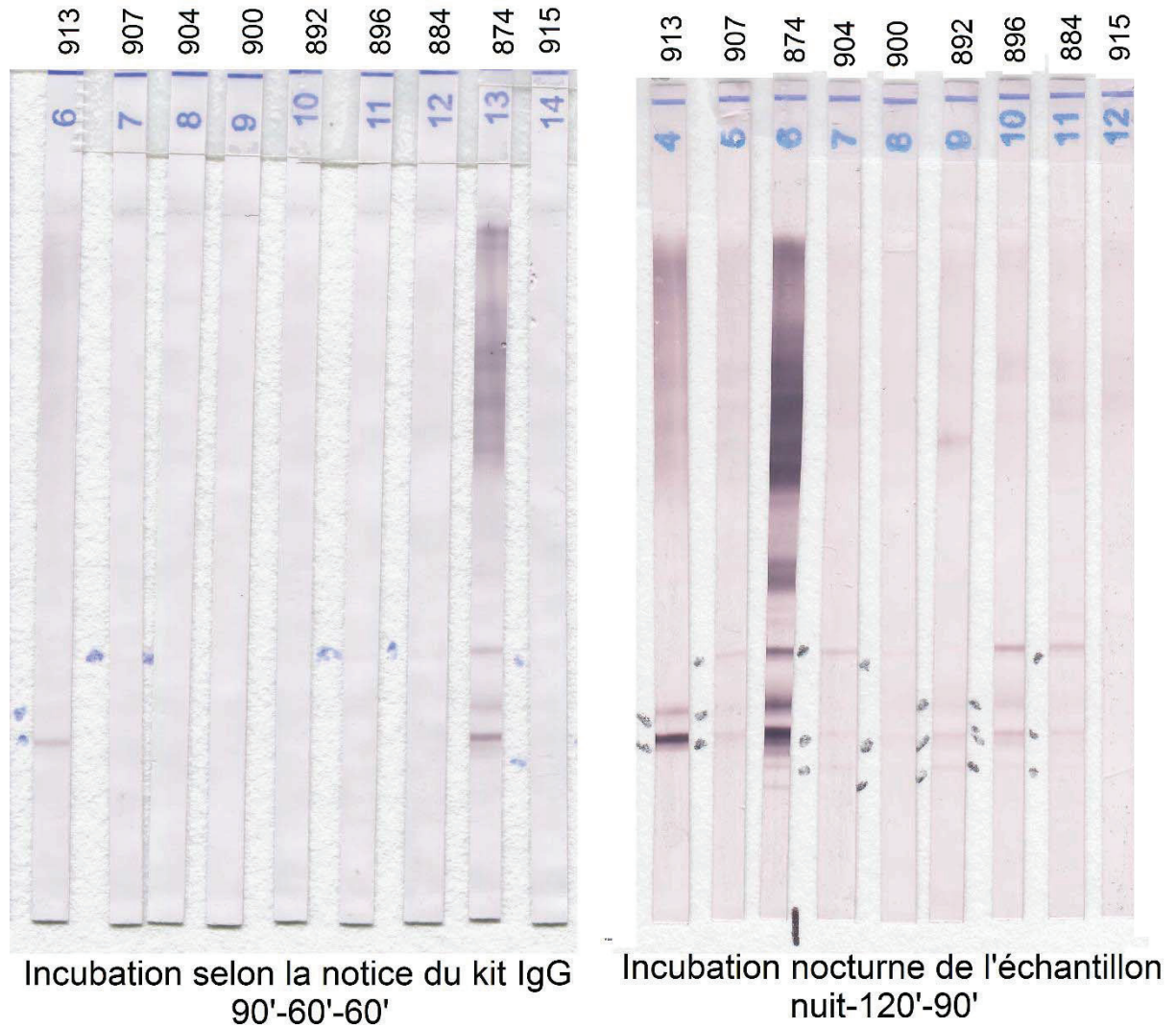


Figure 37 Comparaison sur une série de sérum avec un faible taux d'IgE spécifiques.

Le sérum 874 est un sérum fortement positif utilisé en contrôle positif sur les deux séries. Tous les autres sérums sont rangés dans l'ordre croissant d'intensité de leur résultat sérologique en ImmunoCap® sur Asp M3 (antigène total aspergillaire) avec des valeurs allant de 0.7 à 3 kUa/L. La série de gauche a été réalisée en incubant 50µL de l'échantillon durant 90 minutes dans le diluant échantillon puis 60 minutes dans le conjugué et enfin durant 60 minutes dans le substrat. La série de droite correspond aux mêmes sérums, avec la même prise d'échantillon mais qui a été incubé sur la nuit dans le diluant échantillon (de 17h à 9h le lendemain) puis 120 minutes dans le conjugué et 90 minutes dans le substrat. Les points représentent des bandes visibles à l'œil nu sur la bandelette à leur droite.

Nous avons ensuite pu mener une évaluation pilote des performances sur un échantillon de patients caractérisés : dix patients souffrant d'ABPA, prélevés lors du diagnostic ou lors d'une rechute, 38 patients sensibilisés à *Aspergillus fumigatus* sans ABPA et onze témoins négatifs. Les caractéristiques clinico-biologiques de ces patients sont résumés en annexe 5.

Sur cette population, le WB a obtenu d'excellentes performances : il a permis de reconnaître la totalité (10/10) des patients souffrant d'ABPA et 34 patients sur les 38 présentant une sensibilisation à *Aspergillus fumigatus* mesurée à l'ImmunoCap®. Dans le même temps, tous les patients non sensibilisés étaient négatifs (11/11). De plus, le WB a montré des profils différents entre les patients ayant une sensibilisation et les patients ayant une ABPA (Figure 38). Le profil spécifique de l'ABPA a été retrouvé pour neuf des dix patients souffrant d'ABPA, alors qu'il n'était pas présent pour 35 des 38 patients sensibilisés. Le WB a donc une sensibilité de 92% et une spécificité de 100% par rapport aux résultats de l'ImmunoCap® tout en présentant la possibilité de différencier ABPA et sensibilisation avec une sensibilité de 90% et une spécificité de 92%. Des exemples de résultats sont présentés en Figure 39.

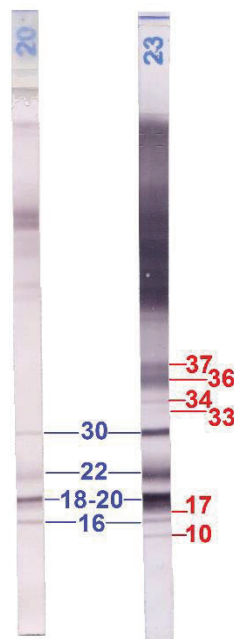


Figure 38 Profil sensibilisation et ABPA.

La bandelette de gauche présente un profil positif WB associé à une sensibilisation. Les quatre bandes retenues pour ce profil ont été nommées bandes majeures et sont les B16, B18-20, B22 et B30 (en bleu). La positivité est définie par la présence d'au moins deux de ces bandes. La bandelette de droite présente un profil d'ABPA correspondant à la présence d'un profil de sensibilisation positif, mais également de bandes mineures, B10, B17, B33, B34, B36 et B37. Le profil ABPA est défini par la présence d'au moins deux bandes parmi B10, B17, B33 et B34. Les bandes B36 et B37 n'ont pas été retenues dans le profil ABPA malgré une meilleure sensibilité, en raison de leur moins bonne spécificité.

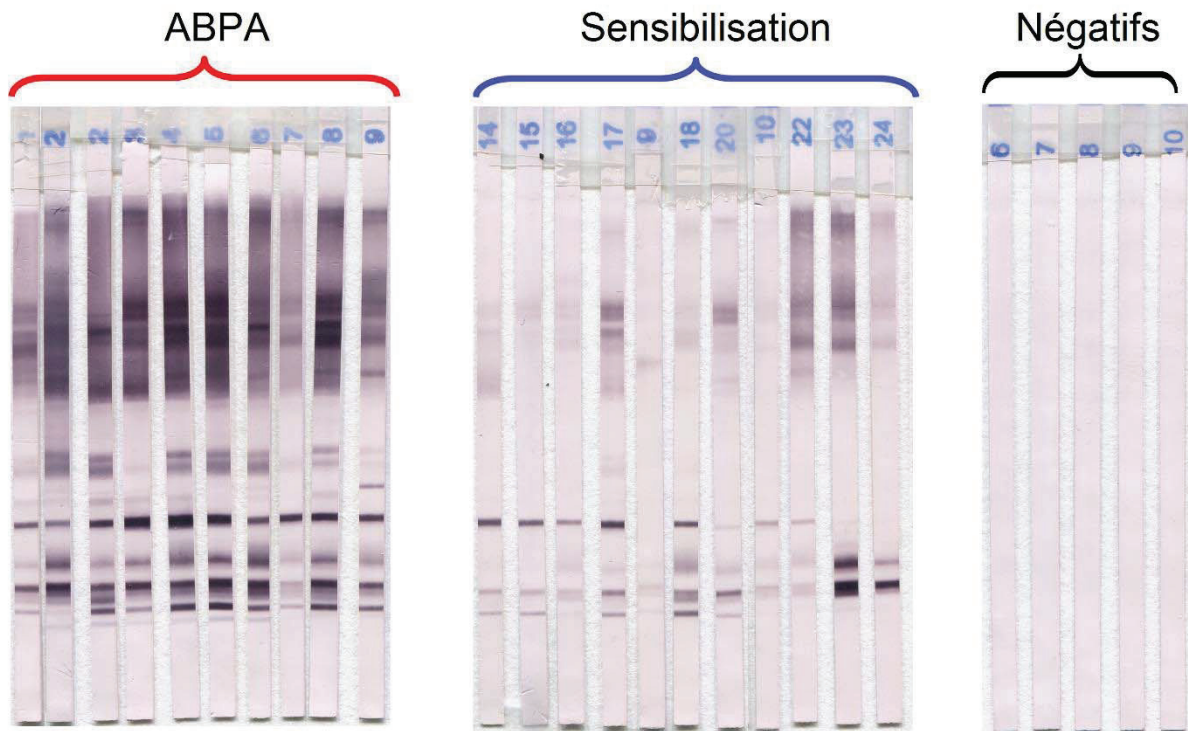


Figure 39. Exemples de WB IgE.

Le groupe de gauche correspond à des patients atteints d'ABPA, le groupe central à des patients atteints de sensibilisation aspergillaire mais pas d'ABPA et le groupe de droite à des témoins négatifs

De plus, une analyse des cas discordants entre l'ImmunoCap® et le WB a montré que l'un d'entre eux était en fait une réaction croisée avec *Alternaria alternata* non retrouvée en WB, ce qui présage d'une meilleure spécificité du WB. De la même façon, parmi les trois patients sensibilisés ayant un profil WB d'ABPA, l'un d'entre eux a été diagnostiqué comme souffrant d'une ABPA dans les mois qui ont suivi. Le WB pourrait donc être aussi un marqueur prédictif ou de diagnostic précoce d'ABPA.

2.2. Article

L'article intitulé *A new IgE Western blot identifies Aspergillus fumigatus sensitization and discriminates allergic bronchopulmonary aspergillosis* a été soumis le 03/10/2018 à *Allergy*, une revue d'*impact factor* 6.048. Nous venons d'envoyer une réponse aux reviewers.

1 **A new IgE Western blot identifies *Aspergillus fumigatus* sensitization and discriminates allergic**
2 **bronchopulmonary aspergillosis**

3 **Short title: IgE WB for *Aspergillus* sensitization and ABPA**

4 Raphaël Piarroux^{1,2*}, Jean-Christophe Dubus^{3,4}, Martine Reynaud-Gaubert^{4,5}, Stéphane Ranque^{2§},
5 Joana Vitte^{4§}

6 ¹LDBIO Diagnostics, Lyon, France

7 ²Aix-Marseille Université, IRD, APHM, VITROME, IHU-Méditerranée Infection, Marseille, France

8 ³Aix-Marseille Université, APHM, Hôpital Timone Enfants, Pneumo-pédiatrie, Centre de Ressources et
9 de Compétences en Mucoviscidose (CRCM) enfant, Marseille, France

10 ⁴Aix-Marseille Université, IRD, APHM, MEPHI, IHU-Méditerranée Infection, MEPHI, Marseille, France

11 ⁵Aix-Marseille Université, APHM, Hôpital Nord, Service de pneumologie, Centre de Ressources et de
12 Compétences de la Mucoviscidose (CRCM) adulte, Marseille, France

13

14 § share senior authorship

15 *corresponding author:

16 Raphaël Piarroux, LDBIO Diagnostics, 19 rue Louis Loucheur, Lyon, France

17 **Phone: +33 6 51 73 59 64; E-mail: rpiarroux@ldbiodiag.com**

18 Complete list of e-mail addresses:

19 RP rpiarroux@ldbiodiag.com ; JCD jeanchristophe.dubus@ap-hm.fr; MRG [martine.reynaud@ap-](mailto:martine.reynaud@ap-hm.fr)
20 hm.fr; SR stephane.ranque@ap-hm.fr; JV jvitte@ap-hm.fr

21

22 **Conflict of interest statement:** RP is a PhD student employed at LDBIO Diagnostics. The other
23 authors have no conflict of interest to declare in this work.

24

25

26 **Word count: 984; 2 figures**

27

28 **Keywords:** allergic bronchopulmonary aspergillosis, *Aspergillus fumigatus*, cystic fibrosis, IgE,
29 molecular allergen; western blot

30 **Abbreviations:** ABPA, allergic bronchopulmonary aspergillosis; *Af*, *Aspergillus fumigatus*; ARD,
31 *Aspergillus*-related diseases; CF, cystic fibrosis; _{95%}CI, confidence interval, 95%; Ig, immunoglobulin;
32 IQR, interquartile range; MB, major band; mB, minor band; MW, molecular weight; tIgE, total IgE;
33 WB, western blot

34 **Abstract**

35 **Background:** Allergic bronchopulmonary aspergillosis (ABPA) is a severe disease that complicates
36 asthma and cystic fibrosis. One major criterion for the diagnosis of ABPA is *Aspergillus* sensitization
37 with elevated levels of *Aspergillus fumigatus*-specific immunoglobulin E (IgE). The potential benefit of
38 assessing molecular antigens to differentiate between sensitization and ABPA has been suggested. As
39 only five of 23 characterized *Aspergillus fumigatus* allergens are commercially available, western blot
40 methods would enable diagnostic laboratories to assess the entire molecular spectrum of an
41 allergenic source. Such methods are lacking for IgE sensitization to *Aspergillus fumigatus*. We
42 designed a western blot method to detect sensitization to *Aspergillus fumigatus* antigens and
43 evaluated its capacity to discriminate between ABPA and *Aspergillus fumigatus* sensitization.

44 **Methods:** We evaluated a total of 59 characterized patient serum samples, including 38 non-ABPA
45 *Aspergillus fumigatus* sensitized samples, 10 samples taken at initial diagnosis or during flare-ups of
46 ABPA, and 11 samples without *Aspergillus fumigatus* sensitization. Immunoglobulin E determination
47 with ImmunoCAP® and clinical diagnosis were employed as gold standards to determine *Aspergillus*
48 *fumigatus* sensitization and ABPA.

49 **Results:** Using a two-step interpretation, based on the presence of major and minor bands, this
50 western blot for *Aspergillus fumigatus*-specific IgE displayed 92% sensitivity and 100% specificity for
51 the detection of *Aspergillus fumigatus* sensitization and 90% specificity and 92% specificity for the
52 identification of ABPA.

53 **Conclusion:** We describe an innovative western blot method to analyze the molecular profile of
54 *Aspergillus fumigatus* sensitization, which may be applied as a novel technique for laboratory
55 assessment of ABPA.

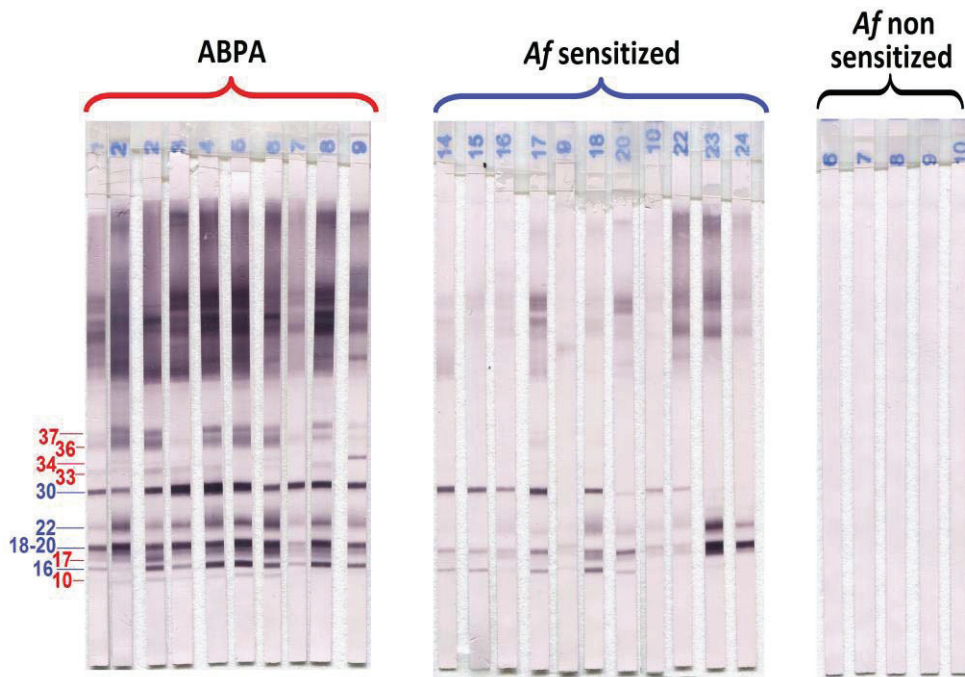
56 Asthmatic, cystic fibrosis (CF) and immunocompromised patients are burdened with various
57 *Aspergillus*-related diseases (ARD), with *Aspergillus fumigatus* (*Af*) as the most common species
58 involved in human disease (1). ARD progress via two distinct mechanisms: 1) infection involving
59 cellular immunity and immunoglobulin (Ig) G (2) and 2) IgE-driven pathophysiology, commencing with
60 *Af* sensitization and later developing into allergic forms of aspergillosis (3).

61 Allergic bronchopulmonary aspergillosis (ABPA) is a severe and incapacitating ARD, with an estimated
62 prevalence of 2.5% among asthmatic patients and up to 15% among CF patients, affecting about 4.8
63 million individuals worldwide (4-5). The detection of *Af*-specific IgE, defining *Af* sensitization, through
64 serological or skin tests, has been recognized as a major ABPA diagnostic criterion since 1977 (6).
65 Molecular allergen profiling has shown promise for more accurate IgE analysis (7). However, only 5
66 out of 23 characterized *Af* are currently commercialized (5,8). An alternative approach using western
67 blot (WB) would enable one-step characterization of sensitization to an even greater number of *Af*
68 molecules and therefore a more complex immune profile. We aimed to design a WB assay for the
69 detection of *Af*-specific IgE and to evaluate its performance for the diagnosis of *Af* sensitization and
70 ABPA.

71 Fifty-nine patients from the Pulmonology Department and Adult and Pediatric Regional Centers for
72 Cystic Fibrosis of Marseille (France) were studied: 10 patients at initial diagnosis or during an ABPA
73 flare-up, 38 *Af*-sensitized patients, and 11 *Af* non-sensitized patients (**Supplemental Methods,**
74 **Supplemental Table 1**). Total IgE, specific IgE to *Af* extract, and *Af* allergen-specific IgE were
75 measured using the ImmunoCAP® platform (ThermoFisher, Uppsala, Sweden) and the newly
76 designed *Af* IgE WB assay. WB bands were visualized. Intensity was graded with an increasing 1-4
77 scale. Prevalence and intensity of WB IgE bands were evaluated and compared between ABPA and
78 *Af*-sensitized sera. Sensitivity, specificity, and Youden's Index (YI) were calculated using ImmunoCAP®
79 *Af*-IgE as the reference. WB band intensity was compared to that of the ImmunoCAP® IgE results
80 expressed in classes using Spearman's test. The 95% confidence interval (95%CI) was estimated using
81 Wilson's method with correction for continuity. The correlation between the prevalence of
82 ImmunoCAP® *Af*-IgE and *Af*-IgE WB band intensity was tested with Spearman's rank correlation
83 coefficient (ρ) using R 3.2.3 .

84 IgE bound to the four bands used for *Af* IgG WB (B16, B18-20, B22, B30, thereafter termed "major
85 bands", MB) as well as to additional bands. Six additional bands bound by $\geq 8\%$ of *Af*-sensitized sera
86 (B10, B17, B33, B34, B36, B37) were termed "minor bands", mB (**Figure 1**).

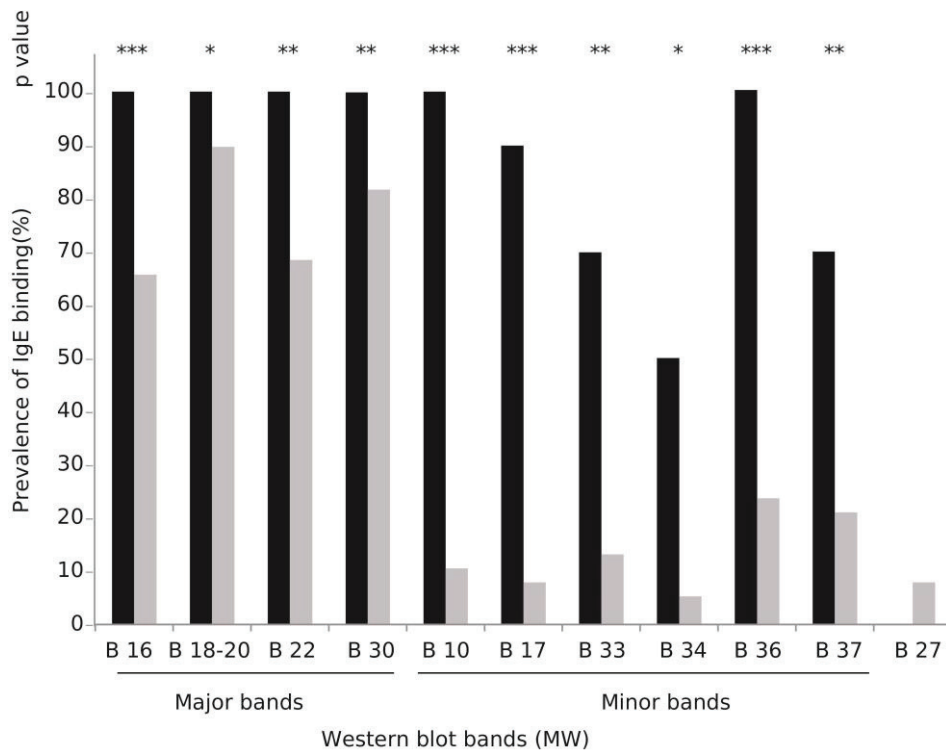
87 *Af*-IgE WB was first analyzed considering that IgE binding to ≥ 2 MB defined a positive sample.



88

89 **Figure 1. Af-specific IgE WB profiles of the three study groups.** Analysis relied on IgE binding to four major
 90 bands (B16, B18-20, B22, and B30, blue font) and to six minor bands (B10, B17, B33, B34, B36, and B37, red
 91 font). Representative samples are shown for each group: ABPA 10/10, Af-sensitized 11/38, and Af-non-
 92 sensitized 5/11. ABPA, allergic bronchopulmonary aspergillosis; Af, *Aspergillus fumigatus*.

93



94

95 **Figure 2. Western blot-based *Af*-specific IgE profiles of ABPA and *Af*-sensitized groups.** Binding to major and
96 minor bands varied between ABPA (black bars) and *Af*-sensitized samples (grey bars). Binding to all but one
97 band (B27) was more frequent among ABPA samples. Statistical significance flags for *p*-values: less than 0.05, *;
98 less than 0.01, **; less than 0.001, ***. *Af*, *Aspergillus fumigatus*; MW, molecular weight.

99 10/10 ABPA and 18/38 *Af*-sensitized sera displayed IgE binding to the four MB, while 16/38 *Af*-
100 sensitized sera bound to 2 or 3 MB (**Figure 2**). WB sensitivity was 91.7% (95%CI [79.1-97.3%]). WB was
101 negative in 11/11 *Af* non-sensitized samples. Specificity was 100% (95%CI [67.8-100%]). YI was 0.92.

102 Analysis of mB enabled better differentiation between ABPA and *Af*-sensitized samples. The presence
103 of ≥ 2 MB and ≥ 2 mB yielded a sensitivity of 100% (95%CI [65.5-100%]) (10/10 ABPA samples
104 adequately classified) and a specificity of 76.3% (95%CI [56.5-89.3%]) (29/38 *Af*-sensitized samples
105 adequately classified). YI was 0.76. No IgE binding to mB was observed in *Af*-non-sensitized sera
106 (**Figure 2**).

107 By excluding the two less-specific mB (B36 and B37), sensitivity decreased to 90% (95%CI [54.1-99.5%])
108 (9/10 ABPA adequately classified), while specificity increased to 92% (95%CI [76.6-98.1%]) (35/38 *Af*-
109 sensitized samples adequately classified). YI was 0.82.

110 Given the overall results, the profile using 4 MB and 4 mB (B10, B17, B33 and B34) was considered
111 the most performant.

112 Discordances between *Af*-IgE WB and ImmunoCAP® IgE were analyzed. Four patients with no or 1 MB
113 and no mB displayed ImmunoCAP® IgE to *Af* extract and Asp f 1 greater than 0.10 kU_A/L. Three of
114 them displayed ImmunoCAP® IgE below 2 kU_A/L. The fourth was primarily sensitized to *Alternaria*
115 *alternata* with cross-reaction to *Af* (**Supp Table 2**). This finding suggests that *Af*-specific IgE WB may
116 discriminate between genuine *Af* sensitization and cross-reactions. Conversely, 1/3 *Af*-sensitized
117 patients who displayed an ABPA-compatible profile (≥ 2 MB and ≥ 2 mB) subsequently developed
118 ABPA, suggesting that *Af*-IgE WB profile might be an early marker for ABPA.

119 ABPA samples showed significantly more intense IgE binding to all MB and to mB B10 and B17 in
120 comparison with other samples (**Supp Table 3**). IgE binding was highly correlated between B16 and
121 Asp f 1 (ribotoxin, 18 kDa) (Spearman $\rho=0.87$, $p < 10^{-5}$) and between B36 and Asp f 4 (30 kDa)
122 ($\rho=0.81$, $p < 10^{-12}$).

123 Low-affinity binding to the *Af* WB in cases of elevated levels of total IgE (tIgE) was not specifically
124 addressed during this study. However, tIgE levels >100 kIU/L in *Af*-non-sensitized patients did not
125 result in visible WB binding, and *Af*-sensitized patients with tIgE levels ≤ 100 kIU/L retained strong
126 binding to *Af* WB bands (data not shown).

127

128 Taken together, our results suggest that *Af*-IgE WB offers better discrimination between ABPA and *Af*
129 sensitization than current criteria (tIgE > 500 kIU/L and *Af*-IgE > 0.35 kU_A/L), which would have
130 identified 9/10 ABPA samples and 28/38 *Af*-sensitized patient samples (90% sensitivity, 74%
131 specificity, YI 0.64). *Af*-IgE also outcompetes the performance of multiparametric approaches, which
132 identified 7/10 ABPA and 35/39 *Af*-sensitized patients (sensitivity 70%, specificity 90%, YI 0.60) (6).

133 Considering the monocentric study design, the small sample size, and the lack of longitudinal data
134 with the WB approach, our findings need confirmation in prospective studies. Nevertheless, the
135 capacity to differentiate between ABPA and *Af* sensitization represents a major step forward in
136 strengthening ABPA diagnostic criteria. Enhanced diagnosis capacity would reduce underdiagnosis,
137 diagnostic lag and overdiagnosis, and ultimately improve ABPA case management.

138 In conclusion, we describe a new WB technique to study *Af* sensitization at the molecular level, which
139 offers a virtually complete examination of IgE sensitization to *Af* allergens with the best as-yet
140 available serological sensitivity, specificity and discrimination between ABPA and *Af* sensitization.

141

142 **Acknowledgements:**

143 We are grateful to S. Moore for English language editing.

144 **Funding:** LDBIO Diagnostics, Lyon, France.

145 **Author Contributions:** RP, JV and SR designed the research study. JCD and MRG collected clinical
146 data. RP performed WB assays and collected and analyzed data. RP, SR and JV performed statistical
147 analysis. RP, SR and JV wrote the manuscript. All authors read and approved the final version of the
148 manuscript.

149 **References**

- 150 1. Kosmidis C, Denning DW. The clinical spectrum of pulmonary aspergillosis. *Thorax* 2015;70: 270–7.
- 151 2. van de Veerdonk FL, Gresnigt MS, Romani L, Netea MG, Latgé JP. *Aspergillus fumigatus*
- 152 morphology and dynamic host interactions. *Nat Rev Microbiol* 2017;15:661-74.
- 153 3. Larenas-Linnemann D, Baxi S, Phipatanakul W, Portnoy JM; Environmental Allergens Workgroup.
- 154 Clinical Evaluation and Management of Patients with Suspected Fungus Sensitivity. *J Allergy Clin*
- 155 *Immunol Pract* 2016;4:405-14.
- 156 4. Maturu VN, Agarwal R. Prevalence of *Aspergillus* sensitization and allergic bronchopulmonary
- 157 aspergillosis in cystic fibrosis: systematic review and meta-analysis. *Clin Exp Allergy* 2015;45:
- 158 1765–78.
- 159 5. Carsin A, Romain T, Ranque S, Reynaud-Gaubert M, Dubus JC, Mège JL *et al.* *Aspergillus fumigatus*
- 160 in cystic fibrosis: An update on immune interactions and molecular diagnostics in allergic
- 161 bronchopulmonary aspergillosis. *Allergy* 2017;72: 632–42.
- 162 6. Agarwal R, Chakrabarti A, Shah A, Gupta D, Meis JF, Guleria R *et al.* Allergic bronchopulmonary
- 163 aspergillosis: review of literature and proposal of new diagnostic and classification criteria. *Clin*
- 164 *Exp Allergy* 2013;43:850–73.
- 165 7. Matricardi PM, Kleine-Tebbe J, Hoffmann HJ, Valenta R, Hilger C Hofmaier S *et al.* EAACI Molecular
- 166 Allergology User’s Guide. *Pediatr Allergy Immunol* 2016;27:1–250.
- 167 8. http://allergen.org/search.php?allergen_source=Aspergillus+fumigatus accessed Sep 27th 2018.
- 168 9. Vitte J, Ranque S, Carsin A, Gomez C, Romain T, Cassagne C *et al.* Multivariate Analysis As a
- 169 Support for Diagnostic Flowcharts in Allergic Bronchopulmonary Aspergillosis: A Proof-of-Concept
- 170 Study. *Front Immunol* 2017;8:1019.

1 Supplemental Methods

2 Patients

3 The characteristics of the study population, including IgE work-up, are presented in **Supp Table 1**.
4 Briefly, ABPA diagnosis relied on the presence of all major criteria and at least two minor criteria as
5 follows (9,21–231-4). Major criteria included 1) acute or subacute pulmonary function deterioration
6 and 2) elevated levels of *Af*-specific IgE (>0.35 kU_A/L) and total IgE > 500 kIU/L. Minor criteria
7 included 1) history of asthma or CF, 2) positive *Af*-specific IgG (ELISA Serion® or precipitins), and 3)
8 chest or computed tomographic pulmonary infiltrates with high attenuation mucous plugging.
9 Additional criteria included therapeutic unresponsiveness to antibiotics, followed by resolution under
10 corticosteroid treatment (5).

11

12 Ethics statement

13 Total IgE levels, *Af* extract and *Af* molecular allergen IgE were assessed using ImmunoCAP® during
14 routine medical visits. Patients received written laboratory work-up reports. IgE analysis via WB was
15 performed on excess serum samples. Patient characteristics were obtained from a retrospective,
16 non-interventional review of the medical charts and laboratory results. According to French law, the
17 patients were informed that their samples and clinical data may be used for research purposes and
18 retained the right to oppose the use of their anonymized medical data for such purposes. Therefore,
19 neither dedicated ethical approval nor individual patient consent were required for this type of study
20 (6-7).

21

22 Assessment of total and *Af*-specific IgE levels

23 Total IgE, specific IgE to *Af* extract, and allergen-specific (Asp f 1, Asp f 2, Asp f 3, Asp f 4 and Asp f 6)
24 IgE were measured using the ImmunoCAP® platform (ThermoFisher, Uppsala, Sweden). The positivity
25 threshold for specific IgE was 0.10 kUA/L (8-10). The ImmunoCap® results were retrospectively
26 collected from laboratory reports.

27 All ABPA and *Af*-sensitized patients (n=48) had ImmunoCAP® IgE levels > 0.10 kU_A/L for *Af* extract. All
28 sera from *Af* non-sensitized patients (*Af*-specific IgE extract < 0.10 kU_A/L) also displayed results below
29 the positivity threshold for Asp f 1, Asp f 2, Asp f 3, Asp f 4 and Asp f 6 allergen-specific IgE.

30

31 Development of the *Af*-specific IgE western blot

32 The WB was performed on the remaining serum sample subsequent to the ImmunoCAP® *Af*-specific
33 IgE assay, for which the samples remained at -20°C.

34 The commercialized *Aspergillus* WB IgG kit (LDBIO Diagnostics, Lyon, France) was modified to detect
35 *Af*-specific IgE. The strips were incubated for 12-14 hours (overnight) with 50 µL of sera diluted in 1.2
36 mL of sample buffer, followed by a 2-hour incubation with IgE-alkaline phosphatase conjugate (LDBIO
37 Diagnostics) and a final incubation of 90 min with 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-phosphate/nitro blue
38 tetrazolium (BCIP/NBT) substrate. The strips were washed three times with washing buffer between
39 incubation steps. The reaction was stopped with a final wash in deionized water. All reagents
40 including sample buffer, washing buffer and BCIP/NBT were included in the commercial *Aspergillus*
41 WB IgG kit. The bands were visualized, and increasing band intensity was graded using a scale
42 ranging from one to four.

43

44 **Supplemental references**

- 45 1. Agarwal R, Chakrabarti A, Shah A, Gupta D, Meis JF, Guleria R *et al.* Allergic bronchopulmonary
46 aspergillosis: review of literature and proposal of new diagnostic and classification criteria. *Clin*
47 *Exp Allergy* 2013;43:850–73.
- 48 2. Stevens DA, Moss RB, Kurup VP, Knutsen AP, Greenberger P, Judson MA *et al.* Allergic
49 bronchopulmonary aspergillosis in cystic fibrosis--state of the art: Cystic Fibrosis Foundation
50 Consensus Conference. *Clin Infect Dis* 2003; 37 Suppl 3: S225-64.
- 51 3. Patterson KC, Strek ME. Diagnosis and treatment of pulmonary aspergillosis syndromes. *Chest*
52 2014;146: 1358–68.
- 53 4. Knutsen AP, Bush RK, Demain JG, Denning DW, Dixit A, Fairs A *et al.* Fungi and allergic lower
54 respiratory tract diseases. *J Allergy Clin Immunol* 2012;129:280–91.
- 55 5. Carsin A, Romain T, Ranque S, Reynaud-Gaubert M, Dubus JC, Mège JL *et al.* *Aspergillus*
56 *fumigatus* in cystic fibrosis: An update on immune interactions and molecular diagnostics in
57 allergic bronchopulmonary aspergillosis. *Allergy* 2017;72: 632–42.
- 58 6. Loi n° 2012-300 du 5 mars 2012. *Journal Officiel de la République Française* (2012).
- 59 7. Décret n° 2016-1537 du 16 novembre 2016. *Journal Officiel de la République Française* (2016).
- 60 8. Hamilton RG. Allergic sensitization is a key risk factor for but not synonymous with allergic
61 disease. *J Allergy Clin Immunol* 2014;134:360–1.
- 62 9. Hamilton RG. Clinical laboratories worldwide need to report IgE antibody results on clinical
63 specimens as analytical results and not use differential positive thresholds. *J Allergy Clin*
64 *Immunol* 2015;136:811–2.
- 65 10. Vitte J, Romain T, Carsin A, Gouitaa M, Stremier-Le Bel N, Baravalle-Einaudi M *et al.* *Aspergillus*
66 *fumigatus* components distinguish IgE but not IgG4 profiles between fungal sensitization and
67 allergic broncho-pulmonary aspergillosis. *Allergy* 2016;71: 640–3.

68

Group	Sample size	Age (years)	Sex ratio M/F	<i>Af</i> -specific IgE extract and molecular allergens (ImmunoCAP®, kU _A /L)						Total IgE (ImmunoCAP®, kIU/L)
				<i>Af</i>	Asp f 1	Asp f 2	Asp f 3	Asp f 4	Asp f 6	
All	10	54 (36-59)	0.7	39 (23-49)	100% (14;4-26)	100% (9;5-15)	100% (9;7-20)	100% (12;6-24)	90 (3;1-4)	2121 (1126-4361)
ABPA	Adult	8 57 (51-61)	0.3	43 (29-53)	100% (17;6-29)	100% (10;7-17)	100% (13;7-24)	100% (20;8-31)	88% (4;2-4)	3260 (1865-4433)
	Pediatric	2 12;12	2 M	23;32	100% (7;14)	100% (5;5)	100% (1;2)	100% (1;1)	100% (0.5;1)	573;783
All	38	24 (12-34)	0.8	4 (2-11)	100% (1;0.3-2)	87% (1;0.3-4)	37% (1;1-2)	42% (1;0.3-2)	24% (0.4;0.2-2)	236 (94-513)
<i>Af</i> -sensitized	Adult	24 31 (25-47)	0.7	3 (2-11)	100% (1;0.3-2)	88% (1;0.3-2)	42% (2;1-2)	42% (1;0.2-2)	33% (0.4;0.2-1)	174 (89-320)
	Pediatric	14 10 (8-12)	1	4 (1-11)	100% (0.5;0.2-2)	86% (1;0.3-6)	29% (1;0.4-3)	43% (1;0.5-2)	7% (1 positive result = 2.4 kU _A /L)	506 (162-878)
All	11	26 (11-40)	2.7	0	0	0	0	0	0	25 (13-35)
<i>Af</i> non-sensitized	Adult	7 39 (31-40)	6	0	0	0	0	0	0	30 (13-35)
	Pediatric	4 9 (3-15)	1	0	0	0	0	0	0	24 (19-76)

1 **Supplemental Table 1. Demographic, clinical and laboratory characteristics of the study population.**

- 2 Age, *Af*-specific IgE extract and total IgE levels are presented as median and IQR. *Af*-specific IgE molecular
3 allergens are presented as a positive sample ratio (percentage of results > 0.10 kU_A/L in the group), median and
4 IQR of the positive sample results. If n ≤ 2, each value is shown. *Af*, *Aspergillus fumigatus*; IQR, interquartile
5 range.
6

1

Age	Gender	WB major bands	WB minor bands	<i>Af</i> extract IgE (ImmunoCAP® kUA/L)	<i>Af</i> molecular allergens IgE (ImmunoCAP® kUA/L)	Total IgE (kIU/L)	Further information
10	M	B18-20	none	5.00	Asp f 1: 0.41	984	Primary sensitization to <i>Alternaria alternata</i> confirmed by Alt a 1-specific IgE (>100 kUA/L). Cross-reaction with <i>Af</i> extract.
6	F	none	none	1.96	Asp f 1: 0.22 Asp f 2: 1.05	64	
3	M	none	none	0.58	Asp f 1: 0.26	19	
18	M	B30	none	0.14	Asp f 1: 0.22	4	

2

3 **Supplemental Table 2** Error! Reference source not found.. **Characteristics of the four patients with discordant**
4 **results between the *Af*-IgE WB and ImmunoCAP® assays.** WB was considered positive if IgE binding was
5 detected with at least two bands. Four patients displayed either no band or one band upon WB analysis and
6 detectable ImmunoCAP specific IgE to *Af* extract and ribotoxin (Asp f 1). One patient was also sensitized to Asp
7 f 2.

1

	Sample size	Major bands							Minor bands						
		B16	B18-20	B22	B30	B10	B17	B27	B33	B34	B36	B37			
ABPA	10	4 (3;4)	4 (4;4)	3 (3;4)	4 (4;4)	2 (1;2)	3 (2;4)	0	1 (1;2)	1 (1;3)	3 (1;3)	3 (2;3)			
Af sensitized	38	1 (1;3)**	2 (1;4)**	2 (1;3)**	3 (1;4)**	1 (1;1)*	1 (1;2)*	1 (1;2)*	N = 2: 1 and 2						
Adult	24	1 (1;3)**	3 (2;4)*	2 (1;3)*	3 (1;4)**	N = 1: 1	N = 1: 1	1 (1;2)	N = 2: 1;2	N = 1: 2	1 (1;2)	1 (1;2)			
Pediatric	14	2 (1;3)	2 (1;3)**	1 (1;3)**	4 (2;4)	1 (1;1)*	N = 1: 2	0	1 (1;2)	N = 1: 1	1 (1;1)*	1 (1;1)*			
Af non-sensitized	11	N = 1: 1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0			

2

3 **Supplemental Table 3. Intensity of IgE binding as a function of clinical status and age.**

4 The intensity of IgE binding was classified from one (weakest) to four (strongest). Median and IQR values were calculated for the positive results. For groups with positive
 5 results for one or two bands, individual data are presented instead of the median and IQR values. The mean summed intensity was 29 for ABPA and 8 for Af-sensitized
 6 patients. Figures in bold denote significant differences between Af-sensitized subjects and ABPA. Statistical significance flags for p-values: less than 0.05, one star (*); less
 7 than 0.01, two stars (**); less than 0.001, three stars (***). ABPA, allergic bronchopulmonary aspergillosis; Af, *Aspergillus fumigatus*; IQR, interquartile range.

2.3. Perspectives

Ce travail reste préliminaire et doit encore être approfondi. Deux axes de travail sont actuellement en cours :

- D'une part, continuer à améliorer les performances du kit en augmentant la lisibilité du profil grâce à une modification des transferts utilisés.
- D'autre part, confirmer à plus grande échelle, lors d'essais multicentriques, les performances établies lors de l'étude préliminaire. Il faut en particulier confirmer ou infirmer le potentiel du profil WB typique de l'ABPA, ainsi que la spécificité du WB par rapport aux autres espèces fongiques. D'ores et déjà, les premiers essais ont commencé sur une petite cohorte complémentaire de patients ne souffrant pas de mucoviscidose mais présentant une sensibilisation aspergillaire sans pas d'ABPA, par la suite nous vérifierons si le profil de sensibilisation se retrouve bien dans l'ensemble des cas de sensibilisation, et qu'il n'y a pas une réactivité spécifique chez les patients atteints de mucoviscidose par rapport aux patients issus d'autres contextes, en particulier l'asthme.

3. Diagnostic des aspergilloses chroniques par technique d'immunochromatographie

3.1. Contexte et résumé du projet

De nombreux patients souffrent de maladies liées aux champignons du genre *Aspergillus*. La très grande majorité de ces patients présentent des formes chroniques, difficiles à diagnostiquer car leurs tableaux cliniques sont peu spécifiques. De ce fait, la détection d'une sérologie positive pour *Aspergillus fumigatus* reste aujourd'hui l'un des principaux marqueurs diagnostiques de ces maladies. Or, ces patients sont plus nombreux dans les pays en voie de développement.

Les techniques ELISA de sérologie aspergillaire présentent de graves inconvénients dans un tel contexte : en effet, elles nécessitent une alimentation électrique et l'utilisation d'automates onéreux ; de plus elles font appel à des réactifs qui doivent généralement être conservés à 4°C, et donc imposent une couverture électrique stable. De ce fait, ces techniques ne peuvent pas être mises en place dans des environnements aux moyens limités, tels qu'ils peuvent exister dans les pays en voie de développement.

Pour leur part, les techniques d'immunodiffusion sont complexes à mettre en œuvre et demandent des techniciens confirmés, ainsi que le maintien d'un approvisionnement en antigène ou sa production au sein du laboratoire (avec les risques de non reproductibilité inhérents à la production d'antigène), ce qui fait qu'elles ne sont accessibles qu'à des centres de référence.

Or, l'aspergillose pulmonaire chronique (APC) est une complication fréquente de la tuberculose, qui est une maladie endémique de nombreux pays en voie de développement. Il est donc probable que la majorité des cas d'APC se trouvent dans les mêmes régions¹⁹. Faute de moyens, ces patients ne sont pas diagnostiqués, et le risque de morbidité ou de mortalité est donc élevé. Des demandes de développement de tests diagnostiques répondant aux critères ASSURED (Abordables, Sensibles, Spécifiques, faciles d'Utilisation, Robustes, ne demandant pas d'Équipement, et Disponibles partout dans le monde) sont effectivement émises de manière répétée par les équipes spécialisées dans le domaine²⁴⁰. Nous présentons ici le résultat du développement d'un test rapide immunochromatographique répondant à l'ensemble de ces critères.

Ce test est composé de (voir paragraphe 1.7.1 pour la composition générale d'un test ICT) :

- Un *conjugate pad* imprégné de particules de latex noires couplées à de l'antigène aspergillaire (extrait de culture purifié) et de particules de latex bleues couplées à des anticorps de chèvre anti-anticorps de lapin.
- Sur la nitrocellulose, de deux bandes, constituées d'une part, d'un dépôt du même antigène aspergillaire que celui utilisé sur les particules de latex (bande test), et de l'autre d'anticorps de lapin (bande contrôle).

L'antigène aspergillaire utilisé est le même que celui utilisé dans le western blot LDBIO Diagnostics mais il a subi des étapes de purification supplémentaires développées spécifiquement pour le kit.

Développement de tests de diagnostic in vitro appliqués au sérodiagnostic des infections fongiques par western blot et immunochromatographie

Le kit a été évalué selon trois critères : sa reproductibilité, sa robustesse et ses performances. Les évaluations sont conduites et menées selon les bonnes pratiques de fabrication telles que définies dans les normes ISO 13485 et ISO 13485. Le respect de ces normes est une étape indispensable afin de prouver que le kit répond aux standards de qualité de l'industrie du diagnostic, et peut répondre aux attentes des biologistes et personnel soignants amenés à utiliser ces tests.

Trois lots « d'essai » ont été produits pour permettre l'évaluation du kit. Ces lots correspondent à des lots pilotes fabriqués avant la mise sur le marché du kit pour valider le processus de production mais également faire son évaluation.

La reproductibilité du kit a été évaluée sur une série de 16 sérums positifs et 65 sérums négatifs. Les trois lots d'essai ont été comparés. L'intensité de réaction des sérums positifs a été évaluée visuellement. Elle était la même pour les trois lots. De plus, l'ensemble des sérums négatifs l'ont été sur tous les lots.

Les essais de robustesse ont permis de s'assurer que le kit puisse fonctionner dans un laboratoire en brousse. Des essais de stabilité à plusieurs températures, de résistance à des stress thermiques et d'utilisation dans des environnements raisonnablement prévisibles ont donc été menés. Une série de 5 sérums connus présentant des intensités de réaction caractérisées sur plusieurs lots a été utilisée en même temps sur des cassettes ayant été soumises au stress considéré et sur des cassettes de même lot ayant été conservées à +4°C.

La stabilité a été évaluée en contrôlant les résultats donnés par le kit dans le temps et sur plusieurs lots. Les résultats sont restés stables pendant une durée supérieure à 18 mois à 4°C ou une durée d'au moins quatre mois à 37°C.

Les essais de stress ont consisté à soumettre le kit à trois stress différents : d'abord une congélation puis 2 jours à 50°C, ou quatre jours à 50°C ou 14 jours à 42°C. Ces stress ont été imaginés pour simuler des conditions d'acheminement complexes qui peuvent parfois être rencontrées dans des secteurs reculés. Les résultats du kit n'ont été impactés par aucune condition.

Enfin, les résultats du kit ont été comparés entre une utilisation à 23°C avec une humidité relative d'environ 50% (telle que retrouvée dans la plupart des laboratoires climatisés) et celle à 37°C avec une humidité relative inférieure à 30%, pour simuler une atmosphère désertique, ou à 100%, pour simuler des conditions tropicales. Les performances du test n'ont pas été affectées par ces conditions climatiques extrêmes.

L'évaluation des performances diagnostiques du kit a été réalisée en deux études : une étude monocentrique prospective et une étude multicentrique rétrospective. Les performances de l'ICT y ont été comparées au diagnostic basé sur les éléments des dossiers patients, d'une part, et au western blot LDBIO Diagnostics, d'autre part. Les patients ont été classés en fonction des maladies aspergillaires suivantes : ABPA, APC, colonisation chronique pour les patients atteints de mucoviscidose, aspergillose invasive ou semi-invasive, et une catégorie regroupant toutes les formes extra-pulmonaires (abcès, balles sinusiennes). Les caractéristiques clinico-biologiques des patients sont résumées à l'annexe 5.

L'étude prospective a été menée sur quatre mois, de Juillet à Octobre 2017 à l'hôpital de la Timone à Marseille. Au total, 263 patients ont été enrôlés dans l'étude : 44 cas et 219 témoins négatifs. L'ICT a été positive dans 40 des 44 cas (sensibilité de 90,9%) et négative pour 211 des 219 témoins négatifs (spécificité de 96,3%). Le WB n'a pas été réalisé sur deux cas et cinq témoins négatifs en raison

Développement de tests de diagnostic in vitro appliqués au sérodiagnostic des infections fongiques par western blot et immunochromatographie

d'un volume de sérum insuffisant, et a montré une sensibilité de 85,7% (36/42) et une spécificité de 89,7% (192/214). L'étude rétrospective a été menée dans les CHU de Bordeaux, Toulouse, Marseille, Montpellier et Rennes. Elle a permis d'augmenter fortement le nombre de cas mais aussi d'étudier certaines populations à risque de réactions faussement positives, en particulier les patients présentant un facteur rhumatoïde ou des anticorps anti-nucléaires, souvent impliqués dans des réactions croisées en sérologie. Au total, 262 cas et 188 contrôles ont été inclus. L'ICT a été positive pour 232 cas et négative pour 181 contrôles (sensibilité de 88,5% et spécificité de 96,3%). Le WB a été positif pour 247 cas et négatif pour 187 contrôles (sensibilité de 94,3% et spécificité de 99,5%).

Au total, sur les 306 cas et 407 contrôles, l'ICT a eu une sensibilité de 88,9% et une spécificité de 96,3% tandis que le WB a eu une sensibilité de 93,1% et une spécificité de 94,3%.

Les performances de l'ICT ont donc été très proches de celles du WB. En regardant plus attentivement les cas d'APC (78 cas), l'ICT a eu une sensibilité de 92%, ce qui est au niveau de celles d'autres techniques sérologiques dans le même contexte : sur une population de 241 cas d'APC, Page avait trouvé une sensibilité à 90% pour l'Elisa Serion et à 96% pour l'ImmunoCap® et l'Immulite®¹⁸.

3.2. Article

L'article intitulé *Multicenter evaluation of a novel immunochromatographic test for anti-Aspergillus IgG detection* a été soumis le 24/10/2018 à *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* (impact factor 4.3) et est actuellement *under review*.

Multicenter evaluation of a novel immunochromatographic test for anti-Aspergillus IgG detection

Raphaël P. Piarroux^{1, 2*}, Thomas Romain², Aurélie Martin², Damien Vainqueur³, Joana Vitte², Laurence Lachaud^{4, 5}, Jean-Pierre Gangneux^{6, 7, 8}, Frederic Gabriel⁹, Judith Fillaux^{3, 10}, Stéphane Ranque²

¹Ldbio Diagnostics, France, ²Vitrome, IHU Mediterranee Infection, France, ³Service de Parasitologie-Mycologie, Centre Hospitalier Universitaire (CHU) de Toulouse, France, ⁴Université de Montpellier, France, ⁵Service de parasitologie-mycologie, Centre Hospitalier Universitaire de Montpellier, France, ⁶Centre Hospitalier Universitaire (CHU) de Rennes, France, ⁷University of Rennes 1, France, ⁸INSERM U1085 Institut de Recherche en Santé, Environnement et Travail, France, ⁹Service de parasitologie-mycologie, Centre Hospitalier Universitaire (CHU) de Bordeaux, France, ¹⁰IRD UMR152 Pharmacochimie et Biologie Pour le Développement, France

Submitted to Journal:

Frontiers in Cellular and Infection Microbiology

Specialty Section:

Clinical Microbiology

Article type:

Original Research Article

Manuscript ID:

430045

Received on:

10 Oct 2018

Frontiers website link:

www.frontiersin.org

Conflict of interest statement

The authors declare a potential conflict of interest and state it below

RP is a Ph.D. student currently employed at LDBIO. SR received travel grants in relation to this work. All other authors have nothing to declare.

This work was sponsored by LDBIO. LDBIO participated in the study design but did not interfere with the analysis or conclusions reported. LDBIO provided for free the ICT test and part of the IB (Marseille, Rennes, 50% of Toulouse).

Author contribution statement

Designed the experiment: RP, SR

Conducted the test: RP, TR, AM, DV

Reviewed medical files - prospective study: TR, AM, SR

Reviewed medical files - retrospective study: DV, JV, LL, FG, JF, JPG, SR

Wrote the manuscript: RP, SR

Approved final version: all authors

Keywords

Immunochromatography, Aspergillus serology, Point-of-care, Chronic pulmonary aspergillosis, Allergic bronchopulmonary aspergillosis, Sensitivity, specificity

Abstract

Word count: 249

Aspergillus sp. fungi cause various diseases in both immunocompetent and immunocompromised patients. The most frequent Aspergillus disorders include chronic pulmonary aspergillosis (CPA), a life-threatening disease that affects at least 3 million people worldwide, and allergic bronchopulmonary aspergillosis (ABPA), which affects approximately 4.8 million severe asthmatic patients globally. Diagnosis of such diseases involves IgG serological testing; however, the currently available anti-Aspergillus IgG detection assays are inappropriate for resource-poor laboratory settings, as they are expensive, rely on automated procedures, and require stable electrical power. Therefore, accurate CPA or ABPA diagnosis facilities are lacking in most low- and middle-income countries.

We evaluated a novel anti-Aspergillus antibody immunochromatographic test (ICT) that requires minimal laboratory equipment. Two evaluations were performed: a single-center four-month prospective study in a French reference laboratory (44 cases /257 patients) and a retrospective study in five French reference laboratories (262 cases and 188 controls). We estimated the ICT indices for the diagnosis of chronic aspergillosis, and the test results were compared to those of anti-Aspergillus IgG immunoblot (IB) assay.

Of the 713 patients included in the study, 306 had chronic aspergillosis. Test sensitivity and specificity were 88.9% (95%CI[85-92]) and 96.3% (95%CI[94-98]) for the ICT and 93.1% (95%CI[90-96]) and 94.3% (95%CI[92-96]) for the IB, respectively. Agreement between the two assays was almost perfect ($\kappa=0.86$).

As this ICT displays good diagnostic performance and complies with the ASSURED (Affordable, Sensitive, Specific, User-friendly, Equipment-free and Delivered) criteria, we concluded that this anti-Aspergillus antibody ICT can be used to diagnose Aspergillus diseases in resource-poor settings.

Funding statement

This work was sponsored by LDBIO. LDBIO participated in the study design but did not interfere with the analysis or conclusions reported herein. LDBIO provided for free the ICTs for the study. LDBIO also donated the IB assays for Marseille and Rennes and 50% of the IB assays for Toulouse.

Ethics statements

(Authors are required to state the ethical considerations of their study in the manuscript, including for cases where the study was exempt from ethical approval procedures)

Does the study presented in the manuscript involve human or animal subjects: Yes

Please provide the complete ethics statement for your manuscript. Note that the statement will be directly added to the manuscript file for peer-review, and should include the following information:

- Full name of the ethics committee that approved the study
- Consent procedure used for human participants or for animal owners
- Any additional considerations of the study in cases where vulnerable populations were involved, for example minors, persons with disabilities or endangered animal species

As per the *Frontiers authors guidelines*, you are required to use the following format for statements involving human subjects: This study was carried out in accordance with the recommendations of [name of guidelines], [name of committee]. The protocol was approved by the [name of committee]. All subjects gave written informed consent in accordance with the Declaration of Helsinki.

For statements involving animal subjects, please use:

This study was carried out in accordance with the recommendations of 'name of guidelines, name of committee'. The protocol was approved by the 'name of committee'.

If the study was exempt from one or more of the above requirements, please provide a statement with the reason for the exemption(s).

Ensure that your statement is phrased in a complete way, with clear and concise sentences.

Aspergillus serology was performed during routine laboratory work-up for the patients who received written laboratory reports. The IB and ICT assays were performed using excess serum. Patient characteristics were obtained from a non-interventional review of medical charts and laboratory results. According to French law, the patients were informed and retained the right to oppose the use of their anonymized medical data for research purposes. Dedicated ethical approval and individual patient consent were not necessary for this type of study (Loi n° 2012-300 du 5 mars 2012. Journal Officiel de la République Française and Décret n° 2016-1537 du 16 novembre 2016, journal officiel de la république française). Patient data were anonymized as required by the French regulatory authorities (CNIL authorization n° 2151008).

Data availability statement

Generated Statement: The datasets generated for this study are available on request to the corresponding author.

Multicenter evaluation of a novel immunochromatographic test for anti-*Aspergillus* IgG detection

Running title: New *Aspergillus* serology immunochromatographic test

Raphaël Piarroux^{1,2,*}, Thomas Romain³, Aurélie Martin³, Damien Vainqueur⁴, Joana Vitte⁵, Laurence Lachaud^{6,7}, Jean-Pierre Gangneux⁸, Frédéric Gabriel⁹, Judith Fillaux^{5,10}, Stéphane Ranque^{2,3}

1 LDBIO Diagnostics, Lyon, France

2 APHM, IRD, SSA, VITROME, IHU-Méditerranée Infection, Marseille, France

3 Aix-Marseille Université, APHM, Parasitologie-Mycologie, IHU Méditerranée Infection, Marseille, France

4 Service de Parasitologie – Mycologie, CHU de Toulouse, France

5 Aix-Marseille Université, APHM, MEPHI, IHU Méditerranée Infection, Marseille, France

6 CHU de Montpellier, Montpellier, France

7 Université de Montpellier, Montpellier, France

8 Université de Rennes, CHU de Rennes, Inserm, EHESP, Institut de recherche en santé, environnement et travail, UMR_S 1085, Rennes, France

9 CHU Bordeaux, Laboratoire de Parasitologie-Mycologie, F-33000 Bordeaux, France

10 PHARMA-DEV, IRD UMR 152, Université Paul Sabatier, Toulouse, France

* Corresponding author:

Raphael Piarroux, VITROME, IHU Méditerranée Infection, 19-21 Boulevard Jean Moulin, 13005 Marseille, France. Phone: + 33 (0) 4 13 73 24 01. Fax: + 33 (0) 4 13 73 24 02. E-mail address: rpiarroux@ldbiodiag.com

Keywords: Immunochromatography, *Aspergillus* serology, point-of-care, chronic pulmonary aspergillosis, allergic broncho-pulmonary aspergillosis, sensitivity, specificity

28 Abstract

29 *Aspergillus* sp. fungi cause various diseases in both immunocompetent and
30 immunocompromised patients. The most frequent *Aspergillus* disorders include chronic
31 pulmonary aspergillosis (CPA), a life-threatening disease that affects at least 3 million people
32 worldwide, and allergic bronchopulmonary aspergillosis (ABPA), which affects approximately
33 4.8 million severe asthmatic patients globally. Diagnosis of such diseases involves IgG
34 serological testing; however, the currently available anti-*Aspergillus* IgG detection assays are
35 inappropriate for resource-poor laboratory settings, as they are expensive, rely on automated
36 procedures, and require stable electrical power. Therefore, accurate CPA or ABPA diagnosis
37 facilities are lacking in most low- and middle-income countries.

38

39 We evaluated a novel anti-*Aspergillus* antibody immunochromatographic test (ICT) that
40 requires minimal laboratory equipment. Two evaluations were performed: a single-center four-
41 month prospective study in a French reference laboratory (44 cases /257 patients) and a
42 retrospective study in five French reference laboratories (262 cases and 188 controls). We
43 estimated the ICT indices for the diagnosis of chronic aspergillosis, and the test results were
44 compared to those of anti-*Aspergillus* IgG immunoblot (IB) assay.

45

46 Of the 713 patients included in the study, 306 had chronic aspergillosis. Test sensitivity and
47 specificity were 88.9% (95%CI[85-92]) and 96.3% (95%CI[94-98]) for the ICT and 93.1%
48 (95%CI[90-96]) and 94.3% (95%CI[92-96]) for the IB, respectively. Agreement between the two
49 assays was almost perfect ($\kappa=0.86$).

50

51 As this ICT displays good diagnostic performance and complies with the ASSURED
52 (Affordable, Sensitive, Specific, User-friendly, Equipment-free and Delivered) criteria, we
53 concluded that this anti-*Aspergillus* antibody ICT can be used to diagnose *Aspergillus* diseases
54 in resource-poor settings.

55 1. Introduction

56 *Aspergillus fumigatus* (*Af*) is a ubiquitous mould that spreads via airborne spores. Inhaled
57 spores are usually cleared from the airway by the mucociliary transport and innate immune
58 systems. However, in certain frail patients, the fungus can cause various diseases, which are
59 classified into six major groups: transient or chronic colonization, immune-allergic
60 sensitization, chronic pulmonary aspergillosis (CPA), allergic bronchopulmonary aspergillosis
61 (ABPA), non-pulmonary localized aspergillosis, invasive aspergillosis (IA), and sub-acute
62 invasive aspergillosis (SAIA) (1).

63

64 Most forms of aspergillosis are observed in immunocompetent patients with chronic lung
65 diseases, with the exception of IA and SAIA, which only occur in moderately or severely
66 immunocompromised patients. CPA usually occurs in patients with pre-existing cavitary lung
67 lesions, such as tuberculosis sequels. ABPA primarily occurs in asthmatic or cystic fibrosis
68 patients. The worldwide prevalence of aspergillosis is approximately 8 million, predominantly
69 including cases of ABPA (4.8 million) (2,3) and CPA (3 million, including 1.6 million post-
70 tuberculosis cases) (4,5). Although most patients are diagnosed in high-income countries, it has

71 been estimated that the prevalence is higher in middle- to low-income countries (5). In France,
72 most cases are immunoallergic forms, with approximately 95,000 cases of ABPA (6).

73

74 *Aspergillus*-related disease symptoms are heterogeneous and may be confused with many other
75 pulmonary conditions. Therefore, the diagnosis of *Aspergillus*-related diseases is complex and
76 relies on the combination of positive serology results with compatible clinical symptoms and
77 radiological findings (7). To detect anti-*Aspergillus* antibodies, various serological techniques
78 are currently available, ranging from precipitin-based techniques, such as
79 immunoelectrophoresis (IEP), to automated ELISA or immunoblot (IB). However, assay
80 performance varies greatly and discrepancies are common between the various techniques, as
81 recently demonstrated by Page *et al.* (4). This heterogeneity may be explained by the variability
82 of antigens (either culture extract or recombinants) and/or type of assay reaction (ELISA, IEP,
83 or IB). While other techniques detect only one IgG isotype, precipitin-based techniques are also
84 capable of detecting both IgA and IgM. This distinction might explain why some patient results
85 yield a positive precipitin test and a negative IgG test. Although, precipitin-based assays have
86 a relatively lower sensitivity compared with other assays (8). Furthermore, as such techniques
87 are either expensive, require a stable electrical source, or involve complex automated systems,
88 none of the currently available techniques are suited for resource-poor settings. Therefore, the
89 capacity to properly diagnose *Aspergillus*-related diseases is significantly limited in the
90 countries where it is most needed (5). Immunochromatographic tests (ICT) are easy to both use
91 and read (usually via the naked eye). As such assays require minimal equipment, are less
92 expensive than typical serological assays, and can be performed in small series, they are highly
93 suited for resource-poor settings. However, to our knowledge, no ICT assays are currently
94 available for the serological diagnosis of *Aspergillus* diseases, despite repeated demands (9,10).

95

96 This study aimed to evaluate anti-*Aspergillus* antibody detection in serum samples using a novel
97 ICT assay. This test uses colored latex particles that enable the detection of anti-*Aspergillus*
98 IgG via the naked eye. The diagnostic performance of the ICT was evaluated on patient samples
99 corresponding to various *Aspergillus*-associated diseases and then compared with the IB results.

100 2. Materials and methods

101 2.1. Inclusion criteria

102 Two studies were performed: a single- prospective study and a retrospective multicenter study.
103 In both studies, only patients of at least 18 years of age were included. Patient medical history
104 files, including routine serological test results, were first screened by a medical mycology
105 expert. If a conclusion could not be reached by the expert, a decision was then made by
106 consensus with a second expert. The prospective study was conducted at the University Hospital
107 la Timone in Marseille, France. All sera received for *Aspergillus* serology from July 2017 to
108 late-October 2017 were also tested with the new ICT in parallel with the routine techniques. All
109 samples of sufficient volume were retrospectively tested via IB assay; a total of seven samples
110 lacked ample volume for IB as further detailed. The retrospective study was conducted in five
111 French university hospitals, located in Bordeaux, Marseille, Montpellier, Rennes and Toulouse.
112 All centers included samples from patients with *Aspergillus* disease. Bordeaux, Marseille and
113 Toulouse also included control sera, which were derived from patients for whom the diagnosis
114 of *Aspergillus* disease had been excluded. All tested sera were collected between 2015 and
115 2018. To carry out the ICT and IB assays, including potential duplicates, a sample volume of

116 200µL was required. Both IB and ICT assays were performed and interpreted blindly and
117 anonymously.

118 2.2. Case definition

119 The following *Aspergillus* diseases were considered:

- 120 • Colonization was defined by two *Aspergillus* sp.-positive cultures from respiratory
121 samples collected between ≥ 10 days apart and ≤ 6 months apart in a patient who did not
122 meet other *Aspergillus*-related disease criterion.
- 123 • ABPA was defined according to Agarwal *et al.* (11) as follows: elevated total IgE levels
124 and elevated (>0.1 kU/l) *Af*-specific serum-IgE levels using the ImmunoCap® assay.
125 The patient had either asthma or cystic fibrosis and at least one of the following
126 elements: positive anti-*Aspergillus* IgG, *Aspergillus* colonization or compatible
127 imaging.
- 128 • CPA was defined according to Denning *et al.* (7) as follows: lung fungus ball and/or
129 irregular intraluminal material and/or fibrotic destruction in one or more pulmonary lobe
130 as shown via radiology and positive serology, culture-positive broncho-alveolar lavage
131 or positive histological examination.
- 132 • IA was defined according to the proven/probable EORTC/MSG criteria (12). For the
133 diagnosis of SAIA, underlying clinical conditions were extended to include less severe
134 immunosuppression, such as intensive care unit admission, and evolution of symptoms
135 over one month.
- 136 • Other proven localized aspergillosis, such as histologically confirmed *Aspergillus*
137 abscesses or fungal sinusitis, were also considered. For fungal sinusitis, invasive, non-
138 invasive and allergic forms were included according to Chakrabarti and Kaur (13).

139

140 Control definitions:

141 Prospective study: patients who did not correspond to any of the case definitions above were
142 considered non-*Aspergillus* disease patients.

143 Retrospective study, negative controls were selected as follows:

- 144 - In Bordeaux, sera collected from patients who underwent *Aspergillus* serology
145 assessment but did not correspond to any of the case definitions above were used as
146 negative controls.
- 147 - In Toulouse, sera collected from patients who had been screened before solid organ
148 transplantation and displayed no marker of *Af* disease.
- 149 - In Marseille, sera derived from patients with other pulmonary infectious diseases,
150 rheumatoid factor or anti-nuclear antibodies were selected to assess potential ICT cross-
151 reaction.

152

153 2.3. Serological techniques

154 2.3.1. Routine techniques

155 All commercialized techniques were used and interpreted according to manufacturer's
156 instructions. Each center used its own routine laboratory assays to detect anti-*Aspergillus* IgG
157 antibodies:

- 158 • Marseille: IEP (in-house, threshold: one precipitin band) and ELISA Serion®
159 (Würzburg, Germany).
- 160 • Montpellier: ELISA Bio-Rad® (Marnes-la-Coquette, France), followed by
161 confirmation of positive and equivocal results via IB using *Aspergillus* WB IgG
162 (LDBIO Diagnostics, Lyon, France).
- 163 • Bordeaux: ELISA Bio-Rad and IB LDBIO.
- 164 • Toulouse: ELISA Serion and IEP (in-house, somatic and metabolic *Af* antigens,
165 threshold: three bands for at least one of the two antigens).
- 166 • Rennes: ELISA Bio-Rad and IEP (in-house, threshold: two bands or catalase activity).

167 2.3.2. Immunochromatographic test

168 The ICTs were provided by LDBIO. The composition of the test is detailed in the instructions
169 provided with the kit and available online (14).

170

171 The ICT was performed as follows: 15 µL of sample (serum or plasma) followed by four drops
172 of the elution solution (provided with the kit) were aliquoted into the cassette sample well. The
173 results were read between 20 and 30 minutes after adding the elution solution. The result was
174 considered positive if a grey or black line was visible under the “T” marker; otherwise, the
175 sample was considered negative. The test result was considered invalid if the blue “C” line did
176 not appear. Examples of positive and negative ICT results are illustrated in Figure 1.

177 2.3.3. Immunoblot

178 All IBs were performed and interpreted according to the manufacturer’s instruction. An
179 example of a positive IB result is provided in Figure 1. When IB assays were performed during
180 routine laboratory workup (Montpellier, Bordeaux), the results were collected from the hospital
181 Laboratory Information Management System. The IBs were performed on site in Toulouse. The
182 IBs were performed at LDBIO for Marseille and Rennes.

183 2.4. Statistical analysis

184 The sensitivity and specificity of the ICT and IB were calculated for the prospective and
185 retrospective study populations as well as the overall population. For the prospective study,
186 positive and negative predictive values were calculated for the ICT and IB. We calculated the
187 95% confidence intervals (95%CI) using binomial law (15). For both tests, the Diagnostic Odds
188 Ratio (DOR) and corresponding 95%CI (16), Number needed to diagnose and misdiagnose (17)
189 were calculated for the overall population.

190

191 The strength of agreement between the ICT and IB was measured using the Cohen’s kappa (18)
192 with the following scale: 0-0.2, very weak agreement; 0.21-0.4, weak agreement; 0.41-0.6,
193 moderate agreement; 0.61-0.8, strong agreement; and 0.81-1, almost perfect agreement (19).

194

195 All other comparisons were performed using the chi-squared test.

196 2.5. Ethical considerations

197 *Aspergillus* serology was performed during routine laboratory work-up for the patients who
198 received written laboratory reports. The IB and ICT assays were performed using excess serum.
199 Patient characteristics were obtained from a non-interventional review of medical charts and
200 laboratory results. According to French law, the patients were informed and retained the right

201 to oppose the use of their anonymized medical data for research purposes. Dedicated ethical
202 approval and individual patient consent were not necessary for this type of study (20,21). Patient
203 data were anonymized as required by the French regulatory authorities (CNIL authorization
204 n°2151008).

205 3. Results

206 3.1. Patient recruitment

207 In the prospective study, *Aspergillus* serology was performed for 276 patients in Marseille
208 during the four-month period; 13 patients were excluded because they were less than 18 years
209 of age. Of the 263 remaining samples, 44 were classified as having *Aspergillus* disease, while
210 219 samples were classified as controls. Patient distribution is detailed in Table 1. Due to
211 limited sample volume, seven samples could not be tested by IB (two colonization and five
212 negative samples).

213

214 Retrospective study: 262 sera from patients with aspergillosis and 188 controls were selected.
215 Study populations and *Aspergillus* disease distribution per center are detailed in Table 1.

216 3.2. ICT results

217 The blue “C” line was visible for all cassettes; thus, all tests were interpretable. In the
218 prospective study population, the ICT was positive in 40 of 44 cases, with 90.9% (95%CI [78.3-
219 97.5%]) sensitivity, while the ICT was negative in 211 of 219 controls, with 96.3% (95%CI
220 [92.9-98.4%]) specificity. The positive predictive value was 83.3% (95%CI [69.8% – 92.5%]),
221 and the negative predictive value was 98.1% (95%CI [95.3% - 99.5%]).

222

223 In the retrospective study, the ICT showed 88.5% sensitivity (95%CI [84.1-92.1%]) and 96.3%
224 (95%CI [92.5-98.5%]) specificity. Notably, of the 43 sera tested for potential cross-reaction, only
225 one rheumatoid factor-positive serum yielded a positive ICT result. No cross-reaction was
226 detected in the sera of patients infected with other etiological agents of pneumonia nor in those
227 with anti-nuclear antibodies.

228

229 The differences between the diagnostic indices measured in the prospective and retrospective
230 study were not statistically significant (p=0.64).

231

232 In the global study population, the ICT showed 88.9% sensitivity (95%CI: [84.8-92.2%]), 96.3%
233 specificity (95%CI [94.0-97.9%]), and a high DOR of 209 (95%CI: [112-391]) (Table 2). The
234 number needed to diagnose and to misdiagnose were 1.04 and 14.5, respectively.

235 3.3. IB results

236 In the prospective study population, the IB showed good sensitivity (36/42, 85.7%, 95%CI [71.5-
237 94.6%]) and specificity (192/214, 89.7%, 95%CI [84.9-93.4%]). The positive predictive value
238 was 62.1% (95%CI [48.4% – 74.5%]), and the negative predictive value was 97.0% (95%CI
239 [93.5% - 98.9%]).

240

241 Retrospective study: the IB showed 94.3% sensitivity (95CI [90.7-96.7%]) and 99.5%
242 specificity (95CI [97.1-100%]).

243

244 In the global study population, the IB assay had 93.1% sensitivity (95CI: [89.6-95.7%]), 94.3%
245 specificity (95CI [91.5-96.3%]), and a high DOR of 222 (95%CI: [121-409]) (Table 2). The
246 number needed to diagnose and to misdiagnose were 1.1 and 16, respectively.

247 3.4. Comparison of diagnostic indices between different forms of *Aspergillus* disease

248 The comparison of diagnostic indices between the different forms of *Aspergillus* disease was
249 performed on the global study population. The results are summarized in Table 3. Briefly, the
250 ICT had a lower sensitivity for the diagnosis of IA-SAIA than for ABPA ($p<0.001$), CPA
251 ($p=0.0014$) or colonization ($p=0.006$). No other statistically significant difference was
252 identified. Similarly, the IB assay showed a lower sensitivity for the diagnosis of IA-SAIA than
253 for ABPA ($p<0.001$) or CPA ($p<0.001$), the IB assay also showed lower sensitivity for the
254 diagnosis of colonization than for ABPA ($p=0.009$) or CPA ($p=0.007$).

255 3.5. Comparison of the ICT and IB

256 Test sensitivity did not significantly differ between the ICT and IB in the prospective and
257 overall study populations nor for the diagnosis of each distinct *Aspergillus* disease. The
258 specificity of the ICT was significantly higher in the prospective study populations ($p=0.007$)
259 but not in the global study population ($p=0.17$).

260

261 The ICT and IB results were consistent in 657 of 706 samples (93%); the kappa coefficient was
262 0.858 (95%CI [0,819-0,896]), indicating an almost perfect agreement.

263 4. Discussion

264 This novel anti-*Aspergillus* IgG ICT showed very good sensitivity (88.9%) and specificity
265 (96.3%) for the diagnosis of *Aspergillus* diseases. The sensitivity was however lower for the
266 diagnosis of acute and sub-acute forms of *Aspergillus* disease than for the other forms. One
267 explanation might be that patients presenting with acute and sub-acute forms usually display a
268 greater degree of immunosuppression than patients presenting with the other clinical forms, and
269 thus might have lower serum antibody levels (7).

270

271 In our study, the ICT and IB results were comparable to those of others studies, using various
272 techniques for anti-*Aspergillus* IgG detection, as shown in Table 4. Notably, the cut-off used
273 for ELISA-based techniques are heterogeneous among studies. This difference is due to a high
274 variation in antibody levels in the control group. For instance, a 20 mg/l cut-off yielded 98%
275 specificity for Ugandan blood donors, whereas a 50 mg/l cut-off was required for European
276 controls (4,22). ICT specificity should also be assessed in other countries and populations, as
277 our study was only carried out in France on a hospital-based population of patients who are at
278 risk of aspergillosis.

279

280 Finally, the ICT complies with the ASSURED criteria (23) in that the assay requires minimal
281 laboratory equipment, is easy to use (interpretation via the naked eye), has good sensitivity and
282 specificity, and operates under tropical or desert conditions (tested under 100% and 30%
283 relative humidity, 37°C; data not shown). The assay can be stored at ambient temperature for

284 at least two months after initial storage at 2-8°C before use and can therefore be used in
285 environments with no reliable power source. The test could be used in resource-poor settings
286 in complement to CT-scan (when available) or chest X-ray, when CT-Scan is not available.

287 5. List of abbreviations

288 ABPA Allergic broncho-pulmonary aspergillosis

289 CPA Chronic pulmonary aspergillosis

290 IA Invasive Aspergillosis

291 IB Immunoblot

292 ICT Immunochromatographic test

293 IEP Immunoelectrophoresis

294 SAIA Sub-acute invasive aspergillosis

295

296 6. Acknowledgment

297 We are grateful to S. Moore for English language editing.

298

299 This work was sponsored by LDBIO. LDBIO participated in the study design but did not
300 interfere with the analysis or conclusions reported herein. LDBIO provided for free the ICTs
301 for the study. LDBIO also donated the IB assays for Marseille and Rennes and 50% of the IB
302 assays for Toulouse.

303

304 The authors gratefully acknowledge Nathalie Bardin for providing the sera from patients with
305 rheumatoid factor and anti-nuclear antibodies and Sophie Baron for preparing the prospective
306 study samples for IB analysis.

307

308 This work was partially presented in the 8th Advance of Aspergillosis (poster 113), the 2018
309 congress of the Société Française de Mycologie Médicale (poster MP004) and the 2018 congres
310 of the International Society of Human and Animal Mycology (PP1.004).

311 7. Conflict of interest

312 RP is a Ph.D. student currently employed at LDBIO. SR received travel grants in relation to
313 this work. All others authors have nothing to declare.

314 8. Author contribution

315 Designed the experiment: RP, SR

316 Conducted the test: RP, TR, AM, DV

317 Reviewed medical files – prospective study: TR, AM, SR

318 Reviewed medical files – retrospective study: DV, JV, LL, FG, JF, JPG, SR

319 Wrote the manuscript: RP, SR

320 Approved final version: all authors

321 9. Bibliography

- 322 1. Barnes PD, Marr KA. Aspergillosis: spectrum of disease, diagnosis, and treatment.
323 *Infect Dis Clin North Am.* 2006;20(3):545-61, vi.
- 324 2. Maturu VN, Agarwal R. Prevalence of *Aspergillus* sensitization and allergic
325 bronchopulmonary aspergillosis in cystic fibrosis: systematic review and meta-analysis. *Clin*
326 *Exp Allergy J Br Soc Allergy Clin Immunol.* 2015; 45(12):1765-78.
- 327 3. Carsin A, Romain T, Ranque S, Reynaud-Gaubert M, Dubus J-C, Mège J-L, et al.
328 *Aspergillus fumigatus* in cystic fibrosis: An update on immune interactions and molecular
329 diagnostics in allergic bronchopulmonary aspergillosis. *Allergy.* 2017;72(11):1632-42
- 330 4. Page ID, Richardson MD, Denning DW. Comparison of six *Aspergillus*-specific IgG
331 assays for the diagnosis of chronic pulmonary aspergillosis (CPA). *J Infect.* 2016;72(2):240-9.
- 332 5. Denning DW, Pleuvry A, Cole DC. Global burden of chronic pulmonary aspergillosis
333 as a sequel to pulmonary tuberculosis. *Bull World Health Organ.* 2011;89(12):864-72.
- 334 6. Gangneux J-P, Bougnoux M-E, Hennequin C, Godet C, Chandenier J, Denning DW, et
335 al. An estimation of burden of serious fungal infections in France. *J Mycol Medecale.*
336 2016;26(4):385-90.
- 337 7. Denning DW, Cadranel J, Beigelman-Aubry C, Ader F, Chakrabarti A, Blot S, et al.
338 Chronic pulmonary aspergillosis: rationale and clinical guidelines for diagnosis and
339 management. *Eur Respir J.* 2016;47(1):45-68.
- 340 8. Baxter CG, Denning DW, Jones AM, Todd A, Moore CB, Richardson MD.
341 Performance of two *Aspergillus* IgG EIA assays compared with the precipitin test in chronic
342 and allergic aspergillosis. *Clin Microbiol Infect.* 2013;19(4):E197-204.
- 343 9. Richardson MD, Page ID. *Aspergillus* serology: Have we arrived yet? *Med Mycol.*
344 2017;55(1):48-55.
- 345 10. Page ID, Richardson M, Denning DW. Antibody testing in aspergillosis--quo vadis?
346 *Med Mycol.* 2015;53(5):417-39.
- 347 11. Agarwal R, Chakrabarti A, Shah A, Gupta D, Meis JF, Guleria R, et al. Allergic
348 bronchopulmonary aspergillosis: review of literature and proposal of new diagnostic and
349 classification criteria. *Clin Exp Allergy J Br Soc Allergy Clin Immunol.* 2013;43(8):850-73.
- 350 12. De Pauw B, Walsh TJ, Donnelly JP, Stevens DA, Edwards JE, Calandra T, et al. Revised
351 definitions of invasive fungal disease from the European Organization for Research and
352 Treatment of Cancer/Invasive Fungal Infections Cooperative Group and the National Institute
353 of Allergy and Infectious Diseases Mycoses Study Group (EORTC/MSG) Consensus Group.
354 *Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am.* 2008;46(12):1813-21.
- 355 13. Chakrabarti A, Kaur H. Allergic *Aspergillus* Rhinosinusitis. *J Fungi Basel Switz.*
356 2016;2(4).
- 357 14. Ldbiodiagnostics. *Aspergillus* ICT IgG-IgM Instruction For Use [Internet]. 2018.
358 Available at: <http://ldbiodiagnostics.com/m-63-notices-d-utilisation.html> [accessed Oct 10th
359 2018]

- 360 15. Clopper CJ, Pearson ES. The Use of Confidence or Fiducial Limits Illustrated in the
361 Case of the Binomial. *Biometrika*. 1934;26(4):404-13.
- 362 16. Glas AS, Lijmer JG, Prins MH, Bossel GJ, Bossuyt PMM. The diagnostic odds ratio: a
363 single indicator of test performance. *J Clin Epidemiol*. 2003;56(11):1129-35.
- 364 17. Habibzadeh F, Yadollahie M. Number Needed to Misdiagnose: A Measure of
365 Diagnostic Test Effectiveness. *Epidemiology*. 2013;24(1):170.
- 366 18. Cohen J. A Coefficient of Agreement for Nominal Scales. *Educ Psychol Meas*.
367 1960;20(1):37-46.
- 368 19. Landis JR, Koch GG. The measurement of observer agreement for categorical data.
369 *Biometrics*. 1977;33(1):159-74.
- 370 20. Loi n° 2012-300 du 5 mars 2012. *Journal Officiel de la République Française* (2012).
- 371 21. Décret n° 2016-1537 du 16 novembre 2016. *Journal Officiel de la République Française*
372 (2016).
- 373 22. Page ID, Baxter C, Hennequin C, Richardson MD, van Hoeyveld E, van
374 Toorenbergen AW, et al. Receiver operating characteristic curve analysis of four *Aspergillus*-
375 specific IgG assays for the diagnosis of chronic pulmonary aspergillosis. *Diagn Microbiol*
376 *Infect Dis*. 2018;91(1):47-51.
- 377 23. Drain PK, Hyle EP, Noubary F, Freedberg KA, Wilson D, Bishai WR, et al. Diagnostic
378 point-of-care tests in resource-limited settings. *Lancet Infect Dis*. 2014;14(3):239-49.
- 379 24. Oliva A, Flori P, Hennequin C, Dubus J-C, Reynaud-Gaubert M, Charpin D, et al.
380 Evaluation of the *Aspergillus* Western Blot IgG Kit for Diagnosis of Chronic Aspergillosis. *J*
381 *Clin Microbiol*. 2015;53(1):248-54.
- 382 25. Dumollard C, Bailly S, Perriot S, Brenier-Pinchart MP, Saint-Raymond C, Camara B,
383 et al. Prospective Evaluation of a New *Aspergillus* IgG Enzyme Immunoassay Kit for Diagnosis
384 of Chronic and Allergic Pulmonary Aspergillosis. *J Clin Microbiol*. 2016;54(5):1236-42.
- 385 26. Guitard J, Sendid B, Thorez S, Gits M, Hennequin C. Evaluation of a recombinant
386 antigen-based enzyme immunoassay for the diagnosis of noninvasive aspergillosis. *J Clin*
387 *Microbiol*. 2012;50(3):762-5.

388



390

391

392 *Figure 1. A) Example of positive (top) and negative (bottom) immunochromatographic test results.*

393 *B) Positive Aspergillus Immunoblot results. Immunoblot results were considered positive if at least two bands between B16,*
394 *B18-20, B22 and B30 were visible (by the naked eye). Band numbers correspond to the approximate molecular weight of the*
395 *antigens in kDa.*

396

397

398

399

Table 1. Distribution of the various clinical forms of *Aspergillus* disease and study population per center.

	Prospective study	Retrospective study				
	Marseille	Bordeaux	Marseille	Montpellier	Rennes	Toulouse
Colonization	23 (IB*: 21)\$	20	6	13	1	31
ABPA*	6	23	8	18	4	14
CPA*	11	15	0	6	34	12
IA SAIA*	4	5	0	7	2	6
Others*	0	1	0	2	33	1
Total positive tests	44 (IB: 42)\$	64	14	46	74	64
Negative controls	219 (IB: 214)\$	68	43 α	0	0	77

400 *ABPA: allergic bronchopulmonary aspergillosis; CPA: chronic pulmonary aspergillosis; IA
 401 SAIA: invasive or sub-acute invasive aspergillosis; IB: Immunoblot; ICT:
 402 Immunochromatographic test; others: severe asthma with fungal sensitization, abscesses,
 403 *Aspergillus* sinusitis.

404 α 14 of the 43 samples were selected to assess potential test cross-reaction with other
 405 documented lung infections (mostly due to *Streptococcus pneumoniae*), 24 samples were
 406 selected to assess potential cross-reaction with rheumatoid factor, and five samples were
 407 selected to assess potential cross-reaction with anti-nuclear antibodies.

408 \$ Seven samples were not done with IB due to limited volume: two colonization and five
 409 controls

410

411 *Table 2. The ICT and IB results of the prospective, retrospective and pooled studies.*

	Prospective study		Retrospective study		Overall	
	ICT	IB	ICT	IB	ICT	IB
Cases (pos./neg.)	40/4	36/6	232/30	247/15	272/34	283/21
Controls (pos./neg.)	8/211	22/192	7/181	1/187	15/392	23/379
Sensitivity	90.9%	85.7%	88.5%	94.3%	88.9%	93.1%
Specificity	96.3%	89.7%	96.3%	99.5%	96.3%	94.3%

412

413 Test results are presented as follows: XX/YY where XX is the number of positives tests and
 414 YY the number of negatives tests in the population. IB, Immunoblot; ICT,
 415 Immunochromatographic test.

416

In review

417 *Table 3. Comparison between diseases: results of ICT and IB for each Aspergillus-related disease.*

<i>Aspergillus</i> -related disease	ICT	IB
ABPA	68/73 (93%)	72/73 (99%)
CPA	72/78 (92%)	77/78 (99%)
Colonization	84/94 (89%)	81/92 (88%)
IA-SAIA	16/24 (67%)	19/24 (79%)
Others	32/37 (86%)	34/37 (92%)

418

419 The results are displayed as the number of positive/negative results, via ICT and IB, for each
420 group of *Aspergillus*-related diseases and the corresponding percentage. IB, Immunoblot; ICT,
421 Immunochromatographic test.

422

In review

Table 4. Comparison of overall test performance of the various anti-*Aspergillus* antibody detection techniques.

Study	Technique/cut-off	Cases	Controls
This study	ICT/any band	<i>Aspergillus</i> diseases, n=306 88.9%	Ruled out, n=407 96.3%
	IB ≥ 2 bands	<i>Aspergillus</i> diseases, n=304 93.1%	Ruled out, n=402 94.3%
Oliva <i>et al.</i> (24)	IB ≥ 2 bands	<i>Aspergillus</i> diseases, n=308 91.2%	Blood donors, n=212 93.9%
Page <i>et al.</i> (4)	ImmunoCap® ≥ 20 mg/l	CPA, n=241 96%	Blood donors, n=100 98%
	Immulite® ≥ 10 mg/l	CPA, n=241 96%	Blood donors, n=100 98%
	Serion® ≥ 35 U/ml	CPA, n=241 90%	Blood donors, n=100 98%
	Dynamiker® ≥ 65 U/ml	CPA, n=241 77%	Blood donors, n=100 97%
	Genesis® ≥ 20 U/ml	CPA, n=241 75%	Blood donors, n=100 99%
	IPD/1 band	CPA, n=241 59%	Blood donors, n=100 100%
Dumollard <i>et al.</i> (25)	Bordier® OD ≥ 0.8	CPA/ABPA, n=226 97%	Ruled out, n=206 90.3%
	Bio-Rad® ≥ 5 U/ml	CPA/ABPA, n=226 91.7%	Ruled out, n=206 91.3%
	Serion® ≥ 50 U/ml	CPA/ABPA, n=226 86.1%	Ruled out, n=206 81.5%
Guitard <i>et al.</i> (26)	Bio-Rad® ≥ 10 U/ml	CPA/ABPA, n=64 90.6%	Ruled out and pregnant, n=371 89.6%
	Serion® ≥ 70 U/ml	CPA/ABPA, n=64 85.9%	Ruled out and pregnant, n=371 84.4%

424 * Various forms of *Aspergillus* disease tested: ABPA, CPA, and colonization. Blood donors:
 425 blood donors considered negative for *Aspergillus*-related disease. Pregnant: Pregnant women
 426 without pulmonary condition and considered free of *Aspergillus*-related disease. Ruled-out:
 427 patients for whom diagnosis of aspergillosis had been ruled out.

428 ABPA, allergic bronchopulmonary aspergillosis; CPA, chronic pulmonary aspergillosis; IB,
 429 Immunoblot; ICT, Immunochromatographic test IPD, immunoprecipitin detection.

Figure 1.TIF



3.3. Perspectives

Au vu de sa grande robustesse, de sa facilité d'utilisation et de ses performances élevées, le test ICT devrait permettre d'effectuer des diagnostics d'APC dans des endroits jusque-là démunis de possibilité diagnostique pour ces patients. Un recrutement de patients est en cours à l'hôpital du point G, à Bamako (Mali) pour vérifier l'adéquation du test avec les besoins sur le terrain.

Il reste toutefois quelques questions en suspens : le test n'a été évalué qu'en France, où *Aspergillus fumigatus* est l'espèce la plus souvent isolée. Ses performances sur d'autres espèces, comme *Aspergillus flavus*, ne sont pas connues. De même, la réactivité croisée avec d'autres champignons n'a pas pu être évaluée et devra l'être avant d'utiliser le test dans des zones d'endémie d'histoplasmosse, coccidiomycose ou paracoccidiomycose. Enfin, le test a été développé pour une utilisation sur sérum ou plasma, ce qui implique d'avoir accès à une centrifugeuse. Une utilisation sur sang total, par piqûre au bout du doigt par exemple, permettrait d'augmenter encore plus l'accès au test.

4. Discussion – perspectives

Les maladies liées aux champignons du genre *Aspergillus* affectent des millions de patients dans le monde^{19,163}. Les moyens diagnostiques mis à disposition sont à l'heure actuelle limités et exigent d'avoir accès à des moyens et appareillages importants, rendant le diagnostic de l'ABPA difficile, et empêchant les laboratoires des pays émergents d'y avoir accès^{246,312}. Dans cette étude, nous avons cherché à mettre au point de nouvelles méthodes diagnostiques palliant à ces deux problèmes : une approche par western blot permettant d'envisager un diagnostic de confirmation dans la sérologie IgE *Aspergillus* et une approche par technique immunochromatographique, permettant d'amener la sérologie IgG là où les automates ne peuvent pas aller.

Le premier axe de travail a donc porté sur le diagnostic de l'ABPA : les techniques actuelles font que le diagnostic repose sur un faisceau de critères et que la place relative des critères, ainsi que les seuils de positivité font débat. De très nombreuses définitions de l'ABPA ont été proposées (annexe 1), mais elles sont difficiles à appliquer en pratique clinique, au point que cette pathologie ne serait documentée que pour un tiers des patients atteints de mucoviscidose souffrant d'une ABPA⁹⁰. Par le développement d'un western blot, technique de référence dans le diagnostic de nombreuses infections, nous avons cherché à augmenter les moyens diagnostiques de cette maladie et par extension à mieux prendre en charge et traiter ces patients. Nous espérons aussi que notre test pourra participer à l'harmonisation et à l'amélioration des critères de définition de l'ABPA dans un futur proche.

La technique que nous avons développée semble pouvoir répondre à cet objectif : avec une sensibilité de 90% et une spécificité de 92%, telles qu'estimées dans notre évaluation, le test a des performances très nettement supérieures aux techniques déjà en place en ce qui concerne le diagnostic différentiel entre ABPA et sensibilisation aspergillaire. En effet, sur la même population ces tests ont montré une sensibilité de 90% mais une spécificité de 74%. Les performances du test WB doivent maintenant être confirmées sur un plus grand nombre de patients. Une évaluation prospective multicentrique de ses performances permettra également d'étudier le potentiel prédictif du test. Enfin, des études pourront être faites sur la nature des protéines reconnues par le profil WB afin de mieux comprendre la physiopathologie de l'ABPA.

D'autres questions restent toutefois en suspens : actuellement, la technique du western-blot est utilisée principalement par des microbiologistes mais ce sont les immuno-allergologues qui effectuent la recherche des IgE. Si ces deux spécialités sont pour le moment différenciées, la création de grands plateaux techniques de biologie ces dernières années tend à rapprocher ces deux spécialités et, comme ce fut le cas avec ce travail, permettent de créer des ponts entre ces spécialités. Un tel rapprochement ne peut qu'être bénéfique pour les patients souffrant d'ABPA ou d'autres pathologies nécessitant une approche multidisciplinaire tant pour le diagnostic que pour le suivi de leur maladie.

Enfin, il serait intéressant dans un travail futur d'essayer de déterminer la nature des antigènes retrouvés sur les WB. En effet, le WB utilisant un extrait de culture, la nature de ces antigènes n'est pas connue, mais leur nombre important (10 bandes spécifiques détectées en dessous de 37 kDa ainsi qu'un nombre important de bandes non caractérisées au-dessus) est un argument en faveur de

l'hypothèse d'un nombre insuffisant d'antigènes commercialement disponibles dans les techniques automatisées actuelles, en particulier les techniques de chimiluminescence.

Le second axe de travail a donc porté sur le développement, l'optimisation et l'évaluation d'un test rapide immunochromatographique de détection des anticorps anti-*Aspergillus* afin d'en faire un test répondant aux critères ASSURED de l'OMS. En effet, aucune technique actuellement disponible sur le marché ne semble répondre à ces critères, ce qui fait que le diagnostic de maladie aspergillaire n'est souvent pas fait dans les pays émergents, où les aspergilloses pulmonaires chroniques sont confondues avec des tuberculoses résistantes aux traitements, entraînant une perte de chance dramatique pour les patients.

Le test immunochromatographique que nous avons mis au point a répondu à des essais de robustesse permettant d'envisager son déploiement dans des laboratoires de pays tropicaux et désertiques. De plus, ses performances dans le diagnostic des maladies aspergillaires se sont révélées convaincantes, avec une sensibilité de 88,9% et une spécificité de 96,3%. Le test doit maintenant être validé dans des conditions de terrain dans d'autres pays. Actuellement, plusieurs projets d'études sont en cours, à des stades d'avancement variables, au Mali, en Ouganda et en Angleterre. Enfin, une comparaison des performances entre une utilisation sur sérum et sur sang total, comme cela a récemment été fait en toxoplasmose³²⁷, pourrait aussi être envisagée mais demande de prévoir une étude prospective afin de pouvoir réaliser des prélèvements au bout du doigt.

En conclusion, au moyen de ces deux tests, nous espérons améliorer la qualité du diagnostic des maladies aspergillaires et apporter une solution diagnostique au bénéfice du plus grand nombre possible de malades.

Références bibliographiques

1. Bongomin F, Gago S, Oladele RO, Denning DW. Global and Multi-National Prevalence of Fungal Diseases—Estimate Precision. *J Fungi*. 2017;3:57.
2. Premamalini T, Ambujavalli BT, Anitha S, Somu L, Kindo AJ. Schizophyllum Commune a Causative Agent of Fungal Sinusitis: A Case Report. *Case Rep Infect Dis*. 2011;2011:821259.
3. Ishiguro T, Takayanagi N, Tokunaga D, Kurashima K, Matsushita A, Harasawa K, et al. Pulmonary Schizophyllum Commune Infection Developing Mucoïd Impaction of the Bronchi. *Yale J Biol Med*. 2007;80:105–11.
4. Tortorano AM, Richardson M, Roilides E, van Diepeningen A, Caira M, Munoz P, et al. ESCMID and ECMM joint guidelines on diagnosis and management of hyalohyphomycosis: *Fusarium* spp., *Scedosporium* spp. and others. *Clin Microbiol Infect*. 2014;20 Suppl 3:27–46.
5. Walther G, Stasch S, Kaerger K, Hamprecht A, Roth M, Cornely OA, et al. *Fusarium* Keratitis in Germany. *J Clin Microbiol*. 2017;55:2983–95.
6. Tsang VC, Brand JA, Boyer AE. An enzyme-linked immunoelectrotransfer blot assay and glycoprotein antigens for diagnosing human cysticercosis (*Taenia solium*). *J Infect Dis*. 1989;159:50–9.
7. Franck J, Garin YJ-F, Dumon H. LDBio-Toxo II Immunoglobulin G Western Blot Confirmatory Test for Anti-Toxoplasma Antibody Detection. *J Clin Microbiol*. 2008;46:2334–8.
8. Henn A, Fleteau C, Gallien S. Primary HIV Infection: Clinical Presentation, Testing, and Treatment. *Curr Infect Dis Rep*. 2017;19:37.
9. Rudzińska M, Kowalewska B, Sikorska K. Clinical usefulness of Western blotting and ELISA avidity for the diagnosis of human toxocariasis. *Parasite Immunol*. 2017;39:e12400.
10. Oliva A, Flori P, Hennequin C, Dubus J-C, Reynaud-Gaubert M, Charpin D, et al. Evaluation of the *Aspergillus* Western Blot IgG Kit for Diagnosis of Chronic Aspergillosis. *J Clin Microbiol*. 2015;53:248–54.
11. Persat F, Hennequin C, Gangneux JP. *Aspergillus* antibody detection: diagnostic strategy and technical considerations from the Société Française de Mycologie Médicale (French Society for Medical Mycology) expert committee. *Med Mycol*. 2017;55:302–7.
12. Bernstein JA, Zeiss CR, Greenberger PA, Patterson R, Marhoul JF, Smith LL. Immunoblot analysis of sera from patients with allergic bronchopulmonary aspergillosis: Correlation with disease activity. *J Allergy Clin Immunol*. 1990;86:532–9.
13. Agarwal R, Aggarwal AN, Gupta D, Jindal SK. *Aspergillus* hypersensitivity and allergic bronchopulmonary aspergillosis in patients with bronchial asthma: systematic review and meta-analysis. *Int J Tuberc Lung Dis*. 2009;13:936–44.
14. Stevens DA, Moss RB, Kurup VP, Knutsen AP, Greenberger P, Judson MA, et al. Allergic bronchopulmonary aspergillosis in cystic fibrosis—state of the art: Cystic Fibrosis Foundation Consensus Conference. *Clin Infect Dis*. 2003;37 Suppl 3:S225-264.

15. Agarwal R, Chakrabarti A, Shah A, Gupta D, Meis JF, Guleria R, et al. Allergic bronchopulmonary aspergillosis: review of literature and proposal of new diagnostic and classification criteria. *Clin Exp Allergy*. 2013;43:850–73.
16. Greenberger PA. When to suspect and work up allergic bronchopulmonary aspergillosis. *Ann Allergy Asthma Immunol*. 2013;111:1–4.
17. Kosmidis C, Denning DW. The clinical spectrum of pulmonary aspergillosis. *Thorax*. 2015;70:270–7.
18. Page ID, Richardson MD, Denning DW. Comparison of six *Aspergillus*-specific IgG assays for the diagnosis of chronic pulmonary aspergillosis (CPA). *J Infect*. 2016;72:240–9.
19. Denning DW, Pleuvry A, Cole DC. Global burden of chronic pulmonary aspergillosis as a sequel to pulmonary tuberculosis. *Bull World Health Organ*. 2011;89:864–72.
20. Ulm H, Wilmes M, Shai Y, Sahl H-G. Antimicrobial Host Defensins – Specific Antibiotic Activities and Innate Defense Modulation. *Front Immunol*. 2012;3:249.
21. Lozupone CA, Stombaugh JI, Gordon JI, Jansson JK, Knight R. Diversity, stability and resilience of the human gut microbiota. *Nature*. 2012;489:220–30.
22. Romani L. Immunity to fungal infections. *Nat Rev Immunol*. 2011;11:275–88.
23. Hogg JC, Doerschuk CM. Leukocyte Traffic in the Lung. *Annu Rev Physiol*. 1995;57:97–114.
24. Drost EM, Selby C, Lannan S, Lowe GDO, MacNee W. Changes in Neutrophil Deformability following In Vitro Smoke Exposure: Mechanism and Protection. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 1992;6:287–95.
25. Hogan SP, Rosenberg HF, Moqbel R, Phipps S, Foster PS, Lacy P, et al. Eosinophils: biological properties and role in health and disease. *Clin Exp*. 2008;38:709–50.
26. Galli SJ. Mast cells and basophils. *Curr Opin Hematol*. 2000;7:32.
27. Cooper MD. The early history of B cells. *Nat Rev Immunol*. 2015;15:191–7.
28. Traherne JA. Human Leucocyte Antigen (HLA) System and Human Disorders. In: eLS. American Cancer Society; 2018. p. 1–7.
29. Takemoto S, Port FK, Claas FHJ, Duquesnoy RJ. HLA matching for kidney transplantation. *Hum Immunol*. 2004;65:1489–505.
30. Alam N, Kim D. Transplantation of Haematopoietic Stem Cells. In: eLS . American Cancer Society; 2013
31. Harrison LC. Immunity: Humoral and Cellular. In: eLS; American Cancer Society; 2016 p. 1–12.
32. Hwang S-A, Actor JK. Lymphocytes. In: American Cancer Society; 2014.
33. Paul WE, Zhu J. How are T(H)2-type immune responses initiated and amplified? *Nat Rev Immunol*. 2010;10:225–35.
34. Zouali M. Antibodies. In: eLS. American Cancer Society; 2016. p. 1–13.

35. Collins AM, Jackson KJL. A Temporal Model of Human IgE and IgG Antibody Function. *Front Immunol*; 2013;4.
36. Chen K, Xu W, Wilson M, He B, Miller NW, Bengten E, et al. Immunoglobulin D enhances immune surveillance by activating antimicrobial, pro-inflammatory and B cell-stimulating programs in basophils. *Nat Immunol*. 2009;10:889–98.
37. Umetsu DT, DeKruyff RH. The regulation of allergy and asthma. *Immunol Rev*. 212:238–55.
38. Durandy A. Mini-review Activation-induced cytidine deaminase: a dual role in class-switch recombination and somatic hypermutation. *Eur J Immunol*. 2003;33:2069–73.
39. Lieber MR, Yu K, Raghavan SC. Roles of nonhomologous DNA end joining, V(D)J recombination, and class switch recombination in chromosomal translocations. *DNA Repair*. 2006;5:1234–45.
40. Stavnezer J, Amemiya CT. Evolution of isotype switching. *Semin Immunol*. 2004;16:257–75.
41. Brière F, Servet-Delprat C, Bridon JM, Saint-Remy JM, Banchereau J. Human interleukin 10 induces naive surface immunoglobulin D+ (sIgD+) B cells to secrete IgG1 and IgG3. *J Exp Med*. 1994;179:757–62.
42. Malisan F, Brière F, Bridon JM, Harindranath N, Mills FC, Max EE, et al. Interleukin-10 induces immunoglobulin G isotype switch recombination in human CD40-activated naive B lymphocytes. *J Exp Med*. 1996;183:937–47.
43. Stavnezer J. Immunoglobulin class switching. *Curr Opin Immunol*. 1996;8:199–205.
44. Oettgen HC. Regulation of the IgE isotype switch: new insights on cytokine signals and the functions of epsilon germline transcripts. *Curr Opin Immunol*. 2000;12:618–23.
45. Dedobbeleer O, Stockis J, van der Woning B, Coulie PG, Lucas S. Cutting Edge: Active TGF- β 1 Released from GARP/TGF- β 1 Complexes on the Surface of Stimulated Human B Lymphocytes Increases Class-Switch Recombination and Production of IgA. *J Immunol Baltim Md 1950*. 2017;199:391–6.
46. Brown GD. Innate antifungal immunity: the key role of phagocytes. *Annu Rev Immunol*. 2011;29, 29:1, 1–21.
47. Moalli F, Doni A, Deban L, Zelante T, Zagarella S, Bottazzi B, et al. Role of complement and Fcy receptors in the protective activity of the long pentraxin PTX3 against *Aspergillus fumigatus*. *Blood*. 2010;116:5170–80.
48. Wüthrich M, Deepe GS, Klein B. Adaptive Immunity to Fungi. *Annu Rev Immunol*. 2012;30:115–48.
49. Nelson MP, Christmann BS, Werner JL, Metz AE, Trevor JL, Lowell CA, et al. IL-33 and M2a Alveolar Macrophages Promote Lung Defense against the Atypical Fungal Pathogen *Pneumocystis murina*. *J Immunol*. 2011;186:2372–81.
50. Luo S, Skerka C, Kurzai O, Zipfel PF. Complement and innate immune evasion strategies of the human pathogenic fungus *Candida albicans*. *Mol Immunol*. 2013;56:161–9.

51. Aimanianda V, Bayry J, Bozza S, Knemeyer O, Perruccio K, Elluru SR, et al. Surface hydrophobin prevents immune recognition of airborne fungal spores. *Nature*. 2009;460:1117–21.
52. Baker BS. The role of microorganisms in atopic dermatitis. *Clin Exp Immunol*. 144:1–9.
53. Global Initiative for Asthma. Global strategy for asthma management and prevention report (2018 update) [Internet]. Available from: www.ginasthma.org.
54. Jackson M. Asthma, illness, and identity. *The Lancet*. 2008;372:1030–1.
55. Ellwood P, Asher MI, Billo NE, Bissell K, Chiang C-Y, Ellwood EM, et al. The Global Asthma Network rationale and methods for Phase I global surveillance: prevalence, severity, management and risk factors. *Eur Respir J*. 2017;49:1601605.
56. Annesi-Maesano I. [Epidemiology of asthma in the world and in France]. *Rev Prat*. 2011;61:329–35.
57. Bel EH. Clinical phenotypes of asthma. *Curr Opin Pulm Med*. 2004;10:44–50.
58. Gonzalez M, Jégu J, Kopferschmitt M-C, Donnay C, Hedelin G, Matzinger F, et al. Asthma among workers in healthcare settings: role of disinfection with quaternary ammonium compounds. *Clin Exp Allergy*. 2014;44:393–406.
59. Vandenas O, Godet J, Hurdubaea L, Riffart C, Suojalehto H, Wiszniewska M, et al. Are high- and low-molecular-weight sensitizing agents associated with different clinical phenotypes of occupational asthma? *Allergy*. 2018 [Early view]
60. Ramamurthy MB. Asthma Mimickers: Approach to Differential Diagnosis. *Indian J Pediatr*. 2018;85:667–72.
61. Miravittles M, Andreu I, Romero Y, Sitjar S, Altés A, Anton E. Difficulties in differential diagnosis of COPD and asthma in primary care. *Br J Gen Pract*. 2012;62:e68-75.
62. Braun JJ, Delmas C, Charloix A, Schultz P, de Blay F. [Vocal cord dyskinesia and/or asthma]. *Rev Mal Respir*. 2018;35:62–8.
63. Obata K, Mukai K, Tsujimura Y, Ishiwata K, Kawano Y, Minegishi Y, et al. Basophils are essential initiators of a novel type of chronic allergic inflammation. *Blood*. 2007;110:913–20.
64. Schröder NWJ. The role of innate immunity in the pathogenesis of asthma. *Curr Opin Allergy Clin Immunol*. 2009;9:38–43.
65. Nguyen KD, Vanichsarn C, Fohner A, Nadeau KC. Selective deregulation in chemokine signaling pathways of CD4+CD25hiCD127lo/- regulatory T cells in human allergic asthma. *J Allergy Clin Immunol*. 2009;123:933-939.e10.
66. Holgate ST. Susceptibility genes in severe asthma. *Curr Allergy Asthma Rep*. 2006;6:345–8.
67. Moffatt MF, Gut IG, Demenais F, Strachan DP, Bouzigon E, Heath S, et al. A Large-Scale, Consortium-Based Genomewide Association Study of Asthma. *N Engl J Med*. 2010;363:1211–21.
68. Guarneri M, Balmes JR. Outdoor air pollution and asthma. *Lancet*. 2014;383:1581–92.

69. Caulin C, Roguet I, Vidal SA. Vidal Recos: recommandations en pratique 2016 : 185 stratégies thérapeutiques. Issy-les-Moulineaux: Vidal; 2015.
70. Molimard M, de Blay F, Didier A, Le Gros V. Effectiveness of omalizumab (Xolair®) in the first patients treated in real-life practice in France. *Respir Med.* 2008;102:71–6.
71. Vidal 2018 le dictionnaire. Issy-les-Moulineaux: Vidal;2018
72. Andersen DH. Cystic fibrosis of the pancreas and its relation to celiac disease: a clinical and pathologic study. *Am J Dis Child.* 1938;56:344–99.
73. Lopes-Pacheco M. CFTR Modulators: Shedding Light on Precision Medicine for Cystic Fibrosis. *Front Pharmacol.* 2016;7:275.
74. Sies H. Glutathione and its role in cellular functions. *Free Radic Biol Med.* 1999;27:916–21.
75. O’Sullivan BP, Freedman SD. Cystic fibrosis. *Lancet Lond Engl.* 2009;373:1891–904.
76. Sanders DB, Bittner RC, Rosenfeld M, Redding GJ, Goss CH. Pulmonary exacerbations are associated with subsequent FEV1 decline in both adults and children with cystic fibrosis. *Pediatr Pulmonol.* 2011;46:393–400.
77. Ratjen F, McColley SA. Update in Cystic Fibrosis 2011. *Am J Respir Crit Care Med.* 2012;185:933–6.
78. Milla CE, Warwick WJ. Risk of death in cystic fibrosis patients with severely compromised lung function. *Chest.* 1998;113:1230–4.
79. Hulzebos EHJ, Bomhof-Roordink H, van de Weert-van Leeuwen PB, Twisk JWR, Arets HGM, van der Ent CK, et al. Prediction of mortality in adolescents with cystic fibrosis. *Med Sci Sports Exerc.* 2014;46:2047–52.
80. Hayes D, Kirkby S, Whitson BA, Black SM, Sheikh SI, Tobias JD, et al. Mortality Risk and Pulmonary Function in Adults With Cystic Fibrosis at Time of Wait Listing for Lung Transplantation. *Ann Thorac Surg.* 2015;100:474–9.
81. Salsgiver EL, Fink AK, Knapp EA, LiPuma JJ, Olivier KN, Marshall BC, et al. Changing Epidemiology of the Respiratory Bacteriology of Patients With Cystic Fibrosis. *Chest.* 2016;149:390–400.
82. Vaincre la mucoviscidose, INED. Registre français de la mucoviscidose - bilan des données 2016. Paris; 2017. 51 p.
83. Aaron SD, Vandemheen KL, Ferris W, Fergusson D, Tullis E, Haase D, et al. Combination antibiotic susceptibility testing to treat exacerbations of cystic fibrosis associated with multiresistant bacteria: a randomised, double-blind, controlled clinical trial. *Lancet Lond Engl.* 2005;366:463–71.
84. Sherrard LJ, McGrath SJ, McIlreavey L, Hatch J, Wolfgang MC, Muhlebach MS, et al. Production of extended-spectrum β -lactamases and the potential indirect pathogenic role of *Prevotella* isolates from the cystic fibrosis respiratory microbiota. *Int J Antimicrob Agents.* 2016;47:140–5.

85. Waters V, Ratjen F. Combination antimicrobial susceptibility testing for acute exacerbations in chronic infection of *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis. *Cochrane Database Syst Rev*. 2017;6:CD006961.
86. Association Française pour le Dépistage et la Prévention des Handicaps de l'Enfant. Bilan d'activité 2012. 2013.
87. Collège de la Haute Autorité de santé. Place de la stratégie couplant les dosages de la trypsine immunoréactive (TIR) et de la protéine associée à la pancréatite (PAP) dans le dépistage systématique de la mucoviscidose en France. Haute autorité de santé; 2015.
88. Centre de référence mucoviscidose de Lyon. Programme national de diagnostic et de soins - mucoviscidose. Haute autorité de santé; 2017.
89. Singh M, Rebordosa C, Bernholz J, Sharma N. Epidemiology and genetics of cystic fibrosis in Asia: In preparation for the next-generation treatments. *Respirol Carlton Vic*. 2015;20:1172–81.
90. Armstead J, Morris J, Denning DW. Multi-Country Estimate of Different Manifestations of Aspergillosis in Cystic Fibrosis. *PLoS ONE*. 2014;9.
91. Jackson AD, Goss CH. Epidemiology of CF: How registries can be used to advance our understanding of the CF population. *J Cyst Fibros*. 2018;17:297–305.
92. Elborn JS. Cystic fibrosis. *Lancet Lond Engl*. 2016;388:2519–31.
93. Ziesing S, Suerbaum S, Sedlacek L. Fungal epidemiology and diversity in cystic fibrosis patients over a 5-year period in a national reference center. *Med Mycol*. 2016;54:781–6.
94. Garczewska B, Jarzynka S, Kuś J, Skorupa W, Augustynowicz-Kopeć E. Fungal infection of cystic fibrosis patients - single center experience. *Pneumonol Alergol Pol*. 2016;84:151–9.
95. Kramer R, Sauer-Heilborn A, Welte T, Guzman CA, Abraham W-R, Höfle MG. A cohort study of the airway mycobiome in adult cystic fibrosis patients: differences in community structure of fungi compared to bacteria reveal predominance of transient fungal elements. *J Clin Microbiol*. 2015;
96. Muthig M, Hebestreit A, Ziegler U, Seidler M, Müller F-MC. Persistence of *Candida* species in the respiratory tract of cystic fibrosis patients. *Med Mycol*. 2010;48:56–63.
97. Cimon B, Carrere J, Chazalotte J, Ginies J, Chabasse D, Bouchara J. Mycoses bronchopulmonaires au cours de la mucoviscidose. *J Mycol Medicale*. 2000;128–35.
98. Hickey PW, Sutton DA, Fothergill AW, Rinaldi MG, Wickes BL, Schmidt HJ, et al. *Trichosporon mycotoxinivorans*, a Novel Respiratory Pathogen in Patients with Cystic Fibrosis. *J Clin Microbiol*. 2009;47:3091–7.
99. Shah AV, McColley SA, Weil D, Zheng X. *Trichosporon mycotoxinivorans* infection in patients with cystic fibrosis. *J Clin Microbiol*. 2014;52:2242–4.
100. Paugam A, Baixench M-T, Demazes-Dufeu N, Burgel P-R, Sauter E, Kanaan R, et al. Characteristics and consequences of airway colonization by filamentous fungi in 201 adult patients with cystic fibrosis in France. *Med Mycol*. 2010;48 Suppl 1:S32-36.

101. Parize P, Billaud S, Bienvenu AL, Bourdy S, le Pogam MA, Reix P, et al. Impact of *Scedosporium apiospermum* complex seroprevalence in patients with cystic fibrosis. *J Cyst Fibros*. 2014;13:667–73.
102. Burgel P-R, Paugam A, Hubert D, Martin C. *Aspergillus fumigatus* in the cystic fibrosis lung: pros and cons of azole therapy. *Infect Drug Resist*. 2016;9:229–38.
103. de Valk HA, Klaassen CHW, Yntema J-B, Hebestreit A, Seidler M, Haase G, et al. Molecular typing and colonization patterns of *Aspergillus fumigatus* in patients with cystic fibrosis. *J Cyst Fibros*. 2009;8:110–4.
104. Rougeron A, Giraud S, Razafimandimby B, Meis JF, Bouchara J-P, Klaassen CHW. Different colonization patterns of *Aspergillus terreus* in patients with cystic fibrosis. *Clin Microbiol Infect*. 2014;20:327–33.
105. Jones AM, Horsley A, Denning DW. What is the importance of classifying *Aspergillus* disease in cystic fibrosis patients? *Expert Rev Respir Med*. 2014;8:389–92.
106. Howard SJ, Cerar D, Anderson MJ, Albarrag A, Fisher MC, Pasqualotto AC, et al. Frequency and evolution of Azole resistance in *Aspergillus fumigatus* associated with treatment failure. *Emerg Infect Dis*. 2009;15:1068–76.
107. Howard SJ, Pasqualotto AC, Denning DW. Azole resistance in allergic bronchopulmonary aspergillosis and *Aspergillus* bronchitis. *Clin Microbiol Infect*. 2010;16:683–8.
108. Bueid A, Howard SJ, Moore CB, Richardson MD, Harrison E, Bowyer P, et al. Azole antifungal resistance in *Aspergillus fumigatus*: 2008 and 2009. *J Antimicrob Chemother*. 2010;65:2116–8.
109. Mortensen KL, Jensen RH, Johansen HK, Skov M, Pressler T, Howard SJ, et al. *Aspergillus* species and other molds in respiratory samples from patients with cystic fibrosis: a laboratory-based study with focus on *Aspergillus fumigatus* azole resistance. *J Clin Microbiol*. 2011;49:2243–51.
110. Burgel P-R, Baixench M-T, Amsellem M, Audureau E, Chapron J, Kanaan R, et al. High prevalence of azole-resistant *Aspergillus fumigatus* in adults with cystic fibrosis exposed to itraconazole. *Antimicrob Agents Chemother*. 2012;56:869–74.
111. Prigitano A, Esposito MC, Biffi A, De Lorenzis G, Favuzzi V, Koncan R, et al. Triazole resistance in *Aspergillus fumigatus* isolates from patients with cystic fibrosis in Italy. *J Cyst Fibros*. 2017;16:64–9.
112. Hamprecht A, Morio F, Bader O, Le Pape P, Steinmann J, Dannaoui E. Azole Resistance in *Aspergillus fumigatus* in Patients with Cystic Fibrosis: A Matter of Concern? *Mycopathologia*. 2018;183:151–60.
113. Rougeron A. Distribution dans la mucoviscidose et écologie des différentes espèces du complexe *Scedosporium apiospermum* [phdthesis]. Université d'Angers; 2013
114. Chabasse D, Bouchara J, Chazalotte J, Carrere J, Ginies J, De Gentile L. Mucoviscidose et colonisation fongique à *Scedosporium apiospermum*. A propos de trois observations. *Journal De Mycologie Medicale*. 1991;152–5.
115. Larcher G, Cimon B, Franç, Symoens O, Tronchin G, Chabasse D, et al. A 33 kDa serine proteinase from *Scedosporium apiospermum*. *Biochem J*. 1996;315:119–26.

116. Lima OC, Larcher G, Vandeputte P, Lebouil A, Chabasse D, Simoneau P, et al. Molecular cloning and biochemical characterization of a Cu,Zn-superoxide dismutase from *Scedosporium apiospermum*. *Microbes Infect.* 2007;9:558–65.
117. Pihet M, Carrere J, Cimon B, Chabasse D, Delhaes L, Symoens F, et al. Occurrence and relevance of filamentous fungi in respiratory secretions of patients with cystic fibrosis--a review. *Med Mycol.* 2009;47:387–97.
118. Cimon B, Pihet M, Bouchara J. Infections dues aux champignons du genre *Scedosporium* et apparentés. *EMC-Biol Medicale.* 2016;11:1–12.
119. Ramirez-Garcia A, Pellon A, Rementeria A, Buldain I, Barreto-Bergter E, Rollin-Pinheiro R, et al. *Scedosporium* and *Lomentospora*: an updated overview of underrated opportunists. *Med Mycol.* 2018;56:102–25.
120. Nagano Y, Elborn JS, Millar BC, Walker JM, Goldsmith CE, Rendall J, et al. Comparison of techniques to examine the diversity of fungi in adult patients with cystic fibrosis. *Med Mycol.* 2010;48:166-176.e1.
121. Fukutomi Y, Tanimoto H, Yasueda H, Taniguchi M. Serological diagnosis of allergic bronchopulmonary mycosis: Progress and challenges. *Allergol Int.* 2016;65:30–6.
122. Lobo LJ, Noone PG. Respiratory infections in patients with cystic fibrosis undergoing lung transplantation. *Lancet Respir Med.* 2014;2:73–82.
123. Ammerman E, Sweet SC, Fenchel M, Storch GA, Conrad C, Hayes D, et al. Risk and outcomes of pulmonary fungal infection after pediatric lung transplantation. *Clin Transplant.* 2017;31.
124. Parize P, Boussaud V, Poinsignon V, Sitterlé E, Botterel F, Lefeuve S, et al. Clinical outcome of cystic fibrosis patients colonized by *Scedosporium* species following lung transplantation: A single-center 15-year experience. *Transpl Infect Dis.* 2017;19.
125. Hong G, White M, Lechtzin N, West NE, Avery R, Miller H, et al. Fatal disseminated *Rasamsonia* infection in cystic fibrosis post-lung transplantation. *J Cyst Fibros.* 2017;16:e3–7.
126. Calderón EJ, Friaza V, Dapena FJ, de La Horra C. *Pneumocystis jirovecii* and cystic fibrosis. *Med Mycol.* 2010;48 Suppl 1:S17-21.
127. Pederiva MA, Wissmann G, Friaza V, Morilla R, de La Horra C, Montes-Cano MA, et al. High prevalence of *Pneumocystis jirovecii* colonization in Brazilian cystic fibrosis patients. *Med Mycol.* 2012;50:556–60.
128. Nosotti M, Tarsia P, Morlacchi LC. Infections after lung transplantation. *J Thorac Dis.* 2018;10:3849–68.
129. Gal SL, Héry-Arnaud G, Ramel S, Virmaux M, Damiani C, Totet A, et al. *Pneumocystis jirovecii* and cystic fibrosis in France. *Scand J Infect Dis.* 2010;42:225–7.
130. Nguyen LDN, Viscogliosi E, Delhaes L. The lung mycobiome: an emerging field of the human respiratory microbiome. *Front Microbiol.* 2015;6:89
131. Tracy MC, Moss RB. The myriad challenges of respiratory fungal infection in cystic fibrosis. *Pediatr Pulmonol.* 2018;1-11

132. Condren ME, Bradshaw MD. Ivacaftor: A Novel Gene-Based Therapeutic Approach for Cystic Fibrosis. *J Pediatr Pharmacol Ther.* 2013;18:8–13.
133. Ong T, Ramsey BW. New Therapeutic Approaches to Modulate and Correct Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator. *Pediatr Clin North Am.* 2016;63:751–64.
134. Ren HY, Grove DE, De La Rosa O, Houck SA, Sopha P, Van Goor F, et al. VX-809 corrects folding defects in cystic fibrosis transmembrane conductance regulator protein through action on membrane-spanning domain 1. *Mol Biol Cell.* 2013;24:3016–24.
135. Blackwell M. The Fungi: 1, 2, 3 ... 5.1 million species? *Am J Bot.* 2011;98:426–38.
136. Romani L, Puccetti P. Protective tolerance to fungi: the role of IL-10 and tryptophan catabolism. *Trends Microbiol.* 2006;14:183–9.
137. Richardson MD, Cole DC. Special Issue “Fungal Burden in Different Countries.” *J Fungi.* 2018;4.
138. Benedict K, Jackson BR, Chiller T, Beer KD. Estimation of direct healthcare costs of fungal diseases in the United States. *Clin Infect Dis.* 2018 [early access]
139. Samson RA, Visagie CM, Houbraeken J, Hong S-B, Hubka V, Klaassen CHW, et al. Phylogeny, identification and nomenclature of the genus *Aspergillus*. *Stud Mycol.* 2014;78:141–73.
140. Desoubeaux G. Diagnostic biologique d’une infection aspergillaire. *Feuill Biol.* 2010;294.
141. Vidal-Acuña MR, Ruiz-Pérez de Pipaón M, Torres-Sánchez MJ, Aznar J. Identification of clinical isolates of *Aspergillus*, including cryptic species, by matrix assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS). *Med Mycol.* 2017;
142. Howard SJ, Harrison E, Bowyer P, Varga J, Denning DW. Cryptic species and azole resistance in the *Aspergillus niger* complex. *Antimicrob Agents Chemother.* 2011;55:4802–9.
143. Gautier M, Normand A-C, Ranque S. Previously unknown species of *Aspergillus*. *Clin Microbiol Infect.* 2016;22:662–9.
144. Zhang B, Guan Z-B, Cao Y, Xie G-F, Lu J. Secretome of *Aspergillus oryzae* in Shaoxing rice wine koji. *Int J Food Microbiol.* 2012;155:113–9.
145. Alberts AW. Discovery, biochemistry and biology of lovastatin. *Am J Cardiol.* 1988;62:10J-15J.
146. Nogueira L, Foerster C, Groopman J, Egner P, Koshiol J, Ferreccio C. Association of Aflatoxin With Gallbladder Cancer in Chile. *JAMA.* 2015;313:2075–7.
147. Baan R, Grosse Y, Straif K, Secretan B, Ghissassi FE, Bouvard V, et al. A review of human carcinogens—Part F: Chemical agents and related occupations. *Lancet Oncol.* 2009;10:1143–4.
148. Abbas HK. Aflatoxin and Food Safety. Boca Raton; 2005. 587 p
149. Barnes PD, Marr KA. Aspergillosis: spectrum of disease, diagnosis, and treatment. *Infect Dis Clin North Am.* 2006;20:545–61, vi.
150. Ibrahim-Granet O, Philippe B, Boleti H, Boisvieux-Ulrich E, Grenet D, Stern M, et al. Phagocytosis and intracellular fate of *Aspergillus fumigatus* conidia in alveolar macrophages. *Infect Immun.* 2003;71:891–903.

151. De Pauw B, Walsh TJ, Donnelly JP, Stevens DA, Edwards JE, Calandra T, et al. Revised definitions of invasive fungal disease from the European Organization for Research and Treatment of Cancer/Invasive Fungal Infections Cooperative Group and the National Institute of Allergy and Infectious Diseases Mycoses Study Group (EORTC/MSG) Consensus Group. *Clin Infect Dis*. 2008;46:1813–21.
152. Persat F. Sérologie aspergillaire, d’hier à aujourd’hui pour demain. *J Mycol Médicale J Med Mycol*. 2012;22:72–82.
153. Fillaux J, Brémont F, Murriss M, Cassaing S, Rittié J-L, Tétu L, et al. Assessment of *Aspergillus* sensitization or persistent carriage as a factor in lung function impairment in cystic fibrosis patients. *Scand J Infect Dis*. 2012;44:842–7.
154. Fillaux J, Brémont F, Murriss M, Cassaing S, Tétu L, Segonds C, et al. *Aspergillus* sensitization or carriage in cystic fibrosis patients. *Pediatr Infect Dis J*. 2014;33:680–6.
155. Maturu VN, Agarwal R. Prevalence of *Aspergillus* sensitization and allergic bronchopulmonary aspergillosis in cystic fibrosis: systematic review and meta-analysis. *Clin Exp Allergy J Br Soc Allergy Clin Immunol*. 2015;45:1765–78.
156. Denning DW, O’Driscoll BR, Hogaboam CM, Bowyer P, Niven RM. The link between fungi and severe asthma: a summary of the evidence. *Eur Respir J*. 2006;27:615–26.
157. Agarwal R. Severe Asthma with Fungal Sensitization. *Curr Allergy Asthma Rep*. 2011;11:403.
158. Rick EM, Woolnough K, Pashley CH, Wardlaw AJ. Allergic Fungal Airway Disease. *J Investig Allergol Clin Immunol*. 2016;26:344–54.
159. Reddel HK, Bateman ED, Becker A, Boulet L-P, Cruz AA, Drazen JM, et al. A summary of the new GINA strategy: a roadmap to asthma control. *Eur Respir J*. 2015;46:622–39.
160. Hinson KFW, Moon AJ, Plummer NS. Broncho-pulmonary Aspergillosis *. *Thorax*. 1952;7:317–33.
161. Moss RB. Allergic bronchopulmonary aspergillosis. *Clin Rev Allergy Immunol*. 2002;23:87–104.
162. Ghosh G, Sharma B, Chauhan A, Chawla MPS. Coexistence of allergic bronchopulmonary aspergillosis and allergic aspergillus sinusitis in a patient without clinical asthma. *Case Rep*. 2013;2013:bcr2013008683.
163. Denning DW, Pleuvry A, Cole DC. Global burden of allergic bronchopulmonary aspergillosis with asthma and its complication chronic pulmonary aspergillosis in adults. *Med Mycol*. 2013;51:361–70.
164. Agarwal R, Gupta D, Aggarwal AN, Saxena AK, Chakrabarti A, Jindal SK. Clinical Significance of Hyperattenuating Muroid Impaction in Allergic Bronchopulmonary Aspergillosis: An Analysis of 155 Patients. *Chest*. 2007;132:1183–90.
165. Rosenberg M, Patterson R, Mintzer R, Cooper BJ, Roberts M, Harris KE. Clinical and immunologic criteria for the diagnosis of allergic bronchopulmonary aspergillosis. *Ann Intern Med*. 1977;86:405–14.

166. Carsin A, Romain T, Ranque S, Reynaud-Gaubert M, Dubus J-C, Mège J-L, et al. *Aspergillus fumigatus* in cystic fibrosis: An update on immune interactions and molecular diagnostics in allergic bronchopulmonary aspergillosis. *Allergy*. 2017;72:1632–42.
167. Wang JLF, Patterson R, Rosenberg M, Roberts M, Cooper BJ. Serum IgE and IgG Antibody Activity against *Aspergillus fumigatus* as a Diagnostic Aid in Allergic Bronchopulmonary Aspergillosis. *Am Rev Respir Dis*. 1978;117:917–27.
168. Hamilton RG. Clinical laboratories worldwide need to report IgE antibody results on clinical specimens as analytical results and not use differential positive thresholds. *J Allergy Clin Immunol*. 2015;136:811–2.
169. Hamilton RG. Allergic sensitization is a key risk factor for but not synonymous with allergic disease. *J Allergy Clin Immunol*. 2014;134:360–1.
170. Ricketti AJ, Greenberger PA, Pruzansky JJ, Patterson R. Hyperreactivity of mediator-releasing cells from patients with allergic bronchopulmonary aspergillosis as evidenced by basophil histamine release. *J Allergy Clin Immunol*. 1983;72:386–92.
171. Hartl D. Immunological mechanisms behind the cystic fibrosis-ABPA link. *Med Mycol*. 2009;47:S183–91.
172. Delhaes L, Frealle E, Pinel C. Serum markers for allergic bronchopulmonary aspergillosis in cystic fibrosis: State of the art and further challenges. *Med Mycol*. 2010;48:S77–87.
173. Vitte J, Ranque S, Carsin A, Gomez C, Romain T, Cassagne C, et al. Multivariate Analysis As a Support for Diagnostic Flowcharts in Allergic Bronchopulmonary Aspergillosis: A Proof-of-Concept Study. *Front Immunol*. 2017;8:1019.
174. Muthu V, Sehgal IS, Dhooria S, Aggarwal AN, Agarwal R. Utility of recombinant *Aspergillus fumigatus* antigens in the diagnosis of allergic bronchopulmonary aspergillosis: a systematic review and diagnostic test accuracy meta-analysis. *Clin Exp Allergy*. 2018;
175. Asano K, Kamei K, Hebisawa A. Allergic bronchopulmonary mycosis - pathophysiology, histology, diagnosis, and treatment. *Asia Pac Allergy*. 2018;8:e24.
176. Boyle M, Moore JE, Whitehouse JL, Bilton D, Downey DG. The diagnosis and management of respiratory tract fungal infection in cystic fibrosis: A UK survey of current practice. *Med Mycol*. 2018; [Epub ahead of print]
177. Agarwal R, Aggarwal AN, Dhooria S, Singh Sehgal I, Garg M, Saikia B, et al. A randomised trial of glucocorticoids in acute-stage allergic bronchopulmonary aspergillosis complicating asthma. *Eur Respir J*. 2016;47:490–8.
178. Agarwal R, Dhooria S, Singh Sehgal I, Aggarwal AN, Garg M, Saikia B, et al. A Randomized Trial of Itraconazole vs Prednisolone in Acute-Stage Allergic Bronchopulmonary Aspergillosis Complicating Asthma. *Chest*. 2018;153:656–64.
179. Aydın Ö, Sözüner ZÇ, Soyyiğit Ş, Kendirlihan R, Gençtürk Z, Mısırlıgil Z, et al. Omalizumab in the treatment of allergic bronchopulmonary aspergillosis: One center's experience with 14 cases. *Allergy Asthma Proc*. 2015;36:493–500.

180. Emiralioglu N, Dogru D, Tugcu GD, Yalcin E, Kiper N, Ozcelik U. Omalizumab Treatment for Allergic Bronchopulmonary Aspergillosis in Cystic Fibrosis. *Ann Pharmacother.* 2016;50:188–93.
181. Li J-X, Fan L-C, Li M-H, Cao W-J, Xu J-F. Beneficial effects of Omalizumab therapy in allergic bronchopulmonary aspergillosis: A synthesis review of published literature. *Respir Med.* 2017;122:33–42.
182. Ashkenazi M, Sity S, Sarouk I, Bar Aluma BE, Dagan A, Bezalel Y, et al. Omalizumab in allergic bronchopulmonary aspergillosis in patients with cystic fibrosis. *J Asthma Allergy.* 2018;11:101–7.
183. Terashima T, Shinozaki T, Iwami E, Nakajima T, Matsuzaki T. A case of allergic bronchopulmonary aspergillosis successfully treated with mepolizumab. *BMC Pulm Med.* 2018;18:53.
184. Laoudi Y, Paolini J-B, Grimfed A, Just J. Nebulised corticosteroid and amphotericin B: an alternative treatment for ABPA? *Eur Respir J.* 2008;31:908–9.
185. Godet C, Meurice J-C, Roblot F, Kauffmann-Lacroix C, Verdaguer M, Frat J-P, et al. Efficacy of nebulised liposomal amphotericin B in the attack and maintenance treatment of ABPA. *Eur Respir J.* 2012;39:1261–3.
186. Godet C, Couturaud F, Ragot S, Laurent F, Brun AL, Bergeron A, et al. [Allergic bronchopulmonary aspergillosis: Evaluation of a maintenance therapy with nebulized Ambisome®]. *Rev Mal Respir.* 2017;34:581–7.
187. Chakrabarti A, Das A, Panda NK. Overview of fungal rhinosinusitis. *Indian J Otolaryngol Head Neck Surg.* 2004;56:251–8.
188. Glass D, Amedee RG. Allergic Fungal Rhinosinusitis: A Review. *Ochsner J.* 2011;11:271–5.
189. Chakrabarti A, Kaur H. Allergic Aspergillus Rhinosinusitis. *J Fungi.* 2016;2.
190. Safirstein BH. Allergic Bronchopulmonary Aspergillosis with Obstruction of the Upper Respiratory Tract. *Chest.* 1976;70:788–90.
191. Manning SC, Holman M. Further evidence for allergic pathophysiology in allergic fungal sinusitis. *The Laryngoscope.* 108:1485–96.
192. Chakrabarti A, Denning DW, Ferguson BJ, Ponikau J, Buzina W, Kita H, et al. Fungal rhinosinusitis: a categorization and definitional schema addressing current controversies. *The Laryngoscope.* 2009;119:1809–18.
193. Barac A, Ong DSY, Jovancevic L, Peric A, Surda P, Tomic Spiric V, et al. Fungi-Induced Upper and Lower Respiratory Tract Allergic Diseases: One Entity. *Front Microbiol.* 2018;9:583.
194. Ponikau JU, Sherris DA, Kern EB, Homburger HA, Frigas E, Gaffey TA, et al. The Diagnosis and Incidence of Allergic Fungal Sinusitis. *Mayo Clin Proc.* 1999;74:877–84.
195. Ferguson BJ. Eosinophilic Mucin Rhinosinusitis: A Distinct Clinicopathological Entity. *The Laryngoscope.* 2000;110:799–813.

196. Ishiguro T, Kawai S, Kojima A, Shimizu Y, Kamei K, Takayanagi N. Occupational hypersensitivity pneumonitis in a koji brewer. *Clin Case Rep.* 2018;6:461–4.
197. Roussel S, Reboux G, Millon L, Dalphin J-C, Piarroux R. Pneumopathies d’hypersensibilité et exposition aux moisissures et actinomycètes de l’environnement. *J Mycol Médicale.* 2006;16:239–47.
198. Dickie HA, Rankin J. Farmer’s lung; an acute granulomatous interstitial pneumonitis occurring in agricultural workers. *J Am Med Assoc.* 1958;167:1069–76.
199. Fink JN, Ortega HG, Reynolds HY, Cormier YF, Fan LL, Franks TJ, et al. Needs and opportunities for research in hypersensitivity pneumonitis. *Am J Respir Crit Care Med.* 2005;171:792–8.
200. Girard M, Lacasse Y, Cormier Y. Hypersensitivity pneumonitis. *Allergy.* 2009;64:322–34.
201. Barrera C. Optimisation du diagnostic sérologique des pneumopathies d’hypersensibilité par le développement d’antigènes recombinants spécifiques des micro-organismes de l’environnement [PhD thesis]. Besançon; 2013
202. Dalphin J-C. Pneumopathies d’hypersensibilité. *EMC - Médecine.* 2005;2:24–33.
203. Rae W, Doffinger R, Shelton F, Sproson E, Ismail-Koch H, Lund VJ, et al. A novel insight into the immunologic basis of chronic granulomatous invasive fungal rhinosinusitis. *Allergy Rhinol Provid RI.* 2016;7:102–6.
204. Rupa V, Maheswaran S, Ebenezer J, Mathews SS. Current therapeutic protocols for chronic granulomatous fungal sinusitis. *Rhinology.* 2015;53:181–6.
205. deShazo RD, O’Brien M, Chapin K, Soto-Aguilar M, Gardner L, Swain R. A new classification and diagnostic criteria for invasive fungal sinusitis. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg.* 1997;123:1181–8.
206. deShazo RD, Chapin K, Swain RE. Fungal Sinusitis. *N Engl J Med.* 1997;337:254–9.
207. Raz E, Win W, Hagiwara M, Lui YW, Cohen B, Fatterpekar GM. Fungal Sinusitis. *Neuroimaging Clin N Am.* 2015;25:569–76.
208. Lafont E, Aguilar C, Vironneau P, Kania R, Alanio A, Poirée S, et al. [Fungal sinusitis]. *Rev Mal Respir.* 2017;34:672–92.
209. Ferguson BJ. Definitions of fungal rhinosinusitis. *Otolaryngol Clin North Am.* 2000;33:227–35.
210. Jiang R-S, Huang W-C, Liang K-L. Characteristics of Sinus Fungus Ball: A Unique Form of Rhinosinusitis. *Clin Med Insights Ear Nose Throat.* 2018;11:1179550618792254.
211. Yoon YH, Xu J, Park SK, Heo JH, Kim YM, Rha K-S. A retrospective analysis of 538 sinonasal fungus ball cases treated at a single tertiary medical center in Korea (1996-2015). *Int Forum Allergy Rhinol.* 2017;7:1070–5.
212. Denning DW, Cadranel J, Beigelman-Aubry C, Ader F, Chakrabarti A, Blot S, et al. Chronic pulmonary aspergillosis: rationale and clinical guidelines for diagnosis and management. *Eur Respir J.* 2016;47:45–68.

213. Uzunhan Y, Nunes H, Jeny F, Lacroix M, Brun S, Brillet P-Y, et al. Chronic pulmonary aspergillosis complicating sarcoidosis. *Eur Respir J.* 2017;49:1602396.
214. de Vrankrijker AMM, van der Ent CK, van Berkhout FT, Stellato RK, Willems RJL, Bonten MJM, et al. *Aspergillus fumigatus* colonization in cystic fibrosis: implications for lung function? *Clin Microbiol Infect.* 2011;17:1381–6.
215. Amin R, Dupuis A, Aaron SD, Ratjen F. The effect of chronic infection with *Aspergillus fumigatus* on lung function and hospitalization in patients with cystic fibrosis. *Chest.* 2010;137:171–6.
216. Luong M-L, Chaparro C, Stephenson A, Rotstein C, Singer LG, Waters V, et al. Pretransplant *Aspergillus* colonization of cystic fibrosis patients and the incidence of post-lung transplant invasive aspergillosis. *Transplantation.* 2014;97:351–7.
217. Shoseyov D, Brownlee KG, Conway SP, Kerem E. *Aspergillus* bronchitis in cystic fibrosis. *Chest.* 2006;130:222–6.
218. Brandt C, Roehmel J, Rickerts V, Melichar V, Niemann N, Schwarz C. *Aspergillus* Bronchitis in Patients with Cystic Fibrosis. *Mycopathologia.* 2018;183:61–9.
219. Walsh TJ, Anaissie EJ, Denning DW, Herbrecht R, Kontoyiannis DP, Marr KA, et al. Treatment of aspergillosis: clinical practice guidelines of the Infectious Diseases Society of America. *Clin Infect Dis.* 2008;46:327–60.
220. Lowes D, Al-Shair K, Newton PJ, Morris J, Harris C, Rautemaa-Richardson R, et al. Predictors of mortality in chronic pulmonary aspergillosis. *Eur Respir J.* 2017;49.
221. Jhun BW, Jeon K, Eom JS, Lee JH, Suh GY, Kwon OJ, et al. Clinical characteristics and treatment outcomes of chronic pulmonary aspergillosis. *Med Mycol.* 2013;51:811–7.
222. Denning DW, Riniotis K, Dobrashian R, Sambatakou H. Chronic cavitary and fibrosing pulmonary and pleural aspergillosis: case series, proposed nomenclature change, and review. *Clin Infect Dis.* 2003;37 Suppl 3:S265-280.
223. Muldoon EG, Sharman A, Page I, Bishop P, Denning DW. *Aspergillus* nodules; another presentation of Chronic Pulmonary Aspergillosis. *BMC Pulm Med.* 2016;16.
224. Binder RE, Faling LJ, Pugatch RD, Mahasaen C, Snider GL. Chronic necrotizing pulmonary aspergillosis: a discrete clinical entity. *Medicine (Baltimore).* 1982;61:109–24.
225. Nash G, Irvine R, Kerschmann RL, Herndier B. Pulmonary aspergillosis in acquired immune deficiency syndrome: autopsy study of an emerging pulmonary complication of human immunodeficiency virus infection. *Hum Pathol.* 1997;28:1268–75.
226. Kim SY, Lee KS, Han J, Kim J, Kim TS, Choo SW, et al. Semiinvasive pulmonary aspergillosis: CT and pathologic findings in six patients. *AJR Am J Roentgenol.* 2000;174:795–8.
227. Kobashi Y, Fukuda M, Yoshida K, Miyashita N, Niki Y, Oka M. Chronic necrotizing pulmonary aspergillosis as a complication of pulmonary *Mycobacterium avium* complex disease. *Respirol Carlton Vic.* 2006;11:809–13.

228. Nakamoto K, Takayanagi N, Kanauchi T, Ishiguro T, Yanagisawa T, Sugita Y. Prognostic factors in 194 patients with chronic necrotizing pulmonary aspergillosis. *Intern Med Tokyo Jpn.* 2013;52:727–34.
229. Ullmann AJ, Aguado JM, Arikan-Akdagli S, Denning DW, Groll AH, Lagrou K, et al. Diagnosis and management of Aspergillus diseases: executive summary of the 2017 ESCMID-ECMM-ERS guideline. *Clin Microbiol Infect Dis.* 2018;24 Suppl 1:e1–38.
230. Yuan S-M. Fungal Endocarditis. *Braz J Cardiovasc Surg.* 2016;31:252–5.
231. Meshaal MS, Labib D, Said K, Hosny M, Hassan M, Abd Al Aziz S, et al. Aspergillus endocarditis: Diagnostic criteria and predictors of outcome, A retrospective cohort study. *PLoS One.* 2018;13:e0201459.
232. Habib G, Lancellotti P, Antunes MJ, Bongiorni MG, Casalta J-P, Del Zotti F, et al. 2015 ESC Guidelines for the management of infective endocarditis: The Task Force for the Management of Infective Endocarditis of the European Society of Cardiology (ESC). Endorsed by: European Association for Cardio-Thoracic Surgery (EACTS), the European Association of Nuclear Medicine (EANM). *Eur Heart J.* 2015;36:3075–128.
233. McCormack J, Pollard J. Aspergillus endocarditis 2003-2009. *Med Mycol.* 2011;49 Suppl 1:S30-34.
234. Tattévin P, Revest M, Lefort A, Michelet C, Lortholary O. Fungal endocarditis: current challenges. *Int J Antimicrob Agents.* 2014;44:290–4.
235. Lamoth F, Calandra T. Let's add invasive aspergillosis to the list of influenza complications. *Lancet Respir Med.* 2018;
236. Bernardeschi C, Foulet F, Ingen-Housz-Oro S, Ortonne N, Sitbon K, Quereux G, et al. Cutaneous Invasive Aspergillosis: Retrospective Multicenter Study of the French Invasive-Aspergillosis Registry and Literature Review. *Medicine (Baltimore).* 2015;94:e1018.
237. Darr-Foit S, Schliemann S, Scholl S, Hipler U-C, Elsner P. Primary cutaneous aspergillosis - an uncommon opportunistic infection Review of the literature and case presentation. *J Dtsch Dermatol Ges.* 2017;15:839–41.
238. Persat F, Ranque S, Derouin F, Michel-Nguyen A, Picot S, Sulahian A. Contribution of the (1→3)- β -D-Glucan Assay for Diagnosis of Invasive Fungal Infections. *J Clin Microbiol.* 2008;46:1009–13.
239. White PL, Wingard JR, Bretagne S, Löffler J, Patterson TF, Slavin MA, et al. Aspergillus Polymerase Chain Reaction: Systematic Review of Evidence for Clinical Use in Comparison With Antigen Testing. *Clin Infect Dis.* 2015;61:1293–303.
240. Richardson M, Page I. Role of Serological Tests in the Diagnosis of Mold Infections. *Curr Fungal Infect Rep.* 2018;12(3):127-136
241. Pepys J, Riddell RW, Clayton YM. Human precipitins against common pathogenic and non-pathogenic fungi. *Nature.* 1959;184(Suppl 17):1328–9.
242. Longbottom JL, Pepys J, Clive FT. Diagnostic precipitin test in aspergillus pulmonary mycetoma. *Lancet Lond Engl.* 1964;1:588–9.

243. Yao Y, Zhou H, Shen Y, Yang Q, Ye J, Fu Y, et al. Evaluation of a quantitative serum *Aspergillus fumigatus*-specific IgM assay for diagnosis of chronic pulmonary aspergillosis. *Clin Respir J*. 2018;
244. Page ID, Baxter C, Hennequin C, Richardson MD, van Hoeyveld E, van Toorenenbergen AW, et al. Receiver operating characteristic curve analysis of four *Aspergillus*-specific IgG assays for the diagnosis of chronic pulmonary aspergillosis. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2018;91:47–51.
245. Ouchterlony O. Antigen-antibody reactions in gels. *Acta Pathol Microbiol Scand*. 1949;26:507–15.
246. Page ID, Richardson M, Denning DW. Antibody testing in aspergillosis--quo vadis? *Med Mycol*. 2015;53:417–39.
247. Tran Van Ky P, Torck C, Vaucelle T, Floc'h F. Etude comparee sur immunoelectrophoregramme des enzymes de l'extrait antigenique d'*aspergillus fumigatus*, reveles par des serums experimentaux et des serums de malades atteints d'aspergillose. *Sabouraudia*. 1969;7:73–84.
248. Association française des enseignants de parasitologie, Botterel-Chartier F, Kauffmann-Lacroix C, Roques C. Parasitologie et mycologie médicales: guide des analyses et pratiques diagnostiques. 2018.
249. Uriel J. Characterization of Enzymes in Specific Immune-Precipitates. *Ann N Y Acad Sci*. 1963;103:956–79.
250. Tran Van Ky P, Uriel J, Rose F. [Characterization of types of enzymatic activities in antigenic extracts of *Aspergillus fumigatus* after electrophoresis and immunoelectrophoresis in agarose]. *Ann Inst Pasteur*. 1966;111:161–70.
251. Collège de la Haute Autorité de santé. Actualisation des actes de biologie médicale relatifs au diagnostic des infections à *Aspergillus*. Haute autorité de santé; 2017
252. Hirst GK. The quantitative determination of influenza virus and antibodies by means of red cell agglutination. *J Exp Med*. 1942;75:49–64.
253. Ikemoto H, Shibata S. Indirect haemagglutination in pulmonary aspergilloma diagnosis. *Sabouraudia*. 1973;11:167–70.
254. Tönder O, Rödsæthier M. Indirect haemagglutination for demonstration of antibodies to *Aspergillus fumigatus*. *Acta Pathol Microbiol Scand*. 1974;82:871–8.
255. Drouhet E, Camey L, Segretain G. [Value of immunoprecipitation and of indirect immunofluorescence in bronchopulmonary aspergillosis]. *Ann Inst Pasteur*. 1972;123:379–95.
256. Franck J, Dunan S. Etude comparative de plusieurs types d'antigènes pour la réaction d'immunofluorescence indirecte dans l'aspergillose. *Médecine Mal Infect*. 1977;7:73–6.
257. Fritschy J-M, Härtig W. Immunofluorescence. In: eLS. American Cancer Society; 2001.
258. Schønheyder H, Andersen P, Stenderup A. Serum antibodies to *aspergillus fumigatus* in patients with pulmonary aspergillosis detected by immunofluorescence. *Acta Pathol Microbiol Immunol Scand*. 1982;90:273–9.

259. Sepulveda R, Longbottom JL, Pepys J. Enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) for IgG and IgE antibodies to protein and polysaccharide antigens of *Aspergillus fumigatus*. *Clin Allergy*. 1979;9:359–71.
260. Burnie JP, Matthews RC, Clark I, Milne LJR. Immunoblot fingerprinting *Aspergillus fumigatus*. *J Immunol Methods*. 1989;118:179–86.
261. Pinel C, Monod M, Ambroise-Thomas P, Grillot R. Western blot detection of IgG anti-*Aspergillus fumigatus* elastase in sera of patients with aspergillosis. *J Med Vet Mycol*. 1994;32:231–4.
262. Grenouillet F, Cabrolier N, Grenouillet F, Roussel S. Sérologie aspergillaire : corrélation immunoélectrophorèse - Western Blot *Aspergillus*. *J Mycol Médicale*. 2015;25:e109.
263. Penack O, Rempf P, Graf B, Blau IW, Thiel E. *Aspergillus galactomannan* testing in patients with long-term neutropenia: implications for clinical management. *Ann Oncol*. 2008;19:984–9.
264. Girmenia C, Micozzi A, Gentile G, Santilli S, Arleo E, Cardarelli L, et al. Clinically Driven Diagnostic Antifungal Approach in Neutropenic Patients: A Prospective Feasibility Study. *J Clin Oncol*. 2010;28:667–74.
265. Luong M-L, Fillion C, Labbé A-C, Roy J, Pépin J, Cadrin-Tourigny J, et al. Clinical utility and prognostic value of bronchoalveolar lavage galactomannan in patients with hematologic malignancies. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2010;68:132–9.
266. Tan BH, Low JGH, Chlebicka NL, Kurup A, Cheah FK, Lin RTP, et al. Galactomannan-guided preemptive vs. empirical antifungals in the persistently febrile neutropenic patient: a prospective randomized study. *Int J Infect Dis*. 2011;15:e350-356.
267. Hadrich I, Makni F, Cheikhrouhou F, Neji S, Amouri I, Sellami H, et al. Clinical utility and prognostic value of galactomannan in neutropenic patients with invasive aspergillosis. *Pathol Biol*. 2012;60:357–61.
268. Barnes R, Earnshaw S, Herbrecht R, Morrissey O, Slavin M, Bow E, et al. Economic Comparison of an Empirical Versus Diagnostic-Driven Strategy for Treating Invasive Fungal Disease in Immunocompromised Patients. *Clin Ther*. 2015;37:1317-1328.e2.
269. Garcia-Vidal C, Alastruey-Izquierdo A, Aguilar-Guisado M, Carratalà J, Castro C, Fernández-Ruiz M, et al. Executive summary of clinical practice guideline for the management of invasive diseases caused by *Aspergillus*: 2018 Update by the GEMICOMED-SEIMC/REIPI. *Enfermedades Infecc Microbiol Clínica*. 2018; S0213-005X(18)30200-3
270. Leeflang MM, Debets-Ossenkopp YJ, Wang J, Visser CE, Scholten RJ, Hooft L, et al. Galactomannan detection for invasive aspergillosis in immunocompromised patients. In: The Cochrane Collaboration, editor. *Cochrane Database of Systematic Reviews*. Chichester, UK; 2015.
271. Musher B, Fredricks D, Leisenring W, Balajee SA, Smith C, Marr KA. *Aspergillus Galactomannan Enzyme Immunoassay and Quantitative PCR for Diagnosis of Invasive Aspergillosis with Bronchoalveolar Lavage Fluid*. *J Clin Microbiol*. 2004;42:5517–22.
272. Husain S, Paterson DL, Studer SM, Crespo M, Pilewski J, Durkin M, et al. *Aspergillus Galactomannan Antigen in the Bronchoalveolar Lavage Fluid for the Diagnosis of Invasive Aspergillosis in Lung Transplant Recipients: Transplantation*. 2007;83:1330–6.

273. Maertens J, Maertens V, Theunissen K, Meersseman W, Meersseman P, Meers S, et al. Bronchoalveolar Lavage Fluid Galactomannan for the Diagnosis of Invasive Pulmonary Aspergillosis in Patients with Hematologic Diseases. *Clin Infect Dis*. 2009;49:1688–93.
274. D’Haese J, Theunissen K, Vermeulen E, Schoemans H, De Vlieger G, Lammertijn L, et al. Detection of Galactomannan in Bronchoalveolar Lavage Fluid Samples of Patients at Risk for Invasive Pulmonary Aspergillosis: Analytical and Clinical Validity. *J Clin Microbiol*. 2012;50:1258–63.
275. Asano-Mori Y, Kanda Y, Oshima K, Kako S, Shinohara A, Nakasone H, et al. False-positive *Aspergillus* galactomannan antigenaemia after haematopoietic stem cell transplantation. *J Antimicrob Chemother*. 2007;61:411–6.
276. Mori Y, Nagasaki Y, Kamezaki K, Takenaka K, Iwasaki H, Harada N, et al. High incidence of false-positive *Aspergillus* galactomannan test in multiple myeloma. *Am J Hematol*. 2010;NA-NA.
277. Gerlinger MP, Rousselot P, Rigaudeau S, Billon C, Touratier S, Castaigne S, et al. False positive galactomannan Platelia due to piperacillin-tazobactam. *Médecine Mal Infect*. 2012;42:10–4.
278. Xavier MO, Araujo JSV, Aquino VR, Severo CB, Guazzelli LS, Severo LC, et al. Variability in Galactomannan detection by platelia *Aspergillus* EIA™; according to the *Aspergillus* species. *Rev Inst Med Trop São Paulo*. 2013;55:145–7.
279. Wattal C, Khanna S, Oberoi J, Datta S, Aggarwal S. Variables affecting the performance of galactomannan assay in high-risk patients at a Tertiary Care Centre in India. *Indian J Med Microbiol*. 2013;31:34.
280. Horie M, Tamiya H, Goto Y, Suzuki M, Matsuzaki H, Hasegawa WT, et al. Nonspecific elevation of serum *Aspergillus* galactomannan antigen levels in patients with rheumatoid arthritis. *Respir Investig*. 2016;54:44–9.
281. Rivière S, Denis B, Bougnoux M-E, Lanternier F, Lecuit M, Lortholary O. Serum *Aspergillus* galactomannan for the management of disseminated histoplasmosis in AIDS. *Am J Trop Med Hyg*. 2012;87:303–5.
282. Steinbach WJ, Addison RM, McLaughlin L, Gerrald Q, Martin PL, Driscoll T, et al. Prospective *Aspergillus* galactomannan antigen testing in pediatric hematopoietic stem cell transplant recipients. *Pediatr Infect Dis J*. 2007;26:558–64.
283. Thomas L, Baggen L, Chisholm J, Sharland M. Diagnosis and treatment of aspergillosis in children. *Expert Rev Anti Infect Ther*. 2009;7:461–72.
284. Frange P, Bougnoux M-E, Lanternier F, Neven B, Moshous D, Angebault C, et al. An update on pediatric invasive aspergillosis. *Médecine Mal Infect*. 2015;45:189–98.
285. Thornton CR. Development of an Immunochromatographic Lateral-Flow Device for Rapid Serodiagnosis of Invasive Aspergillosis. *Clin Vaccine Immunol*. 2008;15:1095–105.
286. Wiederhold NP, Thornton CR, Najvar LK, Kirkpatrick WR, Bocanegra R, Patterson TF. Comparison of Lateral Flow Technology and Galactomannan and (1->3)-D-Glucan Assays for Detection of Invasive Pulmonary Aspergillosis. *Clin Vaccine Immunol*. 2009;16:1844–6.

287. Hoenigl M, Koidl C, Duettmann W, Seeber K, Wagner J, Buzina W, et al. Bronchoalveolar lavage lateral-flow device test for invasive pulmonary aspergillosis diagnosis in haematological malignancy and solid organ transplant patients. *J Infect.* 2012;65:588–91.
288. Thornton C, Johnson G, Agrawal S. Detection of Invasive Pulmonary Aspergillosis in Haematological Malignancy Patients by using Lateral-flow Technology. *JoVE J Vis Exp.* 2012;e3721–e3721.
289. Held J, Schmidt T, Thornton CR, Kotter E, Bertz H. Comparison of a novel Aspergillus lateral-flow device and the Platelia® galactomannan assay for the diagnosis of invasive aspergillosis following haematopoietic stem cell transplantation. *Infection.* 2013;41:1163–9.
290. White PL, Parr C, Thornton C, Barnes RA. Evaluation of real-time PCR, galactomannan enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), and a novel lateral-flow device for diagnosis of invasive aspergillosis. *J Clin Microbiol.* 2013;51:1510–6.
291. Hoenigl M, Prattes J, Spiess B, Wagner J, Pruessner F, Raggam RB, et al. Performance of galactomannan, beta-d-glucan, Aspergillus lateral-flow device, conventional culture, and PCR tests with bronchoalveolar lavage fluid for diagnosis of invasive pulmonary aspergillosis. *J Clin Microbiol.* 2014;52:2039–45.
292. Eigl S, Prattes J, Reinwald M, Thornton CR, Reischies F, Spiess B, et al. Influence of mould-active antifungal treatment on the performance of the Aspergillus-specific bronchoalveolar lavage fluid lateral-flow device test. *Int J Antimicrob Agents.* 2015;46:401-5
293. Johnson GL, Sarker S-J, Nannini F, Ferrini A, Taylor E, Lass-Flörl C, et al. Aspergillus-Specific Lateral-Flow Device and Real-Time PCR Testing of Bronchoalveolar Lavage Fluid: a Combination Biomarker Approach for Clinical Diagnosis of Invasive Pulmonary Aspergillosis. Warnock DW, editor. *J Clin Microbiol.* 2015;53:2103–8.
294. Pan Z, Fu M, Zhang J, Zhou H, Fu Y, Zhou J. Diagnostic accuracy of a novel lateral-flow device in invasive aspergillosis: a meta-analysis. *J Med Microbiol.* 2015;64:702–7.
295. Prattes J, Lackner M, Eigl S, Reischies F, Raggam RB, Koidl C, et al. Diagnostic accuracy of the Aspergillus-specific bronchoalveolar lavage lateral-flow assay in haematological malignancy patients. *Mycoses.* 2015;58:461–9.
296. Miceli MH, Goggins MI, Chander P, Sekaran AK, Kizy AE, Samuel L, et al. Performance of lateral flow device and galactomannan for the detection of Aspergillus species in bronchoalveolar fluid of patients at risk for invasive pulmonary aspergillosis. *Mycoses.* 2015;58:368–74.
297. Castillo CG, Kauffman CA, Zhai J, Jiang H, Agozino SM, Miceli MH. Testing the performance of a prototype lateral flow device using bronchoalveolar lavage fluid for the diagnosis of invasive pulmonary aspergillosis in high-risk patients. *Mycoses.* 2018;61:4–10.
298. Metan G, Keklik M, Dinç G, Pala Ç, Yıldırım A, Saraymen B, et al. Performance of Galactomannan Antigen, Beta-d-Glucan, and Aspergillus-Lateral-Flow Device for the Diagnosis of Invasive Aspergillosis. *Indian J Hematol Blood Transfus.* 2017;33:87–92.
299. Odabasi Z, Mattiuzzi G, Estey E, Kantarjian H, Saeki F, Ridge RJ, et al. β -d-Glucan as a Diagnostic Adjunct for Invasive Fungal Infections: Validation, Cutoff Development, and Performance in Patients with Acute Myelogenous Leukemia and Myelodysplastic Syndrome. *Clin Infect Dis.* 2004;39:199–205.

300. Karageorgopoulos DE, Vouloumanou EK, Ntziora F, Michalopoulos A, Rafailidis PI, Falagas ME. β -D-glucan assay for the diagnosis of invasive fungal infections: a meta-analysis. *Clin Infect Dis*. 2011;52:750–70.
301. Sulahian A, Porcher R, Bergeron A, Touratier S, Raffoux E, Menotti J, et al. Use and Limits of (1-3)- β -d-Glucan Assay (Fungitell), Compared to Galactomannan Determination (Platelia Aspergillus), for Diagnosis of Invasive Aspergillosis. *J Clin Microbiol*. 2014;52:2328–33.
302. Theel ES, Doern CD. β -d-Glucan Testing Is Important for Diagnosis of Invasive Fungal Infections. *J Clin Microbiol*. 2013;51:3478–83.
303. Marty FM, Koo S. Role of (1 \rightarrow 3)-beta-D-glucan in the diagnosis of invasive aspergillosis. *Med Mycol*. 2009;47 Suppl 1:S233-240.
304. Diba K, Mirhendi H, Kordbacheh P, Rezaie S. Development of RFLP-PCR method for the identification of medically important Aspergillus species using single restriction enzyme MwoI. *Braz J Microbiol*. 2014;45:503–7.
305. Torelli R, Sanguinetti M, Moody A, Pagano L, Caira M, Carolis ED, et al. Diagnosis of Invasive Aspergillosis by a Commercial Real-Time PCR Assay for Aspergillus DNA in Bronchoalveolar Lavage Fluid Samples from High-Risk Patients Compared to a Galactomannan Enzyme Immunoassay. *J Clin Microbiol*. 2011;49:4273–8.
306. Guinea J, Padilla C, Escribano P, Muñoz P, Padilla B, Gijón P, et al. Evaluation of MycAssay™ Aspergillus for Diagnosis of Invasive Pulmonary Aspergillosis in Patients without Hematological Cancer. *PLoS ONE*. 2013;8:e61545.
307. White PL, Posso RB, Barnes RA. Analytical and Clinical Evaluation of the PathoNostics AsperGenius Assay for Detection of Invasive Aspergillosis and Resistance to Azole Antifungal Drugs during Testing of Serum Samples. *J Clin Microbiol*. 2015;53:2115–21.
308. White PL, Barnes RA, Springer J, Klingspor L, Cuenca-Estrella M, Morton CO, et al. Clinical Performance of Aspergillus PCR for Testing Serum and Plasma: a Study by the European Aspergillus PCR Initiative. *J Clin Microbiol*. 2015;53:2832–7.
309. Buchheidt D, Reinwald M, Hofmann W-K, Boch T, Spiess B. Evaluating the use of PCR for diagnosing invasive aspergillosis. *Expert Rev Mol Diagn*. 2017;17:603–10.
310. Cramer R. The problem of cross-reactivity in the diagnosis of fungal allergy: Cross-reactivity in fungal allergy. *Clin Exp Allergy*. 2011;41:302–4.
311. Denning DW, Page ID, Chakaya J, Jabeen K, Jude CM, Cornet M, et al. Case Definition of Chronic Pulmonary Aspergillosis in Resource-Constrained Settings. *Emerg Infect Dis*. 2018;24:e171312.
312. Richardson MD, Page ID. Aspergillus serology: Have we arrived yet? *Med Mycol*. 2017;55:48–55.
313. Towbin H, Staehelin T, Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1979;76:4350–4.

314. Burnette WN. "Western blotting": electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate--polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A. *Anal Biochem.* 1981;112:195–203.
315. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 1970;227:680–5.
316. Alwine JC, Kemp DJ, Stark GR. Method for detection of specific RNAs in agarose gels by transfer to diazobenzoyloxymethyl-paper and hybridization with DNA probes. *Proc Natl Acad Sci.* 1977;74:5350–4.
317. Southern EM. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J Mol Biol.* 1975;98:503–17.
318. Villard O, Cimon B, L'Ollivier C, Fricker-Hidalgo H, Godineau N, Houze S, et al. Help in the Choice of Automated or Semiautomated Immunoassays for Serological Diagnosis of Toxoplasmosis: Evaluation of Nine Immunoassays by the French National Reference Center for Toxoplasmosis. Gilligan PH, editor. *J Clin Microbiol.* 2016;54:3034–42.
319. Villard O, Cimon B, L'Ollivier C, Fricker-Hidalgo H, Godineau N, Houze S, et al. Serological diagnosis of *Toxoplasma gondii* infection: Recommendations from the French National Reference Center for Toxoplasmosis. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2016;84:22–33.
320. Zafindraibe NJ, Ralalarinivo J, Rakotoniaina AI, Maeder MN, Andrianarivelo MR, Contamin B, et al. [Seroprevalence of cysticercosis and associated risk factors in a group of patients examined at the Regional Referral Hospital in Antsirabe]. *Pan Afr Med J.* 2017;28:260.
321. Chevallet M, Luche S, Rabilloud T. Silver staining of proteins in polyacrylamide gels. *Nat Protoc.* 2006;1:1852–8.
322. Koivunen ME, Krogsrud RL. Principles of Immunochemical Techniques Used in Clinical Laboratories. *Lab Med.* 2006;37:490–7.
323. Allergen Search Results [Internet]. [cited 2018 Aug 28]. Available from: <http://allergen.org/search.php?allergensource=Aspergillus+fumigatus>
324. Cramer R, Lidholm J, Grönlund H, Stüber D, Blaser K, Menz G. Automated specific IgE assay with recombinant allergens: evaluation of the recombinant *Aspergillus fumigatus* allergen I in the Pharmacia CAP System. *Clin Exp Allergy.* 26:1411–9.
325. Cramer R. Recombinant *Aspergillus fumigatus* allergens: from the nucleotide sequences to clinical applications. *Int Arch Allergy Immunol.* 1998;115:99–114.
326. Vitte J, Romain T, Carsin A, Gouitaa M, Stremmer-Le Bel N, Baravalle-Einaudi M, et al. *Aspergillus fumigatus* components distinguish IgE but not IgG4 profiles between fungal sensitization and allergic broncho-pulmonary aspergillosis. *Allergy.* 2016;71:1640–3.
327. Lykins J, Li X, Levigne P, Zhou Y, Bissati KE, Clouser F, et al. Rapid, inexpensive, fingerstick, whole-blood, sensitive, specific, point-of-care test for anti-*Toxoplasma* antibodies. *PLoS Negl Trop Dis.* 2018;12:e0006536.

Annexes

Annexe 1 : listes des définitions proposées pour l'ABPA

Annexe 2 : liste des évaluations de tests de détection des anticorps anti-*Aspergillus*

Annexe 3 : posters ABPA

Annexe 4 : posters ICT

Annexe 5 : tableaux patients

Annexe 1 : principales définitions de l'ABPA au cours du temps

Classification	Année	Critères majeurs (obligatoires)	Critères mineurs
Rosenberg <i>et al.</i> ¹	1977	Asthme Hyperéosinophilie Prick-test positif à <i>Aspergillus</i> Précipitines anti- <i>Aspergillus</i> IgE totales élevées Antécédents d'infiltrat pulmonaire Bronchiectasie centrale	
Kurup <i>et al.</i> ²	1989	Episodes fébriles récurrents Infiltrats pulmonaires Bronchiectasie Bouchons muqueux Hyperéosinophilie IgE totales élevées IgE et IgG anti- <i>Aspergillus</i> élevées Prick-test positif	
Greenberger ^{3,4}	2002, 2013	Asthme Prick-test positif à <i>Aspergillus</i> IgE totales >417kUI/ml Bronchiectasie centrale sans bronchiectasie distale	IgE et/ou IgG anti- <i>Aspergillus</i> (présent dans la classification de 2002 mais retiré en 2013)
Cystic Fibrosis Foundation Consensus Conference ⁵	2003	Cas "Classique" Mucoviscidose Détérioration Clinique aiguë/subaiguë IgE totales >1000 UI/ml sans corticoïdes Prick-test ou IgE spécifiques positif Précipitines ou IgG aspergillaires positives Radiologie : infiltrat, bouchon de mucus résistants aux antibiotiques	Critères « minimaux » Mucoviscidose Mucoviscidose Détérioration Clinique aiguë/subaiguë IgE totales >500 UI/ml sans corticoïdes Prick-test ou IgE spécifiques positif Précipitines ou IgG aspergillaires positives ou radiologie : infiltrat, bouchon de mucus résistants aux antibiotiques

Classification	Année	Critères majeurs (obligatoires)	Critères mineurs
Meili <i>et al.</i> ⁶	2007	Asthme Prick-test positif Présence d'IgE et d'IgG spécifiques IgE totales > 417UI/ml Bronchectasie centrale Eosinophilie périphérique	
ABPA complicating asthma ISHAM working group ⁷	2013	Asthme ou mucoviscidose Prick-test ou IgE <i>Aspergillus</i> positif IgE totales>1000 UI/ml (facultatif si tous les critères mineurs sont remplis)	Requis 2 parmi 3 Précipitines ou IgG anti- <i>Aspergillus</i> Opacités radiographiques compatibles avec ABPA (consolidation, nodules, doigt de gants, lignes parallèles, ombres en anneau...) Hyperéosinophilie (>500/ μ l) présente ou passée.
Denning <i>et al.</i> ⁸	2014	Asthme ou mucoviscidose IgE totales>1000UI/ml Prick-test ou IgE positives à <i>Aspergillus</i>	2 parmi : IgG ou précipitines anti- <i>Aspergillus</i> positifs Opacités radiographiques compatibles avec l'ABPA Eosinophilie (>500/ μ l)
Chisimba <i>et al.</i> ⁹	2015	IgE totales présentes ou passées >1000UI/ml IgE anti <i>Aspergillus</i>	2 parmi : Asthme Prick-test à <i>Aspergillus</i> Précipitines positives à <i>Aspergillus</i> Historique d'infiltrats pulmonaire Bronchectasie centrale Antécédent d'expectorations muqueuses marron ou particulaires
Lowes <i>et al.</i> ¹⁰	2015	IgE totales>1000 UI/ml IgE anti- <i>Aspergillus</i> positive ou prick-test positif Antécédent d'asthme avec expectorations purulentes et asthme non contrôlé	

Classification	Année	Critères majeurs (obligatoires)	Critères mineurs
Oliva <i>et al.</i> ¹¹	2015	Dégradation de la fonction respiratoire IgE anti- <i>Aspergillus</i> > 0.7 UA/ml	IgE totales > 1000 UI/ml Ou IgE totales > 500 UI/ml + culture positive et/ou précipitines et/ou imagerie anormale
Vitte <i>et al.</i> ¹²	2016	Asthme ou mucoviscidose Déterioration pulmonaire aiguë ou subaiguë IgE totales > 500 UI/ml IgE et IgG anti- <i>Aspergillus</i> Imagerie : infiltrats pulmonaires, bouchons muqueux	Echec du traitement par antibiotiques, amélioration sous corticoïdes
Carsin <i>et al.</i> ¹³	2017	Asthme ou mucoviscidose Total IgE > 1000 UI/ml ou 1000 µg/l Prick-test positif ou IgE spécifiques à <i>Aspergillus</i> > 0.35 UI/ml	2 parmi 3 : IgG positives ou élevées ou précipitines positives Imagerie : Opacités pulmonaire, bronchectasie centrale Hyperéosinophilie
Muldoon <i>et al.</i> ¹⁴	2017	Symptômes d'asthme persistant ou d'aggravation continue ou mucoviscidose avec déclin progressif de la fonction pulmonaire Bronchectasie (+/- bouchons muqueux) visible à l'imagerie IgE totales très élevées Prick-teste et/ou IgE spécifiques	Culture positive à <i>Aspergillus</i> Hyperéosinophilie IgG spécifiques à <i>Aspergillus</i>
Vitte <i>et al.</i> ¹⁵	2017	Approche avec antigènes moléculaires : IgE anti Asp F4 > 5 UA/ml IgE anti-Asp F1 > 14 UA/ml IgE anti-Asp F6 > 0.5 UA/ml IgG4 anti-Asp F2 < 0.15 UA/ml	Aucun des critères : sensibilisation Tous les critères : ABPA Une partie des critères : zone grise

Classification	Année	Critères majeurs (obligatoires)	Critères mineurs
Harada et al. ¹⁶	2018	Prick test positif pour <i>A. fumigatus</i> IgE totales >1000 UI/ml	2 parmi IgG ou précipitines positives pour <i>A. fumigatus</i> Imagerie compatible Hyperéosinophilie

Annexe 2 : Performances des tests de sérologie aspergillaire

Etude	Test	cut-off	Effectifs	Sensibilité	Spécificité
Longbottom <i>et al.</i> 1964 ¹⁷	IEP	1 arc	93 ABPA, 57 aspergillomes 245 témoins	82.7%	94.3%
	IFI	1/40 ^e	130 cas (5 ABPA, 99 aspergillomes, 26 API) 25 témoins	100%	100%
Drouhet <i>et al.</i> 1972 ¹⁸	IEP	1 arc		96.9%	100%
	IFI	1/640 ^e	22 APC 157 témoins	72.7%	84.1%
Schonheyder <i>et al.</i> 1982 ¹⁹	IFI				
	Bio-Rad®	10 U/ml	51 APC 13 ABPA	90,6%	89,6%
Guitard <i>et al.</i> 2012 ²⁰	Serion®	70 U/ml	371 femmes enceintes ou avec un diagnostic d'aspergillose exclus	85,9%	84,4%
	CE	1 arc		44,4%	NA
Baxter <i>et al.</i> 2013 ²¹	Immunocap®	40 mg/l	116 APC 46 ABPA	73,5%	NA
	Bio-Rad®	10 U/ml		74%	NA
	WB	2 bands	308 cas (diverses maladies aspergillaires)	91,2%	94%
Oliva <i>et al.</i> 2015 ¹¹	IEP	*	212 donneurs de sang	83,1%	NA
	Immunocap®	20 mg/l		96%	98%
Page <i>et al.</i> 2016 ²²	Siemens®	10 mg/l	241 APC 100 donneurs de sang	96%	98%
	Serion®	35 U/ml		90%	98%

Etude	Test	cut-off	Effectifs	Sensibilité	Spécificité
	Dynamiker®	65 U/ml		77%	97%
	Genesis®	20 U/ml		75%	99%
	CE	1 arc		59%	100%
Dumollard <i>et al.</i> 2016 ²³	Bordier®	0,8	226 APC/ABPA 206 contrôles avec un diagnostic d'aspergillose exclus	97%	90,3%
	Bio-Rad®	5 U/ml		91,7%	91,3%
	Serion®	50 U/ml		86,1%	81,5%
Harada <i>et al.</i> 2018 ¹⁶	Immunocap®	27 mg/l	52 ABPA	75%	NA
	DD	1 arc		53,8%	NA
	Serion®	70 U/ml		85,9%	84,4%

Pour les techniques Elisa, le nom de la société fabriquant le test a été utilisé.

** : Chaque centre de l'étude a utilisé ses propres critères. ABPA, aspergillose broncho-pulmonaire allergique ; APC, Aspergillose pulmonaire chronique ; API, aspergillose pulmonaire invasive ; CE, contre-électrophorèse ; DD, double diffusion ; IEP, Immunoelectrophorèse ; IFI ; immunofluorescence indirecte ; NA, non applicable ; NC, non connu*

Annexe 3 : posters et présentations sur le western blot IgE

Le travail sur le western blot de détection des IgE spécifiques d'*Aspergillus* a été présenté dans les congrès suivants :

8th Advances against Aspergillosis, Lisbonne, Portugal, 1-3 Février 2018 (poster 113)

13^{ème} Congrès Francophone d'Allergologie, Paris, 17-20 Avril 2018 (poster pneu-13)

Congrès de la Société-Française de Mycologie Médicale 16-17 Mai 2018 (communication MC014)

Congrès de l'European Academy of Allergy and Clinical Immunology 26-30 Mai 2018 (PDS 13)

20th International Society of Human and Animal Mycology 30 Juin – 4 Juillet 2018 (communication 6.2d)

Sont présentés dans cette annexe les 3 posters, dans l'ordre chronologique. Les diapositives ayant servies de support pour les deux communications orales ne sont pas présentées.

A new *Aspergillus fumigatus* Western Blot assay for IgE sensitization and Allergic Broncho Pulmonary Aspergillosis diagnosis

Raphaël Piarroux^{1,2*}, Carine Gomez³, Ania Carsin⁴, Stéphane Ranque^{2,5§}, Joana Vitte^{6§}

¹ LDBIO Diagnostics, Lyon, France

² VITROME, APHM, IHU Méditerranée Infection, Aix-Marseille Université, IRD, Marseille, France

³ Aix-Marseille Univ, APHM Assistance Publique Hôpitaux de Marseille, Hôpital Nord, Centre de Ressources et de Compétences en Mucoviscidose, Marseille, France

⁴ Aix-Marseille Univ, APHM Assistance Publique Hôpitaux de Marseille, Hôpital Timone Enfants, Pneumo-pédiatrie, Centre de Ressources et de Compétences en Mucoviscidose, Marseille, France

⁵ Parasitology-Mycology, APHM Assistance Publique Hôpitaux de Marseille, IHU Méditerranée Infection, Marseille, France

⁶ MEPHI, APHM Assistance Publique Hôpitaux de Marseille, IHU Méditerranée Infection, Aix-Marseille Université, Marseille, France

*Corresponding author, contact piarroux@ldbiodia.com; §Share senior authorship

Conflict of interest

RP received a PhD funding and SR travel grants from LDBIO Diagnostics; other authors: no conflict of interest

Introduction:

Immunoglobulin E directed against *Aspergillus fumigatus* (sIgE to Af) detection is key to both *Aspergillus* sensitization (AfS) and Allergic Broncho Pulmonary Aspergillosis (ABPA) diagnosis. No available assay is able to differentiate between these two conditions, maybe because of the limited number of Af molecular antigens available for diagnostic use.

Using a crude antigen, Western Blot (WB) should allow the detection of all antigens recognized by a patient's Ig in a single assay. Yet, data on IgE response characterization via WB remain scarce. This study aimed to test whether an Af IgE WB assay could detect both AfS and ABPA and distinguish between these two conditions.

Material and Methods:

61 sera with known sIgE reactivity (12 sIgE negative controls, 10 ABPA¹, 39 sensitization (AfS)¹), previously assayed with ImmunoCap[®] to Af extract and molecular antigens, were tested using the LDBIO *Aspergillus* WB with an anti-IgE conjugate. Performances of WB were evaluated with ImmunoCap[®] as reference. We evaluated the ability of WB LDBIO to differentiate between ABPA and sensitization patients.

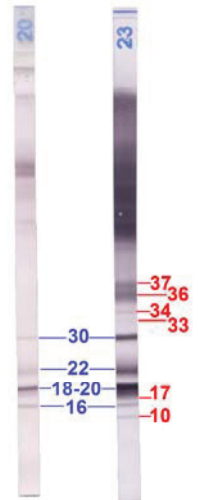
WB was performed as described by Oliva and colleagues², except for serum volume (50µL) and incubation time (overnight serum incubation).

- **AfS profile** was defined by the presence of at least 2 bands among the specific bands **B16, B18-20, B22 and B30**.
- **ABPA profile** was defined by a positive sensitization profile + at least 2 bands among **B10, B17, B33, and B34**. (Fig 1). 2 others bands, B36 and B37 were recorded, while less specific of ABPA profile

Results:

All recorded IgE WB bands are summarized in table 1. Examples are shown in Fig 2.

WB bands specific for Af sensitization	ABPA	AfS	WB bands specific for ABPA	ABPA	AfS
	N=10	N=39		N=10	N=39
B16	10 (100%)	26 (67%)	B10	8 (80%)	5 (13%)
B18-20	10 (100%)	35 (90%)	B17	9 (90%)	4 (10%)
B22	10 (100%)	27 (69%)	B33	7 (70%)	6 (15%)
B30	10 (100%)	32 (82%)	B34	5 (50%)	3 (8%)
WB positive	10 (100%)	35 (90%)	ABPA profile	9 (90%)	4 (10%)
			B36	10 (10%)	10 (26%)
			B37	7 (70%)	9 (22%)



Af sensitization bands ABPA bands
Fig 1: IgE WB profiles

Table 1: Number of IgE WB positive bands in ABPA and AfS sensitization populations for each profile:

Sensitization WB profile (left), ABPA WB profile (right).

• Specificity

- 12/12 sIgE negative sera were WB negative: Specificity = 100%.

• Af sensitization profile:

- 10/10 ABPA and 35/39 AfS sera were WB positive. Sensitivity = 92%.

- Among the 4 WB negative AfS samples, 1 was a proven ImmunoCap[®] *Alternaria alternata* cross reaction, and intensity was weak (<0,7kUA/L) in 2 others samples.

• ABPA profile:

- 9/10 ABPA displayed an ABPA profile

- the ABPA profile was absent in 35/39 non-ABPA AfS.

- The ABPA profile displayed 90% sensitivity and 90% specificity for ABPA diagnosis.

- NB. 2/4 non-ABPA (AfS) patients with WB ABPA profile were diagnosed as clinical ABPA a couple months later.

- Adding B36 and B37 to the profile would increase sensitivity to 100% but decrease specificity to 74%

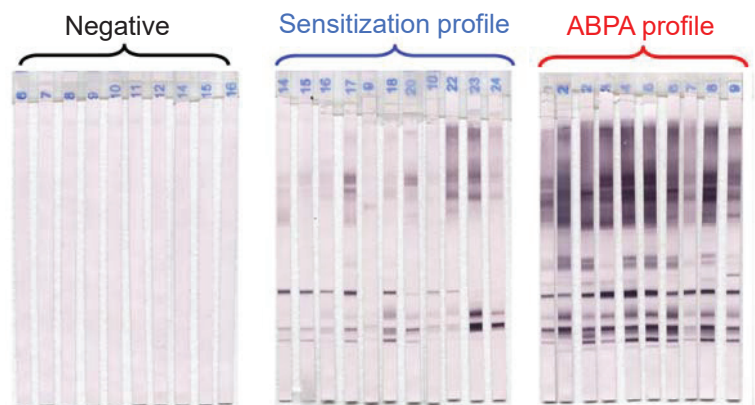


Fig 2: Aspergillus IgE WB profiles: negative, Af sensitization and ABPA

Conclusion:

Sensitization: *Aspergillus* IgE WB showed very promising results with 92% sensitivity and 100% specificity for the diagnosis of Af sensitization. It was even able to avoid a false positive result in one *A. alternata* cross reaction case.

ABPA: *Aspergillus* IgE WB discriminated ABPA from AfS with 90% sensitivity and 90% specificity. It was also an early ABPA diagnostic marker in 2 patients in whom ABPA was diagnosed a few month after the assay. Further studies are needed to confirm these preliminary results.

1 Agarwal R., et al. 2013. « Allergic Bronchopulmonary Aspergillosis: Review of Literature and Proposal of New Diagnostic and Classification Criteria ». Clinical and Experimental Allergy 43 (8):850-73.

2 Oliva A., et al. 2015. « Evaluation of the Aspergillus Western Blot IgG Kit for Diagnosis of Chronic Aspergillosis ». Journal of Clinical Microbiology 53 (1):248-54.

Intérêt du Western Blot dans le diagnostic des Aspergillose Broncho Pulmonaires Allergiques et de la sensibilisation à *Aspergillus fumigatus*

Raphaël Piarroux^{1,2*}, Carine Gomez³, Ania Carsin⁴, Stéphane Ranque^{2,5§}, Joana Vitte^{6§}

¹ LDBIO Diagnostics, Lyon, France

² VITROME, APHM, IHU Méditerranée Infection, Aix-Marseille Université, IRD, Marseille, France

³ Aix-Marseille Univ, APHM Assistance Publique Hôpitaux de Marseille, Hôpital Nord, Centre de Ressources et de Compétences en Mucoviscidose, Marseille, France

⁴ Aix-Marseille Univ, APHM Assistance Publique Hôpitaux de Marseille, Hôpital Timone Enfants, Pneumo-pédiatrie, Centre de Ressources et de Compétences en Mucoviscidose, Marseille, France

⁵ Parasitology-Mycology, APHM Assistance Publique Hôpitaux de Marseille, IHU Méditerranée Infection, Marseille, France

⁶ MEPHI, APHM Assistance Publique Hôpitaux de Marseille, IHU Méditerranée Infection, Aix-Marseille Université, Marseille, France

*Corresponding author, contact piarroux@ldbiodia.com; §Share senior authorship

Conflit d'intérêt

RP a reçu un financement CIFRE et SR des remboursement de frais de transport de la part de LDBIO Diagnostics; Tous les autres : pas de conflit d'intérêt

Introduction:

La recherche des immunoglobulines E anti-*Aspergillus fumigatus* (sIgE anti Af) est un élément majeur dans le diagnostic à la fois de la sensibilisation aspergillaire (A/S) et de l'Aspergillose Broncho Pulmonaire Allergique (ABPA). Aucun test disponible ne permet actuellement de différencier correctement ces deux conditions. Une explication à cette limite pourrait être le faible nombre d'antigènes utilisables dans le cadre du diagnostic.

Un Western Blot (WB) fabriqué à partir d'un extrait d'antigène devrait permettre la détection de tous les antigènes reconnus par les Ig d'un patient en un seul test. Cependant, les données sur l'utilisation des IgE en WB sont limitées dans la littérature. Cette étude cherche à savoir si un WB IgE pour Af pourrait détecter la sensibilisation et l'ABPA et différencier ces deux maladies.

Matériel et Méthodes :

61 échantillons avec une réactivité sIgE (12 contrôles négatifs, 10 ABPA¹, 39 A/S¹), déjà connus en ImmunoCap[®] pour l'extrait d'Af et les allergènes moléculaires, ont été testés avec le WB LDBIO Aspergillus et un conjugué anti IgE.

Les performances du WB ont été évaluées en prenant l'ImmunoCap[®] en référence. Nous avons aussi évalué le potentiel du WB pour discriminer entre A/S et ABPA.

Le WB a été réalisé comme décrit par Oliva *et al*², à l'exception du volume de sérum (50µL) et du temps d'incubation (incubation nocturne du sérum).

- Le profil A/S profile est défini par la présence d'au moins 2 bandes parmi B16, B18-20, B22 et B30.
- Le profil ABPA est défini par un profil A/S positif + au moins 2 bandes parmi B10, B17, B33, et B34. (Fig 1). 2 autres bandes, B36 et B37, ont également été identifiées, bien que moins spécifiques de l'ABPA.

Résultats:

Toutes les bandes recensées par le WB IgE sont résumées dans le tableau 1. Des exemples sont présentés dans le tableau 2.

Bandes WB spécifiques de la sensibilisation	ABPA	A/S	Bandes WB spécifiques de l'ABPA	ABPA	A/S
	N=10	N=39		N=10	N=39
B16	10 (100%)	26 (67%)	B10	8 (80%)	5 (13%)
B18-20	10 (100%)	35 (90%)	B17	9 (90%)	4 (10%)
B22	10 (100%)	27 (69%)	B33	7 (70%)	6 (15%)
B30	10 (100%)	32 (82%)	B34	5 (50%)	3 (8%)
WB positifs	10 (100%)	35 (90%)	Profil ABPA	9 (90%)	4 (10%)
			B36	10 (10%)	10 (26%)
			B37	7 (70%)	9 (22%)

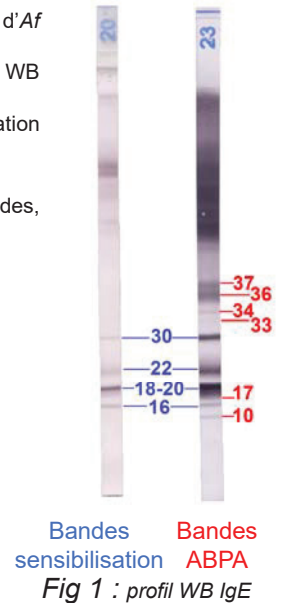


Tableau 1 : Nombre de bandes positives en WB IgE pour les groupes ABPA et A/S. A gauche : profil sensibilisation WB. A droite : profil ABPA WB

• Spécificité

- 12/12 sérums négatifs en sIgE l'étaient aussi en WB. Spécificité = 100%.

• Profil sensibilisation :

- 10/10 ABPA et 35/39 A/S étaient positifs en WB. Sensibilité = 92%.
- Parmi les 4 sérums sensibilisés avec un WB négatif, un correspondait à une réaction croisée prouvée en ImmunoCap[®] à *Alternaria alternata*. 2 des 3 autres sérums correspondaient à des réactions très faibles (<0,7KUA/L).

• Profil ABPA :

- 9/10 ABPA présentaient un profil ABPA.
- 35/39 A/S non ABPA ne présentaient pas de profil ABPA.
- Le profil a présenté une sensibilité et une spécificité de 90% pour le diagnostic de l'ABPA.
- NB : 2/4 patients non-ABPA (A/S) avec un profil WB ABPA ont développé une ABPA clinique 2 et 6 mois après le prélèvement.
- Ajouter les B36 et B37 au profil augmente la sensibilité à 100% mais diminue la spécificité à 74%.

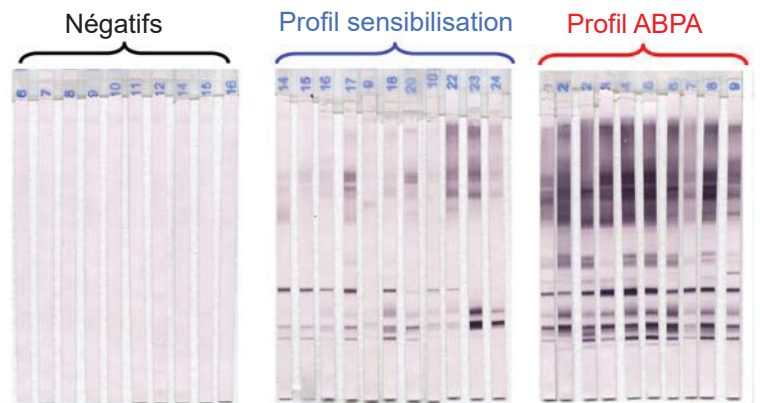


Fig 2: Profils Aspergillus IgE WB : négatif, sensibilisation à Af et ABPA

Conclusion :

Sensibilisation : Le WB IgE *Aspergillus* a montré des résultats très prometteurs avec 92% de sensibilité et 100% de spécificité pour le diagnostic de la sensibilisation aspergillaire. Il a même évité un faux positif dans le cadre d'une réaction croisée à *Alternaria alternata*.

ABPA: Le WB a séparé ABPA et sensibilisation avec une sensibilité et une spécificité à 90%. Il a aussi été un marqueur prédictif d'ABPA pour deux patients pour lesquels l'ABPA a été diagnostiquée quelques mois plus tard. Des essais complémentaires sont nécessaires pour confirmer ces résultats.

A new *Aspergillus fumigatus* Western Blot assay for IgE sensitization and Allergic Broncho Pulmonary Aspergillosis diagnosis

Raphaël Piarroux^{1,2*}, Stéphane Ranque^{2,3§}, Joana Vite^{4§} *Corresponding author, contact rpiarroux@ldbiodiag.com ; §Share senior authorship

¹ LDBIO Diagnostics, Lyon, France ² VITROME, APHM, IHU Méditerranée Infection, Aix-Marseille Université, Marseille, France ³ Parasitology-Myecology, APHM, IHU Méditerranée Infection, Marseille, France ⁴ MEPHI, APHM, IHU Méditerranée Infection, Aix-Marseille Université, Marseille, France

RP received a PhD grant and SR a travel grant from LDBIO Diagnostics. JV : none to declare.

Conflict of interest

RP received a PhD grant and SR a travel grant from LDBIO Diagnostics. JV : none to declare.

Introduction:

Allergic Broncho-Pulmonary Aspergillosis (ABPA) is a severe disease, complicating asthma and cystic fibrosis. Its diagnosis is complex and relies on various criterion. One of the major criterion is the detection of a sensitization to *Aspergillus fumigatus* (AFS) by detecting specific IgE to Af (sIgE). This sensitization can be asymptomatic and is not sufficient to define ABPA.

To date, no single test is able to help physicians differentiating ABPA from sensitization and ABPA remains underdiagnosed with only 1/3 of cases recognized. In order to improve ABPA diagnosis we evaluate here the use of a WB test (WB) to detect sIgE to *Aspergillus fumigatus*. We expect the patients to show a different IgE response between ABPA and AFS.

Material and Methods:

Population: 61 clinically characterized samples (12 negative controls, 10 ABPA and 39 AFS), with sIgE reactivity assayed by ImmunoCap® (aspergillus extract and molecular antigens).

WB Aspergillus (LDBIO, Lyon, France) was used as described by Oliva *et al*² with the following changes: sample volume (50µL), overnight incubation, anti-IgE conjugate.

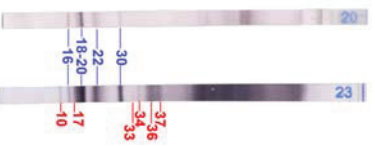
WB performances were calculated using ImmunoCap® as reference. WB discriminating power between AFS and ABPA was also evaluated.

The following profiles were used

- **AFS profile** is defined by the presence of at least 2 bands among **B16, B18-20, B22 et B30.**

- **ABPA profile** is defined by a positive AFS profile + at least 2 bands among **B10, B17, B33, et B34.** (Fig 1).

Other bands were screened and tested,



Results:

Examples of WB are shown on figure 2. Detailed band occurrence is given on table for each profile.

- **Specificity** - 12/12 sIgE negative samples were also negative in WB. Specificity = 100%.

- **AFS profile:** - 10/10 ABPA patients and 35/39 AFS patients had a positive WB AFS profile. Sensibility = 92%.

- Among the 4 AFS patients with negative WB, one was a proven ImmunoCap® cross-reaction to *Alternaria alternata*. 2 of the 3 remaining sera corresponded to very weak reactions (<0,7kU/L).

- **ABPA profile:** - 9/10 ABPA patients had a WB ABPA profile.

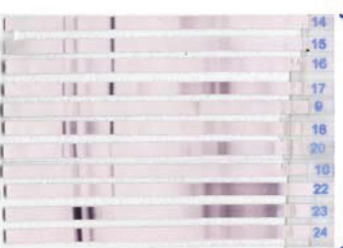
- 35/39 AFS patients did not.
- WB ABPA profile had both sensitivity and specificity of 90%.
- **NB :** 2/4 non-ABPA patients (AFS) with WB ABPA profile developed a clinically proven ABPA 2 and 6 month after the sample was tested.

- Two other bands were identified, B36 and B37. Adding them to the profile increased the sensitivity to 100% but decreased the specificity to 74%.

ABPA



Af sensitization sIgE negatives



WB ABPA profile specific bands	ABPA	AFS
	N=10	N=39
B10	8 (80%)	5 (13%)
B17	9 (90%)	4 (10%)
B33	7 (70%)	6 (15%)
B34	5 (50%)	3 (8%)
Positive ABPA profile	9 (90%)	4 (10%)
B36	10 (100%)	10 (26%)
B37	7 (70%)	9 (22%)

WB AFS profile specific bands	ABPA	AFS
	N=10	N=39
B16	10 (100%)	26 (67%)
B18-20	10 (100%)	35 (90%)
B22	10 (100%)	27 (69%)
B30	10 (100%)	32 (82%)
WB positive	10 (100%)	35 (90%)

Conclusion:

AFS: IgE *Aspergillus* WB showed very promising results with 92% sensitivity and 100% specificity. One case of cross reaction with *A. alternata* was even correctly ruled out.

ABPA: WB discriminated APBA and AFS with sensibility and specificity of 90%. In two cases, WB was positive before ABPA criteria were fulfilled, therefore WB might have a predictive potential. Further studies are needed to confirm these results.

Annexe 4 : posters et présentations sur l'ICT

Le travail sur le test rapide immunochromatographique de détection des anticorps anti-*Aspergillus* a été présenté dans les congrès suivants :

8th Advances against Aspergillosis, Lisbonne, Portugal, 1-3 Février 2018 (poster 112)

Congrès de la Société-Française de Mycologie Médicale 16-17 Mai 2018 (poster MP004)

20th International Society of Human and Animal Mycology 30 Juin – 4 Juillet 2018 (PP 1.004)

Les trois posters sont présentés dans l'ordre chronologique.

Evaluation of a new immunochromatographic test for anti-*Aspergillus* antibodies detection: Preliminary results

Raphaël Piarroux^{1,2} *, Thomas Romain³, Aurélie Martin³, Frédéric Gabriel⁵, Laurence Lachaud⁶, Joana Vitte⁴, Stéphane Ranque^{2,3}

¹ LDBIO Diagnostics, Lyon, France

² VITROME, APHM Assistance Publique Hôpitaux de Marseille, IHU Méditerranée Infection, Aix-Marseille Université, Marseille, France

³ Parasitology-Mycology, APHM Assistance Publique Hôpitaux de Marseille, IHU Méditerranée Infection, Marseille, France

⁴ MEPHI, APHM Assistance Publique Hôpitaux de Marseille, IHU Méditerranée Infection, Aix-Marseille Université, Marseille, France

⁵ Laboratoire de Parasitologie-Mycologie, CHU Bordeaux, Bordeaux, France

⁶ Laboratoire de Parasitologie-Mycologie, CHU Lapeyronie, Montpellier, France

* Corresponding author, contact : rpiarroux@ldbiodiag.com

Conflict of interest: RP received a PhD funding and SR travel grants from LDBIO Diagnostics; other authors: no conflict of interest

Introduction

Aspergillus fungi cause a wide spectrum of chronic progressive diseases in immunocompetent hosts. The detection of specific IgG (sIgG) to *Aspergillus* is a key diagnosis criterion. These diseases are endemic both in high and low-income countries. Many tests already exist for the serological diagnosis of the disease. However, they are either too expensive or requiring sophisticated automates, incompatible with resource-poor laboratory settings.

Here, we present the preliminary results of the evaluation of a new immunochromatographic test (ICT) that detects anti-*Aspergillus* antibodies in sera in less than 30 minutes and requires minimal laboratory equipment.

Material and methods

Two studies were conducted simultaneously:

- Prospective: a 4 months single-center study. 44 cases, 219 controls.
- Retrospective: a multicenter study in 3 French expert hospital laboratories. Ongoing, 123 cases, 82 controls recruited for the moment.

Case definition: multi-criteria diagnosis, based on reference consensus definitions, of the following *Aspergillus* diseases:

- Allergic Broncho Pulmonary Aspergillosis (ABPA)¹
- Chronic Pulmonary Aspergillosis (CPA)²
- Chronic colonization in cystic fibrosis patients³
- Acute and sub-acute invasive aspergillosis (IA-SAIA)⁴

Controls: patients tested for *Aspergillus* serology and who did not comply with any of the *Aspergillus* diseases case definitions above.

sIgG were determined by the test routinely used in the laboratories: Elisa Biorad® + WB *Aspergillus* LDBIO (Montpellier, Bordeaux) or Elisa Orgentec® + IEP Sebia® (Marseille).

Aspergillus ICT was performed as follow: 15µL of sera or plasma followed by 4 drops of the eluting solution were deposited onto the sample application pad. Results were read after 20 to 30 minutes. Any line at the "T" marker was considered positive. (Figure 1).

Robustness to environmental conditions variations: A panel of 5 sera, including negative and very weak positives, were tested in controlled atmosphere under low and high relative humidity (RH) – respectively, <30% and 100% RH and/or 37°C operating temperature.



Figure 1: *Aspergillus* ICT
Positive (top) and negative (bottom) results

Results

- Prospective study:

ICT was positive for 40/44 cases Sensitivity = 90.9%	ICT was negative for 211/219 controls Specificity = 96.3%
---	--

- Retrospective study:

ICT was positive for 114/123 cases Sensitivity = 92.7%	ICT was negative for 80/82 controls Specificity = 97.6%
---	--

- Compiled results: (Detailed results are shown in table 1)

ICT was positive for 154/167 cases Sensitivity = 92.2%	ICT was negative for 292/301 controls Specificity = 97.0%
---	--

Table 1:

Performances of the ICT on the whole population. Sensitivity is calculated for each disease subgroup and for the whole population.

<i>Aspergillus</i> disease	ICT +	ICT -
ABPA	51 (93%)	4
CPA	32 (100%)	0
Colonization	58 (94%)	4
IA – SAIA	8 (67%)	4
Others	5 (83%)	1
Overall positives (Sensitivity)	154 (92.2%)	13
Negatives controls (Specificity)	9	292 (97%)

Robustness to environmental conditions:

The ICT performances were not affected by high temperatures, high humidity (100% RH) or combination of both.

Same results were observed with high temperatures and low humidity.

Conclusion

- Performances:

This new *Aspergillus* ICT showed 92% sensitivity (_{95%}CI: [86.8-95.6%]) and 97% specificity (_{95%}CI: [94,1-98.6%]) in the studies. It has only been validated on serum and plasma samples; further application on whole blood samples is in progress.

- ASSURED criteria compliant diagnostic test:

The *Aspergillus* ICT requires minimal laboratory equipment, and can even be used under tropical or desert atmosphere. It could thus be implemented in middle- and low-income countries, where it could substantially enhance the diagnostic capacities of chronic aspergillosis.

References

- 1 Agarwal R., et al. 2013. « Allergic Bronchopulmonary Aspergillosis: Review of Literature and Proposal of New Diagnostic and Classification Criteria ». *Clinical and Experimental Allergy* 43 (8):850-73.
- 2 Denning D., et al. 2016. « Chronic Pulmonary Aspergillosis: Rationale and Clinical Guidelines for Diagnosis and Management ». *The European Respiratory Journal* 47 (1):45-68.
- 3 Oliva A., et al. 2015. « Evaluation of the *Aspergillus* Western Blot IgG Kit for Diagnosis of Chronic Aspergillosis ». *Journal of Clinical Microbiology* 53 (1):248-54.
- 4 De Pauw, B., et al. 2008. « Revised Definitions of Invasive Fungal Disease from the European Organization for Research and Treatment of Cancer/Invasive Fungal Infections Cooperative Group and the National Institute of Allergy and Infectious Diseases Mycoses Study Group (EORTC/MSG) Consensus Group ». *Clinical Infectious Diseases* 46 (12):1813-21.

Evaluation d'un nouveau test rapide pour la recherche d'anticorps anti-Aspergillus et comparaison au Western Blot LDBIO.

Raphaël Piarroux^{1,2*}, Thomas Romain³, Aurélie Martin³, Joana Vitte⁴, Nathalie Bourgeois⁵, Laurence Lachaud⁵, Frédéric Gabriel⁶, Damien Vainqueur⁷, Judith Fillaux⁷, Sylviane Chevrier⁸, Jean Pierre Gangneux⁸, Stéphane Ranque^{2,3}

¹ LDBIO Diagnostics, Lyon, France

² VITROME, APHM Assistance Publique Hôpitaux de Marseille, IHU Méditerranée Infection, Aix-Marseille Université, Marseille, France

³ Parasitologie-Mycologie, APHM Assistance Publique Hôpitaux de Marseille, IHU Méditerranée Infection, Marseille, France

⁴ MEPHI, APHM Assistance Publique Hôpitaux de Marseille, IHU Méditerranée Infection, Aix-Marseille Université, Marseille, France

⁵ Laboratoire de Parasitologie-Mycologie, CHU Lapeyronie, Montpellier, France

⁶ Laboratoire de Parasitologie-Mycologie, CHU Bordeaux, Bordeaux, France

⁷ Service de Parasitologie-Mycologie, CHU Toulouse, Toulouse, France

⁸ Laboratoire de Parasitologie-Mycologie, CHU Rennes, Rennes, France

* Corresponding author, contact : rpiarroux@ldbiodiag.com

Conflit d'intérêt : RP : financement CIFRE (LDBIO), SR : frais de transport (LDBIO), autres : aucun conflit d'intérêt.

Introduction

Les champignons du genre *Aspergillus* sont des champignons ubiquitaires. Chez l'immunocompétent, ils peuvent provoquer un grand nombre de maladies chroniques différentes. La détection des IgG spécifiques (sIgG) est un des éléments majeurs dans le diagnostic de ces maladies, qui affectent plusieurs millions de personnes dans le monde. S'il existe de nombreux tests disponibles pour la recherche des IgG, aucun n'est adapté aux marchés émergents en raison d'un coup trop élevé et/ou d'un besoin d'électricité stable.

Nous présentons ici l'évaluation d'un test rapide (ICT *Aspergillus*) pour la recherche des anticorps spécifiques anti-*Aspergillus* dans le sérum en moins de 30 minutes et avec un besoin minimal d'équipement.

Matériel et méthodes

Deux études ont été menées :

- Prospective: 4 mois, sur un centre (Marseille) : 44 cas, 219 témoins.
- Retrospective: multicentrique (Bordeaux, Marseille, Montpellier, Rennes, Toulouse) : 262 cas, 188 témoins.

Définition des cas : basée sur des conférences consensus :

- Aspergillose BronchoPulmonaire Allergique (ABPA)¹
- Aspergillose Pulmonaire Chronique (APC)²
- Colonisation chronique chez le patient mucoviscidose³
- Aspergilloses Invasives et Aspergilloses Invasives Sub-Aigues (AI-AISA)⁴
- Toute autre forme d'aspergillose localisée prouvée (sinusite, abcès...)

Contrôles : patients ayant fait l'objet d'une recherche sérologique aspergillaire mais qui ne correspondent à aucune des définitions de cas ci-dessus.

La recherche des anticorps aspergillaires a été faite avec 2 techniques par centre. Les techniques étaient : Elisa Biorad® (Rennes, Bordeaux, Montpellier), WB *Aspergillus* LDBIO (Montpellier, Bordeaux), Elisa Serion® (Toulouse, Marseille), IEP (Toulouse, Marseille, Rennes).

L'ICT *Aspergillus* a été utilisé en dispensant séquentiellement 15µL du sérum à tester puis 4 gouttes de la solution d'éluion dans le puits échantillon. Les résultats ont été lus 20 à 30 minutes plus tard. La présence d'une bande noire au niveau du marqueur T signifiait la positivité du test (Figure 1).

Pour tous les centres où le WB n'a pas été fait en routine, il a été effectué *a posteriori* sauf pour 7 échantillons de Marseille où le volume était insuffisant (2 cas, 5 témoins). Le WB a été réalisé et interprété selon les instructions du fabricant. Un exemple de WB positif est présenté en figure 2.

La sensibilité et la spécificité, ainsi que leurs intervalles de confiance à 95% (IC95 - méthode de Wilson avec correction de continuité) ont été mesurées pour les deux tests. L'accord entre les deux tests a été mesuré par un coefficient de kappa.



Figure 1: Aspergillus ICT
Résultats positif (haut) et négatif (bas)

Figure 2: Aspergillus WB
La positivité correspond à au moins 2 bandes parmi B16 B18-20 B22 et B30



Résultats

- Etude prospective:

L'ICT a été positive pour 40/44 cas et négative pour 211/219 contrôles Sensibilité = 90.9% Spécificité = 96.3%	Le WB a été positif pour 36/42 cas et négatif pour 192/214 contrôles. Sensibilité = 85.7% Spécificité = 89.7%
--	---

- Etude rétrospective :

L'ICT a été positive pour 232/262 cas et négative pour 181/188 contrôles. Sensibilité = 88.5% Spécificité = 96.3%	Le WB a été positif pour 247/262 cas et négatif pour 187/188 contrôles. Sensibilité = 94.3% Spécificité = 99.5%
---	---

- Au total : (résultats par maladie dans le tableau 1)

L'ICT a été positive pour 272/306 cas et négative pour 392/407 contrôles. Sensibilité = 88.9% Spécificité = 96.3%	Le WB a été positif pour 283/304 cas et négatif pour 379/402 contrôles. Sensibilité = 93.1% Spécificité = 94.3%
---	---

Table 1:

Résultats de l'ICT et du WB pour chaque population de patients.

Maladie aspergillaire	ICT	WB
ABPA	68/73 (93%)	72/73 (99%)
APC	72/78 (92%)	77/78 (99%)
Colonisation	84/94 (89%)	81/92 (88%)
AI – AISA	16/24 (67%)	19/24 (79%)
Autres formes	32/37 (86%)	34/37 (92%)
Total des positifs (Sensibilité) [IC95]	272/306 (89%) [84,7-92,1%]	283/304 (93%) [89,5-95,6%]
Contrôles (Spécificité) [IC95]	392/407 (96%) [93,8-97,9%]	379/402 (94%) [91,3-96,3%]

- Comparaison ICT/WB

L'accord entre les deux techniques est jugé très bon : 657/706 échantillons ont donné le même résultat (93%)
Coefficient de kappa : 0,858 [0,819-0,896].

Conclusion

Le nouveau kit *Aspergillus* ICT a démontré d'excellentes performances sur cette étude : 89% de sensibilité et 96% de spécificité. Ces performances sont très proches de celles du Western Blot (93% de sensibilité et 94% de spécificité). L'accord entre les deux techniques est très bon, avec un coefficient de kappa à 0,858.

Par sa facilité d'utilisation, il pourrait apporter une vraie opportunité diagnostique dans des laboratoires peu équipés.

References

- 1 Agarwal R., et al. 2013. « Allergic Bronchopulmonary Aspergillosis: Review of Literature and Proposal of New Diagnostic and Classification Criteria ». *Clinical and Experimental Allergy* 43 (8):850-73.
- 2 Denning D. et al. 2016. « Chronic Pulmonary Aspergillosis: Rationale and Clinical Guidelines for Diagnosis and Management ». *The European Respiratory Journal* 47 (1):45-68.
- 3 Oliva A, et al. 2015. « Evaluation of the Aspergillus Western Blot IgG Kit for Diagnosis of Chronic Aspergillosis ». *Journal of Clinical Microbiology* 53 (1):248-54.
- 4 De Pauw, B, et al. 2008. « Revised Definitions of Invasive Fungal Disease from the European Organization for Research and Treatment of Cancer/Invasive Fungal Infections Cooperative Group and the National Institute of Allergy and Infectious Diseases Mycoses Study Group (EORTC/MSG) Consensus Group ». *Clinical Infectious Diseases* 46 (12):1813-21.

Evaluation of a new lateral flow device for the detection of anti-*Aspergillus* antibodies and comparison to the Western Blot

Raphaël Piarroux^{1,2*}, Thomas Romain³, Aurélie Martin³, Joana Vitte⁴, Nathalie Bourgeois⁵, Laurence Lachaud⁵, Frédéric Gabriel⁶, Damien Vainqueur⁷, Judith Fillaux⁷, Sylviane Chevrier⁸, Jean Pierre Gangneux⁸, Stéphane Ranque^{2,3*} * Corresponding author, contact : rpiarroux@ldbiodiag.com

¹ LDBIO Diagnostics, Lyon, France; ² VITROME, APHM Assistance Publique Hôpitaux de Marseille, IHU Méditerranée Infection, Aix-Marseille Université, Marseille, France; ³ Parasitology-Mycology, APHM, IHU Méditerranée Infection, Marseille, France; ⁴ MEPHI, APHM, IHU Méditerranée Infection, Aix-Marseille Université, Marseille, France; ⁵ Parasitology-Mycology, CHU Lapeyronie, Montpellier, France; ⁶ Parasitology-Mycology, CHU Bordeaux, Bordeaux, France; ⁷ Parasitology-Mycology, CHU Toulouse, Toulouse, France; ⁸ Parasitology-Mycology, CHU Rennes, Rennes, France;

Conflict of interest

RP received a PhD grant and SR a travel grant from LDBIO Diagnostics. others: none to declare.

Introduction

Molds from the genus *Aspergillus* are ubiquitous. Some of them, mainly *A. fumigatus*, are opportunistic pathogens. They can affect either immunocompetent and immunosuppressed host with a wide range of diseases, some of them lethal without treatment, and are affecting millions of people over the world. Diagnosis of those disease challenging and relies on multiple criteria. For the immunocompetent host, proof of exposure to *Aspergillus* with serology, mainly IgG response, is a major criteria of the diagnosis. Many serological techniques are available, however they are not suited for resource-poor settings, being too expansive and/or relying on a stable electric supply. We present here the evaluation of a lateral flow immunochromatographic (ICT) technique for the detection of anti-*Aspergillus* antibodies in the serum or plasma. This technique produces result in less than 30 minutes with minimal laboratory equipment needed.

Materials and methods

The evaluation was composed of two studies :

- ❖ A 4 month single center prospective study (Marseille, France): 44 cases and 210 controls.
- ❖ A multicentric retrospective study (Bordeaux, Marseille, Montpellier, Rennes and Toulouse, France): 262 cases and 188 controls

Case definition was based on consensus conference:

- ❖ Allergic BronchoPulmonary Aspergillosis (ABPA)¹
- ❖ Chronic Pulmonary Aspergillosis (CPA)²
- ❖ Chronic colonization in CF³
- ❖ Acute and Sub-Acute Invasive Aspergillosis (IA-SAIA)⁴
- ❖ All other proven localized aspergillosis (abscesses, sinusitis, ...)

Controls definition: patients who underwent aspergillus serology testing but did not matched with the above definitions.

Serological techniques used to detect anti-*Aspergillus* antibodies were as follow : Elisa Biorad® (Rennes, Bordeaux, Montpellier), WB *Aspergillus* LDBIO (Montpellier, Bordeaux), Elisa Serion® (Toulouse, Marseille), IEP (Toulouse, Marseille, Rennes).

Aspergillus ICT was used by dispensing 15µL of serum or plasma sample then 4 drops of the eluting solution. Results were read with naked eye 20 to 30 minutes later. Positivity of the test was given by the presence of a grey or black line under the "T" sign (see fig).

For all centers where WB was not done as part of the routine follow-up of patients it has been made retrospectively expect for 7 samples from the prospective study (insufficient volume, 2 cases and 5 controls). WB was used according to manufacturer's instruction. Example of positive WB is shown (see fig).

For both test, Sensibility (Se), Specificity (Sp) and their 95% confidence intervals (95CI – Wilson's method with correction of continuity) were calculated using clinical status as gold standard. Agreement between both test was given using Cohen's kappa.

Results

- Prospective study:

ICT was positive for 40/44 cases and negative for 211/219 controls Se = 90.9% Sp = 96.3%	WB was positive for 36/42 cases and negative for 192/214 controls. Se = 85.7% Sp = 89.7%
--	--

- Retrospective study:

ICT was positive for 232/262 cases and negative for 181/188 controls. Se = 88.5% Sp = 96.3%	WB was positive for 247/262 cases and negative for 187/188 controls. Se = 94.3% Sp = 99.5%
---	--

- Total : (disease per disease results in table 1)

ICT was positive for 272/306 cases and negative for 392/407 controls. Se = 88.9% Sp = 96.3%	WB was positive for 283/304 cases and negative for 379/402 controls. Se = 93.1% Sp = 94.3%
---	--

Table 1 : disease per disease results for ICT and WB

Aspergillus disease	ICT	WB
ABPA	68/73 (93%)	72/73 (99%)
APC	72/78 (92%)	77/78 (99%)
Colonization	84/94 (89%)	81/92 (88%)
IA-SAIA	16/24 (67%)	19/24 (79%)
Others	32/37 (86%)	34/37 (92%)
Total positive (Se) [95CI]	272/306 (89%) [84,7-92,1%]	283/304 (93%) [89,5-95,6%]
Controls (Sp) [95CI]	392/407 (96%) [93,8-97,9%]	379/402 (94%) [91,3-96,3%]

- ICT/WB comparison

Agreement between both technique was considered to be very good : 657/706 samples gave the same results (93%).
Cohen's kappa: 0,858 [0,819-0,896].



Fig left: Positive (top) and negative (bottom) ICT

Fig right: Example of positive WB: 2 out of the 4 bands shown are needed

Conclusion

The new *Aspergillus* ICT kit showed excellent performances with 89% sensitivity and 96% specificity. Those performances were very closed of those of the WB (93% sensitivity, 94% specificity). Agreement between both techniques was very good (Kappa 0,858). Due to its ease of use, the ICT brings new diagnostic opportunities in resource-poor settings.

References

- 1 Agarwal R., et al. 2013. « Allergic Bronchopulmonary Aspergillosis: Review of Literature and Proposal of New Diagnostic and Classification Criteria ». Clinical and Experimental Allergy 43 (8):850-73.
- 2 Denning D, et al. 2016. « Chronic Pulmonary Aspergillosis: Rationale and Clinical Guidelines for Diagnosis and Management ». The European Respiratory Journal 47 (1):45-68.
- 3 Oliva A, et al. 2015. « Evaluation of the Aspergillus Western Blot IgG Kit for Diagnosis of Chronic Aspergillosis ». Journal of Clinical Microbiology 53 (1):248-54.
- 4 De Pauw, B, et al. 2008. « Revised Definitions of Invasive Fungal Disease from the EORTC/ MSG Consensus Group ». Clinical Infectious Diseases 46 (12):1813-21.

Annexe 5 : tableaux de résultats

Cette annexe présente les tableaux récapitulatifs des résultats des échantillons utilisés lors de l'évaluation du WB IgE et de l'ICT

Développement de tests de diagnostic in vitro appliqués au sérodiagnostic des infections fongiques par western blot et immunochromatographie

Code anonymat	code ano 2 pros.	age	Elisa biorad	Elisa Serion	Ccl Elisa	IEP Mar arc	IEP Mar ccl	IEP Ren arcs	IEP Ren Catal	IEP Ren ccl	IEP Tou met	IEP Tou som	IEP Tou ccl	WB ccl	ICT ccl	Clinique
ABDAM	2692429	44		156	pos	3	pos							neg	neg	témoin
ROMLO	2692445	89		12	neg	0	neg							neg	neg	témoin
BELBE	2692479	70		7	neg	0	neg							neg	neg	témoin
CASMA	2693500	66		115	pos	2	pos							pos	pos	témoin
CORCH	2693507	66		17	neg	0	neg							neg	neg	témoin
CHADI	2693529	56		34	neg	0	neg							neg	neg	témoin
MAGHU	2693530	29		14	neg	0	neg							pos	pos	témoin
DULJA	2695010	35		19	neg	0	neg							neg	neg	témoin
FOUSY	2696453	49		173	pos	2	pos							neg	neg	témoin
BARSE	2725243	39		7	neg	0	neg							neg	neg	témoin
MARVI	2727231	24		61	dtx	2	pos							pos	pos	colonisation
PASHO	2727461	80		13	neg	0	neg							pos	pos	témoin
GUIJE	2727789	64		8	neg	0	neg							neg	neg	témoin
HARKN	2727896	76		138	pos	5	pos							pos	pos	APC
CARAN	2728115	58		13	neg	0	neg							neg	neg	témoin
FONGE	2728118	66		31	neg	2	pos							pos	pos	APC
BOUSO	2728897	42		85	pos	0	neg							neg	neg	témoin
CLAVE	2729040	58		9	neg	1	pos							neg	neg	témoin
SOUJE	2732347	65		38	neg	0	neg							neg	neg	témoin
BOUPA	2741765	48		30	neg	0	neg							neg	neg	témoin
BOUMO	2742885	63		6	neg	0	neg							neg	neg	témoin
DECVA	2742889	49		35	neg	0	neg							neg	neg	témoin
MOULA	2743260	47		10	neg	0	neg							neg	neg	témoin
MICJE	2744175	21		160	pos	0	neg							pos	pos	témoin
BARJO	2744188	72		19	neg	0	neg							neg	neg	témoin
QUEJU	2744637	28		107	pos	2	pos							pos	pos	APC
AGUAU	2744642	38		85	pos	0	neg							neg	neg	témoin
MIRLU	2744677	57		6	neg	1	pos							neg	neg	témoin
AMRAB	2744748	55		38	neg	0	neg							neg	neg	témoin
RAKEV	2747012	65		6	neg	0	neg							neg	neg	témoin
DOMTI	2747016	59		118	pos	0	neg							neg	neg	témoin
GOMRU	2747584	73		8	neg	0	neg							neg	neg	témoin
RIOAU	2747629	27		8	neg	0	neg							neg	neg	témoin
HAMLY	2747673	26		10	neg	0	neg							neg	neg	témoin
HAMHA	2747678	55		0	neg	0	neg							neg	neg	témoin
RIVGI	2748185	85		31	neg	1	pos							neg	neg	témoin
PEREV	2748346	30		68	dtx	2	pos							neg	neg	colonisation
FARMI	2748536	57		21	neg	0	neg							neg	neg	témoin
FERDO	2748860	21		13	neg	0	neg							neg	neg	témoin
TURRO	2749056	74		27	neg	2	pos							neg	neg	témoin
ROUJA	2750248	72		6	neg	0	neg							neg	neg	témoin
PIARA	2750281	83		4	neg	0	neg							neg	neg	témoin
OLJO	2750282	27		55	dtx	1	pos							pos	pos	colonisation
OLJO	2750282	28		48	neg	0	neg								pos	colonisation
OLJO	2750282	28		55	dtx	1	pos								pos	colonisation
BOUMO	2750293	63		6	neg	0	neg							neg	neg	témoin
CASMA	2750297	74		25	neg	0	neg							neg	neg	témoin
FOECL	2750301	74		9	neg	0	neg							pos	pos	témoin
ZENMA	2750446	49		18	neg	0	neg							neg	neg	témoin
PERMA	2750712	54		15	neg	1	pos							neg	neg	témoin
AMRAB	2750917	55		34	neg	0	neg							neg	neg	témoin
GOMRU	2751760	73		9	neg	0	neg							neg	neg	témoin
PASJE	2751829	51		47	neg	0	neg							neg	neg	témoin
CASBR	2754030	50		93	pos	2	pos							pos	pos	AI - SAIA
MAUMA	2757171	87		4	neg	0	neg							neg	neg	témoin
MOURE	2757173	79		7	neg	0	neg							neg	neg	témoin
SERCA	2757174	41		24	neg	0	neg							neg	neg	témoin
RAPAN	2757208	89		64	dtx	1	pos							neg	neg	témoin
SERRO	2757345	79		29	neg	0	neg							neg	neg	témoin
ZENMA	2757773	49		19	neg	0	neg							neg	neg	témoin
YOUIB	2757900	56		6	neg	0	neg							neg	neg	témoin
AITFA	2757950	39		61	dtx	0	neg							neg	neg	témoin
ROUDO	2758029	45		11	neg	0	neg							pos	pos	colonisation
TORED	2758397	60		21	neg	0	neg							neg	neg	témoin
GUEEM	2758440	36		10	neg	2	pos							pos	pos	colonisation
FALDA	2759049	68		70	pos	0	neg							neg	neg	témoin
DELPI	2759070	74		8	neg	0	neg							neg	neg	témoin
SUBSA	2760803	34		11	neg	0	neg							neg	neg	témoin
SAAYO	2761793	50		6	neg	0	neg							neg	neg	témoin
GROJE	2762025	26		54	dtx	1	pos							neg	neg	témoin
PETIS	2762048	44		9	neg	0	neg							neg	neg	témoin
PLALA	2762055	39		6	neg	1	pos							neg	neg	témoin
BENMA	2762802	55		8	neg	0	neg							neg	neg	témoin
GRIHE	2765668	54		48	neg	2	pos							pos	pos	colonisation
JONPH	2765682	64		180	pos	0	neg							neg	neg	témoin
MOLBA	2765694	61		19	neg	1	pos							neg	neg	témoin
CASMA	2767637	74		21	neg	0	neg							neg	neg	témoin
GOUAN	2767652	64		11	neg	0	neg							neg	neg	témoin
MASBE	2768167	54		20	neg	0	neg							neg	neg	témoin
VACFR	2768981	46		41	neg	0	neg							neg	neg	témoin
PREPI	2772170	23		63	dtx	2	pos							pos	pos	APC
JOAGH	2773345	58		14	neg	0	neg							neg	neg	témoin
FERJE	2773347	87		7	neg	0	neg							neg	neg	témoin
CECJE	2774689	67		0	neg	0	neg							neg	neg	témoin
BALCL	2777969	84		9	neg	0	neg							neg	neg	témoin
DUFCL	2779542	40		67	dtx	2	pos							pos	pos	colonisation
RASIS	2782230	82		9	neg	0	neg							neg	neg	témoin
ORTJO	2782906	30		35	neg	0	neg							neg	neg	témoin
BOUYV	2783492	68		2	neg	0	neg							neg	neg	témoin
BOUYV	2783492	68		2	neg	0	neg							neg	neg	témoin
HUECL	2786012	60		9	neg	0	neg							neg	neg	témoin
ELMAB	2786282	61		10	neg	0	neg							neg	neg	témoin
AZOMH	2786306	40		6	neg	0	neg							neg	neg	témoin
AHAHE	2786310	24		70	pos	0	neg							pos	pos	ABPA
VINQU	2786314	25		33	neg	1	pos							pos	pos	ABPA
MAKRO	2786329	31		8	neg	0	neg							pos	pos	témoin
DUGMI	2786364	61		16	neg	0	neg							neg	neg	témoin
DASCH	2786845	60		244	pos	1	pos							neg	neg	AI - SAIA
DRIMO	2787406	22		44	neg	0	neg							neg	neg	témoin
BOULA	2788557	18		8	neg	0	neg							neg	neg	témoin
SOLAB	2788564	34		12	neg	0	neg							neg	neg	témoin
VIDCA	2788577	82		8	neg	0	neg							neg	neg	témoin
RIELA	2788940	48		51	dtx	0	neg							neg	neg	témoin
JANJU	2789490	23		5	neg	0	neg							neg	neg	témoin
DIADÉ	2789630	76		12	neg	0	neg							neg	neg	témoin
DARMO	2790145	45		8	neg	0	neg							neg	neg	témoin
ELGTO	2790249	59		8	neg	0	neg							neg	neg	témoin
DARAL	2801703	78		35	neg	0	neg							neg	neg	témoin
BROST	2802828	48		17	neg	0	neg							neg	neg	témoin
CASMI	2802913	80		17	neg	0	neg							pos	pos	témoin
KASMA	2803480	84		13	neg	0	neg							neg	neg	témoin
GUISO	2804920	46		55	dtx	1	pos							neg	neg	témoin
NEKAB	2804923	65		347	pos	3	pos							pos	pos	colonisation
DRENO	2804934	71		0	neg	3	pos							pos	pos	APC
URVLA	2805351	61		34	neg	2	pos							pos	pos	colonisation
MELAR	2805364	59		29	neg	0	neg							neg	neg	témoin
CAMVA	2805670	49		22	neg	1	pos							neg	neg	témoin
ZAIRI	2806034	55		11	neg	0										

Développement de tests de diagnostic in vitro appliqués au sérodiagnostic des infections fongiques par western blot et immunochromatographie

Code anonymat	code ano 2 pros.	age	Elisa biorad	Elisa Serion	Ccl Elisa	IEP Mar arc	IEP Mar ccl	IEP Ren arcs	IEP Ren Catal	IEP Ren ccl	IEP Tou met	IEP Tou som	IEP Tou ccl	WB ccl	ICT ccl	Clinique
CHAVA	2806046	31		5	neg	0	neg							neg	neg	témoin
OLLFA	2806718	46		49	neg	0	neg							pos	neg	témoin
LEPSO	2806725	24		148	pos	2	pos							pos	pos	colonisation
LAUCA	2806767	18		194	pos	4	pos							pos	pos	colonisation
DECD	2807343	77		180	pos	1	pos							neg	neg	témoin
CARPA	2809328	64		6	neg	0	neg							pos	neg	témoin
COHPE	2810411	70		6	neg	0	neg							neg	neg	témoin
BRUPI	2810791	75		10	neg	0	neg							neg	neg	témoin
TRALA	2811909	68		14	neg	1	pos							neg	neg	témoin
WILDA	2811914	75		21	neg	0	neg							neg	neg	témoin
DUPDI	2811918	61		14	neg	0	neg							pos	neg	témoin
CHEHO	2812349	45		22	neg	0	neg							neg	neg	témoin
PREPI	2813272	26		59	dtx	2	pos							pos	pos	APC
BOUGE	2813848	84		4	neg	0	neg							neg	neg	témoin
ROMMA	2813937	84		21	neg	0	neg							neg	neg	témoin
ODEAN	2815227	72		19	neg	0	neg							neg	neg	témoin
GATPH	2818106	60		3	neg	0	neg							neg	neg	témoin
MALMA	2818114	77		33	neg	0	neg							neg	neg	témoin
DAADA	2818217	47		10	neg	0	neg							neg	neg	témoin
PARCE	2818224	38		14	neg	0	neg							neg	neg	témoin
MONDA	2818241	60		5	neg	0	neg							neg	neg	témoin
HOMBE	2818448	63		146	pos	0	neg							neg	neg	témoin
ABOAH	2818469	42		53	dtx	0	neg							neg	neg	témoin
BACAB	2819393	58		15	neg	0	neg							neg	neg	témoin
PERJE	2819946	63		20	neg	0	neg							neg	neg	témoin
OPPVA	2820286	28		56	dtx	1	pos							pos	pos	colonisation
COLUMI	2823082	78		41	neg	0	neg							neg	neg	témoin
PRAEL	2824175	50		184	pos	0	neg							neg	neg	témoin
FIADA	2824197	35		0	neg	1	pos							pos	pos	colonisation
SCHVI	2824202	27		42	neg	0	neg							neg	pos	colonisation
ALOAB	2824220	63		31	neg	0	neg							neg	neg	témoin
BOUAL	2824715	80		16	neg	0	neg							neg	neg	témoin
SAMEL	2824832	85		19	neg	0	neg							neg	neg	témoin
TRUCL	2825222	58		11	neg	0	neg							neg	neg	témoin
HALSA	2825296	26		116	pos	3	pos							pos	pos	APC
BOUAL	2825354	80		109	pos	0	neg							neg	neg	témoin
TAIHE	2826419	72		190	pos	0	neg							neg	neg	témoin
TCHEM	2826586	51		157	pos	0	neg							neg	neg	témoin
CORJE	2826654	67		28	neg	1	pos							neg	neg	témoin
PARMI	2826784	57		31	neg	1	pos							neg	neg	témoin
DELCE	2827601	44		22	neg	0	neg							neg	neg	témoin
LIBMA	2827708	25		61	dtx	1	pos							pos	pos	ABPA
MONMA	2827959	20		22	neg	0	neg							neg	neg	témoin
WEINI	2828293	58		86	pos	3	pos							pos	pos	colonisation
RAPAN	2828307	90		52	dtx	0	neg							neg	neg	témoin
DESGE	2829644	59		14	neg	0	neg							neg	neg	témoin
GILRO	2829921	81		21	neg	0	neg							neg	neg	témoin
KHATH	2829931	62		36	neg	0	neg							neg	neg	témoin
SEMGU	2830383	57		104	pos	4	pos							pos	pos	APC
CAVMI	2830397	71		67	dtx	0	neg							neg	neg	témoin
DETFR	2830612	85		10	neg	0	neg							neg	neg	témoin
SACCH	2830614	62		14	neg	0	neg							neg	neg	témoin
SANMA	2835811	56		42	neg	0	neg							neg	neg	témoin
CHAJA	2835812	56		23	neg	0	neg							neg	neg	témoin
QUEJU	2835817	28		74	pos	3	pos							pos	pos	APC
BENLU	2835900	31		13	neg	0	neg							neg	neg	témoin
KEIMI	2835931	69		26	neg	1	pos							neg	neg	témoin
CASBR	2836533	50		119	pos	2	pos							pos	pos	AI - SAIA
ULIAL	2836555	85		8	neg	0	neg							pos	pos	AI - SAIA
DEBBE	2837283	32		65	dtx	0	neg							pos	neg	témoin
TERDI	2837306	53		15	neg	0	neg							neg	neg	témoin
VERKA	2837307	33		36	neg	1	pos							pos	pos	colonisation
BELFA	2839578	87		13	neg	0	neg							neg	neg	témoin
DEBJE	2839599	69		8	neg	0	neg							neg	neg	témoin
PAPPA	2840538	35		10	neg	0	neg							neg	neg	témoin
ELKNA	2840541	55		191	pos	1	pos							pos	neg	AI - SAIA
TKOEL	2841065	51		41	neg	0	neg							neg	neg	témoin
HACVA	2841358	52		11	neg	0	neg							neg	neg	témoin
SAUVI	2841771	73		20	neg	0	neg							neg	neg	témoin
BESFA	2843481	58		6	neg	0	neg							neg	neg	témoin
SANGI	2843569	61		11	neg	0	neg							neg	neg	témoin
VIGMA	2844019	32		121	pos	2	pos							pos	pos	APC
SACSY	2844024	49		156	pos	1	pos							neg	pos	colonisation
HUVMI	2844043	56		12	neg	0	neg							neg	neg	témoin
GUIN	2844060	18		8	neg	0	neg							neg	neg	témoin
GRANI	2844582	70		9	neg	0	neg							neg	neg	témoin
TRAJA	2844649	84		255	pos	1	pos							neg	neg	témoin
BARLI	2845022	54		9	neg	0	neg							neg	neg	témoin
DELCL	2846551	55		13	neg	0	neg							neg	neg	témoin
BERJA	2846562	71		29	neg	2	pos							pos	neg	témoin
DAULA	2847218	43		42	neg	1	pos							pos	neg	témoin
LENAL	2847917	65		8	neg	0	neg							neg	neg	témoin
LEFJO	2848412	39		13	neg	0	neg							neg	neg	témoin
MAREL	2849673	27		39	neg	0	neg							neg	pos	ABPA
IACPI	2850419	72		6	neg	0	neg							neg	neg	témoin
GIARO	2850908	75		15	neg	0	neg							neg	neg	témoin
RAPAN	2851400	90		55	dtx	0	neg							neg	neg	témoin
FORLE	2851401	76		6	neg	0	neg							neg	neg	témoin
LEVJA	2855722	66		9	neg	0	neg							neg	neg	témoin
BEAJI	2855724	69		20	neg	0	neg							neg	neg	témoin
GAUPH	2855846	57		131	pos	1	pos							neg	neg	témoin
BOYLU	2855908	28		8	neg	0	neg							neg	neg	témoin
DELGE	2856245	69		9	neg	0	neg							neg	neg	témoin
CICAN	2856769	82		7	neg	0	neg							neg	neg	témoin
BARAN	2857119	83		11	neg	0	neg							pos	pos	ABPA
OUDOM	2857127	30		10	neg	0	neg							neg	neg	témoin
GRADO	2857131	26		127	pos	0	neg							neg	neg	témoin
CARMA	2857152	60		24	neg	0	neg							neg	neg	témoin
BOUSA	2857178	27		18	neg	0	neg							pos	pos	témoin
RAYEM	2857194	30		24	neg	0	neg							pos	pos	témoin
ELETH	2857198	73		11	neg	0	neg							neg	neg	témoin
COLDE	2857751	51		44	neg	0	neg							neg	neg	témoin
BISJO	2859626	81		109	pos	0	neg							pos	pos	témoin
HADYA	2859648	33		11	neg	0	neg							neg	neg	témoin
RODJO	2860252	67		8	neg	0	neg							pos	neg	témoin
NAJMO	2860487	79		10	neg	0	neg							neg	neg	témoin
MURPA	2860508	50		12	neg	0	neg							neg	neg	témoin
BOSMA	2860534	64		16	neg	0	neg							neg	neg	témoin
JACMA	2860874	76		70	pos	0	neg							pos	neg	témoin
OPPVA	2861071	29		75	pos	0	neg							pos	pos	colonisation
RAMAI	2861082	71		5	neg	0	neg							neg	neg	témoin
DUCBR	2861083	23		121	pos	0	neg							neg	pos	colonisation
AKLYA	2861134	18		43	neg	0	neg							neg	neg	témoin
MOLGI	2862726	59		145	pos	0	neg							neg	neg	témoin
BARMI	2862752	64		42	neg	0	neg							neg	neg	témoin
LOPIA	2863711	68		6	neg	0	neg							neg	neg	témoin
DANTH	2863715	20		35	neg	0	neg							pos	pos	témoin
BALOP	286															

Développement de tests de diagnostic in vitro appliqués au sérodiagnostic des infections fongiques par western blot et immunochromatographie

Code anonymat	code ano 2 pros.	age	Elisa biorad	Elisa Serion	Ccl Elisa	IEP Mar arc	IEP Mar ccl	IEP Ren arcs	IEP Ren Catal	IEP Ren ccl	IEP Tou met	IEP Tou som	IEP Tou ccl	WB ccl	ICT ccl	Clinique
BENLA	2863725	48		39	neg	0	neg							neg	neg	témoin
WOERE	2863725	65		9	neg	0	neg							neg	neg	témoin
ROSJU	2864104	94		24	neg	0	neg							neg	neg	témoin
ANIBE	2864314	28		129	pos	2	pos							pos	pos	ABPA
COICH	2864318	57		31	neg	0	neg							pos	pos	témoin
MIACA	2864327	47		4	neg	0	neg							neg	neg	témoin
RAHSA	2865519	33		29	neg	1	pos								neg	témoin
COUAN	2865651	72		39	neg	1	pos								neg	témoin
BOURA	2937104	53		8	neg	0	neg							neg	neg	témoin
PIQLE	2937276	18		108	pos	0	neg							pos	pos	colonisation
SERCA	2958566	41		18	neg	0	neg							neg	neg	témoin
MATMA	2958573	78		4	neg	0	neg							neg	neg	témoin
MONEL	2958989	55		12	neg	0	neg							neg	neg	témoin
DESCL	2959047	78		5	neg	0	neg							neg	neg	témoin
LENAL	2959110	59		18	neg	0	neg							neg	neg	témoin
RODRU	2962154	42		37	neg	1	pos							pos	neg	colonisation
CHEMI	2965428	36		5	neg	1	pos							neg	neg	témoin
GRUO	2965446	74		18	neg	0	neg							neg	neg	témoin
FILAL	2965914	65		13	neg	0	neg							neg	neg	témoin
FARJE	2965956	63		3	neg	0	neg							neg	neg	témoin
BATOU	2966058	25		29	neg	0	neg							neg	neg	témoin
ROSJE	2966557	67		6	neg	0	neg							neg	neg	témoin
JOLLU	2966578	59		6	neg	0	neg							neg	neg	témoin
MOUPA	2966590	65		24	neg	0	neg							neg	neg	témoin
YVAGE	2966648	70		15	neg	1	pos							neg	neg	témoin
SEOSE	2966848	59		11	neg	0	neg							neg	neg	témoin
BERCL	2830609	68		22	neg	0	neg							pos	pos	témoin
BOR001		23	23,7		pos									pos	pos	colonisation
BOR002		44	3,3		neg									pos	pos	ABPA
BOR003		50	3,6		neg									pos	pos	colonisation
BOR004		26	>80,0		pos									pos	pos	APC
BOR005		49	33,4		pos									pos	pos	ABPA
BOR006		63	>80		pos									pos	pos	AI - SAIA
BOR007		71	0,2		neg									pos	neg	AI - SAIA
BOR008		21	23,8		pos									pos	pos	ABPA
BOR009		46	>80		pos									pos	pos	APC
BOR010		19	6,6		dtx									pos	pos	colonisation
BOR012		54	60,2		pos									pos	pos	colonisation
BOR013		33	>80		pos									pos	pos	AI - SAIA
BOR014		57	>80,0		pos									pos	pos	autre
BOR016		74	>80		pos									pos	pos	APC
BOR017		70	>80		pos									pos	pos	APC
BOR018		42	14,6		pos									pos	pos	ABPA
BOR019		56	36,1		pos									pos	pos	AI - SAIA
BOR020		28	14,6		pos									pos	pos	APC
BOR021		23	10,3		dtx									pos	pos	ABPA
BOR023		68	>80,0		pos									pos	pos	APC
BOR024		61	1,1		neg									pos	pos	ABPA
BOR026		51	54,6		pos									pos	pos	colonisation
BOR027		50	11,9		pos									pos	pos	ABPA
BOR028		61	1		neg									pos	neg	ABPA
BOR029		22	42		pos									pos	pos	colonisation
BOR030		54	1,9		neg									pos	neg	ABPA
BOR031		68	>80		pos									pos	pos	APC
BOR032		21	6,8		dtx									pos	pos	ABPA
BOR033		55	27,8		pos									pos	pos	APC
BOR034		46	20,5		pos									pos	pos	AI - SAIA
BOR035		19	15		pos									pos	pos	ABPA
BOR036		64	20,9		pos									pos	pos	ABPA
BOR037		35	13,6		pos									pos	pos	colonisation
BOR039		25	0,4		neg									pos	pos	ABPA
BOR040		60	43,2		pos									pos	pos	ABPA
BOR041		53	2		neg									pos	pos	ABPA
BOR042		77	23,3		pos									pos	pos	APC
BOR044		56	0,7		neg									pos	pos	ABPA
BOR045		46	11,5		pos									pos	pos	colonisation
BOR046		25	8,2		dtx									pos	pos	colonisation
BOR047		74	>80		pos									pos	pos	APC
BOR049		20	12,8		pos									pos	pos	colonisation
BOR051		55	28,6		pos									pos	pos	colonisation
BOR052		74	49,3		pos									pos	pos	ABPA
BOR053		60	7,6		dtx									pos	pos	ABPA
BOR054		40	7,5		dtx									pos	pos	colonisation
BOR056		68	>80,0		pos									pos	pos	APC
BOR057		43	6,3		dtx									pos	pos	colonisation
BOR059		53	>80		pos									pos	pos	colonisation
BOR060		56	>80		pos									pos	pos	APC
BOR061		19	16,1		pos									pos	pos	colonisation
BOR062		52	10,3		dtx									pos	pos	ABPA
BOR063		25	9,6		dtx									pos	pos	colonisation
BOR064		49	8,7		dtx									pos	pos	colonisation
BOR065		37	3,4		neg									pos	pos	ABPA
BOR066		35	19,3		pos									pos	pos	ABPA
BOR067		72	2,3		neg									pos	neg	colonisation
BOR068		34	30,1		pos									pos	pos	ABPA
BOR069		38	>80		pos									pos	pos	APC
BOR070		39	17,7		pos									pos	pos	colonisation
BOR071		67	24,1		pos									pos	pos	APC
BOR072		37	>80,0		pos									pos	pos	APC
BOR073		59	17,1		pos									pos	neg	ABPA
BOR075		22	6,6		dtx									pos	pos	colonisation
BOR077		60	6,3		dtx									neg	neg	témoin
BOR078		43	0		neg									neg	neg	témoin
BOR079		35	0,1		neg									neg	neg	témoin
BOR080		54	13,1		pos									neg	neg	témoin
BOR081		41	0,2		neg									neg	neg	témoin
BOR082		55	0,1		neg									neg	neg	témoin
BOR083		63	0,1		neg									neg	neg	témoin
BOR084		68	0,1		neg									neg	neg	témoin
BOR085		73	0,1		neg									neg	neg	témoin
BOR086		60	0,1		neg									neg	neg	témoin
BOR087		66	0,1		neg									neg	neg	témoin
BOR088		63	0,1		neg									neg	neg	témoin
BOR089		46	0,3		neg									neg	neg	témoin
BOR090		77	0,2		neg									neg	neg	témoin
BOR091		82	0,1		neg									neg	neg	témoin
BOR092		83	0,1		neg									neg	neg	témoin
BOR093		69	0		neg									neg	neg	témoin
BOR094		55	0,1		neg									neg	neg	témoin
BOR095		46	0,2		neg									neg	neg	témoin
BOR096		73	0,5		neg									neg	neg	témoin
BOR097		53	0		neg									neg	neg	témoin
BOR098		62	0,4		neg									neg	neg	témoin
BOR099		55	0,2		neg									neg	neg	témoin
BOR100		24	0,1		neg									neg	neg	témoin
BOR102		73	0,1		neg									neg	neg	témoin
BOR103		38	0,2		neg									neg	neg	témoin
BOR104		83	0,1		neg									neg	neg	témoin
BOR105		70	0,1		neg									neg	neg	témoin
BOR106		59	0,2		neg									neg	neg	témoin
BOR107		64	0,4		neg									neg	neg	témoin
BOR110		23	0,2		neg									neg	neg	témoin
BOR112		76	0,1		neg									neg	neg	témoin
BOR113		64	0,8		neg									neg	pos	témoin

Développement de tests de diagnostic in vitro appliqués au sérodiagnostic des infections fongiques par western blot et immunochromatographie

Code anonymat	code ano 2 pros.	age	Elisa biorad	Elisa Serion	Ccl Elisa	IEP Mar arc	IEP Mar ccl	IEP Ren arcs	IEP Ren Catal	IEP Ren ccl	IEP Tou met	IEP Tou som	IEP Tou ccl	WB ccl	ICT ccl	Clinique
BOR114		39	0		neg									neg	neg	témoin
BOR115		40	0,9		neg									neg	neg	témoin
BOR116		56	0,6		neg									neg	neg	témoin
BOR117		82	0,1		neg									neg	neg	témoin
BOR118		61	0		neg									neg	neg	témoin
BOR119		74	0,1		neg									neg	neg	témoin
BOR120		55	0,4		neg									neg	neg	témoin
BOR121		55	0,3		neg									neg	neg	témoin
BOR122		55	0,1		neg									neg	neg	témoin
BOR123		46	0,1		neg									neg	neg	témoin
BOR126		48	0,4		neg									neg	neg	témoin
BOR127		55	0,6		neg									neg	neg	témoin
BOR128		65	0,1		neg									neg	neg	témoin
BOR129		50	0,2		neg									neg	neg	témoin
BOR130		21	0,2		neg									neg	neg	témoin
BOR131		43	0,3		neg									neg	neg	témoin
BOR132		52	0,1		neg									neg	neg	témoin
BOR133		70	0,7		neg									neg	neg	témoin
BOR134		75	0		neg									neg	neg	témoin
BOR135		29	0,6		neg									neg	neg	témoin
BOR136		87	0,2		neg									neg	neg	témoin
BOR137		71	0,2		neg									neg	neg	témoin
BOR138		69	0,1		neg									neg	neg	témoin
BOR139		58	0,2		neg									neg	neg	témoin
BOR140		28	0		neg									neg	neg	témoin
BOR141		70	0,1		neg									neg	neg	témoin
BOR142		79	0,3		neg									neg	neg	témoin
BOR143		75	0		neg									neg	neg	témoin
BOR144		41	0,2		neg									neg	neg	témoin
BOR145		68	0		neg									neg	neg	témoin
BOR146		46	0		neg									neg	neg	témoin
BOR147		56	0,7		neg									neg	neg	témoin
BOR148		50	4,1		neg									neg	neg	témoin
BOR149		79	0,1		neg									neg	neg	témoin
BOR150		49	0,8		neg									neg	neg	témoin
FR17	NR				neg									neg	neg	témoin
FR18	NR													neg	neg	témoin
FR19	NR													neg	neg	témoin
FR21	NR													neg	neg	témoin
FR22	NR													neg	neg	témoin
FR23	NR													neg	neg	témoin
FR24	NR													neg	neg	témoin
FR25	NR													neg	neg	témoin
FR26	NR													neg	neg	témoin
FR27	NR													neg	neg	témoin
FR28	NR													neg	neg	témoin
FR30	NR													neg	neg	témoin
FR31	NR													neg	neg	témoin
FR34	NR													neg	neg	témoin
FR35	NR													neg	neg	témoin
FR36	NR													neg	neg	témoin
FR37	NR													neg	pos	témoin
FR38	NR													neg	neg	témoin
FR39	NR													neg	neg	témoin
MAR001		56		115	pos	4	pos							pos	POS	ABPA
MAR002		59		1742	pos	6	pos							pos	POS	ABPA
MAR003		66		600	pos	4	pos							pos	POS	ABPA
MAR004		74		145	pos	3	pos							pos	POS	ABPA
MAR005		50		48	neg	1	pos							pos	POS	ABPA
MAR006		57		81	pos	0	neg							pos	POS	ABPA
MAR007		51		376	pos	0	neg							pos	POS	ABPA
MAR008		30		216	pos	0	neg							pos	POS	ABPA
MAR009		24		69	dtx	0	neg							pos	pos	colonisation
MAR010		23		89	pos	2	pos							pos	pos	colonisation
MAR011		19		neg	neg	1	pos							pos	pos	colonisation
MAR012		48		122	pos	0	neg							neg	pos	colonisation
MAR013		46		22	neg	0	neg							pos	neg	colonisation
MAR014		34		120	pos	1	pos							pos	pos	colonisation
MAR015	NR			26	neg	0	neg							neg	neg	témoin
MAR016	NR			41	neg	0	neg							neg	neg	témoin
MAR017	NR			31	neg	0	neg							neg	neg	témoin
MAR018	NR			24	neg	0	neg							neg	neg	témoin
MAR019	NR			8	neg	0	neg							neg	neg	témoin
MAR020	NR			11	neg	0	neg							neg	neg	témoin
MAR021	NR			13	neg	0	neg							neg	neg	témoin
MAR022	NR			173	pos	2	pos							neg	neg	témoin
MAR023	NR			6	neg	0	neg							neg	neg	témoin
MAR024	NR			18	neg	0	neg							neg	neg	témoin
MAR025	NR			8	neg	0	neg							neg	neg	témoin
MAR026	NR			184	pos	0	neg							neg	neg	témoin
MAR027	NR			15	neg	0	neg							neg	neg	témoin
MAR028	NR				pos	0	neg							neg	neg	témoin
MAR029	NR			157	pos	0	neg							neg	neg	témoin
MAR030	NR													neg	neg	témoin
MAR031	NR													neg	pos	témoin
MAR032	NR													neg	neg	témoin
MAR033	NR													neg	neg	témoin
MAR034	NR													neg	neg	témoin
MAR035	NR													neg	neg	témoin
MAR036	NR													neg	neg	témoin
MAR037	NR													neg	neg	témoin
MAR038	NR													neg	neg	témoin
MON001		57	27		pos									pos	pos	colonisation
MON003		54	31		pos									pos	pos	ABPA
MON004		77	13		pos									pos	pos	colonisation
MON005		27	12		pos									pos	pos	colonisation
MON007		53	7		dtx									pos	pos	ABPA
MON009		27	46		pos									pos	pos	ABPA
MON010		26	5		neg									pos	pos	ABPA
MON012		22	30		pos									pos	pos	colonisation
MON015		55	12		pos									pos	pos	autre
MON017		18	21		pos									pos	pos	ABPA
MON019		22	11		pos									pos	pos	colonisation
MON021		25	17		pos									pos	pos	colonisation
MON022		82	13		pos									pos	pos	APC
MON023		26	5		neg									pos	pos	ABPA
MON024		26	6		dtx									pos	pos	ABPA
MON025		57	39		pos									pos	pos	ABPA
MON029		20	8		dtx									pos	pos	colonisation
MON032		85	400		pos									pos	pos	AI - SAIA
MON033		66	28		pos									pos	pos	APC
MON035		85	82		pos									pos	pos	AI - SAIA
MON038		56	60		pos									pos	pos	ABPA
MON041		26	4		neg									pos	pos	ABPA
MON042		86	49		pos									pos	pos	APC
MON047		55	14		pos									pos	pos	APC
MON048		52	80		pos									pos	pos	ABPA
MON049		36	49		pos									pos	pos	colonisation
MON050		48	26		pos									neg	neg	AI - SAIA
MON051		58	24		pos									pos	pos	ABPA
MON053		22	43		pos									pos	pos	ABPA
MON055		48	11		pos									pos	pos	colonisation
MON057		28	20		pos									pos	pos	colonisation
MON058		56	303		pos									pos	pos	AI - SAIA

Développement de tests de diagnostic in vitro appliqués au sérodiagnostic des infections fongiques par western blot et immunochromatographie

Code anonymat	code ano 2 pros.	age	Elisa biorad	Elisa Serion	Ccl Elisa	IEP Mar arc	IEP Mar ccl	IEP Ren arcs	IEP Ren Catal	IEP Ren ccl	IEP Tou met	IEP Tou som	IEP Tou ccl	WB ccl	ICT ccl	Clinique
MON059		73	10		dtx									pos	pos	colonisation
MON061		55	63		pos									pos	pos	AI - SAIA
MON062		48	11		pos									pos	pos	ABPA
MON065		29	16		pos									pos	pos	ABPA
MON067		18	34		pos									pos	pos	colonisation
MON068		53	12		pos									pos	pos	ABPA
MON069		77	13		pos									pos	pos	APC
MON074		63	1375		pos									pos	pos	AI - SAIA
MON075		52	557		pos									pos	pos	AI - SAIA
MON077		25	39		pos									pos	pos	colonisation
MON079		31	47		pos									pos	pos	ABPA
MON080		73	1154		pos									pos	pos	ABPA
MON081		72	50		pos									pos	pos	autre
MON083		52	1625		pos									pos	pos	APC
REN001		49	75		pos			4	pos	pos				pos	pos	autre
REN002		55	72		pos			4	neg	pos				pos	pos	autre
REN003		67	44		pos			3	neg	pos				pos	pos	APC
REN004		61	>80		pos			4	pos	pos				neg	neg	autre
REN005		42	>80		pos			7	pos	pos				pos	pos	APC
REN006		58	40		pos			3	pos	pos				pos	pos	APC
REN007		62	2240		pos			8	pos	pos				pos	pos	APC
REN008		59	20		pos			3	neg	pos				pos	pos	autre
REN009		45	265		pos			3	neg	pos				pos	pos	APC
REN010		55	>80		pos			3	pos	pos				pos	pos	autre
REN011		68	44		pos			3	neg	pos				pos	pos	autre
REN012		47	71		pos			4	pos	pos				pos	pos	autre
REN013		58	>80		pos			3	neg	pos				pos	pos	APC
REN014		47	80		pos			6	pos	pos				pos	pos	autre
REN015		42	66		pos			9	pos	pos				pos	pos	APC
REN016		38	>80		pos			5	neg	pos				pos	pos	autre
REN017		41	655		pos			4	neg	pos				pos	pos	APC
REN018		40	75		pos			5	pos	pos				pos	pos	APC
REN019		58	50		pos			3	neg	pos				pos	pos	APC
REN020		39	>80		pos			6	pos	pos				pos	pos	APC
REN021		56	73		pos			3	pos	pos				pos	pos	autre
REN022		26	>80		pos			2	neg	pos				pos	pos	autre
REN023		54	291		pos			6	neg	pos				pos	pos	APC
REN024		78	253		pos			2	neg	pos				pos	pos	APC
REN025		71	41		pos			1	neg	neg				pos	pos	autre
REN026		49	>80		pos			5	pos	pos				pos	pos	colonisation
REN027		67	>80		pos			1	neg	neg				pos	neg	APC
REN028		24	10		dtx			1	pos	pos				pos	pos	ABPA
REN029		68	26		pos			1	neg	neg				pos	pos	ABPA
REN030		56	18		pos			2	neg	pos				pos	pos	autre
REN031		70	37		pos			2	neg	pos				pos	pos	autre
REN032		57	>80		pos			7	pos	pos				pos	pos	APC
REN033		51	38		pos			1	neg	neg				pos	neg	autre
REN034		54	232		pos			3	pos	pos				pos	pos	AI - SAIA
REN035		75	156		pos			7	neg	pos				pos	pos	APC
REN036		41	73		pos			4	neg	pos				pos	pos	APC
REN037		32	423		pos			7	pos	pos				pos	pos	APC
REN038		67	58		pos			3	neg	pos				pos	pos	autre
REN039		56	64		pos			2	neg	pos				pos	pos	autre
REN040		55	15		pos			2	neg	pos				pos	pos	autre
REN041		48	25		pos			2	neg	pos				pos	pos	autre
REN042		34	15		pos			2	pos	pos				pos	neg	APC
REN043		40	485		pos			2	pos	pos				pos	pos	autre
REN044		75	253		pos			4	pos	pos				pos	pos	APC
REN045		42	596		pos			9	pos	pos				pos	pos	APC
REN046		79	79		pos			3	neg	pos				pos	pos	APC
REN047		66	10		dtx			1	neg	neg				pos	pos	autre
REN048		58	21		pos			1	neg	neg				pos	neg	autre
REN049		76	51		pos			3	pos	pos				pos	pos	APC
REN050		71	>80		pos			1	neg	neg				pos	pos	autre
REN051		64	>80		pos			2	neg	pos				pos	pos	APC
REN052		55	18		pos			1	neg	neg				pos	pos	autre
REN053		76	20		pos			2	neg	pos				pos	neg	autre
REN054		44	13		pos			4	pos	pos				pos	pos	ABPA
REN055		40	74		pos			5	pos	pos				pos	neg	AI - SAIA
REN056		63	1929		pos			8	pos	pos				pos	pos	APC
REN057		56	37		pos			2	neg	pos				pos	pos	autre
REN058		65	6		dtx			2	pos	pos				neg	pos	autre
REN059		79	27		pos			2	neg	pos				pos	pos	APC
REN060		70	28		pos			3	neg	pos				pos	pos	autre
REN061		64	21		pos			1	neg	neg				pos	pos	APC
REN062		75	100		pos			4	pos	pos				pos	neg	APC
REN063		26	>80		pos			5	pos	pos				pos	pos	APC
REN064		67	14		pos			5	pos	pos				pos	pos	APC
REN065		82	29		pos			2	neg	pos				pos	pos	ABPA
REN066		26	>80		pos			1	neg	neg				pos	pos	autre
REN067		48	43		pos			3	pos	pos				pos	pos	autre
REN068		46	61		pos			1	neg	neg				pos	pos	autre
REN069		46	63		pos			1	neg	neg				pos	pos	autre
REN070		76	2		neg			4	neg	pos				pos	pos	autre
REN071		55	74		pos			5	pos	pos				pos	pos	APC
REN072		34	15		pos			3	pos	pos				pos	neg	APC
REN073		75	56		pos			4	pos	pos				pos	neg	APC
REN074		59	68		pos			2	neg	pos				pos	pos	APC
TOU002		66		201,83	pos						7	7	pos	pos	pos	colonisation
TOU003		52		176,79	pos						5	5	pos	pos	pos	ABPA
TOU004		23		62,66	dtx						4	4	pos	pos	pos	colonisation
TOU005		48		480,3	pos						3	4	pos	pos	pos	ABPA
TOU006		60		113,95	pos						6	6	pos	pos	pos	colonisation
TOU007		48		157,19	pos						6	7	pos	pos	pos	APC
TOU008		49		76,43	pos						5	5	pos	pos	pos	APC
TOU009		73		31,33	neg						3	4	pos	pos	pos	colonisation
TOU013		36		57,99	dtx						1	1	neg	neg	neg	colonisation
TOU014		66		16,82	neg						1	1	neg	pos	pos	AI - SAIA
TOU015		66		17,07	neg						1	1	neg	pos	pos	AI - SAIA
TOU016		76		33,36	neg						4	4	pos	pos	pos	colonisation
TOU017		58		138,03	pos						2	3	pos	pos	pos	colonisation
TOU018		20		158,98	pos						5	4	pos	pos	pos	colonisation
TOU019		18		121,8	pos						5	6	pos	pos	pos	ABPA
TOU020		19		185,14	pos						7	7	pos	pos	pos	ABPA
TOU021		19		234,59	pos						6	6	pos	pos	pos	ABPA
TOU022		18		198,2	pos						3	3	pos	neg	neg	APC
TOU023		72		4,13	neg						0	0	neg	neg	neg	AI - SAIA
TOU024		72		5,22	neg						0	0	neg	neg	neg	AI - SAIA
TOU025		47		113,54	pos						4	5	pos	pos	pos	colonisation
TOU026		63		424,22	pos						7	7	pos	pos	pos	ABPA
TOU027		46		160,32	pos						0	0	neg	neg	neg	colonisation
TOU029		78		37,79	neg						1	1	neg	pos	neg	ABPA
TOU031		73		255,01	pos						8	7	pos	pos	pos	colonisation
TOU032		46		12,9	neg						0	0	neg	neg	neg	AI - SAIA
TOU033		66		154,63	pos						7	7	pos	pos	pos	APC
TOU034		36		6225,15	pos						8	7	pos	pos	pos	ABPA
TOU035		63		729,6	pos						12	10	neg	pos	pos	colonisation
TOU036		28		128,42	pos						6	5	pos	pos	pos	ABPA
TOU037		66		51,38	dtx						4	4	pos	pos	neg	colonisation

Développement de tests de diagnostic in vitro appliqués au sérodiagnostic des infections fongiques par western blot et immunochromatographie

Code anonymat	code ano 2 pros.	age	Elisa biorad	Elisa Serion	Ccl Elisa	IEP Mar arc	IEP Mar ccl	IEP Ren arcs	IEP Ren Catal	IEP Ren ccl	IEP Tou met	IEP Tou som	IEP Tou ccl	WB ccl	ICT ccl	Clinique
TOU038		20	175,48	pos							4	4	pos	pos	pos	ABPA
TOU039		20	87,74	pos							2	4	pos	pos	pos	colonisation
TOU042		46	1,32	neg							0	0	neg	neg	neg	autre
TOU043		36	13,27	neg							1	0	neg	neg	neg	colonisation
TOU044		59	45,44	neg							1	2	neg	pos	pos	APC
TOU045		59	34,94	neg							1	1	neg	pos	pos	colonisation
TOU046		59	45,31	neg							1	1	neg	pos	pos	colonisation
TOU047		55	0,00	neg							0	0	neg	neg	neg	témoin
TOU048		26	133,72	pos							2	2	neg	pos	pos	ABPA
TOU049		55	149,42	pos							6	6	pos	pos	pos	AI - SAIA
TOU050		55	285,24	pos							6	7	pos	pos	pos	colonisation
TOU051		55	22,66	neg							1	1	neg	pos	pos	colonisation
TOU052		66	51,67	dtx							2	2	neg	pos	pos	APC
TOU053		66	55,22	dtx							3	2	pos	pos	pos	APC
TOU054		78	444,21	pos							5	5	pos	pos	pos	colonisation
TOU055		64	85,29	pos							0	1	neg	pos	pos	colonisation
TOU056		61	408,64	pos							10	9	pos	pos	pos	APC
TOU057		77	106,43	pos							2	2	neg	pos	pos	colonisation
TOU058		69	27,42	neg							3	2	pos	neg	neg	colonisation
TOU059		24	213,62	pos							3	2	pos	pos	pos	ABPA
TOU060		61	28,19	neg							1	1	neg	pos	pos	APC
TOU061		61	16,21	neg							0	0	neg	pos	pos	APC
TOU062		62	19,53	neg							0	0	neg	pos	pos	APC
TOU063		56	65,74	dtx							5	5	pos	pos	pos	APC
TOU065		20	32,43	neg							3	4	pos	pos	pos	colonisation
TOU066		23	89,19	pos							1	1	neg	pos	pos	colonisation
TOU067		61	274,37	pos							4	2	pos	pos	pos	ABPA
TOU068		73	76,58	pos							7	7	pos	pos	pos	colonisation
TOU069		68	5,78	neg							1	1	neg	neg	pos	colonisation
TOU071		89	17,4	neg							3	3	pos	pos	pos	colonisation
TOU072		80	15,28	neg							3	3	pos	pos	pos	colonisation
TOU073		89	29,54	neg							3	3	pos	pos	pos	colonisation
TOU074		82	316	pos							8	7	pos	pos	pos	ABPA
TOU075		49	82,96	pos							1	1	neg	neg	neg	colonisation
TOU076		53	3,18	neg							0	0	neg	neg	neg	témoin
TOU077		55	9,50	neg							0	0	neg	neg	pos	témoin
TOU078		73	7,48	neg							0	0	neg	neg	neg	témoin
TOU079		66	11,30	neg							0	0	neg	neg	pos	témoin
TOU080		48	15,98	neg							0	0	neg	neg	neg	témoin
TOU081		44	3,53	neg							0	0	neg	neg	neg	témoin
TOU082		78	4,02	neg							0	0	neg	neg	neg	témoin
TOU083		47	16,77	neg							0	0	neg	neg	neg	témoin
TOU084		57	0,00	neg							0	0	neg	neg	neg	témoin
TOU085		34	30,76	neg							0	0	neg	neg	neg	témoin
TOU086		55	49,89	neg							0	0	neg	neg	pos	témoin
TOU087		59	16,05	neg							0	0	neg	neg	neg	témoin
TOU088		20	10,63	neg							0	0	neg	neg	neg	témoin
TOU089		45	10,96	neg							0	0	neg	neg	neg	témoin
TOU090		57	3,42	neg							0	0	neg	neg	neg	témoin
TOU091		73	26,77	neg							0	0	neg	neg	neg	témoin
TOU093		70	3,43	neg							0	0	neg	neg	neg	témoin
TOU094		66	15,32	neg							0	0	neg	neg	neg	témoin
TOU095		66	14,56	neg							0	0	neg	neg	neg	témoin
TOU096		69	23,01	neg							0	0	neg	neg	neg	témoin
TOU097		44	12,09	neg							0	0	neg	neg	neg	témoin
TOU098		43	19,56	neg							0	0	neg	neg	neg	témoin
TOU099		69	9,47	neg							0	0	neg	neg	neg	témoin
TOU100		58	8,07	neg							0	0	neg	neg	neg	témoin
TOU101		56	16,82	neg							0	0	neg	neg	neg	témoin
TOU102		38	9,47	neg							0	0	neg	neg	neg	témoin
TOU103		65	11,18	neg							0	0	neg	neg	neg	témoin
TOU104		53	14,99	neg							0	0	neg	neg	neg	témoin
TOU105		48	2,74	neg							0	0	neg	neg	neg	témoin
TOU106		29	4,27	neg							0	0	neg	neg	neg	témoin
TOU107		46	7,35	neg							0	0	neg	neg	neg	témoin
TOU108		46	7,20	neg							0	0	neg	neg	neg	témoin
TOU109		59	7,76	neg							0	0	neg	neg	neg	témoin
TOU110		54	19,14	neg							0	0	neg	neg	pos	témoin
TOU111		58	14,87	neg							0	0	neg	neg	neg	témoin
TOU112		50	3,52	neg							0	0	neg	neg	neg	témoin
TOU113		38	4,55	neg							0	0	neg	neg	neg	témoin
TOU114		62	8,58	neg							0	0	neg	neg	neg	témoin
TOU115		28	4,16	neg							0	0	neg	neg	neg	témoin
TOU116		62	10,19	neg							0	0	neg	neg	neg	témoin
TOU117		50	4,90	neg							0	0	neg	neg	neg	témoin
TOU118		73	6,62	neg							0	0	neg	neg	neg	témoin
TOU119		57	20,66	neg							0	0	neg	neg	neg	témoin
TOU120		55	28,12	neg							0	0	neg	neg	neg	témoin
TOU121		68	55,61	dtx							0	0	neg	neg	neg	témoin
TOU122		63	17,80	neg							0	0	neg	neg	neg	témoin
TOU123		72	6,52	neg							0	0	neg	neg	neg	témoin
TOU124		69	4,88	neg							0	0	neg	neg	neg	témoin
TOU125		54	71,05	pos							0	0	neg	neg	neg	témoin
TOU126		65	40,42	neg							0	0	neg	neg	neg	témoin
TOU127		55	5,10	neg							0	0	neg	neg	neg	témoin
TOU128		19	17,83	neg							0	0	neg	neg	neg	témoin
TOU129		19	18,36	neg							0	0	neg	neg	neg	témoin
TOU130		42	11,78	neg							0	0	neg	neg	neg	témoin
TOU131		32	10,34	neg							0	0	neg	neg	neg	témoin
TOU132		76	9,79	neg							0	0	neg	neg	neg	témoin
TOU133		78	4,27	neg							0	0	neg	neg	neg	témoin
TOU134		68	3,90	neg							0	0	neg	neg	neg	témoin
TOU135		44	24,95	neg							0	0	neg	neg	neg	témoin
TOU136		50	7,91	neg							0	0	neg	neg	neg	témoin
TOU137		27	10,90	neg							0	0	neg	neg	neg	témoin
TOU138		70	0,00	neg							0	0	neg	neg	neg	témoin
TOU139		66	4,71	neg							0	0	neg	neg	neg	témoin
TOU140		62	71,49	pos							0	0	neg	neg	neg	témoin
TOU141		57	44,82	neg							0	0	neg	neg	neg	témoin
TOU142		49	31,85	neg							0	0	neg	neg	neg	témoin
TOU143		58	10,78	neg							0	0	neg	neg	neg	témoin
TOU144		57	10,44	neg							0	0	neg	neg	neg	témoin
TOU145		57	10,07	neg							0	0	neg	neg	neg	témoin
TOU146		22	15,60	neg							0	0	neg	neg	neg	témoin
TOU147		22	16,84	neg							0	0	neg	neg	neg	témoin
TOU148		33	4,99	neg							0	0	neg	neg	neg	témoin
TOU149		45	11,02	neg							0	0	neg	neg	neg	témoin
TOU150		52	13,04	neg							0	0	neg	pos	neg	témoin
TOU151		62	13,12	neg							0	0	neg	neg	neg	témoin
TOU152		53	6,24	neg							0	0	neg	neg	neg	témoin

Bibliographie des annexes

1. Rosenberg M, Patterson R, Mintzer R, Cooper BJ, Roberts M, Harris KE. Clinical and immunologic criteria for the diagnosis of allergic bronchopulmonary aspergillosis. *Ann Intern Med.* 1977;86:405–14.
2. Kurup VP, Greenberger PA, Fink JN. Antibody response to low-molecular-weight antigens of *Aspergillus fumigatus* in allergic bronchopulmonary aspergillosis. *J Clin Microbiol.* 1989;27:1312–6.
3. Greenberger PA. Allergic bronchopulmonary aspergillosis. *J Allergy Clin Immunol.* 2002;110:685–92.
4. Greenberger PA. When to suspect and work up allergic bronchopulmonary aspergillosis. *Ann Allergy Asthma Immunol.* 2013;111:1–4.
5. Stevens DA, Moss RB, Kurup VP, Knutsen AP, Greenberger P, Judson MA, et al. Allergic bronchopulmonary aspergillosis in cystic fibrosis--state of the art: Cystic Fibrosis Foundation Consensus Conference. *Clin Infect Dis.* 2003;37 Suppl 3:S225-264.
6. Zmeili OS, Soubani AO. Pulmonary aspergillosis: a clinical update. *QJM Mon J Assoc Physicians.* 2007;100:317–34.
7. Agarwal R, Chakrabarti A, Shah A, Gupta D, Meis JF, Guleria R, et al. Allergic bronchopulmonary aspergillosis: review of literature and proposal of new diagnostic and classification criteria. *Clin Exp Allergy.* 2013;43:850–73.
8. Denning DW, Pashley C, Hartl D, Wardlaw A, Godet C, Del Giacco S, et al. Fungal allergy in asthma--state of the art and research needs. *Clin Transl Allergy.* 2014;4:14.
9. Chishimba L, Langridge P, Powell G, Niven RM, Denning DW. Efficacy and safety of nebulised amphotericin B (NAB) in severe asthma with fungal sensitisation (SAFS) and allergic bronchopulmonary aspergillosis (ABPA). *J Asthma.* 2015;52:289–95.
10. Lowes D, Chishimba L, Greaves M, Denning DW. Development of chronic pulmonary aspergillosis in adult asthmatics with ABPA. *Respir Med.* 2015;109:1509–15.
11. Oliva A, Flori P, Hennequin C, Dubus J-C, Reynaud-Gaubert M, Charpin D, et al. Evaluation of the *Aspergillus* Western Blot IgG Kit for Diagnosis of Chronic Aspergillosis. *J Clin Microbiol.* 2015;53:248–54.
12. Vitte J, Romain T, Carsin A, Gouitaa M, Stremler-Le Bel N, Baravalle-Einaudi M, et al. *Aspergillus fumigatus* components distinguish IgE but not IgG4 profiles between fungal sensitization and allergic broncho-pulmonary aspergillosis. *Allergy.* 2016;71:1640–3.
13. Carsin A, Romain T, Ranque S, Reynaud-Gaubert M, Dubus J-C, Mège J-L, et al. *Aspergillus fumigatus* in cystic fibrosis: An update on immune interactions and molecular diagnostics in allergic bronchopulmonary aspergillosis. *Allergy.* 2017;72:1632–42.

14. Muldoon EG, Streck ME, Patterson KC. Allergic and Noninvasive Infectious Pulmonary Aspergillosis Syndromes. *Clin Chest Med*. 2017;38:521–34.
15. Vitte J, Ranque S, Carsin A, Gomez C, Romain T, Cassagne C, et al. Multivariate Analysis As a Support for Diagnostic Flowcharts in Allergic Bronchopulmonary Aspergillosis: A Proof-of-Concept Study. *Front Immunol*. 2017;8:1019.
16. Harada K, Oguma T, Saito A, Fukutomi Y, Tanaka J, Tomomatsu K, et al. Concordance between Aspergillus-specific precipitating antibody and IgG in allergic bronchopulmonary aspergillosis. *Allergol Int*. 2018;67S:S12–7.
17. Longbottom JL, Pepys J, Clive FT. Diagnostic precipitin test in aspergillus pulmonary mycetoma. *Lancet* 1964;1:588–9.
18. Drouhet E, Camey L, Segretain G. [Value of immunoprecipitation and of indirect immunofluorescence in bronchopulmonary aspergillosis]. *Ann Inst Pasteur*. 1972;123:379–95.
19. Schønheyder H, Andersen P, Stenderup A. Serum antibodies to aspergillus fumigatus in patients with pulmonary aspergillosis detected by immunofluorescence. *Acta Pathol Microbiol Immunol Scand*. 1982;90:273–9.
20. Guitard J, Sendid B, Thorez S, Gits M, Hennequin C. Evaluation of a recombinant antigen-based enzyme immunoassay for the diagnosis of noninvasive aspergillosis. *J Clin Microbiol*. 2012;50:762–5.
21. Baxter CG, Denning DW, Jones AM, Todd A, Moore CB, Richardson MD. Performance of two Aspergillus IgG EIA assays compared with the precipitin test in chronic and allergic aspergillosis. *Clin Microbiol Infect*. 2013;19:E197–204.
22. Page ID, Richardson MD, Denning DW. Comparison of six Aspergillus-specific IgG assays for the diagnosis of chronic pulmonary aspergillosis (CPA). *J Infect*. 2016;72:240–9.
23. Dumollard C, Bailly S, Perriot S, Brenier-Pinchart MP, Saint-Raymond C, Camara B, et al. Prospective Evaluation of a New Aspergillus IgG Enzyme Immunoassay Kit for Diagnosis of Chronic and Allergic Pulmonary Aspergillosis. *J Clin Microbiol*. 2016;54:1236–42.

Intitulés des doctorats AMU

Mentions et Spécialités des doctorats votées en CS le 16/10/2012

ED 62 – SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTE

- Biologie
 - Biochimie structurale
 - Génomique et Bioinformatique
 - Biologie du développement
 - Immunologie
 - Génétique
 - Microbiologie
 - Biologie végétale
- Neurosciences
- Pathologie humaine
 - Oncologie
 - Maladies infectieuses
 - Génétique humaine
 - Conseil en Génétique
 - Pathologie vasculaire et nutrition
 - Ethique
 - Recherche clinique et Santé Publique

ED 67 – SCIENCES JURIDIQUES ET POLITIQUES

- Droit privé
- Droit public
- Histoire du droit
- Droit
- Science politique

ED 184 – MATHÉMATIQUES ET INFORMATIQUE

- Mathématiques
- Informatique
- Automatique

ED 250 – SCIENCES CHIMIQUES DE MARSEILLE

- Sciences chimiques

ED 251 – SCIENCES DE L'ENVIRONNEMENT

- Anthropologie biologique

- Ecologie
- Géosciences de l'environnement
- Génie des procédés
- Océanographie
- Chimie de l'environnement

ED 352 – PHYSIQUE ET SCIENCES DE LA MATIERE

- Astrophysique et Cosmologie
- Biophysique
- Energie, Rayonnement et Plasma
- Instrumentation
- Optique, Photonique et Traitement d'Image
- Physique des Particules et Astroparticules
- Physique Théorique et Mathématique
- Matière Condensée et Nanosciences

ED 353 – SCIENCES POUR L'INGENIEUR : MECANIQUE, PHYSIQUE, MICRO ET NANO ELECTRONIQUE

- Energétique
- Mécanique et Physique des Fluides
- Acoustique
- Mécanique des Solides
- Micro et Nanoélectronique
- Génie Civil et Architecture

ED 354 – LANGUES, LETTRES ET ARTS

- Etudes anglophones
- Etudes germaniques
- Etudes slaves
- Langue et littérature chinoises
- Langue et Littérature françaises
- Littérature générale et comparée
- Arts plastiques et sciences de l'Art
- Musicologie
- Etudes cinématographiques
- Arts du spectacle

ED 355 – ESPACES, CULTURES, SOCIETES

- Géographie
- Urbanisme et Aménagement du territoire

- Préhistoire
- Archéologie
- Histoire de l'Art
- Histoire
- Sciences de l'Antiquité
- Mondes arabe, musulman et sémitique
- Etudes romanes
- Sociologie
- Anthropologie
- Architecture

ED 356 – COGNITION, LANGAGE, EDUCATION

- Philosophie
- Psychologie
- Sciences du Langage
- Sciences de l'Information et de la Communication
- Sciences de l'Education

ED 372 – SCIENCES ECONOMIQUES ET DE GESTION

- Sciences de Gestion
- Sciences Economiques
- Sciences Economiques : AMSE

ED 463 – SCIENCES DU MOUVEMENT HUMAIN

- Sciences du Mouvement Humain
- Biomécanique
- Contrôle Perceptivo-Moteur et Apprentissage
- Physiologie de l'exercice
- Sciences de l'Homme et de la Société

Résumé

Le champignon microscopique *Aspergillus fumigatus* provoque un nombre important de maladies graves. Parmi elles, l'aspergillose pulmonaire chronique (APC) et l'aspergillose broncho-pulmonaire allergique (ABPA) affectent 3 et 4,8 millions de personnes dans le monde, respectivement.

L'APC est très souvent mortelle si elle n'est pas soignée. Elle se développe très souvent après une tuberculose. C'est donc une maladie des pays émergents, où il n'est souvent pas possible de la diagnostiquer à cause du coût trop important des techniques existantes.

L'ABPA est une complication très grave de l'asthme et de la mucoviscidose, qui complique fortement ces maladies. Elle est très difficile à diagnostiquer.

Notre travail a donc consisté à développer et évaluer deux tests, un test rapide permettant de poser le diagnostic d'APC sans avoir à utiliser de matériel de laboratoire à destination des pays émergents et un western blot qui permet la confirmation du diagnostic d'ABPA.

Abstract

Aspergillus fumigatus is a microscopic fungus that can cause numerous diseases. Among them, chronic pulmonary aspergillosis (CPA) and allergic broncho-pulmonary aspergilloses (ABPA) affect 3 and 4.8 million people, respectively.

CPA is often fatal if left untreated. It is often a complication of tuberculosis and therefore affect low and middle income countries. However, it is difficult to diagnose it in those countries, as the tests are too expensive.

ABPA is a severe complication of asthma and cystic fibrosis, worsening those diseases. It's very hard to diagnose it.

Our work was to develop and evaluate two tests, a rapid test for the diagnosis of CPA that does not require laboratory equipment designed for low and middle income countries and a western blot for confirmation of ABPA diagnosis
