

THÈSE

POUR LE DIPLÔME D'ÉTAT DE DOCTEUR EN MÉDECINE SPÉCIALITÉ BIOLOGIE MÉDICALE

Présentée et soutenue publiquement

Par

Damien VAINQUEUR

Le 11 Décembre 2018

DIAGNOSTIC SÉROLOGIQUE DES ASPERGILLOSES PULMONAIRES CHRONIQUES ET ALLERGIQUES CHEZ L'IMMUNOCOMPÉTENT : ÉVALUATION DE SEPT RÉACTIFS

Directeur de thèse : Dr Judith FILLAUX

JURY :

Monsieur le Professeur Antoine BERRY	Président
Monsieur le Professeur Alexis VALENTIN	Assesseur
Madame le Docteur Pamela CHAUVIN	Assesseur
Madame le Docteur Judith FILLAUX	Assesseur

TABLEAU du PERSONNEL HU
des Facultés de Médecine de l'Université
Paul Sabatier au 1^{er} septembre 2017

Professeurs Honoraires

Doyen Honoraire	M. ROUGE Daniel	Professeur Honoraire	M. VIRENQUE Christian
Doyen Honoraire	M. LAZORTHES Yves	Professeur Honoraire	M. CARLES Pierre
Doyen Honoraire	M. CHAP Hugues	Professeur Honoraire	M. BONAFÉ Jean-Louis
Doyen Honoraire	M. GUIRAUD-CHAUMEIL Bernard	Professeur Honoraire	M. VAYSSE Philippe
Doyen Honoraire	M. PUEL Pierre	Professeur Honoraire	M. ESQUERRE J.P.
Professeur Honoraire	M. ESCHAPASSE Henri	Professeur Honoraire	M. GUITARD Jacques
Professeur Honoraire	M. GEDEON André	Professeur Honoraire	M. LAZORTHES Frank
Professeur Honoraire	M. PASQUIE M.	Professeur Honoraire	M. ROQUE-LATRILLE Christian
Professeur Honoraire	M. RIBAUT Louis	Professeur Honoraire	M. CERENE Alain
Professeur Honoraire	M. ARLET Jacques	Professeur Honoraire	M. FOURNIAL Gérard
Professeur Honoraire	M. RIBET André	Professeur Honoraire	M. HOFF Jean
Professeur Honoraire	M. MONROZIES M.	Professeur Honoraire	M. REME Jean-Michel
Professeur Honoraire	M. DALOUS Antoine	Professeur Honoraire	M. FAUVEL Jean-Marie
Professeur Honoraire	M. DUPRE M.	Professeur Honoraire	M. FREXINOS Jacques
Professeur Honoraire	M. FABRE Jean	Professeur Honoraire	M. CARRIERE Jean-Paul
Professeur Honoraire	M. DUCOS Jean	Professeur Honoraire	M. MANSAT Michel
Professeur Honoraire	M. LACOMME Yves	Professeur Honoraire	M. BARRET André
Professeur Honoraire	M. COTONAT Jean	Professeur Honoraire	M. ROLLAND
Professeur Honoraire	M. DAVID Jean-Frédéric	Professeur Honoraire	M. THOUVENOT Jean-Paul
Professeur Honoraire	Mme DIDIER Jacqueline	Professeur Honoraire	M. CAHUZAC Jean-Philippe
Professeur Honoraire	Mme LARENG Marie-Blanche	Professeur Honoraire	M. DELSOL Georges
Professeur Honoraire	M. BERNADET	Professeur Honoraire	M. ABBAL Michel
Professeur Honoraire	M. REGNIER Claude	Professeur Honoraire	M. DURAND Dominique
Professeur Honoraire	M. COMBELLES	Professeur Honoraire	M. DALY-SCHWEITZER Nicolas
Professeur Honoraire	M. REGIS Henri	Professeur Honoraire	M. RAILHAC
Professeur Honoraire	M. ARBUS Louis	Professeur Honoraire	M. POURRAT Jacques
Professeur Honoraire	M. PUJOL Michel	Professeur Honoraire	M. QUERLEU Denis
Professeur Honoraire	M. ROCHICCIOLI Pierre	Professeur Honoraire	M. ARNE Jean-Louis
Professeur Honoraire	M. RUMEAU Jean-Louis	Professeur Honoraire	M. ESCOURROU Jean
Professeur Honoraire	M. BESOMBES Jean-Paul	Professeur Honoraire	M. FORTANIER Gilles
Professeur Honoraire	M. SUC Jean-Michel	Professeur Honoraire	M. LAGARRIGUE Jacques
Professeur Honoraire	M. VALDIGUIE Pierre	Professeur Honoraire	M. PESSEY Jean-Jacques
Professeur Honoraire	M. BOUNHOURE Jean-Paul	Professeur Honoraire	M. CHAVOIN Jean-Pierre
Professeur Honoraire	M. CARTON Michel	Professeur Honoraire	M. GERAUD Gilles
Professeur Honoraire	Mme PUEL Jacqueline	Professeur Honoraire	M. PLANTE Pierre
Professeur Honoraire	M. GOUZI Jean-Louis	Professeur Honoraire	M. MAGNAVAL Jean-François
Professeur Honoraire associé	M. DUTAU Guy	Professeur Honoraire	M. MONROZIES Xavier
Professeur Honoraire	M. PASCAL J.P.	Professeur Honoraire	M. MOSCOVICI Jacques
Professeur Honoraire	M. SALVADOR Michel	Professeur Honoraire	Mme GENESTAL Michèle
Professeur Honoraire	M. BAYARD Francis	Professeur Honoraire	M. CHAMONTIN Bernard
Professeur Honoraire	M. LEOPHONTE Paul	Professeur Honoraire	M. SALVAYRE Robert
Professeur Honoraire	M. FABIE Michel	Professeur Honoraire	M. FRAYSSE Bernard
Professeur Honoraire	M. BARTHE Philippe	Professeur Honoraire	M. BUGAT Roland
Professeur Honoraire	M. CABARROT Etienne	Professeur Honoraire	M. PRADERE Bernard
Professeur Honoraire	M. DUFFAUT Michel	Professeur Honoraire	M. CHAP Hugues
Professeur Honoraire	M. ESCANDE Michel	Professeur Honoraire	M. LAURENT Guy
Professeur Honoraire	M. PRIS Jacques	Professeur Honoraire	M. ARLET Philippe
Professeur Honoraire	M. CATHALA Bernard	Professeur Honoraire	Mme MARTY Nicole
Professeur Honoraire	M. BAZEX Jacques	Professeur Honoraire	M. MASSIP Patrice
		Professeur Honoraire	M. CLANET Michel

Professeurs Émérites

Professeur ALBAREDE Jean-Louis	Professeur MAZIERES Bernard
Professeur CONTÉ Jean	Professeur ARLET-SUAU Elisabeth
Professeur MURAT	Professeur SIMON Jacques
Professeur MANELFE Claude	Professeur FRAYSSE Bernard
Professeur LOUVET P.	Professeur ARBUS Louis
Professeur SARRAMON Jean-Pierre	Professeur CHAMONTIN Bernard
Professeur CARATERO Claude	Professeur SALVAYRE Robert
Professeur GUIRAUD-CHAUMEIL Bernard	Professeur MAGNAVAL Jean-François
Professeur COSTAGLIOLA Michel	Professeur ROQUES-LATRILLE Christian
Professeur ADER Jean-Louis	Professeur MOSCOVICI Jacques
Professeur LAZORTHES Yves	Professeur LAGARRIGUE Jacques
Professeur LARENG Louis	Professeur CHAP Hugues
Professeur JOFFRE Francis	Professeur LAURENT Guy
Professeur BONEU Bernard	Professeur MASSIP Patrice
Professeur DABERNAT Henri	
Professeur BOCCALON Henri	

FACULTE DE MEDECINE TOULOUSE-PURPAN

37 allées Jules Guesde - 31062 TOULOUSE Cedex

Doyen : D. CARRIE

P.U. - P.H. Classe Exceptionnelle et 1ère classe		P.U. - P.H. 2ème classe	
M. ADOUE Daniel (C.E)	Médecine Interne, Gériatrie	Mme BONGARD Vanina	Epidémiologie
M. AMAR Jacques	Thérapeutique	M. BONNEVILLE Nicolas	Chirurgie orthopédique et traumatologique
M. ATTAL Michel (C.E)	Hématologie	M. BUREAU Christophe	Hépto-Gastro-Entéro
M. AVET-LOISEAU Hervé	Hématologie, transfusion	M. CALVAS Patrick	Génétique
Mme BEYNE-RAUZY Odile	Médecine Interne	M. CARRERE Nicolas	Chirurgie Générale
M. BIRMES Philippe	Psychiatrie	Mme CASPER Charlotte	Pédiatrie
M. BLANCHER Antoine	Immunologie (option Biologique)	M. CHAIX Yves	Pédiatrie
M. BONNEVILLE Paul	Chirurgie Orthopédique et Traumatologie.	Mme CHARPENTIER Sandrine	Thérapeutique, méd. d'urgence, addict
M. BOSSAVY Jean-Pierre	Chirurgie Vasculaire	M. COGNARD Christophe	Neuroradiologie
M. BRASSAT David	Neurologie	M. FOURNIE Bernard	Rhumatologie
M. BROUCHET Laurent	Chirurgie thoracique et cardio-vascul	M. FOURNIÉ Pierre	Ophthalmologie
M. BROUSSET Pierre (C.E)	Anatomie pathologique	M. GAME Xavier	Urologie
M. CARRIE Didier (C.E)	Cardiologie	M. LAROCHE Michel	Rhumatologie
M. CHAUVEAU Dominique	Néphrologie	M. LEOBON Bertrand	Chirurgie Thoracique et Cardiaque
M. CHOLLET François (C.E)	Neurologie	M. LOPEZ Raphael	Anatomie
M. DAHAN Marcel (C.E)	Chirurgie Thoracique et Cardiaque	M. MARX Mathieu	Oto-rhino-laryngologie
M. DE BOISSEZON Xavier	Médecine Physique et Réadapt Fonct.	M. MAS Emmanuel	Pédiatrie
M. DEGUINE Olivier	Oto-rhino-laryngologie	M. OLIVOT Jean-Marc	Neurologie
M. DUCOMMUN Bernard	Cancérologie	M. PARANT Olivier	Gynécologie Obstétrique
M. FERRIERES Jean	Epidémiologie, Santé Publique	M. PAYRASTRE Bernard	Hématologie
M. FOURCADE Olivier	Anesthésiologie	M. PERON Jean-Marie	Hépto-Gastro-Entérologie
M. GEERAERTS Thomas	Anesthésiologie et réanimation	M. PORTIER Guillaume	Chirurgie Digestive
M. IZOPET Jacques (C.E)	Bactériologie-Virologie	M. RONCALLI Jérôme	Cardiologie
Mme LAMANT Laurence	Anatomie Pathologique	Mme SAVAGNER Frédérique	Biochimie et biologie moléculaire
M. LANG Thierry (C.E)	Biostatistiques et Informatique Médicale	M. SOL Jean-Christophe	Neurochirurgie
M. LANGIN Dominique	Nutrition		
M. LAUQUE Dominique (C.E)	Médecine Interne		
M. LAUWERS Frédéric	Anatomie		
M. LIBLAU Roland (C.E)	Immunologie		
M. MALAUDA Bernard	Urologie		
M. MANSAT Pierre	Chirurgie Orthopédique		
M. MARCHOU Bruno (C.E)	Maladies Infectieuses		
M. MAZIERES Julien	Pneumologie		
M. MOLINIER Laurent	Epidémiologie, Santé Publique		
M. MONTASTRUC Jean-Louis (C.E)	Pharmacologie		
Mme MOYAL Elisabeth	Cancérologie		
Mme NOURHASHEMI Fatemeh (C.E)	Gériatrie		
M. OLIVES Jean-Pierre (C.E)	Pédiatrie		
M. OSWALD Eric	Bactériologie-Virologie		
M. PARIENTE Jérémie	Neurologie		
M. PARINAUD Jean (C.E)	Biol. Du Dévelop. et de la Reprod.		
M. PAUL Carle	Dermatologie		
M. PAYOUX Pierre	Biophysique		
M. PERRET Bertrand (C.E)	Biochimie		
M. RASCOL Olivier (C.E)	Pharmacologie		
M. RECHER Christian	Hématologie		
M. RISCHMANN Pascal	Urologie		
M. RIVIERE Daniel (C.E)	Physiologie		
M. SALES DE GAUZY Jérôme	Chirurgie Infantile		
M. SALLES Jean-Pierre	Pédiatrie		
M. SANS Nicolas	Radiologie		
Mme SELVES Janick	Anatomie et cytologie pathologiques		
M. SERRE Guy (C.E)	Biologie Cellulaire		
M. TELMON Norbert	Médecine Légale		
M. VINEL Jean-Pierre (C.E)	Hépto-Gastro-Entérologie		
P.U. Médecine générale		P.U. Médecine générale	
M. OUSTRIC Stéphane	Médecine Générale	M. MESTHÉ Pierre	Médecine Générale
		P.A Médecine générale	
		POUTRAIN Jean-Christophe	Médecine Générale

FACULTE DE MEDECINE TOULOUSE-RANGUEIL

133, route de Narbonne - 31062 TOULOUSE Cedex

Doyen : E. SERRANO

P.U. - P.H. Classe Exceptionnelle et 1ère classe		P.U. - P.H. 2ème classe	
M. ACAR Philippe	Pédiatrie	M. ACCADBLED Franck	Chirurgie Infantile
M. ALRIC Laurent	Médecine Interne	M. ARBUS Christophe	Psychiatrie
Mme ANDRIEU Sandrine	Epidémiologie	M. BERRY Antoine	Parasitologie
M. ARNAL Jean-François	Physiologie	M. BONNEVILLE Fabrice	Radiologie
Mme BERRY Isabelle (C.E)	Biophysique	M. BOUNES Vincent	Médecine d'urgence
M. BOUTAULT Franck (C.E)	Chirurgie Maxillo-Faciale et Stomatologie	Mme BOURNET Barbara	Gastro-entérologie
M. BUJAN Louis (C.E)	Urologie-Andrologie	M. CHAUFOUR Xavier	Chirurgie Vasculaire
Mme BURA-RIVIERE Alessandra	Médecine Vasculaire	M. CHAYNES Patrick	Anatomie
M. BUSCAIL Louis (C.E)	Hépatogastro-entérologie	Mme DALENC Florence	Cancérologie
M. CANTAGREL Alain (C.E)	Rhumatologie	M. DECRAMER Stéphane	Pédiatrie
M. CARON Philippe (C.E)	Endocrinologie	M. DELOBEL Pierre	Maladies Infectieuses
M. CHIRON Philippe (C.E)	Chirurgie Orthopédique et Traumatologie	M. FRANCHITTO Nicolas	Addictologie
M. CONSTANTIN Arnaud	Rhumatologie	M. GARRIDO-STÓWHAS Ignacio	Chirurgie Plastique
M. COURBON Frédéric	Biophysique	Mme GOMEZ-BROUCHET Anne-Muriel	Anatomie Pathologique
Mme COURTADE SAIDI Monique	Histologie Embryologie	M. HUYGHE Eric	Urologie
M. DAMBRIN Camille	Chirurgie Thoracique et Cardiovasculaire	Mme LAPRIE Anne	Radiothérapie
M. DELABESSE Eric	Hématologie	M. MARCHEIX Bertrand	Chirurgie thoracique et cardiovasculaire
Mme DELISLE Marie-Bernadette (C.E)	Anatomie Pathologie	M. MAURY Jean-Philippe	Cardiologie
M. DELORD Jean-Pierre	Cancérologie	M. MEYER Nicolas	Dermatologie
M. DIDIER Alain (C.E)	Pneumologie	M. MUSCARI Fabrice	Chirurgie Digestive
Mme DULY-BOUHANICK Béatrice	Thérapeutique	M. OTAL Philippe	Radiologie
M. ELBAZ Meyer	Cardiologie	M. SOLER Vincent	Ophtalmologie
M. GALINIER Michel	Cardiologie	Mme SOTO-MARTIN Maria-Eugénia	Gériatrie et biologie du vieillissement
M. GALINIER Philippe	Chirurgie Infantile	M. TACK Ivan	Physiologie
M. GLOCK Yves (C.E)	Chirurgie Cardio-Vasculaire	M. VERGEZ Sébastien	Oto-rhino-laryngologie
M. GOURDY Pierre	Endocrinologie	M. YSEBAERT Loic	Hématologie
M. GRAND Alain (C.E)	Epidémiologie. Eco. de la Santé et Prévention		
M. GROLLEAU RAOUX Jean-Louis	Chirurgie plastique		
Mme GUIMBAUD Rosine	Cancérologie	P.U. Médecine générale	
Mme HANAIRE Héliène (C.E)	Endocrinologie	Mme ROUGE-BUGAT Marie-Eve	Médecine Générale
M. KAMAR Nassim	Néphrologie		
M. LARRUE Vincent	Neurologie		
M. LEVADE Thierry (C.E)	Biochimie		
M. MALECAZE François (C.E)	Ophtalmologie		
M. MARQUE Philippe	Médecine Physique et Réadaptation		
Mme MAZEREEUW Juliette	Dermatologie		
M. MINVILLE Vincent	Anesthésiologie Réanimation		
M. RAYNAUD Jean-Philippe (C.E)	Psychiatrie Infantile		
M. RITZ Patrick	Nutrition		
M. ROCHE Henri (C.E)	Cancérologie		
M. ROLLAND Yves (C.E)	Gériatrie		
M. ROUGE Daniel (C.E)	Médecine Légale		
M. ROUSSEAU Hervé (C.E)	Radiologie		
M. ROUX Franck-Emmanuel	Neurochirurgie		
M. SAILLER Laurent	Médecine Interne		
M. SCHMITT Laurent (C.E)	Psychiatrie		
M. SENARD Jean-Michel (C.E)	Pharmacologie		
M. SERRANO Elie (C.E)	Oto-rhino-laryngologie		
M. SOULAT Jean-Marc	Médecine du Travail		
M. SOULIE Michel (C.E)	Urologie		
M. SUC Bertrand	Chirurgie Digestive		
Mme TAUBER Marie-Thérèse (C.E)	Pédiatrie		
Mme URO-COSTE Emmanuelle	Anatomie Pathologique		
M. VAYSSIERE Christophe	Gynécologie Obstétrique		
M. VELLAS Bruno (C.E)	Gériatrie		

Professeur Associé de Médecine Générale
Pr STILLMUNKES André

Professeur Associé en O.R.L
Pr WOISARD Virginie

M.C.U. - P.H.		M.C.U. - P.H.	
M. ABBO Olivier	Chirurgie infantile	Mme ABRAVANEL Florence	Bactériologie Virologie Hygiène
M. APOIL Pol Andre	Immunologie	Mme BASSET Céline	Cytologie et histologie
Mme ARNAUD Catherine	Epidémiologie	Mme CAMARE Caroline	Biochimie et biologie moléculaire
M. BIETH Eric	Génétique	M. CMBUS Jean-Pierre	Hématologie
Mme CASPAR BAUGUIL Sylvie	Nutrition	Mme CANTERO Anne-Valérie	Biochimie
Mme CASSAING Sophie	Parasitologie	Mme CARFAGNA Luana	Pédiatrie
M. CAVAINAC Etienne	Chirurgie orthopédique et traumatologie	Mme CASSOL Emmanuelle	Biophysique
M. CONGY Nicolas	Immunologie	Mme CAUSSE Elizabeth	Biochimie
Mme COURBON Christine	Pharmacologie	M. CHAPUT Benoit	Chirurgie plastique et des brûlés
Mme DAMASE Christine	Pharmacologie	M. CHASSAING Nicolas	Génétique
Mme de GLISEZENSKY Isabelle	Physiologie	M. CLAVEL Cyril	Biologie Cellulaire
Mme DE MAS Véronique	Hématologie	Mme COLLIN Laetitia	Cytologie
Mme DELMAS Catherine	Bactériologie Virologie Hygiène	Mme COLOMBAT Magali	Anatomie et cytologie pathologiques
M. DUBOIS Damien	Bactériologie Virologie Hygiène	M. CORRE Jill	Hématologie
M. DUPUI Philippe	Physiologie	M. DE BONNECAZE Guillaume	Anatomie
M. FAGUER Stanislas	Néphrologie	M. DEDOUIT Fabrice	Médecine Légale
Mme FILLAUX Judith	Parasitologie	M. DELPLA Pierre-André	Médecine Légale
M. GANTET Pierre	Biophysique	M. DESPAS Fabien	Pharmacologie
Mme GENNERO Isabelle	Biochimie	M. EDOUARD Thomas	Pédiatrie
Mme GENOUX Annelise	Biochimie et biologie moléculaire	Mme ESQUIROL Yolande	Médecine du travail
M. HAMDJ Safouane	Biochimie	Mme EVRARD Solène	Histologie, embryologie et cytologie
Mme HITZEL Anne	Biophysique	Mme GALINIER Anne	Nutrition
M. IRIART Xavier	Parasitologie et mycologie	Mme GARDETTE Virginie	Epidémiologie
Mme JONCA Nathalie	Biologie cellulaire	M. GASQ David	Physiologie
M. KIRZIN Sylvain	Chirurgie générale	Mme GRARE Marion	Bactériologie Virologie Hygiène
Mme LAPEYRE-MESTRE Maryse	Pharmacologie	Mme GUILBEAU-FRUGIER Céline	Anatomie Pathologique
M. LAURENT Camille	Anatomie Pathologique	M. GUILLEMINAULT Laurent	Pneumologie
M. LHERMUSIER Thibault	Cardiologie	Mme GUYONNET Sophie	Nutrition
M. LHOMME Sébastien	Bactériologie-virologie	M. HERIN Fabrice	Médecine et santé au travail
Mme MONTASTIER Emilie	Nutrition	Mme INGUENEAU Cécile	Biochimie
Mme MOREAU Marion	Physiologie	M. LAIREZ Olivier	Biophysique et médecine nucléaire
Mme NOGUEIRA M.L.	Biologie Cellulaire	M. LEANDRI Roger	Biologie du dével. et de la reproduction
M. PILLARD Fabien	Physiologie	M. LEPAGE Benoit	Biostatistiques et Informatique médicale
Mme PUISSANT Bénédicte	Immunologie	Mme MAUPAS Françoise	Biochimie
Mme RAYMOND Stéphanie	Bactériologie Virologie Hygiène	M. MIEUSSET Roger	Biologie du dével. et de la reproduction
Mme SABOURDY Frédérique	Biochimie	Mme NASR Nathalie	Neurologie
Mme SAUNE Karine	Bactériologie Virologie	Mme PRADDAUDE Françoise	Physiologie
M. SILVA SIFONTES Stein	Réanimation	M. RIMAILHO Jacques	Anatomie et Chirurgie Générale
M. TAFANI Jean-André	Biophysique	M. RONGIERES Michel	Anatomie - Chirurgie orthopédique
M. TREINER Emmanuel	Immunologie	Mme SOMMET Agnès	Pharmacologie
Mme TREMOLLIÈRES Florence	Biologie du développement	Mme VALLET Marion	Physiologie
Mme VAYSSE Charlotte	Cancérologie	M. VERGEZ François	Hématologie
M. VIDAL Fabien	Gynécologie obstétrique	Mme VEZZOSI Delphine	Endocrinologie
M.C.U. Médecine générale		M.C.U. Médecine générale	
M. BRILLAC Thierry		M. BISMUTH Michel	Médecine Générale
Mme DUPOUY Julie		Mme ESCOURROU Brigitte	Médecine Générale

Maîtres de Conférences Associés de Médecine Générale

Dr ABITTEBOUL Yves
 Dr CHICOULAA Bruno
 Dr IRI-DELAHAYE Motoko
 Dr FREYENS Anne

Dr BOYER Pierre
 Dr ANE Serge
 Dr BIREBENT Jordan
 Dr LATROUS Leila

REMERCIEMENTS

Au président du jury,

Monsieur le Professeur Antoine BERRY,

Professeur des Universités – Praticien Hospitalier

Je vous remercie de m'avoir accueilli dans votre service et de me faire l'honneur d'accepter la présidence de ce jury. Veuillez trouver l'expression de toute ma gratitude.

Aux membres du jury,

Monsieur le Professeur Alexis VALENTIN,

Professeur des Universités – Praticien Hospitalier

Et

Madame le Docteur Pamela CHAUVIN,

Praticien Hospitalier

Je vous témoigne ma reconnaissance respectueuse et amicale pour avoir accepté d'être membres et juges de cette thèse d'université. Merci pour l'enseignement dont vous m'avez fait part lors de mon passage en tant qu'interne de Parasitologie - Mycologie.

Madame le Docteur Judith FILLAUX,

Maître de Conférence des Universités – Praticien Hospitalier

Je te remercie sincèrement pour la confiance que tu m'as accordée en me proposant ce sujet de thèse. Merci pour ton soutien et tout le temps que tu m'as consacré. Ce travail n'aurait pas pu aboutir sans ton implication constante.

Sois assurée de ma profonde reconnaissance.

Aux professionnels médecins et pharmaciens

*Qui m'ont accueilli dans leurs services et m'ont enseigné
leurs compétences et leurs savoirs de biologistes.*

Aux équipes techniques

*Rencontrées au cours de mes différents stages d'interne,
qui m'ont fait partager leur expérience et leur bonne humeur.
Toute ma reconnaissance va aux membres du service de Parasitologie - Mycologie
et en particulier à Eric, Delphine, Caroline, Françoise et Linda
pour l' aide précieuse qu'il m'ont apporté dans ce travail.*

A l'équipe de l'EFS

*Merci à Valérie, Guillaume, Adeline et Régine
qui m'ont beaucoup appris et m'ont toujours soutenu dans mon projet.
Bien sûr, je n'oublie pas les techniciens (Fabienne, Sylvie, Laetitia, Amélie, Loïc, Benjamin,
Pauline, Emilie, Lauriane, Kabi, Sandy, Kiki, Chantal, Johanna, Elodie, Marie, Françoise,
Eline, Dominique, Hassina, Alain, Angélique, Vanessa, Sophie, Vincent et tous les autres)
avec qui j'ai passé une année formidable.*

A mes collègues internes

*Grégoire qui a tout le temps le mot pour rire, tes plaisanteries me manqueront,
Elodie ma première cointerne en Biochimie et à son sens de la fête,
Samuel avec qui j'ai formé le duo tropical (pas toujours optimal) au babyfoot,
Jules le futur Dr House de Toulouse,
Camille la pro de la bactério toujours là pour remotiver les troupes,
Anthony et Tiphaine pour leur bonne humeur constante,
Thomas, Julien, Emmanuel, Morgane, Laurie, Noémie, Audrey, Pauline
et à tous ceux que j'ai rencontré durant mon parcours d'interne de biologie médicale,
j'ai passé quatre années toulousaines remplies de bons souvenirs en votre compagnie
et ce même si je n'ai pas été de toutes les fêtes.*

A ma petite famille

A ma mère

*C'est grâce à toi si je suis là aujourd'hui. Tu m'as toujours poussé à persévérer.
Je te suis éternellement reconnaissant pour tout ce que tu as fait pour moi.*

A Robert

*Merci d'avoir veillé sur ma mère.
Tu nous a quitté trop tôt et je pense que
tu aurais été fier d'assister à ce grand moment.*

A Elodie

*Qui m'a toujours soutenu et encouragé
même dans les moments de doutes et de difficultés.
Je suis heureux de partager ma vie à tes côtés.*

A mon petit Baptiste

*Qui me comble de joie et de bonheur.
Tu es la plus belle chose qui me soit arrivé.*

A mon oncle et sa compagne

Merci pour tous vos précieux conseils.

A mes grands-parents

*Qui veillent sur moi ici ou là-haut,
j'espère vous rendre fiers de moi.
Vous me manquez énormément.*

LISTE DES ABRÉVIATIONS

AAE : Alvéolite Allergique Extrinsèque
ABPA : Aspergillose Broncho-Pulmonaire Allergique
Ac : Anticorps
Ag : Antigène
APA : Aspergillose Pulmonaire Allergique
APC : Aspergillose Pulmonaire Chronique
APCC : Aspergillose Pulmonaire Chronique Cavitaire
APCF : Aspergillose Pulmonaire Chronique Fibrosante
APCN : Aspergillose Pulmonaire Chronique Nécrosante
BPCO : Broncho-Pneumopathie Chronique Obstructive
COES : COElectroSynérèse
DO : Densité Optique
EIA : Technique immunoenzymatique (Enzyme ImmunoAssay)
ELISA : Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay
ELS : EElectroSynérèse
FEIA : Fluorescent-Enzyme-ImmunoAssay
HAGG : Hémagglutination sensibilisée
HAI : HémAgglutination Indirecte
IDD : Immunodiffusion double
IDSA : Infectious Diseases Society of America
IEP : ImmunoElectroPhorèse
Ig : Immunoglobuline
LBM : Laboratoire de Biologie Médicale
NABM : Nomenclature des Actes de Biologie Médicale
PMSI : Programme de Médicalisation des Systèmes d'Information
SFMM : Société Française de Mycologie Médicale

TABLE DES MATIÈRES

Introduction	14
Aspergilloses du sujet immunocompétent	15
I. <i>Aspergillus sp.</i>	15
A. <i>Caractéristiques mycologiques</i>	15
1. Caractères culturels	15
2. Caractéristiques microscopiques.....	16
3. Diagnostic d'espèce.....	17
B. <i>Mécanismes de pathogénicité</i>	17
1. Pouvoir colonisateur	18
2. Echappement immunitaire.....	18
3. Immunosuppression	19
4. Formation de biofilm	19
5. Propriétés allergisantes.....	19
II. Les présentations cliniques	20
A. <i>Aspergilloses pulmonaires chroniques</i>	21
B. <i>Aspergilloses pulmonaires allergiques</i>	23
1. Aspergillose broncho-pulmonaire allergique	23
2. Alvéolite allergique extrinsèque.....	24
La sérologie aspergillaire	25
I. Recommandations et stratégie diagnostique	25
II. Techniques sérologiques	28
1. Immunodiffusion double.....	28
2. Electrosynérèse.....	29
3. Immunoélectrophorèse	29
4. Coélectrosynérèse	30
5. Western Blot.....	30
6. Hémagglutination indirecte.....	31
7. Immunofluorescence indirecte	32
8. Techniques immunoenzymatiques.....	32
Comparaison de sept réactifs	34
I. Contexte	34

II. Matériel et méthode	35
A. <i>Sérums collectés</i>	35
B. <i>Réactifs utilisés</i>	35
1. ELISA <i>Aspergillus</i> IgG Biorad	36
2. ELISA <i>Aspergillus</i> IgG Bordier	37
3. ELISA <i>Aspergillus</i> IgG Serion	37
4. FEIA <i>Aspergillus</i> IgG ImmunoCap	37
5. ICT <i>Aspergillus</i> IgG/IgM LDBio	38
6. Western blot <i>Aspergillus</i> LDBio	40
7. IEP <i>Aspergillus</i> Sebia	40
C. <i>Analyse statistique.....</i>	41
III. Résultats	42
A. <i>Population étudiée.....</i>	42
B. <i>Sensibilité et spécificité des tests aux seuils préconisés par les fournisseurs</i>	44
C. <i>Performance analytique et adaptation des seuils.....</i>	45
1. Tests préconisés pour le dépistage.....	45
a) Aire sous la courbe	45
b) Choix des seuils	46
2. Tests préconisés pour la confirmation.....	49
3. Performances de l'ICT LDBio	49
IV. Discussion	51
V. Conclusion	55
Bibliographie.....	56

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Aspect macroscopique des espèces pathogènes majeures d' <i>Aspergillus</i> sur milieu Czapek ⁵	16
Figure 2 : Vue microscopique d'une tête aspergillaire (gauche) ⁷ et sa représentation schématique (droite).17	17
Figure 3 : Interaction hôte- <i>Aspergillus</i> ²¹ (modifié).	20
Figure 4 : Diverses formes et chevauchements possibles d'APC d'après Denning <i>et al.</i> pour l'European Society for clinical Microbiology and infectious Diseases ¹⁹ (modifié).	21
Figure 5 : Techniques recommandées par la NABM pour le sérodiagnostic des aspergilloses.	26
Figure 6 : Répartition des différentes techniques sérologiques en France (données ProBioQual 2018).	27
Figure 7 : Principe de la méthode d'IDD ³⁷	28
Figure 8 : Principe de l'IEP ³⁹	29
Figure 9 : Principe de l'HAL.	31
Figure 10 : Principe de l'IFI.	32
Figure 11 : Principe d'une ELISA indirecte.	33
Figure 12 : Caractéristiques principales d'un "Point Of Care Testing" : critères ASSURED (OMS).	38
Figure 13 : Principe d'une bandelette à écoulement latéral.	39
Figure 14: Exemple de résultats de l'ICT LDBio <i>Aspergillus</i> : négatif (à gauche) et positif (à droite) ⁵⁰	39
Figure 15 : Exemples de résultats positifs au WB.	40
Figure 16 : Exemple d'IEP positive.....	41
Figure 17 : Répartition du nombre de sérums en fonction des groupes de patients.	42
Figure 18 : Répartition des résultats des EIA.	43
Figure 19 : Courbes ROC et ASC des EIA.	46

LISTE DES TABLEAUX

Tableau I : Critères diagnostiques des différentes formes d'APC.....	22
Tableau II : Composition et seuils fournisseurs des différents réactifs testés	36
Tableau III : Nombre de négatifs, douteux et positifs pour chaque technique	44
Tableau IV : Sensibilités et spécificités de chaque réactif.	45
Tableau V : Sensibilités et spécificités de Biorad et Bordier en fonction du seuil.	47
Tableau VI : Sensibilités et spécificités de Sérion et ImmunoCap en fonction du seuil.....	47
Tableau VII : Nombre de sérums positifs et négatifs pour chaque EIA avec des seuils optimaux. (Nombre de malades pour chaque cas, N = 53)	47
Tableau VIII: Sensibilités et spécificités de chaque réactif avec les nouveaux seuils.	48
Tableau IX : Nombre de négatifs, douteux et positifs pour chaque technique avec les nouveaux et anciens seuils	48
Tableau X : Sensibilités aux nouveaux seuils et par catégories de malades.	49
Tableau XI : Sensibilités et spécificités en fonction du nombre d'arcs somatiques et métaboliques.	49

Introduction

Aspergillus sp. est une moisissure ubiquitaire responsable de mycoses opportunistes chez l'homme. L'inhalation quotidienne de spores explique la localisation préférentiellement pulmonaire des maladies aspergillaires. Ces spores sont éliminées grâce à l'appareil mucociliaire et au système immunitaire de l'individu. Cependant, la présence de facteurs favorisants, parmi lesquels des maladies respiratoires préexistantes, l'utilisation d'immunosuppresseurs ou de chimiothérapies et la surexposition aux spores lors de travaux, constitue un terrain propice à l'installation du champignon. La combinaison d'une exposition importante avec un système de dispersion hautement efficace associé à l'acquisition de résistances aux traitements antifongiques¹ a conduit ce pathogène à devenir un véritable sujet d'actualité². On compte plus de trois millions de personnes atteintes d'aspergilloses pulmonaires chroniques (APC) et/ou allergiques (APA) à travers le monde³. Leur diagnostic est complexe car l'enquête menée par le clinicien doit tenir compte de l'ensemble des arguments cliniques, biologiques et radiologiques obtenus. Chez les personnes dont le système immunitaire n'est pas déficient, la sérologie occupe une place importante dans la recherche des formes chroniques et immunoallergiques. A l'heure actuelle, diverses techniques existent pour mettre en évidence les anticorps (Ac) spécifiques de type immunoglobuline (Ig) G développés contre *Aspergillus*, cependant peu d'études ont été menées par les fabricants afin de les évaluer.

A travers ce travail, nous nous sommes intéressés aux différents réactifs sérologiques commercialisés ou en cours de commercialisation en France afin de comparer leurs performances analytiques respectives et proposer une stratégie adaptée dans le diagnostic sérologique des APC et des APA.

Aspergilloses du sujet immunocompétent

I. *Aspergillus sp.*

Les *Aspergillus* sont des champignons cosmopolites, très répandus dans le milieu extérieur. Ils appartiennent à la classe des Ascomycètes, ordre des Eurotiales et famille des Trichocomacées. Ce sont des moisissures qui représentent 1 à 7 % des champignons de l'environnement. Ils se développent sur la matière organique en décomposition, dans les sols, les végétaux, les terreaux, les denrées alimentaires et les céréales. Les *Aspergillus* se nourrissent en recyclant le carbone et l'azote de ces substrats⁴. Ubiquitaires, ils sont retrouvés sous toutes les latitudes du globe, plus particulièrement à la fin de l'été, en automne et en hiver⁵.

Depuis leur première description en 1729 par Micheli, le nombre d'espèces n'a cessé d'augmenter et, actuellement, plus de 300 sont dénombrées. Au sein de cette multitude d'espèces, seulement une vingtaine est potentiellement pathogène chez l'homme, au premier rang desquelles *Aspergillus fumigatus*, responsable de 80 à 90 % des cas d'aspergilloses. *A. flavus*, *A. nidulans*, *A. niger*, *A. versicolor* ou encore *A. terreus* sont aussi retrouvés à des incidences variables. Les autres espèces, qui n'ont pas été citées ici, ne représentent qu'une part infime des cas⁶.

A. Caractéristiques mycologiques

1. Caractères culturels

Les *Aspergillus* sont des champignons cultivables qui présentent une croissance rapide sur milieux mycologiques standards comme le milieu de Sabouraud additionné d'antibiotiques. Ils poussent entre 22-25°C et jusqu'à 37°C pour les espèces thermophiles (*A. fumigatus*). Si nécessaire, leur fructification peut être stimulée par repiquage sur gélose Malt ou sur milieu Czapek considérés comme leurs milieux de référence. La plupart des espèces d'*Aspergillus* sont inhibés par le cycloheximide. Après 24 à 48h de culture, des colonies plates formées de courts filaments aériens blancs se développent. C'est avec la maturation des structures conidiogènes, entre 48 et 96h selon les espèces, que les colonies vont prendre une teinte caractéristique. Cette couleur est essentielle à l'orientation du diagnostic d'espèce (Figure 1).

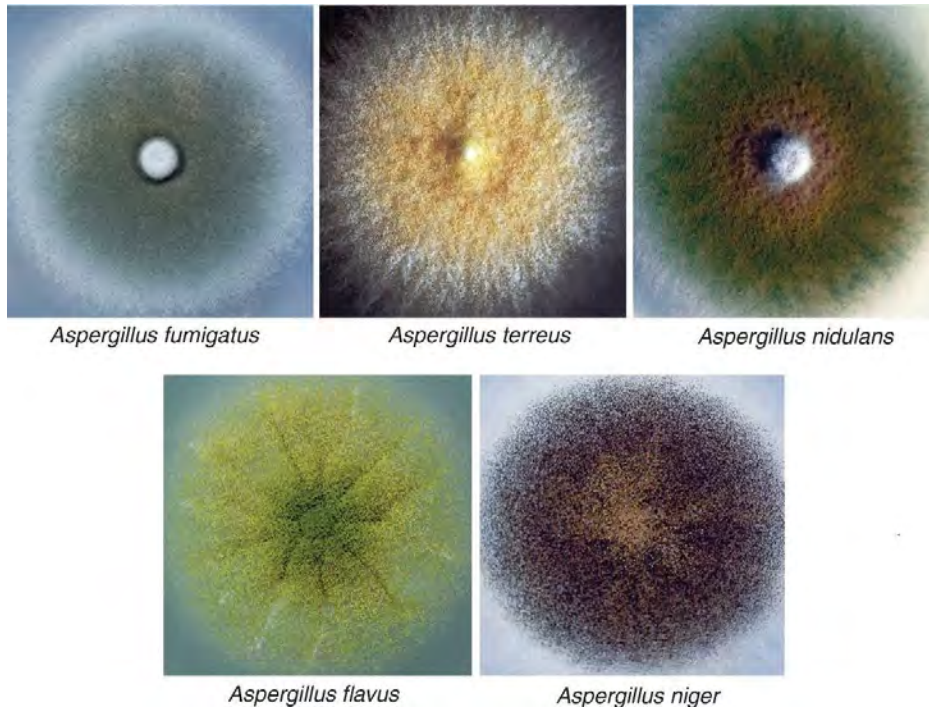


Figure 1 : Aspect macroscopique des espèces pathogènes majeures d'*Aspergillus* sur milieu Czapek⁵.

2. Caractéristiques microscopiques

Les *Aspergillus* sont caractérisés par un thalle végétatif formé de filaments mycéliens hyalins, ou hyphes, fins et réguliers, septés et ramifiés. L'examen microscopique des colonies permet l'identification du genre *Aspergillus* par la mise en évidence des têtes aspergillaires. Sur les hyphes prennent naissance des filaments dressés, non cloisonnés, appelés conidiophores. Ceux-ci se terminent par une vésicule de forme variable sur laquelle sont disposées les cellules conidiogènes ou phialides. Les phialides peuvent être insérées directement sur la vésicule (tête unisériée) ou portées par des petits articles insérés sur la vésicule, les métules (tête bisériée). La conidiogenèse s'effectue sur le mode blastique phialidique, par bourgeonnement de spores ou conidies à l'apex des phialides. Les spores sont toujours unicellulaires, de formes variables, globuleuses, subglobuleuses ou elliptiques. Les spores sont diversement pigmentées et présentent des aspérités plus ou moins marquées. L'ensemble conidiophore, vésicule (\pm métules), phialides et conidies constitue la tête aspergillaire qui caractérise le genre (Figure 2).

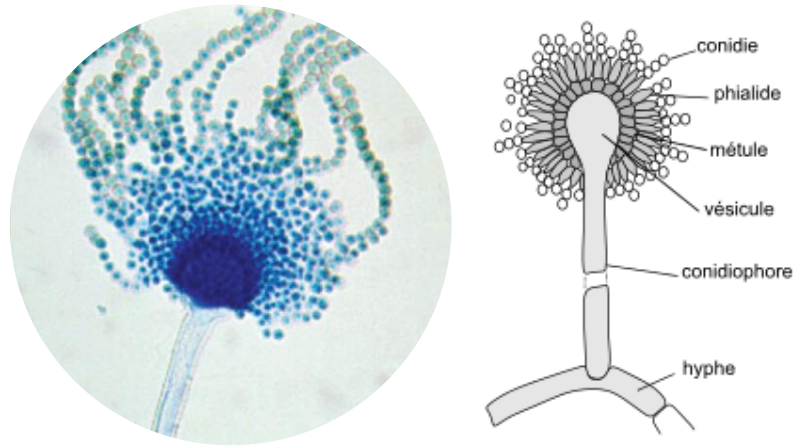


Figure 2 : Vue microscopique d'une tête aspergillaire (gauche)⁷ et sa représentation schématique (droite).

3. Diagnostic d'espèce

Le diagnostic d'espèce sera porté sur un ensemble de critères macroscopiques et microscopiques :

- Critères macroscopiques :
 - La vitesse de pousse
 - L'aspect des colonies à maturité
- Critères microscopiques :
 - La taille du conidiophore, la présence d'une pigmentation ou d'échinulations
 - La taille et la forme de la vésicule
 - La disposition générale des phialides sur la vésicule de la tête aspergillaire (tête en colonne, ronde ou radiée)
 - La présence ou non de métules
 - La pigmentation, la taille et la surface des conidies
 - L'existence d'une reproduction sexuée : présence ou non de cléistothèces et de « Hülle cells » (cellules en noisettes)

B. Mécanismes de pathogénicité

Bien qu'*A. fumigatus* soit le champignon le plus souvent retrouvé dans les APC et/ou APA, il ne représente pas l'espèce prédominante parmi ce genre⁵. Chez l'Homme, sur les 300 espèces d'*Aspergillus* répertoriées, moins de vingt possèdent une pathogénicité qui s'explique par l'expression de facteurs de virulence spécifiques. Les *Aspergillus* présentent de multiples facteurs de virulence qui contribuent à leur résistance vis-à-vis des défenses de l'organisme.

1. Pouvoir colonisateur

La production abondante de spores d'*Aspergillus* par les cellules conidiogènes fertiles participe à la mise en place d'une pression d'inhalation constante. En effet selon certaines études environnementales, les concentrations en spores peuvent varier de 1 à 100 conidies/m³ d'air selon les conditions⁸. Le contact respiratoire perpétuel associé à la petite taille des spores aspergillaires (entre 2 et 5 µm de diamètre) est une condition essentielle à leur pénétration dans les voies respiratoires profondes. Un autre critère majeur réside dans leur thermotolérance, c'est à dire la capacité du champignon à se développer à 37°C (*A. fumigatus* peut survivre à des températures supérieures à 50°C). D'autre part, le pouvoir colonisateur d'*Aspergillus* passe par la présence de mécanismes d'attachement indispensables à son maintien chez l'hôte. L'adhésion repose sur l'interaction spécifique entre des protéines d'adhérence situées à sa surface (adhésines ou lectines) et des ligands (fibrinogène, laminine, fibronectine, collagène, complément, etc.) exprimés au sein des tissus de l'organisme⁹.

2. Echappement immunitaire

La paroi des *Aspergillus* est une structure complexe essentiellement composée d'un réseau de polysaccharides¹⁰. Cette paroi protège non seulement la cellule fongique du monde extérieur mais joue aussi un rôle dans les relations hôte-pathogène. En effet, la surface des conidies contient une couche d'hydrophobines (structure en rodlets), impliquée dans la résistance aux mécanismes de killing par les macrophages alvéolaires. L'hydrophobine RodA a été identifiée comme ayant un rôle immunomodulateur en masquant l'immunogénicité des spores¹¹. La synthèse de pigments mélaniques, tels que la 1,8-dihydroxynaphtalène-mélanine chez *A. fumigatus*, protège les conidies de la lyse cellulaire par les cellules macrophagiques en inhibant l'acidification du phagolysosome ainsi qu'en augmentant leur résistance aux espèces réactives de l'oxygène¹². L'important équipement enzymatique de l'espèce *fumigatus*, lui permet d'échapper aux espèces réactives de l'oxygène par la synthèse de glutathion et de son activité oxydoréductase. Les catalases (Cat1p et Cat2p) vont permettre la détoxification des peroxydes d'hydrogène produits par les cellules immunitaires¹³ et leur activité pourra être révélée au moyen de l'immunoélectrophorèse (IEP).

3. Immunosuppression

Lors de sa croissance fongique *A. fumigatus* peut produire de nombreux métabolites sources de toxicité, comme la gliotoxine, la RNase ou l'hémolysine. La gliotoxine est responsable des propriétés immunosuppressives du champignon. Elle agit en bloquant la phagocytose, la transcription des médiateurs inflammatoires et en induisant l'apoptose des neutrophiles et des monocytes¹⁴. La RNase et l'hémolysine entraînent respectivement la destruction des cellules de l'hôte et une lyse des érythrocytes⁴.

4. Formation de biofilm

Aspergillus peut synthétiser un biofilm, le protégeant de l'action éventuelle d'antifongiques. Ce biofilm correspond à une matrice extracellulaire hydrophobe composée de polysaccharides, hydrophobine et mélanine. Il permet au champignon de se développer et de disséminer à travers l'organisme¹⁵. De plus, cette matrice constitue un environnement favorable à la croissance d'autres agents pathogènes, expliquant la formation de structures mixtes à la fois fongiques et bactériennes.

5. Propriétés allergisantes

Aspergillus est capable de synthétiser de nombreux allergènes (Asp f1 à Asp f34) intervenant dans la physiopathologie des aspergilloses allergiques. Ces allergènes sont responsables chez l'hôte d'une réaction d'hypersensibilité de type I, III ou IV avec production d'IgG et IgE¹⁶.

II. Les présentations cliniques

Lorsque le système immunitaire ne possède pas les capacités suffisantes pour détruire le champignon, celui-ci est en mesure de coloniser les voies aériennes sous forme de portage asymptomatique. Là où certains auteurs caractérisent la colonisation par la simple présence du champignon au niveau des prélèvements respiratoires¹⁷, d'autres la définissent par la présence répétée d'*Aspergillus* (> 6 mois) sur au moins deux prélèvements¹⁸. La colonisation semble constituer une étape préalable avant le passage à une forme cliniquement pathogène³.

Les aspergilloses pulmonaires peuvent être classées en deux groupes selon les facteurs de risque que présentent l'individu (Figure 3) :

- Les aspergilloses pulmonaires chroniques (APC) se développent chez des individus immunocompétents ou sans immunodépression majeure ayant une maladie respiratoire préexistante.
- Les aspergilloses pulmonaires allergiques (APA), plus fréquentes, sont déclenchées par une hypersensibilité aux antigènes (Ag) d'*Aspergillus*, qu'il y ait ou non un antécédent d'atteinte respiratoire.

La classification des différentes formes cliniques au sein des APC et des APA est toujours en évolution en raison de leur connaissance imparfaite^{19,20}.

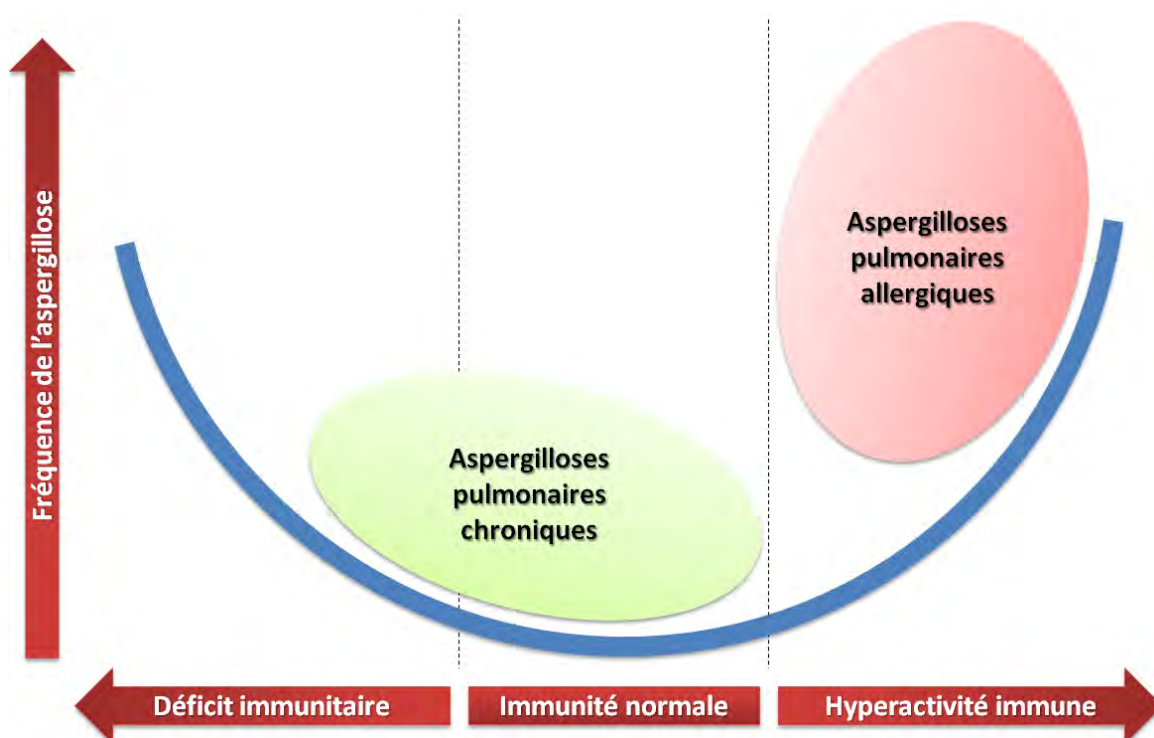


Figure 3 : Interaction hôte-*Aspergillus*²¹ (modifié).

A. Aspergilloses pulmonaires chroniques

Les APC touchent 240 000 personnes en Europe¹⁹. En France, on estime 5,2 cas d'APC/100 000 habitants, soit 3450 cas en 2016²². Ce terme regroupe un ensemble de syndromes qui atteint préférentiellement des sujets sans altération profonde du système immunitaire. Elles s'installent souvent dans les suites de maladies tels que le diabète, l'asthme, la broncho-pneumopathie chronique obstructive (BPCO) sur des cavités séquelaires d'infection (mycobactérioses), de cancer pulmonaire...^{23,24}.

Les APC regroupent deux types de syndrome :

- Les formes localisées qui se développent en un peu plus de 3 mois et qui peuvent elles-mêmes être classées en 4 types d'atteintes :
 - Aspergillome
 - Aspergillose pulmonaire chronique caverneuse (APCC)
 - Aspergillose pulmonaire chronique fibrosante (APCF)
 - Nodule(s) aspergillaire(s)
- La forme nécrosante ou aspergillose pulmonaire chronique nécrosante (APCN) de développement plus rapide entre 1 et 3 mois.

Bien que chaque APC soit classée comme des entités cliniques à part entière, elles restent proches les unes des autres, avec la possibilité d'évolution d'une forme à une autre voire même de chevauchement entre elles (Figure 4).

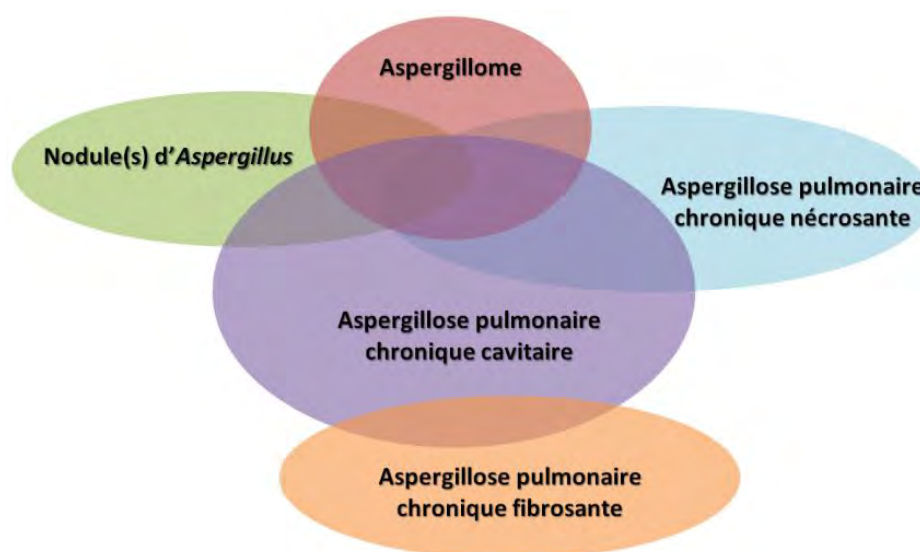


Figure 4 : Diverses formes et chevauchements possibles d'APC d'après Denning *et al.* pour l'European Society for clinical Microbiology and infectious Diseases¹⁹ (modifié).

Le diagnostic des APC est complexe car il repose sur une présentation symptomatologique hétérogène et non spécifique d'une atteinte fongique (fatigue, toux productive,

perte de poids) pouvant conduire à un retard de diagnostic préjudiciable pour la prise en charge du patient²⁵.

Les critères diagnostiques d'APC établis par Denning²⁶ sont les suivants :

- Une toux et/ou une hémoptysie et/ou une perte pondérale durant plus de 3 mois
- Une lésion radiologique cavitaire avec infiltrat paracavitaire (ou balle fongique)
- La mise en évidence d'*Aspergillus* par :
 - Sérologie (précipitines ou IgG)
 - Ou culture positive sur des prélèvements respiratoires
 - Ou histologie positive
- L'exclusion d'autres pathogènes (mycobactéries ou champignons endémiques tels que *Coccidioides immitis* et *Histoplasma capsulatum*)
- Une absence d'immunodépression majeure (HIV, leucémie, granulomatose chronique...)

Afin d'harmoniser les pratiques, l'European Society for Clinical Microbiology and Infectious Disease (ESCMID) et l'European Respiratory Society (ERS) ont établi avec l'aide de groupes d'experts, des critères pour la classification des différentes formes d'APC¹⁹ (Tableau I).

Tableau I : Critères diagnostiques des différentes formes d'APC

Formes	Clinique	Microbiologie	Imagerie
Aspergillome	Pas ou peu de signes.	Preuve sérologique ou mycologique d' <i>Aspergillus</i> .	Cavité unique contenant une balle fongique. Pas d'évolution en 3 mois.
APCC	Signes pulmonaires et/ou systémiques.	Preuve sérologique ou mycologique d' <i>Aspergillus</i> .	Une ou plusieurs cavités pouvant contenir une balle fongique. Evolution en 3 mois.
APCF	Diminution sévère de la fonction respiratoire.	Preuve sérologique ou mycologique d' <i>Aspergillus</i> .	Fibrose sévère d'au moins deux lobes pulmonaires.
Nodule aspergillaire	Pas ou peu de signes.	Preuve sérologique ou mycologique d' <i>Aspergillus</i> . L'histologie fait le diagnostic. Absence d'invasion tissulaire. Nécrose fréquente.	Un ou plusieurs nodules pouvant ou non réaliser des cavités.
APCN	Immunodépression partielle (diabète, dénutrition, alcoolisme, etc.).	Preuve sérologique ou mycologique d' <i>Aspergillus</i> . L'histologie montre une invasion tissulaire sans invasion vasculaire. Ag galactomannane (sanguin ou respiratoire).	Image cavitaire, nodulaire ou de consolidation avec tendance à l'abcédation. Evolution en 1 à 3 mois.

Le dosage des IgG anti-*Aspergillus* occupe une place de choix pour établir le diagnostic des formes chroniques d'aspergillose. La recommandation américaine de l'IDSA (Infec-

tious Diseases Society of America) juge cette examen comme étant le plus sensible en ce qui concerne l'ensemble des examens microbiologiques à disposition dans cette indication²⁷. Par ailleurs, l'ESCMID et l'ERS affirment une valeur prédictive positive de 100% dans les APC et une sensibilité supérieure à 90% dans l'aspergillome¹⁹. D'autre part, la mesure quantitative des Ac permet un suivi de l'efficacité d'une résection chirurgicale d'aspergillome. Les dosages d'IgG par technique quantitative ELISA (Enzyme-linked immunoassay) ou de précipitines par immunoprécipitation sont conseillés tous les 3 à 6 mois¹⁹ pendant 3 ans²⁷.

B. Aspergilloses pulmonaires allergiques

Les APA correspondent à une hypersensibilisation à un ou plusieurs champignons du genre *Aspergillus*. L'exposition aux protéines et allergènes d'*Aspergillus* va entraîner chez les patients ayant des facteurs de risque (terrain atopique, asthme, BPCO ou mucoviscidose) une réponse d'hypersensibilité. Les APA se divisent en deux catégories²⁸ :

- Aspergillose broncho-pulmonaire allergique (ABPA)
- Alvéolite allergique extrinsèque (AAE)

1. Aspergillose broncho-pulmonaire allergique

Aussi nommée maladie de Hinson-Pepys, l'ABPA est une forme particulière d'APA qui se développe à la suite d'autres affections pulmonaires chroniques comme l'asthme ou la mucoviscidose. En 2016, le nombre d'épisodes d'ABPA a été estimé à 145 / 100 000 habitants, soit un 95 361 épisodes en France²². Dans cette maladie, une réaction de type I, atopique avec production d'IgE, et une réaction de type III faisant intervenir les IgG se produisent simultanément. Les symptômes typiques sont un wheezing, une toux productive associés à une fébricule et une altération de l'état général. Des crachats hémoptoïques et des douleurs thoraciques peuvent compléter ce tableau. La complexité diagnostique de l'ABPA en rapport avec le recoupement des tableaux cliniques avec d'autres maladies respiratoires, a donné lieu à l'établissement de critères standards ayant fait l'objet d'une réactualisation en 2013 par l'ABPA complicating asthma ISHAM working group²⁰.

Ces critères combinent en absence de corticothérapie :

- La présence de facteurs prédisposants :
 - Patient atteint d'asthme ou mucoviscidose
- 2 critères obligatoires :
 - IgE totales >1000 ng/mL ou 417 UI/mL
 - Une réaction cutanée immédiate à *Aspergillus* ou une élévation des IgE sériques anti-*Aspergillus*
- ≥ 2 critères secondaires :
 - Des taux d'IgG élevés à *Aspergillus*
 - Des anomalies radiologiques compatibles (infiltrats, nodules, bouchons de mucus ne résorbant pas sous antibiothérapie, etc.)
 - Un taux de polynucléaires éosinophiles > 500/mm³

Bien qu'elles appartiennent aux critères secondaires, les IgG peuvent participer au diagnostic des ABPA. Les cultures ne font pas partie des critères diagnostiques proposés par Agarwal *et al.* mais restent indispensables afin de réaliser l'antifongigramme.

2. **Alvéolite allergique extrinsèque**

L'AAE est une pneumopathie d'hypersensibilité pouvant être d'origine professionnelle, due à une inflammation des alvéoles liée à l'inhalation des poussières organiques. Elle fait intervenir une réaction d'hypersensibilité de type III (semi retardée) et de type IV (retardée)²⁹. Selon la ou les moisissures responsables, elles portent des noms différents (poumon de fermier, poumon des ouvriers du malt, poumon de compost etc.). Elles sont classées en formes aiguë, subaiguë et chronique²⁹. Le diagnostic des AAE, provoquant une réaction d'hypersensibilité retardée, repose sur la détection des IgG spécifiques dirigées contre le ou les pathogènes suspectés.

La sérologie aspergillaire

I. Recommandations et stratégie diagnostique

Comme nous avons pu le voir dans la partie précédente, le diagnostic des APC et/ou APA est complexe. Les examens mycologiques permettent d'apporter une aide indéniable dans la démarche diagnostique. Cependant du fait de l'important risque de contamination des prélèvements respiratoires et de la difficulté à discriminer une colonisation d'une réelle infection¹⁷, ils ne constituent pas à eux seuls des critères suffisants. En effet, les examens biologiques doivent être interprétés en tenant compte des données cliniques et radiologiques.

La littérature décrit deux types d'examen biologique utiles pour la recherche d'une APC et allergique :

- **La recherche directe et l'identification du champignon**

Plusieurs types de prélèvements peuvent être effectués pour la recherche d'*Aspergillus*. L'isolement du champignon au sein d'un site non stérile doit faire preuve d'une interprétation critique, elle doit prendre en compte le contexte clinique et les résultats des autres examens biologiques et radiologiques. Il est préférable de privilégier des prélèvements distaux comme l'aspiration bronchique ou le lavage broncho alvéolaire qui seront moins sujets à un risque éventuel de contamination. Toutefois, cet examen n'est pas systématiquement contributif car son rendement n'est que de 60 %³⁰.

- **La détection des Ac spécifiques anti-*Aspergillus***

Le développement de l'*Aspergillus* dans l'organisme entraîne une réaction humorale, avec synthèse d'Ac spécifiques anti-*Aspergillus*. Le système immunitaire va donc produire différentes classes d'Ig, parmi lesquelles les IgG et les IgE. De nombreuses techniques existent pour la détection des Ig, certaines vont mettre en évidence de façon visuelle la réaction Ac-Ag (techniques de précipitation, immunofluorescence), là où d'autres plus rapides et/ou automatisables (hémagglutination et techniques immunoenzymatiques (EIA)) vont rechercher les différentes classes d'Ig³¹. Alors que IgE ne sont détectées que dans les formes d'hypersensibilité, les IgG seront utilisées à la fois pour le diagnostic des APC et des APA. Du fait d'un manque de données disponibles, les IgM et les IgA spécifiques ne sont pas recommandées pour identifier les formes chroniques et/ou allergiques¹⁹. La Nomenclature des Actes de Biologie Médicale (NABM) préconise la réalisation d'une technique de dépistage qui sera complétée, en cas de positivité, par une technique de

confirmation. L'objectif de cette approche est d'avoir dans un premier temps une excellente sensibilité afin de repérer l'ensemble des sujets potentiellement infectés, puis dans un second temps, grâce à un test spécifique, de confirmer le diagnostic suspecté.

La Figure 5 reprend les différentes techniques de dépistage et de confirmation recommandées par la NABM pour le sérodiagnostic des aspergilloses.

Aspergillose		
4307	<ul style="list-style-type: none"> Dépistage au moyen d'un ou plusieurs antigènes quelle que soit la technique parmi les suivantes : ELS - HAGG - EIA - IDD Cotations limitées à 2 antigènes. Test de confirmation en utilisant une des techniques suivantes : 	B 50
4308	COES	B 90
4309	IELP	B 120
4310	IE	B 180

ELS : Electrosynérèse / HAGG : Hémagglutination sensibilisée / EIA : Technique immunoenzymatique / IDD : Immunodiffusion double
COES : Coélectrosynérèse / IELP : Immunoélectrophorèse / IE : Immunoempreinte ou Western Blot

Figure 5 : Techniques recommandées par la NABM pour le sérodiagnostic des aspergilloses.

Bien que cette démarche soit avalisée par la majorité des biologistes médicaux, dans une enquête de recensement des méthodes utilisées, réalisée sur 20 centres français en 2015 par la Société Française de Mycologie Médicale (SFMM)³², la plupart des laboratoires de biologie médicale (LBM) français ne réalisaient pas la démarche en deux étapes prévues par la NABM :

- 7 centres effectuaient systématiquement un test de dépistage et de confirmation. C'est le cas dans le Service de Parasitologie - Mycologie du CHU de Toulouse en raison d'un manque de sensibilité du test de dépistage.
- 3 centres combinaient deux tests de dépistage et un test de confirmation.

Parmi les centres qui réalisaient la démarche planifiée par la NABM, ceux-ci indiquaient deux autres cas pour lesquels les deux étapes étaient pratiquées :

- En cas de résultat initial négatif en divergence avec la clinique
- En cas de suivi chez un patient précédemment positif

Parmi les réactifs utilisés pour le dépistage, les techniques de type ELISA étaient les plus utilisées (81%) avec quatre réactifs commerciaux différents.

Cette étude témoigne d'un manque de standardisation des pratiques diagnostiques sérologiques, auquel s'associe un défaut d'uniformisation des différentes techniques employées, pouvant contribuer à une certaine variabilité inter-laboratoire. La Figure 6, ci-après, met en avant la diversité des techniques sérologiques adoptées par les LBM français (données ProBioQual 2018).

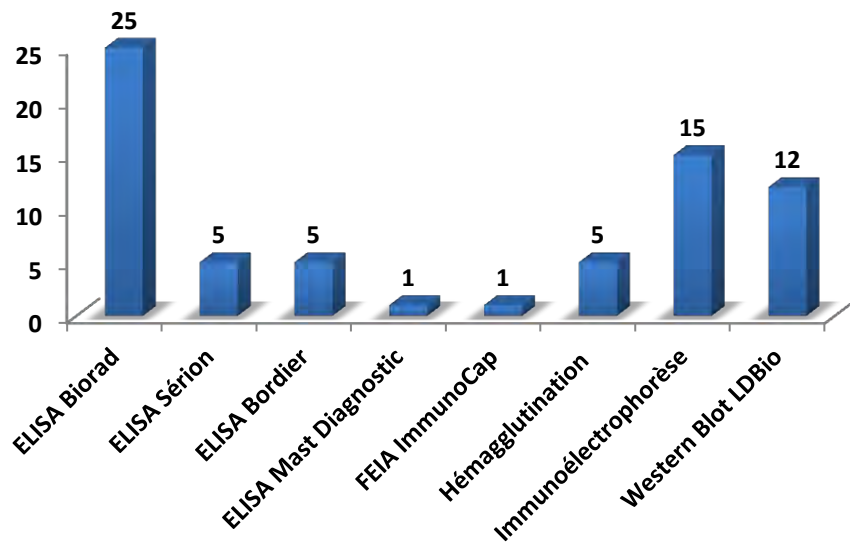


Figure 6 : Répartition des différentes techniques sérologiques en France (données ProBioQual 2018).

On constate que l'immunodiffusion double (IDD), l'hémagglutination sensibilisée (HAGG), l'électrosynérèse (ELS) et la coélectrosynérèse (COES) ne sont plus utilisées dans les laboratoires des services de Parasitologie - Mycologie français alors qu'elles figurent toujours dans la liste des techniques préconisées par la NABM. Les performances des différentes techniques sérologiques actuellement disponibles font l'objet d'un débat qui porte notamment sur la standardisation des Ag utilisés dans la fabrication des réactifs.

II. Techniques sérologiques

Historiquement, les Ag nécessaires aux tests sérologiques étaient produits par extraction à partir de cultures du champignon. Cependant ces mélanges antigéniques obtenus font l'objet de différences quantitatives et qualitatives. Ainsi, selon les conditions de culture (temps de pousse, souche d'*Aspergillus fumigatus* utilisée, etc.), le réactif final ne sera pas identique d'un lot à l'autre³. Afin de palier à ces difficultés, des Ag recombinants ont été développés et commercialisés. Leur utilisation pour la détection des IgG anti-*Aspergillus* semble avoir permis d'améliorer les performances des EIA, en s'affranchissant des problèmes d'hétérogénéité des mélanges bruts d'Ag extraits de cultures ou de broyats³³.

A l'heure actuelle, trois types d'Ag différents sont utilisés parmi les trousse de réactifs commercialisées en France :

- Des Ag somatiques obtenus par broyage des filaments mycéliens (riches en protéines)
- Des Ag métaboliques obtenus par filtrat de culture (riches en polysaccharides)
- Des Ag recombinants

Ces techniques utilisent généralement des Ag d'*Aspergillus fumigatus*³³.

1. Immunodiffusion double

L'IDD consiste à mettre en évidence des arcs de précipitation. C'est une technique qualitative réalisée sur un gel d'agarose où les Ag et le sérum à tester sont déposés dans des puits préformés. Par diffusion radiale passive, des complexes immuns Ac-Ag se forment au point de contact et précipitent après un à deux jours d'incubation. La présence d'Ac sériques se traduit par l'apparition d'un ou plusieurs arcs entre les deux puits. Les arcs sont ensuite révélés par une coloration au Bleu de Coomassie (Figure 7).

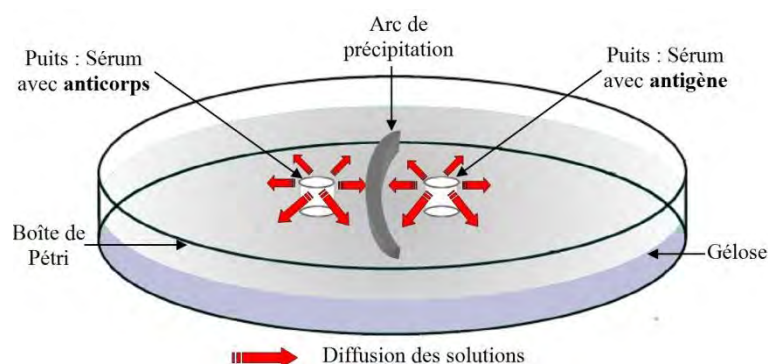


Figure 7 : Principe de la méthode d'IDD³⁷.

Cette technique présente comme inconvénient de fournir un résultat tardif (4 à 5 jours) dont l'interprétation est opérateur-dépendant. En outre, bien qu'il s'agisse d'une technique reproductible, elle manque de sensibilité et ne donne pas de résultat quantitatif^{34,35}. Cette technique qui est inscrite à l'heure actuelle à la NABM pour la détection d'*Aspergillus* est en cours d'abandon³⁶.

2. Electrosynérèse

L'ELS ou contre-immunoelectrophorèse est de principe comparable à celui de la double diffusion. Cette technique consiste à faire migrer les Ag et les Ac par un champ électrique en milieu tamponné, afin d'accélérer la migration. Les Ag chargés négativement migrent vers l'anode et les Ac chargés positivement migrent vers la cathode. C'est une méthode qualitative, qui présente l'avantage d'être plus rapide (quelques heures) que la précédente³⁸. Cependant, elle nécessite un équipement spécialisé et présente une sensibilité comparable à celle de la double diffusion en gel³³.

3. Immunoélectrophorèse

L'immunoélectrophorèse (IEP) consiste en la séparation électrophorétique du sérum sur un gel d'agarose, suivie par une double diffusion perpendiculaire à l'axe de migration des Ag et des Ac. Son résultat repose sur la visualisation d'arcs de précipitation ainsi que de la présence d'une activité enzymatique (catalasique et/ou chymotrypsique) au niveau de ces arcs. Chaque arc représente un complexe immun différent (Figure 8).

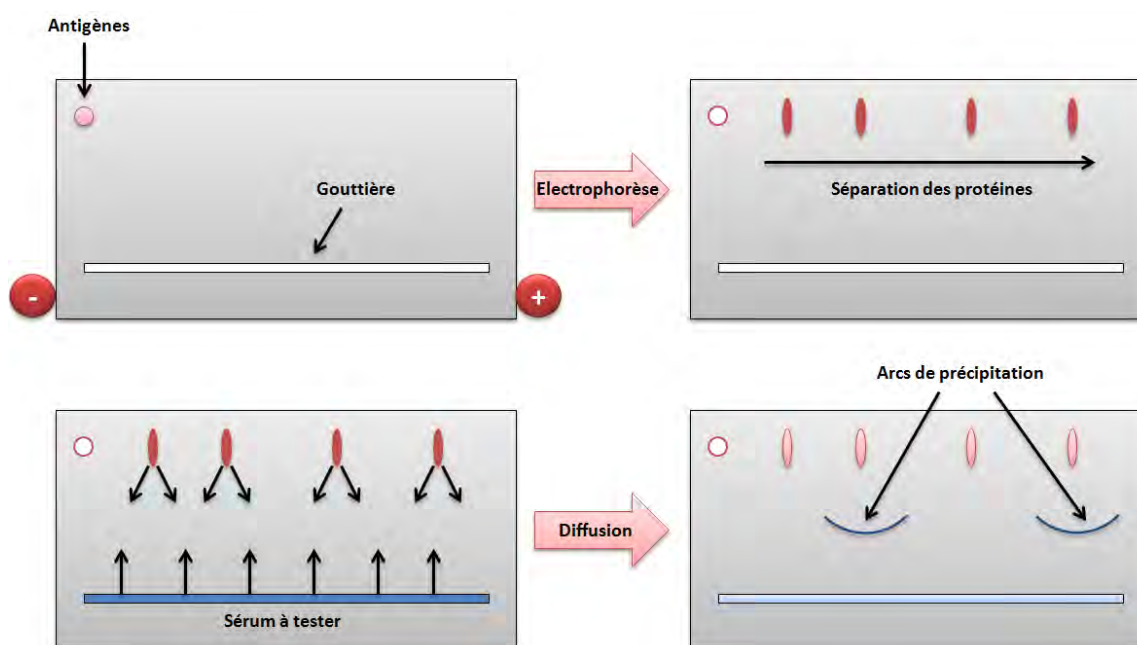


Figure 8 : Principe de l'IEP³⁹.

L'IEP est une technique quantitative considérée comme la technique de référence³¹ bien qu'elle présente quelques inconvénients. Il s'agit d'une technique longue dont la lecture visuelle des arcs de précipitation nécessite un personnel expérimenté.

De plus, elle manque de standardisation et varie d'un laboratoire à l'autre selon :

- Les Ag utilisés (faits "maison" ou commerciaux)
- Le mode opératoire de la technique

Les seuils de positivité qui par convention ont été établis à partir de 3 arcs de précipitation^{31,40}, diffèrent entre LBM (certains la considère positive si ≥ 2 arcs protéiques⁴¹, là où d'autres la considère comme positive à partir d'un 1 seul arc⁴²).

Cette technique est utilisée au Laboratoire de Parasitologie – Mycologie du CHU de Toulouse comme test de confirmation.

4. Coélectrosynérèse

La COES est une technique qui reprend le principe de l'ELS en intégrant la migration concomitante d'un sérum témoin. Elle permet d'obtenir des arcs en continuité de ceux du sérum témoin.

5. Western Blot

Le Western Blot (WB) ou immunoempreinte ne repose pas sur les mêmes principes que les techniques de confirmation précédemment citées. Il s'agit d'un test qualitatif qui est utilisé comme test de confirmation. Il permet d'identifier dans un milieu complexe des protéines, en associant deux principes :

- La migration des Ag aspergillaires selon le poids moléculaire sur un gel d'électrophorèse (polyacrylamide) puis leur fixation par électro-transfert sur une membrane de nitrocellulose^{43,44}
- La détection par révélation immunochimique (phosphatase alcaline) sous forme de bandes transversales colorées

Le profil et le nombre de bandes sur les échantillons sont déterminés par lecture visuelle par rapport à un profil type provenant des bandes d'un sérum témoin. C'est une technique de confirmation moins contraignante que l'IEP et pouvant être semi-automatisée, mais relativement onéreuse.

6. Hémagglutination indirecte

L'hémagglutination indirecte (HAI) est l'une des premières techniques de dépistage à avoir été commercialisée. Elle fait intervenir des hématies d'animal sensibilisées, c'est-à-dire recouvertes d'Ag aspergillaires obtenus à partir de broyats de champignon et/ou de surnageant de culture⁴⁵. Les hématies sont mises en présence du sérum des patients à tester, à différentes dilutions, dans les cupules en U d'une microplaque. La réaction est positive lorsqu'un voile se forme au fond de la cupule. La sédimentation des hématies au fond formant un point signe la négativité (Figure 9). La lecture est visuelle et le résultat est rendu sous forme quantitative (taux de dilution). Son avantage est d'être simple et rapide à réaliser (2 heures). Elle a pour inconvénient d'être opérateur dépendante du fait de sa lecture à l'œil nu.

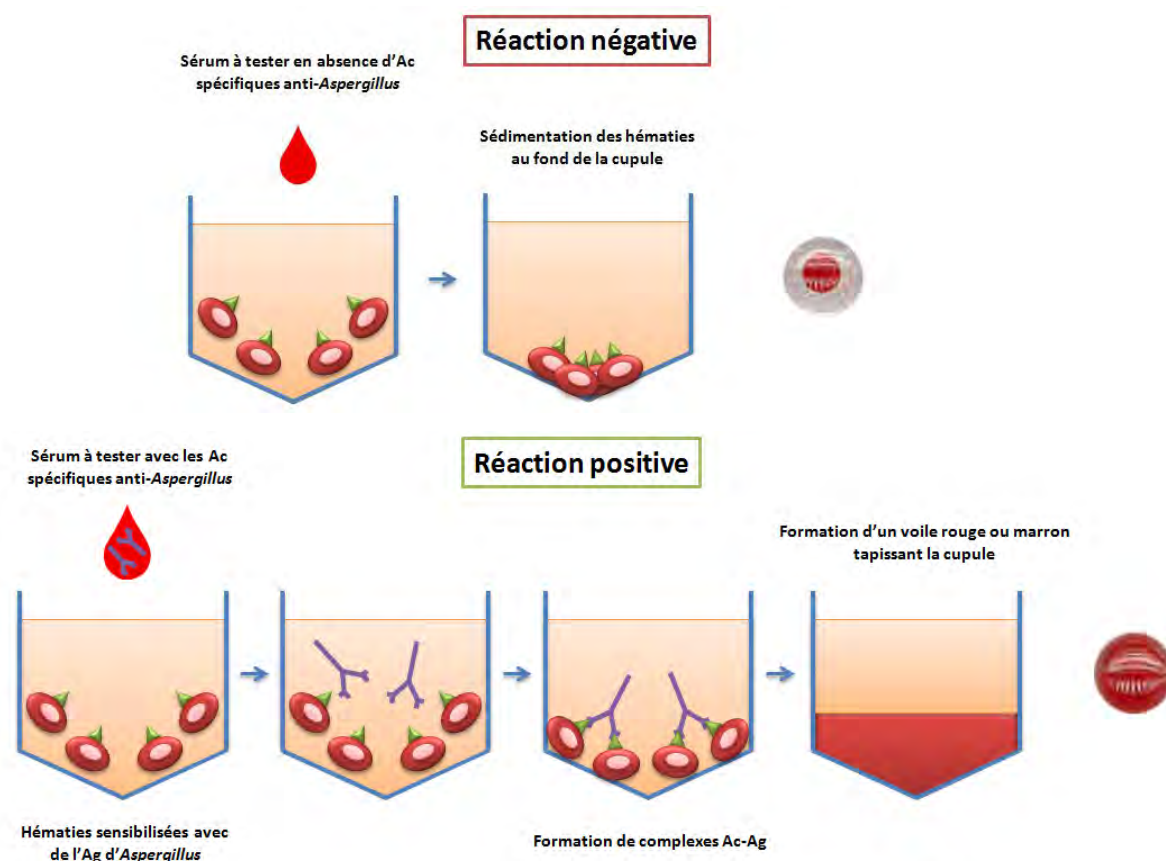


Figure 9 : Principe de l'HAI.

L'HAI est proposée en remplacement de l'HAGG parmi les techniques de dépistage⁴⁶ car cette dernière manque de sensibilité et de reproductibilité⁴⁷.

7. Immunofluorescence indirecte

L'immunofluorescence indirecte (IFI) est une technique sensible et spécifique. Différentes dilutions du sérum des patients, mises en contact avec l'Ag d'*Aspergillus fumigatus*, lui-même fixé dans les puits d'une lame, sont testées. L'Ag est obtenu à partir de culture de mycélium directement sur la lame permettant de préserver l'intégrité du champignon⁴⁸. La réaction Ac-Ag est révélée par l'ajout d'un Ac anti-Ig couplé à un fluorochrome (Figure 10). L'inconvénient est que la lecture des lames nécessite un équipement coûteux (microscope à fluorescence) et le résultat est rendu en taux de dilution dont l'interprétation est subjective (opérateur dépendante).

Tout comme la technique précédente, l'introduction de l'IFI dans la liste des examens pris en charge dans la NABM a été récemment proposée⁴⁶.

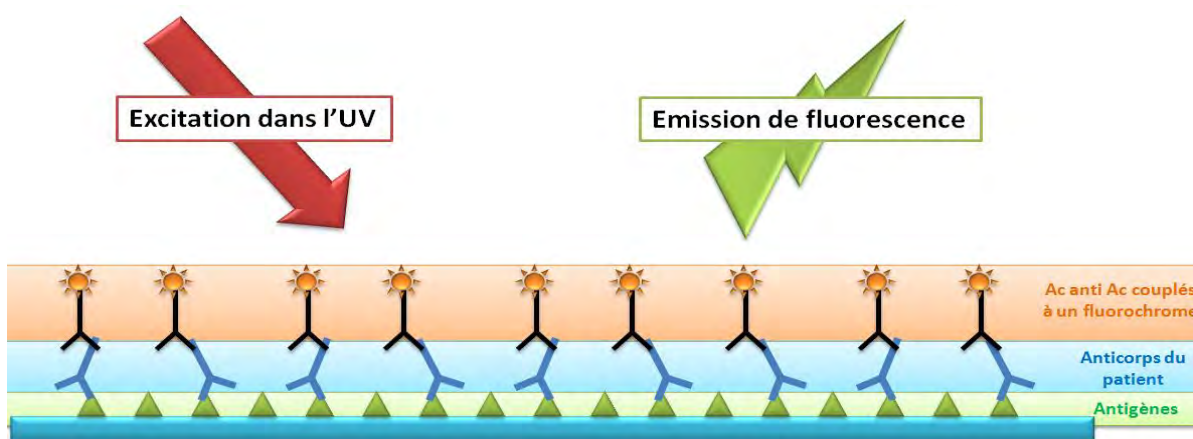


Figure 10 : Principe de l'IFI.

8. Techniques immunoenzymatiques

Les EIA regroupent :

- Les techniques de type ELISA avec révélation enzymatique sont les méthodes les plus fréquemment utilisées dans la détection initiale des Ac anti-*Aspergillus*
- Les techniques de type FEIA (Fluorescent-enzyme-immunoassay) avec révélation par fluorescence

Les EIA font intervenir des Ag d'*Aspergillus* coatés au fond des puits d'une plaque de microtitration. En cas de présence d'Ac anti-*Aspergillus* dans le sérum, ceux-ci se lient aux Ag de la plaque. Les complexes Ac-Ag formés sont révélés par addition d'un Ac secondaire, antiglobuline humaine, lui-même couplé à un marquage enzymatique (ELISA) ou fluorescent (FEIA). Un substrat est ajouté et hydrolysé en un produit coloré ou fluorescent en cas de présence du conjugué. Le résultat de la réaction libère un signal qui est lu par spectrophotométrie (Figure 11).

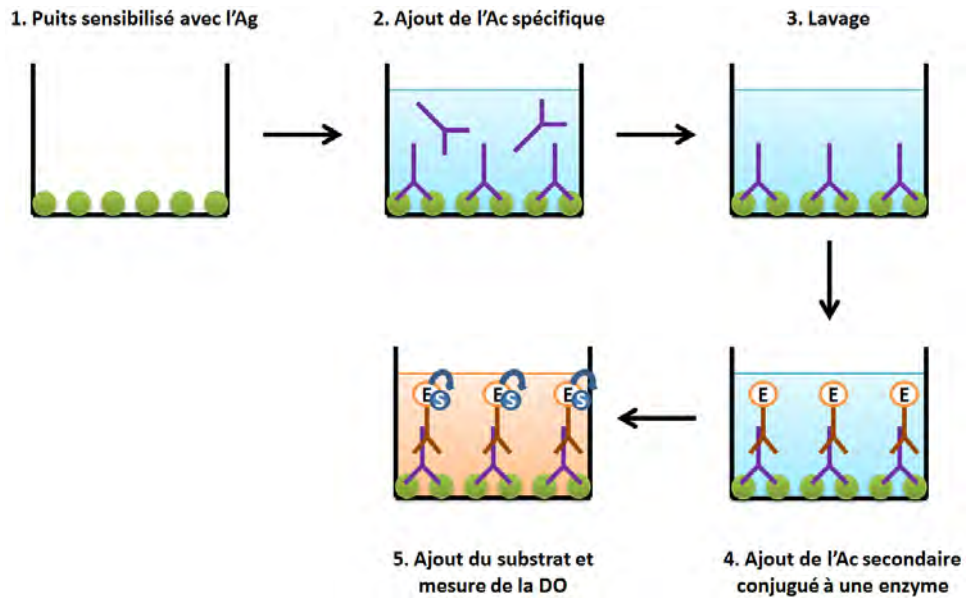


Figure 11 : Principe d'une ELISA indirecte.

Les résultats sont quantitatifs, exprimés en densité optique (DO) ou en unité de fluorescence. Ce sont des techniques sensibles, permettant la réalisation de grandes séries car elles ont pour avantages :

- D'être faciles et rapides à réaliser (2 heures)
- De pouvoir être automatisées jusqu'à l'étape de lecture (opérateur indépendant)

Dans le Service de Parasitologie – Mycologie du CHU de Toulouse, lors de la réalisation de ce travail, l'ELISA Sérion était utilisée comme test de dépistage pour la détection des Ac anti-*Aspergillus* de type IgG.

Comparaison de sept réactifs

I. Contexte

Les APC et l'ABPA sont les deux types atteintes les plus couramment rencontrées chez les sujets immunocompétents, touchant plus de 3 millions de personnes dans le monde³. Leur diagnostic repose sur un faisceau d'arguments cliniques, microbiologiques et radiologiques. Parmi les critères microbiologiques, la sérologie anti-*Aspergillus* occupe une place essentielle dans le diagnostic initial et le suivi des formes chroniques¹⁹ et/ou allergiques²⁰. Utilisée depuis plus d'une cinquantaine d'années, la recherche des Ac spécifiques anti-*Aspergillus* a débuté avec l'utilisation des techniques d'immunoprécipitation (IDD, ELS et IEP) peu sensible, chronophage et d'interprétation subjective. Malgré ces désavantages, l'IEP s'est inscrite comme étant la méthode de choix³¹ en tant que test de confirmation dans la procédure en deux temps prévue par la NABM. C'est à partir de la fin des années 1970 que l'on voit arriver, au sein des laboratoires de mycologie, les EIA plus sensibles, rapides et automatisables et qui vont considérablement changer le paysage des méthodes utilisées dans le dépistage des Ac anti-*Aspergillus* de type IgG.

Bien que les EIA et les techniques d'immunoprécipitation soient majoritairement employées dans les Services de Parasitologie-Mycologie français³², elles présentent toutes deux un défaut d'harmonisation en ce qui concerne les kits de réactifs utilisés (Ag somatiques et métaboliques et/ou recombinants) et les seuils d'interprétation adoptés. A l'heure actuelle, un véritable débat existe au sujet de leurs performances et peu d'études ont été réalisées par les fabricants afin de les comparer.

L'objectif de ce travail était donc d'évaluer les performances des différents réactifs commercialisés en France pour le sérodiagnostic des aspergilloses non invasives, d'adapter les seuils d'interprétation relatifs à chaque technique afin de proposer une stratégie analytique en terme de dépistage et de confirmation. Ce travail a également été l'occasion d'évaluer les performances d'une toute nouvelle technique rapide d'immunochromatographie non commercialisée à l'heure actuelle et produite par LD Bio pour la détection des Ac anti-*Aspergillus*.

II. Matériel et méthode

A. Sérums collectés

Tous les sérums collectés provenaient de la sérothèque du Service de Parasitologie - Mycologie où ils ont été conservés à -20°C.

Le recrutement des sérums de patients présentant une APC ou une APA a été effectué sur la base du codage PMSI (programme de médicalisation des systèmes d'information) réalisé par les cliniciens, en collaboration avec le Département d'Informatique Médicale du Pr Molinier. Une extraction sur trois années consécutives (de 2014 à 2016) de patients ayant eu pour diagnostic principal, associé ou relié, la notion d'une aspergillose « sensu lato » a été réalisée. En effet, du fait de l'absence d'un codage spécifique pour les APC et les APA, cette extraction a concerné l'ensemble des patients ayant eu les codages génériques suivants :

- Code **B44...** pour "Aspergillose"
- Code **J67...** pour "Pneumopathie d'hypersensibilité"

Sur une base de données de 638 patients hospitalisés 1481 fois entre 2014 et 2016, deux populations de patients ont été exclues :

- Les sujets présentant une aspergillose invasive (code **B440**)
- Les sujets immunodéprimés des services d'oncologie et en particulier ceux d'oncohématologie

Après croisement avec les numéros d'identification de notre Système Informatique du Laboratoire (MOLIS), la sélection rétrospective des sérums les plus récents sur lesquels avaient déjà été réalisées deux techniques de routine (ELISA Sérion et IEP FSK/Sébia) a été réalisée. Dans le groupe des APA, les deux patients porteurs d'une AAE ont été exclus du fait de leur petit nombre et de l'incertitude quant à l'allergène responsable de la maladie. Les patients non atteints de maladies aspergillaires, groupe « témoin », ont été sélectionnés parmi les patients ayant bénéficié d'un bilan prégreffe d'organe solide (hors greffe pulmonaire).

B. Réactifs utilisés

L'évaluation a porté sur sept réactifs différents entre Novembre 2017 et Février 2018 (Tableau II). Il s'agit pour la majorité d'entre eux, de techniques commercialisées en France (exception faite de l'ICT LDBio qui est actuellement en cours d'évaluation pour une

commercialisation future). Les réactifs suivants ont été testés selon les recommandations des fournisseurs sur l'ensemble des sérums sélectionnés :

- Platelia™ *Aspergillus* IgG (Biorad®, Marnes-la-Coquette, France) testé sur Evolis®
- ELISA *Aspergillus fumigatus* IgG (Bordier® Affinity Products, Crissier, Suisse)
- ELISA Classic™ *Aspergillus fumigatus* IgG (Sérion®/Virion®, Würzburg, Allemagne)
- Phadia™ *Aspergillus* IgG m3 FEIA (ImmunoCap®, Uppsala, Suède) testé sur Unicap® 100
- Immunochromatographie *Aspergillus* IgG/IgM (LDBIO®, Lyon, France)
- Western-Blot™ *Aspergillus* IgG (LDBIO®, Lyon, France)
- IEP *Aspergillus* FSK Microgen®/Hydragel Sébia® (Microgen Bioproducts, Royaume Uni / Sébia, Evry, France)

Tableau II : Composition et seuils fournisseurs des différents réactifs testés

Tests	Composition antigénique	Négatif	Zone grise	Positif
Biorad (UA/mL)	Ag recombinants	< 5	$5 \leq x < 10$	≥ 10
Bordier (Index)	Ag recombinants + Ag solubles somatiques et métaboliques	< 0,8	$0,9 \leq x < 1$	≥ 1
Sérion (UA/mL)	Non renseignée	< 50	$50 \leq x < 70$	≥ 70
ImmunoCap (mg/L)	Extrait total de conidies et mycélium	< 40	NA	≥ 40
ICT LDBio	Ag purifiés	Bande C	NA	Bandes C et T
WB LDBio	Non renseignée	< 2 bandes	NA	≥ 2 bandes parmi P16, P18-20, P22 et P30
IEP FSK/Sébia	Ag solubles somatiques et métaboliques	Absence d'arcs <u>ET</u> absence d'activité catalasique	$1 \leq x < 3$ arcs Somatiques ou métaboliques <u>ET</u> pas d'activité catalasique	≥ 3 arcs somatiques ou métaboliques <u>OU</u> présence d'une activité catalasique

1. ELISA *Aspergillus* IgG Biorad

Il s'agit d'une technique ELISA indirecte qui utilise des Ag d'*Aspergillus fumigatus* recombinants dont la composition n'est pas communiquée par le fabricant. Pour chaque série, cinq calibrateurs sont systématiquement testés afin d'obtenir concomitamment une courbe d'étalonnage. Les séries de sérums ont été testées avec l'automate Evolis®, gestionnaire de plaque. Une fois la réaction terminée, la lecture de la DO est réalisée par un spectrophotomètre réglé à 450 nm. Les résultats sont rendus sous forme de concentrations en UA/mL à partir de la courbe d'étalonnage [DO = f(UA/mL)] obtenue à partir des 5 points de gamme 0, 10, 20, 40 et 80 UA/mL. La zone de linéarité de cette technique est comprise entre 2 et 80 UA/mL. Les points de gamme utilisés pour le tracé de la courbe d'étalonnage ne permettent pas d'obtenir une titration pour des concentrations supé-

rieures à 80 UA/mL. Par conséquent, pour déterminer une valeur concernant les sérums fortement positifs, il aurait été nécessaire de recommencer le test en effectuant une pré-dilution supplémentaire des échantillons. Cependant en raison d'une quantité limitée de sérum, nous n'avons pas pu réaliser ces dosages.

2. ELISA *Aspergillus* IgG Bordier

Dans cette EIA de type ELISA indirecte, les puits sont sensibilisés avec le mélange d'Ag suivant :

- Des Ag solubles somatique et métabolique d'*Aspergillus fumigatus* produits par le laboratoire de Parasitologie-Mycologie du CHU de Grenoble
- Deux Ag recombinants d'*Aspergillus fumigatus* choisis sur la base de leurs meilleures performances pour la détection des Ac anti-*Aspergillus*⁴⁹ :
 - La dipeptidylpeptidase type V (chymotrypsine)
 - La ribonucléase (mitogilline)

Pour chaque série, un témoin négatif, faiblement positif et positif sont testés. Pendant notre étude, tous les sérums ont été dosés manuellement. Le signal enzymatique libéré est mesuré à 405 nm et le résultat obtenu est rendu sous la forme d'un index correspondant au rapport de la DO du sérum sur la DO seuil.

3. ELISA *Aspergillus* IgG Serion

Il s'agit d'une ELISA indirecte qui utilise des Ag d'*Aspergillus fumigatus* dont la composition n'est pas révélée par le fabricant. Pour chaque série, un blanc et deux sérums standards sont testés. Dans notre étude, tous les sérums ont été dosés manuellement. La lecture de la DO par spectrophotomètre est réalisée à 405 nm. Le résultat est exprimé en UA/mL à partir d'une courbe de référence à quatre paramètres définis par l'institut Virion/Sérion GmbH. Ces paramètres sont différents à chaque nouveau lot de réactifs et doivent être systématiquement mis à jour à chaque changement de lot. La zone de linéarité de cette technique est comprise entre 30 et 1000 UA/mL.

4. FEIA *Aspergillus* IgG ImmunoCap

Contrairement aux trois kits de réactifs précédents, il s'agit d'une FEIA indirecte. Celle-ci utilise des Ag aspergillaires qui proviennent d'un extrait total de conidies et de mycélium d'*Aspergillus fumigatus*⁴². La réaction se fait sur un automate dédié, UniCap[®]. La libération d'un signal fluorescent est mesurée et les résultats sont rendus en mg/L. La plage de

linéarité de cette technique est comprise entre 2 et 200 mg/L. Son seuil de positivité est fixé à 40 mg/L selon un accord lors d'une réunion de consensus entre six laboratoires britanniques et Phadia (données non publiées)⁴².

5. ICT *Aspergillus* IgG/IgM LDBio

Il s'agit d'un test immunochromatographique de diagnostic rapide unitaire qualitatif, permettant la détection simultanée des IgG et des IgM anti-*Aspergillus*. En cours d'évaluation par le fournisseur LDBio, ce test vise les laboratoires à faibles niveaux de ressources avec pour objectif de tenter de répondre aux critères ASSURED (Figure 12).

A = Prix attractif (*Affordable*)
S = Sensible (*Sensitive*)
S = Spécifique (*Specific*)
U = Facile d'utilisation en un minimum d'étapes (*User-friendly*)
R = Robuste et rapide (*Robust and rapid*)
E = Sans équipement spécifique (*Equipment-free*)
D = À disposition de tous ceux qui en ont besoin (*Deliverable*)

Figure 12 : Caractéristiques principales d'un "Point Of Care Testing" : critères ASSURED (OMS).

Le test est basé sur le principe du sandwich homogène. Sa composition est la suivante (Figure 13) :

- Une bandelette de nitrocellulose sur laquelle sont répartis deux bandes réactives :
 - Une bande T « test » contenant l'Ag d'*Aspergillus fumigatus* purifié à partir d'une culture
 - Une bande C « contrôle » contenant des gammaglobulines de lapin
- Un support en fibre de verre imprégné de :
 - Particules de latex noir couplées à l'Ag aspergillaire (« latex test » = latex T)
 - Particules de latex bleu couplées à un anti sérum de chèvre anti-IgG de lapin (« latex contrôle » = latex C)

Le test consiste à déposer successivement le sérum du patient et une solution éluante dans le puits prévu à cet effet. L'éluant va permettre la migration du sérum et des particules de latex noires ou bleues couplées respectivement à l'Ag aspergillaire (« latex test » ou latex T) et à un anti sérum de chèvre anti-IgG de lapin (« latex contrôle » ou latex C). La migration s'achève en 20 à 30 minutes. En cas de présence d'Ac anti *Aspergillus* (IgG et/ou IgM) dans le sérum à tester, un complexe se forme entre les Ac du patient et le latex T. Ce complexe est capturé par la bande T et se traduit par l'apparition d'une bande colorée en

noir reflète de la positivité du test. Toute ligne, même de faible intensité, doit être considérée comme positive.

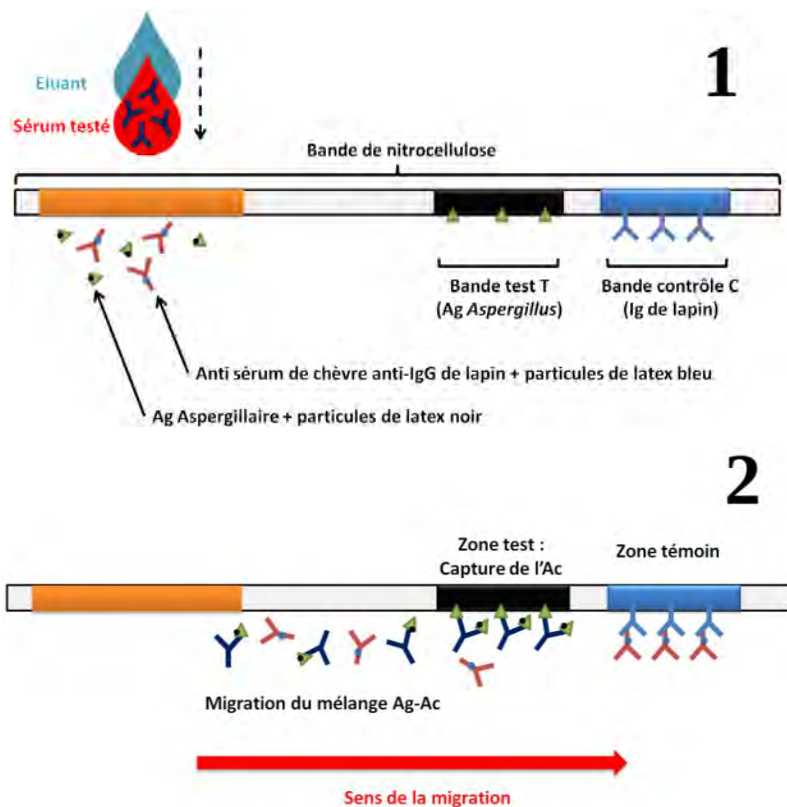


Figure 13 : Principe d'une bandelette à écoulement latéral.

Afin de contrôler le bon fonctionnement de l'examen, la capture directe du latex C par la bande C provoque l'apparition d'une bande contrôle bleue. Cette bande bleue est systématique quelque-soit le statut sérologique du patient (Figure 14). Aucune lecture ne doit être réalisée après 30 minutes de migration.

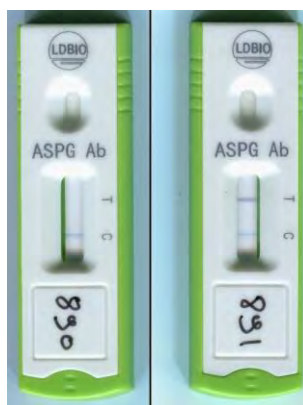


Figure 14: Exemple de résultats de l'ICT LDBio *Aspergillus* : négatif (à gauche) et positif (à droite)⁵⁰.

Ce nouveau réactif a été conçu dans le cadre d'une thèse de science et évalué au sein des CHU de Toulouse, Marseille, Montpellier, Bordeaux et Rennes sous la responsabilité du Dr RANQUE Stéphane du CHU la Timone de Marseille.

6. Western blot *Aspergillus* LDBio

Un seul kit (LDBio Diagnostics) de bandelettes prédécoupées prêtes à l'emploi est pour le moment disponible sur le marché et sa spécificité est en court d'évaluation^{51,52}. La composition des Ag aspergillaires fixés par électro-transfert sur la membrane de nitrocellulose n'est à ce jour pas connue. Les bandes retrouvées par lecture visuelle sont réparties de 10 à 200 kDa. En pratique et pour des raisons de spécificité, seule la zone de bas poids moléculaires (≤ 30 kDa) est retenue pour la lecture. Quatre bandes, parfois dédoublées, ont été retenues pour leur spécificité, leur sensibilité et leur facilité de lecture. Elles sont situées à 16, 18-20, 22 et 30 kDa et sont appelées : P16, P18-20, P22, P30. Deux autres bandes spécifiques moins visibles et peu fréquentes peuvent être parfois rencontrées à 10 kDa et plus rarement à 15 kDa. Elles ne sont pas prises en compte pour l'interprétation du test. Le WB LDBio est considéré positif si l'on observe simultanément la présence d'au minimum deux bandes parmi P16, P18-20, P22 et P30 (Figure 15).

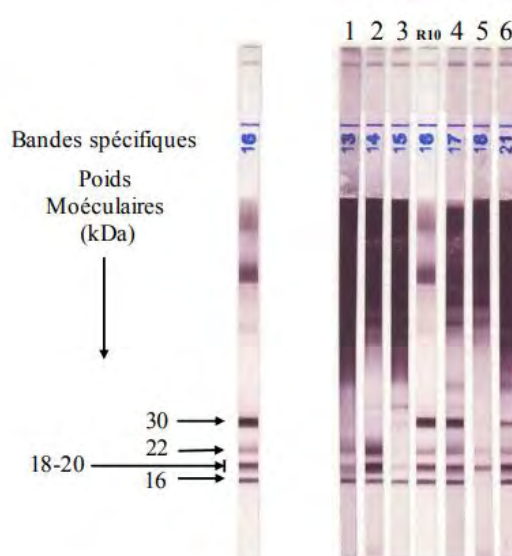


Figure 15 : Exemples de résultats positifs au WB.

7. IEP *Aspergillus* Sebia

L'IEP qui est réalisée au CHU de Toulouse utilise des gels d'agarose prêts à l'emploi (Hydragel, Sebia, France) pour la migration des Ag et des composants du sérum contenant potentiellement des Ac spécifiques d'*Aspergillus fumigatus*. Les Ag utilisés dans cette technique proviennent d'un mélange de filtrat somatique et de culture des Ag d'*Aspergillus fumigatus* (FSK1 Microgen). La recherche de l'activité catalasique est également réalisée après avoir fait réagir les gels dans une solution d'eau oxygénée. Le résultat est exprimé en nombre d'arcs de précipitation pour tous les types d'Ag ainsi que par la présence ou l'absence d'une activité catalasique. Au laboratoire de Parasitologie - Mycologie

du CHU de Toulouse, l'IEP est considérée positive en présence d'au moins 3 arcs de précipitation pour au moins un des deux Ag testés (métaboliques ou somatiques) (Figure 16) ou lorsqu'une activité catalasique est détectée.

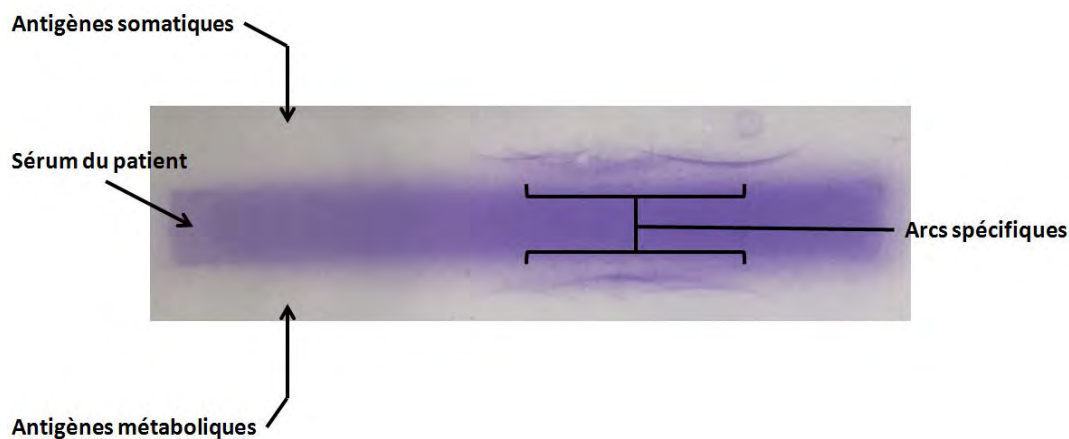


Figure 16 : Exemple d'IEP positive.

C. Analyse statistique

Les caractéristiques de la population étudiée ont été décrites en utilisant les pourcentages et la médiane avec intervalle interquartile (IQR) au vu des distributions non-gaussiennes. Tous les tests commercialisés, qu'ils soient préconisés en dépistage ou en confirmation par les nouvelles recommandations de l'HAS, ainsi que l'ICT ont été évalué par rapport au statut clinique, codage PMSI. Les résultats de sensibilité et spécificité ont été comparés en utilisant un test d'égalité des proportions. L'analyse des résultats a été faites à l'aide de courbe ROC (Receiving Operating Characteristics) afin de déterminer pour chaque test quantitatif quel(s) seuil(s) serai(en)t le(s) plus adapté(s) pour le dépistage ou la confirmation des patients immunocompétents atteints de maladies aspergillaires. Les aires sous la courbe ont été comparées à l'aide d'un test du χ^2 . Le seuil de significativité était fixé à 5%.

L'analyse statistique ont été réalisée avec le logiciel : Intercooled Stata 9.2 statistical package (StataCorp, College Station, TX)

III. Résultats

A. Population étudiée

Durant la période d'étude, 142 sérums provenant de 123 patients ont été analysés. Le nombre de sérums par patients variait de 1 à 3 et seul le premier sérum de chaque patient a été inclus.

L'âge médian des patients était de 56 ans [38 ; 66] avec un minimum à 11 ans et un maximum à 92 ans. La population au sein de l'échantillon de patients était constituée de 63 % d'hommes.

Comme le montre la Figure 17, parmi les 123 sérums étudiés :

- 53 provenaient de patients appartenant au groupe des sujets "malades".
- 70 provenaient de patients appartenant au groupe des sujets "non malades".

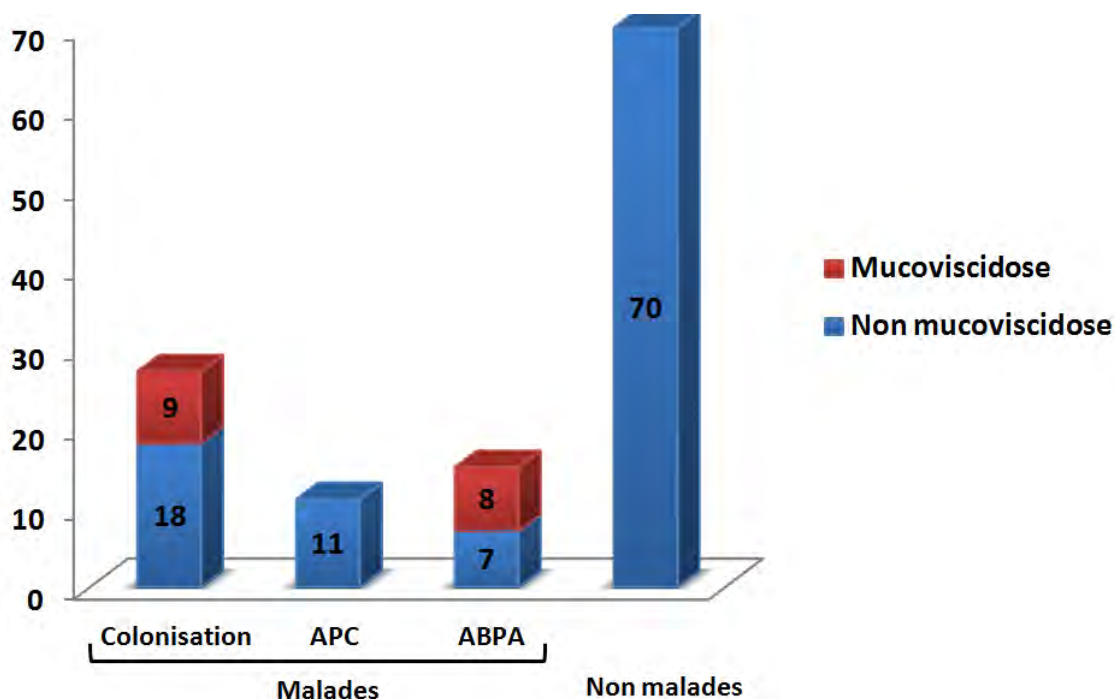


Figure 17 : Répartition du nombre de sérums en fonction des groupes de patients.

La proportion des sujets malades au sein de notre échantillon est de 43,09%.

Au sein du groupe des patients malades, tous les sujets ont bénéficié d'une culture. Seules 30 (55,6%) d'entre elles sont revenues positives et l'espèce *fumigatus* était présente dans la majorité des cas (27 soit 90%). Une culture est revenue positive à *A. terreus* et deux cultures n'ont pas poussées mais le reste des examens complémentaires réalisés a montré la présence de filaments de type *Aspergillus* à l'examen direct pour l'une et une PCR *Aspergillus* positive pour l'autre. Aucune culture n'a été réalisée chez les patients du groupe des non malades.

La Figure 18 montre la répartition des résultats par EIA, tout groupe confondu et par groupe. La répartition des valeurs d'IgG diffère d'une technique à l'autre (Figure 18A) avec des valeurs maximales pouvant varier de 4,4 d'index pour Bordier à plus de 1000 UA/mL pour Sérion. La Figure 18B montre que les quatre EIA possèdent des valeurs chez les sujets malades significativement supérieures à celles des sujets non malades ($p < 0,001$ pour toutes les techniques). Il est à noter qu'une grande majorité des sérums négatifs dosés par Biorad et Sérion soit 93,67 % (74/79) et 86,08 % (68/79) respectivement, sont en deçà des limites inférieures de linéarité.

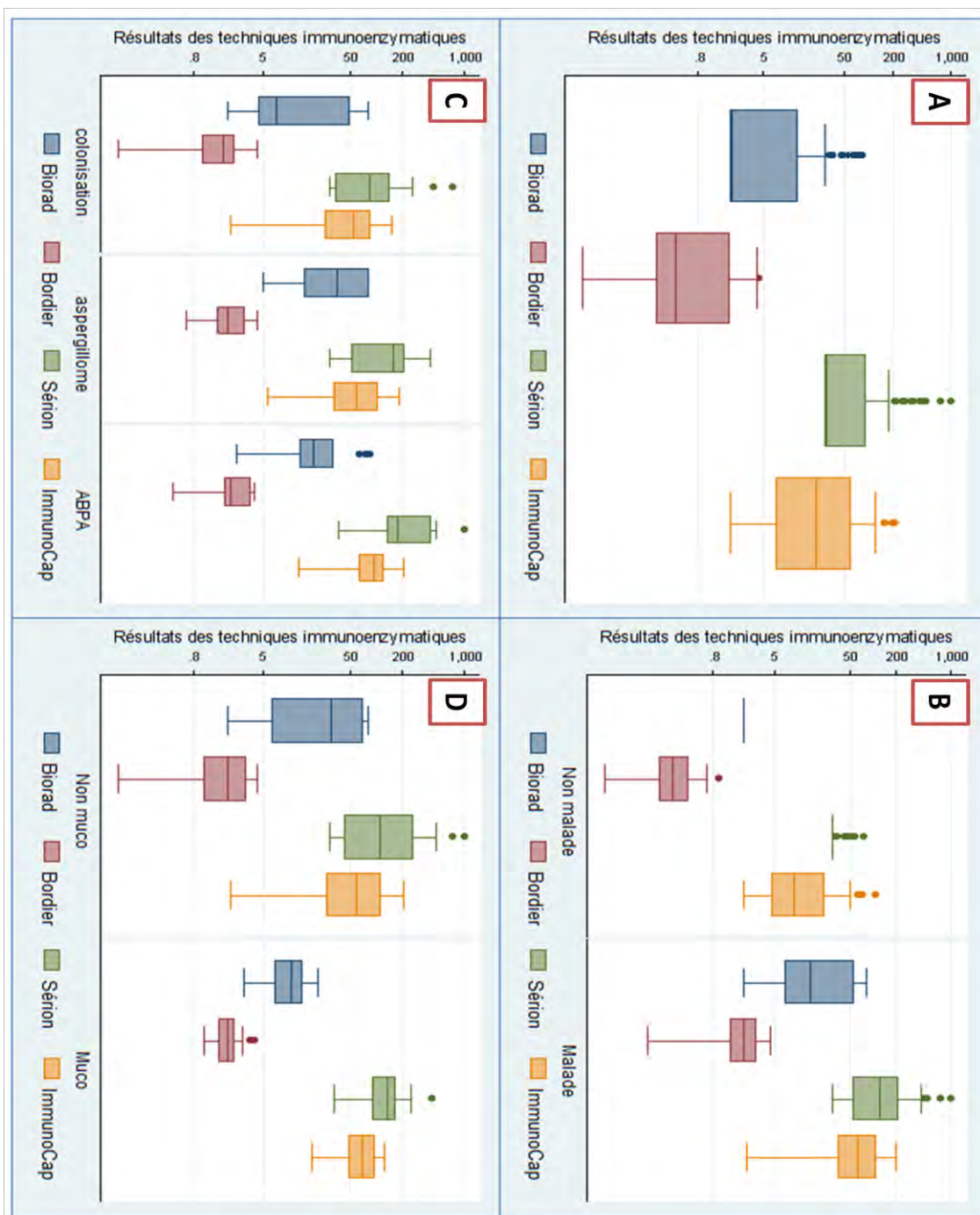


Figure 18 : Répartition des résultats des EIA.

Dans notre groupe de sujets malades, l'étude de la répartition des résultats par techniques entre les patients colonisés, APC et ABPA (Figure 18C) permet de retrouver une différence significative au sein de ces groupes pour Biorad ($p = 0,0427$) et Sérion ($p = 0,0070$). Pour Sérion, seules les valeurs de dosage dans le groupe « ABPA » sont significativement supérieures à celles du groupe « colonisation » (176,8 [128,4-423,3] versus 83,0 [32,4-138,0], $p = 0,002$). Pour Biorad, seules les valeurs de dosage dans le groupe « aspergillome » sont significativement supérieures à celles du groupe « colonisation » (35,4 [14,62-81,0] versus 7,3 [4,3- 47,7], $p = 0,024$). Aucune différence n'a pas été retrouvée pour Bordier et ImmunoCap. Dans le groupe « mucoviscidose » (Figure 18D), pour Bordier, Sérion et ImmunoCap, les valeurs retrouvées ne sont pas différentes de celles rendues dans le groupe « non mucoviscidose ». Pour Biorad, le groupe « mucoviscidose » présente des valeurs significativement plus basses que le groupe « non mucoviscidose » (10,84 [6,74 – 14,07] versus 30,46 [6,29 – 69,49], $p = 0,015$), 50 % des patients du groupe « mucoviscidose » ont des résultats douteux ou négatifs.

B. Sensibilités et spécificités des tests aux seuils préconisés par les fournisseurs

En considérant les résultats douteux comme positifs pour les EIA, un résultat concordant pour les sept techniques utilisées a été retrouvé pour 75 sérums, soit un taux de concordance de 60,98 % (75/123). Ce faible taux de concordance augmente à 78,05 % (96/123) si nous prenons en compte uniquement les quatre EIA, et à 86,99 % (107/123) pour les deux techniques de confirmation (WB LDBio et IEP).

Comme le montre le Tableau III et contrairement à l'IEP qui ne présente aucun sujet malade parmi les résultats négatifs, Sérion et ImmunoCap ne détecte pas 22,64 % et 28,30 % sujets malades, respectivement. D'autre part, 100 % des résultats douteux ou positifs rendus par Biorad et l'IEP concernent des sujets malades.

Tableau III : Nombre de négatifs, douteux et positifs pour chaque technique (nombre de malades pour chaque cas, N=53)

Réactifs	Négatif (malade)	Douteux (malade)	Positif (malade)
Biorad	79 (9)	9 (9)	35 (35)
Bordier	75 (6)	4 (3)	44 (44)
Sérion	79 (12)	7 (6)	37 (35)
ImmunoCap	79 (15)	NA	44 (38)
ICT LDBio	76 (8)	NA	47 (45)
WB LDBio	76 (6)	NA	47 (47)
IEP FSK/Sébia	70 (0)	15 (15)	38 (38)

Dans le Tableau IV, la sensibilité et la spécificité ont été évaluées pour chaque réactif. Dans un premier temps, les valeurs douteuses ont été considérées comme des valeurs positives, puis comme des valeurs négatives. Pour ImmunoCap et l'ICT LDBio, qui ne possèdent pas de zone grise, il n'y a pas de modifications des résultats.

Si l'on considère les valeurs douteuses comme positives, Bordier présente une sensibilité significativement supérieure à celles de Sérion ($p = 0,0091$) et d'ImmunoCap ($p < 0,001$). En revanche aucune différence n'a été trouvée avec Biorad ($p = 0,0998$). La sensibilité de Biorad est significativement supérieure à celle d'ImmunoCap ($p = 0,0171$). Sérion ne présente quant à lui aucune différence de sensibilité avec Biorad ($p = 0,1352$) ou ImmunoCap ($p = 0,1524$). La sensibilité de Sérion augmente significativement ($p = 0,0236$) sans pour autant modifier sa spécificité ($p = 0,2778$). La sensibilité de l'IEP est significativement augmentée ($p < 0,001$) avec une spécificité préservée à 100 %. Pour Biorad et WB LDBio, quel que soit le seuil choisi, la spécificité est de 100 %.

Tableau IV : Sensibilités et spécificités de chaque réactif.

Réactifs	Sensibilité % [IC _{95%}]	Spécificité % [IC _{95%}]
Biorad		
Positive	83,0 [76,4-89,6]	100 [100-100]
Négative	66,0 [57,7-74,4]	100 [100-100]
Bordier		
Positive	88,7 [83,1-94,3]	98,57 [96,5-100]
Négative	83,02 [76,4-89,6]	100 [100-100]
Sérion		
Positive	77,4 [70,0-84,7]	95,7 [92,1-99,3]
Négative	66,0 [57,7-74,4]	97,1 [94,2-100]
ImmunoCap		
Positive/Négative	71,7 [63,7-79,7]	91,4 [86,5-96,4]
ICT LDBio		
Positive/Négative	84,9 [75,6-91,2]	97,1 [94,2-100]
WB LDBio		
Positive/Négative	88,7 [83,1-94,3]	100 [100-100]
IEP FSK/Sébia		
Positive	100 [100-100]	100 [100-100]
Négative	71,7 [63,7-79,7]	100 [100-100]

C. Performances analytiques et adaptation des seuils

1. Tests préconisés pour le dépistage

a) Aire sous la courbe

Le calcul de l'aire sous la courbe (ASC) permet d'apprécier l'intérêt diagnostique d'un test. Elle distingue les tests non informatifs ($ASC < 0,5$), peu informatifs ($0,5 \leq ASC < 0,7$), moyennement informatifs ($0,7 \leq ASC < 0,9$), très informatifs ($0,9 \leq ASC < 1$) et parfaits ($ASC = 1$)⁵³. Plus l'aire sous la courbe est importante et plus un test sera performant.

Comme le montre la Figure 19, trois des quatre techniques testées sont très informatives. Bordier présente une ASC significativement supérieure à celle d'ImmunoCap. Il existe une tendance à la supériorité ($p = 0,052$) des performances analytiques de Bordier par rapport à Sérion. Aucune différence significative n'a pu être trouvée dans notre population d'étude entre Bordier et Biorad ($p = 0,754$).

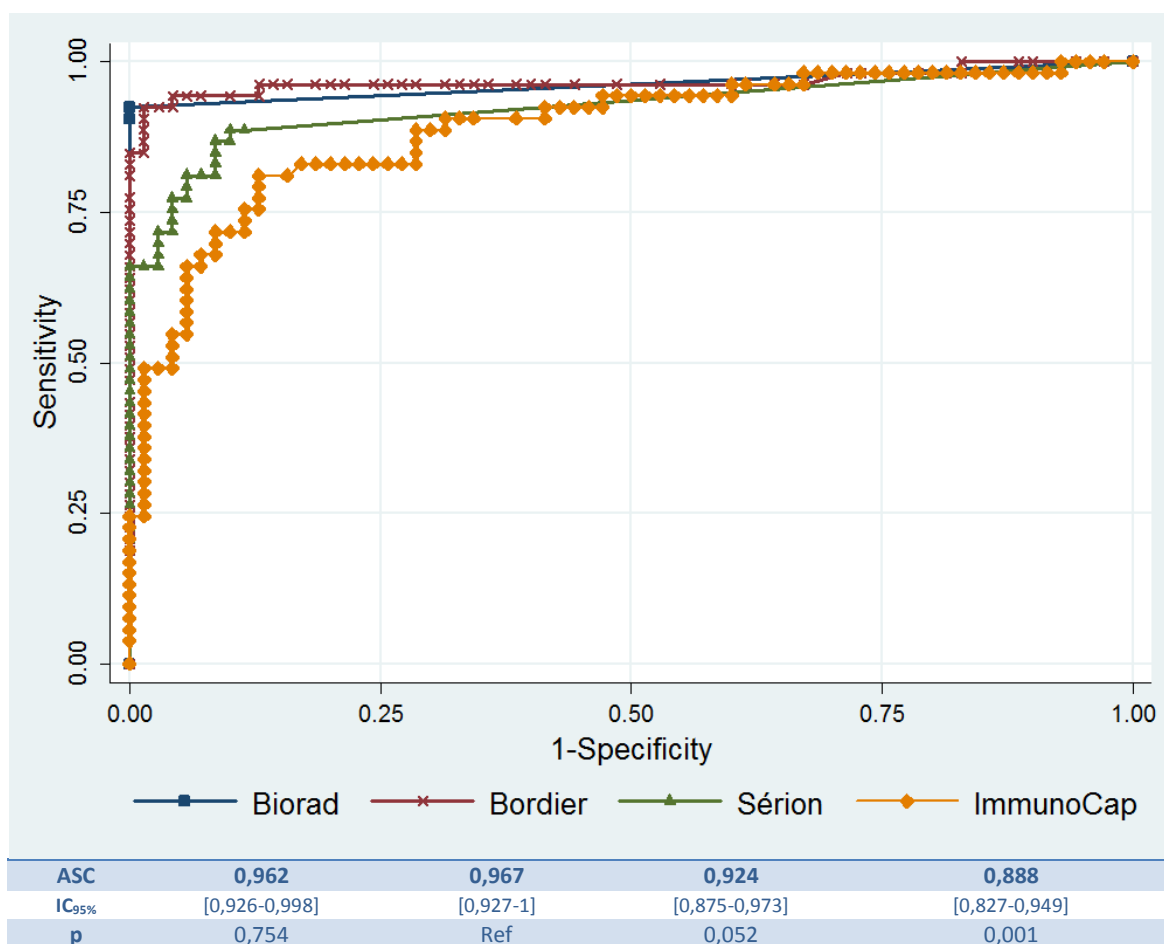


Figure 19 : Courbes ROC et ASC des EIA.

b) Choix des seuils

La discordance observée entre les performances analytiques (courbes ROC, Figure 19) et les valeurs de sensibilité et spécificité exposées dans le Tableau IV des différentes EIA semble lié au choix de leurs valeurs seuils.

Les Tableau V et Tableau VI reprennent pour Biorad, Bordier, Sérion et Immunocap les différents seuils qu'il serait possible d'appliquer afin d'améliorer les performances analytiques ainsi que le nombre de patients correctement classés. Une seule valeur, qui serait le seuil de déclenchement de la technique de confirmation, est proposée afin de détecter le plus de malade possible tout en conservant une spécificité satisfaisante pour éviter un trop grand nombre de test de confirmation, réalisé inutilement.

Pour les quatre techniques, les nouveaux seuils, **en jaune**, sont inférieurs aux seuils fournisseurs précédemment utilisés, **en gras**. Pour Sérion, le gain de sensibilité aurait pu être supérieur, cependant en raison du rapprochement de la limite inférieure de linéarité, il n'a pas été possible d'obtenir de meilleures performances.

Tableau V : Sensibilités et spécificités de Biorad et Bordier en fonction du seuil.

Biorad (Seuil)	Sensibilité	Spécificité	Bordier (Seuil)	Sensibilité	Spécificité
< 2	100,00 %	0,00 %	0,11	100,00 %	17,14 %
2,57	92,45 %	100,00 %	0,17	98,11 %	28,57 %
3,01	90,57 %	100,00 %	0,51	94,34 %	90,00 %
4,14	84,91 %	100,00 %	0,57	94,34 %	95,71 %
5,06	81,13 %	100,00 %	0,79	90,57 %	98,57 %
10,00	60,38 %	100,00 %	0,98	84,91 %	100,00 %

Tableau VI : Sensibilités et spécificités de Sérion et ImmunoCap en fonction du seuil.

Sérion (Seuil)	Sensibilité	Spécificité	ImmunoCap (Seuil)	Sensibilité	Spécificité
< 30	100,00 %	0,00 %	2,17	100,00 %	7,14 %
31,33	88,68 %	90,00 %	5,68	98,11 %	32,86 %
40,42	81,13 %	91,43 %	6,9	96,23 %	40,00 %
49,89	77,36 %	94,29 %	15	90,57 %	68,57 %
71,05	66,04 %	97,14 %	27,2	81,13 %	87,14 %
76,58	66,04 %	100,00 %	38	71,70 %	90,00 %
149,42	43,40 %	100,00 %	106	24,53 %	100,00 %

Après avoir redéfini les seuils pour chacune des techniques de dépistage, la répartition des résultats dans notre population d'étude est représentée dans le Tableau VII.

Tableau VII : Nombre de sérums positifs et négatifs pour chaque EIA avec des seuils optimaux.
(Nombre de malades pour chaque cas, N = 53)

Réactifs	Négatif (malade)	Positif (malade)
Biorad	74 (4)	49 (49)
Bordier	70 (3)	53 (50)
Sérion	69 (6)	54 (48)
ImmunoCap	53 (5)	70 (48)

Le Tableau VIII ci-après, représente les sensibilités et spécificités avec les nouveaux seuils. La quasi totalité des tests a obtenu un gain significatif de sensibilité par rapport au seuil fournisseur (Biorad $p = 0,0120$; Sérion $p = 0,0472$; ImmunoCap $p = 0,0001$). Pour Bordier, seule une tendance à l'amélioration a pu être mise en évidence ($p = 0,0562$). Avec ces nouveaux seuils, il n'y a plus de différence significative de sensibilité entre les différents réactifs. L'augmentation de la sensibilité est associée à une diminution de la spécificité pour Bordier et Sérion. Ces dernières restent à un niveau acceptable, c'est-à-dire $\geq 90\%$. Pour Bordier, elle est significativement meilleure que pour Sérion ($p = 0,04$), les deux étant significativement plus basses que celle de Biorad qui conserve 100 % de spécificité

(p = 0,01). En ce qui concerne ImmunoCap, l'amélioration significative de la sensibilité entraîne une diminution drastique de la spécificité (68,57 %, p < 0,001).

Tableau VIII: Sensibilités et spécificités de chaque réactif avec les nouveaux seuils.

Réactifs	Sensibilité % [IC _{95%}]	Spécificité % [IC _{95%}]
Biorad		
Positive ≥ 5	83,0 [76,4-89,6]	100 [100-100]
Positive ≥ 2,57	92,5 [87,8-97,1]	100 [100-100]
Bordier		
Positive ≥ 0,8	88,7 [83,1-94,3]	98,6 [96,5-100]
Positive ≥ 0,57	94,3 [84,3-98,8]	95,71 [92,1-99,3]
Sérion		
Positive ≥ 50	77,4 [70,0-84,7]	95,71 [92,1-99,3]
Positive ≥ 31,33	88,7 [83,1-94,3]	90 [79,3-96,9]
ImmunoCap		
Positive ≥ 40	71,7 [63,7-79,7]	91,4 [86,5-96,4]
Positive ≥ 15	90,6 [85,4-95,7]	68,6 [60,4-76,8]

Le Tableau IX représente la répartition des résultats avec les nouveaux seuils en comparaison aux anciens seuils.

Tableau IX : Nombre de négatifs, douteux et positifs pour chaque technique avec les nouveaux et anciens seuils (Nombre de malades pour chaque cas, N=53)

Réactifs	Négatif (malade)	Douteux (malade)	Positif (malade)
Biorad			
Ancien seuil	79 (9)	9 (9)	35 (35)
Nouveau seuil	74 (4)	NA	49 (49)
Bordier			
Ancien seuil	75 (6)	4 (3)	44 (44)
Nouveau seuil	70 (3)	NA	53 (50)
Sérion			
Ancien seuil	79 (12)	7 (6)	37 (35)
Nouveau seuil	69 (6)	NA	54 (47)
ImmunoCap			
Ancien seuil	79 (15)	NA	44 (38)
Nouveau seuil	53 (5)	NA	70 (48)

L'optimisation du seuil afin de gagner en sensibilité, entraîne une augmentation significative du nombre de test de confirmation pour ImmunoCap (44 aux anciens seuils versus 70 aux nouveaux seuils, p = 0,001).

Le Tableau X ci-après, représente les valeurs de sensibilités, aux nouveaux seuils, par catégories de malades (colonisation, APC ou ABPA). Pour un même réactif, la sensibilité varie selon le groupe auquel appartient le malade. Au sein du groupe des sujets colonisés, les sensibilités de Bordier et ImmunoCap ne sont pas significativement différentes de Biorad mais elles ont une tendance à être supérieures à celle de Sérion (p = 0,051). Parmi le groupe des APC, Bordier et Biorad sont significativement plus sensibles que Sérion et ImmunoCap (p = 0,001). Les sensibilités des réactifs Biorad et Sérion chez les patients at-

teints d'une ABPA, sont significativement supérieures à celles de Bordier et ImmunoCap ($p = 0,003$).

Tableau X : Sensibilités aux nouveaux seuils et par catégories de malades.

Réactifs	Groupe « Colonisation » Sensibilités % [IC _{95%}]	Groupe « APC » Sensibilités % [IC _{95%}]	Groupe « ABPA » Sensibilités % [IC _{95%}]
Biorad	85,2 [78,1 - 92,3]	100 [100 - 100]	100 [100 - 100]
Bordier	88,9 [82,6 - 95,1]	100 [100 - 100]	93,3 [88 - 98,6]
Sérion	81,5 [73,8 - 89,2]	90,9 [84,7 - 97,1]	100 [100 - 100]
ImmunoCap	88,9 [82,6 - 95,1]	90,9 [84,7 - 97,2]	93,3 [88 - 98,6]

2. Tests préconisés pour la confirmation

L'IEP et le WB sont tout deux des tests préconisés pour la confirmation. Comme vu précédemment dans le Tableau IV, ces deux tests possèdent une spécificité de 100%. La sensibilité du WB LDBio est significativement supérieure à celle de l'IEP lorsqu'elle est considérée comme positive à partir de trois arcs et/ou catalase positive (88,7 % [83,1-94,3] versus 71,7 % [63,7-79,7], $p < 0,001$). Si le seuil de positivité est abaissé au niveau de la zone douteuse (au moins 1 arc pour un des Ag), il est possible de faire de l'IEP un test parfait avec 100% de sensibilité et 100% de spécificité. Comme nous montre le Tableau XI, le choix d'une positivité pour l'IEP à un seul arc de précipitation qu'il soit somatique ou métabolique garantit des sensibilités proches de 100% avec une spécificité toujours parfaite de 100%. La fréquence de catalase positive dans le groupe « APC » est significativement supérieure à celle du reste des malades, tout groupe confondu (54,5 % [25,1-84,0] versus 21,4 % [9,0-33,4], $p = 0,03$).

Tableau XI : Sensibilités et spécificités en fonction du nombre d'arcs somatiques et métaboliques.

IEP Nombre d'arcs somatiques			IEP Nombre d'arcs métaboliques		
Nombre d'arcs somatiques	Sensibilité	Spécificité	Nombre d'arcs métaboliques	Sensibilité	Spécificité
0	100.00 %	0.00 %	0	100.00 %	0.00 %
1	98.11 %	100.00 %	1	98.11 %	100.00 %
2	75.47 %	100.00 %	2	79.25 %	100.00 %
3	62.26 %	100.00 %	3	62.26 %	100.00 %

3. Performances de l'ICT LDBio

Sur les 123 sérums analysés, tous les tests ont présenté la bande bleue contrôle. Un résultat concordant avec les quatre EIA et l'ICT LDBio a été trouvé pour 93 sérums et pour 85 sérums entre l'ICT LDBio, le WB LDBio et l'IEP. Soit une concordance de 75,6 % [68,0-83,2] avec les techniques de dépistage et de 69,11 % [60,9-77,3] avec les techniques de confirmation. Comme montré dans le Tableau IV, au seuil fournisseur, les douteux étant considérés comme positifs, la sensibilité de l'ICT LDBio est significativement supérieure à celle d'ImmunoCap ($p = 0,012$) et n'est pas différente de celles de Biorad, Bordier ou de Sérion.

La spécificité de l'ICT est significativement inférieure à celles des tests de confirmation ($p = 0,029$). Lorsque les paramètres de performances de l'ICT LDBio sont comparés à ceux des techniques avec les nouveaux seuils, la sensibilité de Bordier devient statistiquement supérieure ($p = 0,016$) à celle de l'ICT LDBio et on observe une tendance à la supériorité de Biorad ($p = 0,06$). La sensibilité de l'ICT LDBio n'est plus statistiquement supérieure à celle d'ImmunoCap ($p = 0,17$) et reste inchangée par rapport à celle de Sérion ($p = 0,38$).

IV. Discussion

Cette étude présente une comparaison des performances analytiques de sept réactifs, préconisés en dépistage ou en confirmation, pour la détection d'IgG anti-*Aspergillus* dans une cohorte de sujets immunocompétents sains, colonisés par *Aspergillus* ou atteints d'APC ou d'ABPA. Pour le dépistage de ces patients, les ASC des réactifs Biorad, Bordier et Sérion montrent qu'ils sont suffisamment performants pour pouvoir être utilisés en routine de dépistage, avec une tendance à la supériorité de Bordier par rapport à Sérion, Biorad n'étant différent ni de l'un ni de l'autre. Le réactif ImmunoCap présente des performances significativement moindres dans cette cohorte. Dans tous les cas, les seuils fournisseurs ne paraissent pas optimaux pour cette population et nécessitent d'être adaptés par l'utilisateur. Pour les techniques de confirmation, WB LDBio et IEP présentent une spécificité optimale. La sensibilité de l'IEP peut être améliorée par une modification des seuils et la présence d'une activité catalasique semble être un argument en faveur d'une APC plutôt que d'une ABPA ou d'une colonisation. L'ICT LDBio en cours de commercialisation montre une sensibilité semblable aux tests de dépistage au seuil fournisseur et une spécificité comparable aux techniques de confirmation remplissant ainsi les objectifs posés par le fabricant.

Une des principales limites de notre étude est le manque de puissance dû à un effectif insuffisant. Ainsi certaines tendances à la différence n'ont pas pu être confirmées statistiquement. Nous pouvons aussi craindre un biais de sélection des patients, cette dernière se basant sur le codage PMSI des praticiens qui peut avoir été erroné ou avoir manqué d'exhaustivité et qui s'est probablement basé, du moins en partie sur le résultat des examens biologiques. Le retour au dossier clinique des patients malades n'a pas permis de recueillir les données thérapeutiques qui auraient pu avoir une influence sur les résultats des tests biologiques.

Pour le dépistage, Bordier, Biorad et Sérion montrent des performances significativement supérieures à celle d'ImmunoCap. Biorad semble être aussi performant que Sérion et Bordier, ce dernier montrant une tendance à la supériorité par rapport à Sérion. Cette tendance est confortée par l'étude de Dumollard *et al.* qui montre, dans une cohorte de 352 patients, une supériorité significative de Bordier par rapport à Biorad et Sérion⁵⁴. Dans la littérature, les études sur les performances analytiques de ces réactifs montrent

des niveaux de performances, aux seuils fournisseurs supérieurs, à ceux que nous avons retrouvés. Dans l'étude de Baxter *et al.* qui avance des sensibilités de 97 et 93 % pour ImmunoCap et Biorad⁴², respectivement, les sensibilités sont calculées par rapport au résultat d'une technique d'immunoprécipitation par contreimmunoélectrophorèse, réputée peu sensible. Ces sensibilités se rapprochent de celles de notre étude lorsqu'elles sont calculées par rapport au diagnostic clinique des patients, soit 85 et 86 %, respectivement. Dans l'étude de Guitard *et al.* portant sur les réactifs Biorad et Sérion, les sensibilités rapportées aux seuils fournisseur sont également supérieures aux nôtres et varient en fonction de la prise en compte des résultats douteux comme positifs ou comme négatifs⁴¹. Dans cette étude, les résultats du groupe « colonisation » n'influent pas sur les valeurs de sensibilités des réactifs testés, car ces patients sont positionnés dans le groupe des patients témoins. Cette entité clinique ne bénéficie pas, à l'heure actuelle, d'une définition consensuelle mais différents auteurs ont montré^{55,56,57} qu'elle pouvait faire le lit des APC et des APA. Il nous a donc semblé important de les prendre en compte, en tant que groupe malade. Nous avons, ainsi, montré que les taux d'IgG sont significativement plus faibles dans le groupe « colonisation » par rapport au groupe « ABPA » pour Sérion et par rapport au groupe « APC » pour Biorad. Des résultats similaires sont retrouvés dans l'étude de Baxter *et al.* évoquée ci dessus⁴². Au sein des sujets atteints par la mucoviscidose, les taux d'IgG avec Biorad sont significativement inférieurs chez les patients atteints de mucoviscidose par rapport à ceux qui ne présentent pas cette maladie. Chez les patients atteints de mucoviscidose, les résultats du dosage sont douteux ou négatifs dans 50 % des cas. De plus, comme rapporté par Baxter *et al.*, Biorad présente un inconvénient majeur lié à ses limites de linéarité. Cette technique est celle qui a retrouvé le plus de sérums en dehors de la limite supérieure de linéarité, obligeant à la réalisation d'un test supplémentaire pour connaître le titre exact des anticorps. Sérion et ImmunoCap présentent aussi cet écueil de linéarité, entraînant le rendu d'un résultat « > à » à la place d'un titre exact. Cet inconvénient rend difficile le monitoring des patients.

Dans notre travail, nous proposons un abaissement des seuils des techniques immunoenzymatiques afin d'augmenter la sensibilité du dépistage. La valeur déterminée à l'aide des courbes ROC correspondrait au seuil de déclenchement de la technique de confirmation. Deux études réalisées par Page *et al.* confortent nos résultats sur la nécessité d'une adaptation des seuils^{58,59}. Dans la première étude réalisée en 2016, six réactifs parmi lesquels figuraient Sérion et Immunocap ont été comparés. Page *et al.* proposaient des seuils optimaux, inférieurs aux seuils fournisseurs, à 35 UA/mL pour Sérion et 20 mg/L pour Im-

munocap. Dans une seconde étude plus récente, les seuils optimaux retrouvés étaient à 50 UA/mL pour Sérion, 50 mg/L pour ImmunoCap et 1,5 UA/mL pour Biorad, valeur inférieure à la limite de quantification basse. Au sein de ces deux études, les valeurs de sensibilité et spécificité aux seuils optimaux sont différentes de celles retrouvées dans notre travail. Ces différences pourraient être expliquées par la constitution de la population d'étude, aussi bien dans le groupe malade que dans le groupe témoin. Les valeurs correspondant aux seuils optimaux de chaque technique pourraient varier entre les différentes formes d'aspergilloses pulmonaires et les populations étudiées.

Pour les réactifs préconisés pour l'étape de confirmation, le WB LDBio a montré une spécificité excellente et identique à celle de l'IEP. De plus, si, pour l'IEP, les sérums douteux ne sont pas inclus dans la zone grise, le WB LDBio présente une sensibilité significativement supérieure. L'étude d'Olivia *et al.* montre des résultats similaires lors de la comparaison du WB LDBio à leur technique d'immunoprécipitation⁵² parmi une population de sujets APC, ABPA et colonisés. Ce réactif représente un test de confirmation avantageux qui permet de s'affranchir des contraintes inhérentes à l'IEP puisqu'il fournit un résultat plus rapidement et bénéficie d'une possibilité de semi-automatisation. Cependant, si, pour l'IEP, le seuil de positivité est abaissé au niveau du seuil d'entrée dans la zone grise actuelle, l'intégralité des sujets malades et non malades sont correctement classés avec 100 % de sensibilité et 100 % de spécificité. Ces résultats confirment son statut de technique de référence pour la recherche des Ac spécifiques anti-*Aspergillus*. Cette capacité de discrimination des sujets malades vis-à-vis des sujets non malades repose sur la recherche d'arcs de précipitation protéiques métaboliques et somatiques couplée à celle d'arcs porteurs d'une activité catalasique. Comme décrit dans une étude de Borron *et al.*, la spécificité de l'IEP est remarquable (100 %) quelque soit le type d'arcs protéiques recherchés⁶⁰. La présence de la catalase est, comme le confirme nos résultats, beaucoup plus fréquemment retrouvée dans les APC⁶¹. La détection de ce facteur de virulence est hautement spécifique d'une atteinte fongique. Par rapport à l'activité chymotrypsique qui n'est plus recherchée, l'activité catalasique est plus sensible, de réalisation facile et peu onéreuse.

Les qualités de l'ICT LDBio semblent globalement remplir les critères ASSURED fixés au moment de son développement. Cependant, les critères « facile d'utilisation », « abordable », « à la disposition de ceux qui en ont besoin » pourraient être pris en défaut. En


effet, l'apparition d'une bande de positivité discrète rend parfois difficile l'interprétation du test. De plus, son conditionnement unitaire risque d'être à l'origine de tarifs de vente plus élevés que ceux des autres techniques de dépistage. Par ailleurs, il s'agit d'un test qualitatif ne répondant pas aux nouvelles préconisations de l'HAS en termes de monitoring. Ce test ne pourra probablement pas être proposé à des structures recevant un nombre important de demande de dépistage sérologique des maladies aspergillaires.

V. Conclusion

Parmi les tests préconisés pour le dépistage, les réactifs étudiés ont montré des performances analytiques hétérogènes et peu adaptées, aux seuils spécifiés par les fournisseurs, pour un screening efficace des patients atteints par une APC ou une APA. Ces variations de performances sont également présentes au sein d'un même réactif en fonction des formes cliniques de maladies aspergillaires. L'obtention de caractéristiques analytiques optimales doit passer par une adaptation des seuils en fonction du type de population recrutée au sein du LBM.

A l'heure actuelle, au vu de l'hétérogénéité des résultats présentés dans la littérature, la comparaison des différents réactifs utilisés pour le dépistage nécessite la réalisation d'études prospectives de plus grande échelle. Pour pouvoir mener à bien ce type d'études, des définitions claires et consensuelles des différentes entités aspergillaires, et particulièrement de la colonisation, devront être établies pour limiter les biais de classement des patients.

Pour les patients qui ont bénéficié d'un traitement chirurgical (résection d'un aspergillome) ou médicamenteux (ABPA ou APC inopérable), il serait intéressant d'étudier l'évolution des taux d'IgG anti-*Aspergillus* afin de suivre leur cinétique et de déterminer si elle peut être utilisée comme critère d'efficacité thérapeutique.



Professeur A. BERRY
PU-PH - Chef de Service
Parasitologie - Mycologie
Institut Fédératif de Biologie
Place du Dr Baylac - TSA 40031
31059 TOULOUSE Cedex 9

Toulouse, le 21.11.2018



Vu permis d'imprimer
Le Doyen de la Faculté
de médecine Rangueil
Èlle SERRANO

Bibliographie

1. Denning, D. W. & Perlin, D. S. Azole resistance in *Aspergillus* : a growing public health menace. *Future Microbiology* **6**, 1229–1232 (2011).
2. Paul Benkimoun. L'aspergillose, une maladie respiratoire méconnue. (2018).
3. Page, I. D., Richardson, M. & Denning, D. W. Antibody testing in aspergillosis--quo vadis? *Med. Mycol.* **53**, 417–439 (2015).
4. Latgé, J. P. *Aspergillus fumigatus* and aspergillosis. *Clin. Microbiol. Rev.* **12**, 310–350 (1999).
5. Yamamoto, N. *et al.* Particle-size distributions and seasonal diversity of allergenic and pathogenic fungi in outdoor air. *ISME J* **6**, 1801–1811 (2012).
6. Buffaz, C. *Parasitologie et mycologie médicale pratique*. (2014).
7. Hedayati, M. T., Pasqualotto, A. C., Warn, P. A., Bowyer, P. & Denning, D. W. *Aspergillus flavus*: human pathogen, allergen and mycotoxin producer. *Microbiology* **153**, 1677–1692 (2007).
8. Latgé, J. P. The pathobiology of *Aspergillus fumigatus*. *Trends Microbiol.* **9**, 382–389 (2001).
9. Morin, O. *Aspergillus et aspergillose : biologie*. EM-Consulte 2003.
10. Latgé, J. P. *et al.* Specific molecular features in the organization and biosynthesis of the cell wall of *Aspergillus fumigatus*. *Medical Mycology* **43**, 15–22 (2005).
11. Aimanianda, V. & Latgé, J.-P. Fungal hydrophobins form a sheath preventing immune recognition of airborne conidia. *Virulence* **1**, 185–187 (2010).
12. Brakhage, A. A. & Liebmann, B. *Aspergillus fumigatus* conidial pigment and cAMP signal transduction: significance for virulence. *Medical Mycology* **43**, 75–82 (2005).

13. Paris, S. *et al.* Catalases of *Aspergillus fumigatus*. *Infection and Immunity* **71**, 3551–3562 (2003).
14. Pahl, H. L. The immunosuppressive fungal metabolite gliotoxin specifically inhibits its transcription factor NF-kappaB. *Journal of Experimental Medicine* **183**, 1829–1840 (1996).
15. Beauvais, A., Fontaine, T., Aimanianda, V. & Latgé, J.-P. *Aspergillus* cell wall and biofilm. *Mycopathologia* **178**, 371–377 (2014).
16. Abad, A. *et al.* What makes *Aspergillus fumigatus* a successful pathogen? Genes and molecules involved in invasive aspergillosis. *Rev Iberoam Micol* **27**, 155–182 (2010).
17. Uffredi, M. L., Mangiapan, G., Cadranel, J. & Kac, G. Significance of *Aspergillus fumigatus* isolation from respiratory specimens of nongranulocytopenic patients. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **22**, 457–462 (2003).
18. Jubin, V., Ranque, S., Stremmer Le Bel, N., Sarles, J. & Dubus, J.-C. Risk factors for *Aspergillus* colonization and allergic bronchopulmonary aspergillosis in children with cystic fibrosis. *Pediatr. Pulmonol.* **45**, 764–771 (2010).
19. Denning, D. W. *et al.* Chronic pulmonary aspergillosis: rationale and clinical guidelines for diagnosis and management. *Eur. Respir. J.* **47**, 45–68 (2016).
20. Agarwal, R. *et al.* Allergic bronchopulmonary aspergillosis: review of literature and proposal of new diagnostic and classification criteria. *Clin. Exp. Allergy* **43**, 850–873 (2013).
21. Kosmidis, C. & Denning, D. W. The clinical spectrum of pulmonary aspergillosis. *Thorax* **70**, 270–277 (2015).
22. Gangneux, J.-P. *et al.* An estimation of burden of serious fungal infections in France. *Journal de Mycologie Médicale* **26**, 385–390 (2016).

23. Smith, N. L. & Denning, D. W. Underlying conditions in chronic pulmonary aspergillosis including simple aspergilloma. *Eur. Respir. J.* **37**, 865–872 (2011).
24. Godet, C., Philippe, B., Laurent, F. & Cadranel, J. Chronic Pulmonary Aspergillosis: An Update on Diagnosis and Treatment. *Respiration* **88**, 162–174 (2014).
25. Segal, B. H. Aspergillosis. *New England Journal of Medicine* **360**, 1870–1884 (2009).
26. Denning, D. W., Riniotis, K., Dobrashian, R. & Sambatakou, H. Chronic cavitary and fibrosing pulmonary and pleural aspergillosis: case series, proposed nomenclature change, and review. *Clin. Infect. Dis.* **37 Suppl 3**, S265-280 (2003).
27. Patterson, T. F. *et al.* Practice Guidelines for the Diagnosis and Management of Aspergillosis: 2016 Update by the Infectious Diseases Society of America. *Clinical Infectious Diseases* **63**, e1–e60 (2016).
28. Shah, A. & Panjabi, C. Allergic Bronchopulmonary Aspergillosis: A Perplexing Clinical Entity. *Allergy Asthma Immunol Res* **8**, 282–297 (2016).
29. Mohr, L. C. Hypersensitivity pneumonitis: *Current Opinion in Pulmonary Medicine* **10**, 401–411 (2004).
30. Botterel F, Lachaud L, Pozzetto B, Toro A, Wallet F. Infections broncho-pulmonaires (hors tuberculose et mucoviscidose). in *Société française de microbiologie, ed. Remic 2015. Paris: SFM; 2015*
31. Persat, F. Sérologie aspergillaire, d’hier à aujourd’hui pour demain. *Journal de Mycologie Médicale* **22**, 72–82 (2012).
32. Persat, F., Hennequin, C., Gangneux, J. P. & for the Société Française de Mycologie Médicale – SFMM Study group. *Aspergillus* antibody detection: diagnostic strategy and technical considerations from the Société Française de Mycologie Médicale

- (French Society for Medical Mycology) expert committee. *Medical Mycology* myw078 (2016).
33. Persat F, Ranque S. Intérêts et limites du sérodiagnostic fongique. *La Lettre de L'infectiologue* **24**, 8–18 (2009).
 34. Dee, T. H. Detection of *Aspergillus fumigatus* serum precipitins by counterimmunoelectrophoresis. *J. Clin. Microbiol.* **2**, 482–485 (1975).
 35. Gugnani, H. C., Reijula, K. E., Kurup, V. P. & Fink, J. N. Detection of IgG and IgE antibodies to *Aspergillus fumigatus* in human sera by immunogold assay. *Mycopathologia* **109**, 33–40 (1990).
 36. HAS : Actualisation des actes de biologie médicale relatifs au diagnostic des infections à *Aspergillus*. (2017).
 37. Ouchterlony. *Académie de Nantes* (2009). Available at: <http://www.pedagogie.ac-nantes.fr/sciences-de-la-vie-et-de-la-terre/enseignement/cycle-4/le-corps-humain-et-la-sante/relations-avec-le-monde-microbien/ouchterlony-681573.kjsp?RH=PER>.
 38. Warnock, D. W. Detection of *Aspergillus fumigatus* precipitins: a comparison of counter immunoelectrophoresis and double diffusion. *Journal of Clinical Pathology* **30**, 388–389 (1977).
 39. Sheehan, D. *Physical biochemistry: principles and applications*. (Wiley-Blackwell, 2009).
 40. Tran Van Ky, P., Biguet, J. & Fruit, J. [Localization and frequency of immunoelectrophoregram arcs produced by the serum of patients suffering from aspergillar mycetomas applied against *Aspergillus fumigatus* antigen]. *Rev Immunol Ther Antimicrob* **30**, 13–20 (1966).

41. Guitard, J., Sendid, B., Thorez, S., Gits, M. & Hennequin, C. Evaluation of a Recombinant Antigen-Based Enzyme Immunoassay for the Diagnosis of Noninvasive Aspergillosis. *Journal of Clinical Microbiology* **50**, 762–765 (2012).
42. Baxter, C. G. *et al.* Performance of two Aspergillus IgG EIA assays compared with the precipitin test in chronic and allergic aspergillosis. *Clin. Microbiol. Infect.* **19**, E197–204 (2013).
43. Bernstein, J. *et al.* Immunoblot analysis of sera from patients with allergic bronchopulmonary aspergillosis: Correlation with disease activity. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* **86**, 532–539 (1990).
44. Kurup, V. P. & Kumar, A. Immunodiagnosis of aspergillosis. *Clin. Microbiol. Rev.* **4**, 439–456 (1991).
45. Tönder, O. & Rödsæthier, M. Indirect haemagglutination for demonstration of antibodies to *Aspergillus fumigatus*. *Acta Pathol Microbiol Scand B Microbiol Immunol* **82**, 871–878 (1974).
46. HAS. *Actualisation des actes de biologie médicale relatifs au diagnostic des infections à Aspergillus.* (2017).
47. Hipp, S. S., Berns, D. S., Tompkins, V. & Buckley, H. R. Latex slide agglutination test for aspergillus antibodies. *Medical Mycology* **8**, 237–241 (1970).
48. Hearn, V. M., Wilson, E. V. & Mackenzie, D. W. R. *Aspergillus fumigatus* antigens used in the serodiagnosis of aspergillosis. *Zentralblatt für Bakteriologie, Mikrobiologie und Hygiene. Series A: Medical Microbiology, Infectious Diseases, Virology, Parasitology* **261**, 496–502 (1986).
49. Sarfati, J. *et al.* Recombinant antigens as diagnostic markers for aspergillosis. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* **55**, 279–291 (2006).

50. Raphaël Piarroux, Thomas Romain *et al.* Evaluation of a new immunochromatographic test for anti-Aspergillus antibodies detection: Preliminary results. in (2018).
51. Brun, S. *et al.* Comparaison du Western Blot et de l'immunoélectrophorèse pour le diagnostic sérologique des aspergilloses chroniques. *Journal de Mycologie Médicale* **25**, e108 (2015).
52. Oliva, A. *et al.* Evaluation of the Aspergillus Western Blot IgG Kit for Diagnosis of Chronic Aspergillosis. *Journal of Clinical Microbiology* **53**, 248–254 (2015).
53. Greiner, M., Pfeiffer, D. & Smith, R. . Principles and practical application of the receiver-operating characteristic analysis for diagnostic tests. *Preventive Veterinary Medicine* **45**, 23–41 (2000).
54. Dumollard, C. *et al.* Prospective Evaluation of a New Aspergillus IgG Enzyme Immunoassay Kit for Diagnosis of Chronic and Allergic Pulmonary Aspergillosis. *Journal of Clinical Microbiology* **54**, 1236–1242 (2016).
55. Shoseyov, D., Brownlee, K. G., Conway, S. P. & Kerem, E. Aspergillus Bronchitis in Cystic Fibrosis. *Chest* **130**, 222–226 (2006).
56. Amin, R., Dupuis, A., Aaron, S. D. & Ratjen, F. The Effect of Chronic Infection With *Aspergillus fumigatus* on Lung Function and Hospitalization in Patients With Cystic Fibrosis. *Chest* **137**, 171–176 (2010).
57. Fillaux, J. Evaluation de la sensibilisation à *Aspergillus fumigatus* et du portage persistant comme facteurs de détérioration de la fonction respiratoire des patients atteints de mucoviscidose au CHU de Toulouse. (Toulouse, 2013).
58. Page, I. D., Richardson, M. D. & Denning, D. W. Comparison of six Aspergillus-specific IgG assays for the diagnosis of chronic pulmonary aspergillosis (CPA). *J. Infect.* **72**, 240–249 (2016).

59. Page, I. D. *et al.* Receiver operating characteristic curve analysis of four Aspergillus -specific IgG assays for the diagnosis of chronic pulmonary aspergillosis. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* **91**, 47–51 (2018).
60. Borron, F., Persat, F., Borel, E., Piens, M. A. & Mojon, M. Evaluation de l'immunoélectrophorèse rapide Paragon® (Beckman) appliqué au sérodiagnostic aspergillaire. *Journal de Mycologie Médicale* **4**, 221–225 (1994).
61. Schønheyder H, Jensen T, Laessøe IH, Høiby N, Koch C. Serum antibodies to Aspergillus fumigatus catalase in patients with cystic fibrosis. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases* **7**, 40–4 (1988).

AUTHOR : Damien VAINQUEUR

TITLE : SEROLOGICAL DIAGNOSIS OF CHRONIC AND ALLERGIC PULMONARY ASPERGILLOSIS IN
IMMUNOCOMPETENT PATIENTS : EVALUATION OF SEVEN REAGENTS

THESIS SUPERVISOR : Dr Judith FILLAUX

SUMMARY

Chronic and allergic pulmonary aspergillosis are diseases caused by fungi belonging to the genus *Aspergillus*. They affect more than three million people worldwide and serology is one of the necessary arguments for diagnosis. The detection of anti-*Aspergillus* IgG antibodies is based, according to the french recommendations on a two-step approach, combining a screening technique and, in case of positivity of the latter, a confirmation technique. Within these techniques, there is a diversity of reagents whose analytical performances have been little evaluated. The objective of this study was to compare the diagnostic performance of seven reagents in 123 immunocompetent subjects. Among the tests recommended for screening, the reagents Biorad[®], Bordier[®], Serion[®] and ImmunoCap[®] show heterogeneous analytical performances at the thresholds specified by the suppliers, not adapted to an effective screening. In order for them to be used in routine screening, their performance can be improved by modifying their positivity thresholds. For confirmatory assays, WB LDBio[®] and IEP have optimal specificity and the sensitivity of IEP can be improved by changing the positivity threshold. The LDBio[®] ICT is a reagent being evaluated that shows a sensitivity comparable to screening tests and a specificity similar to those of confirmatory tests.

AUTEUR : Damien VAINQUEUR

TITRE : DIAGNOSTIC SÉROLOGIQUE DES ASPERGILLOSES PULMONAIRES CHRONIQUES ET ALLERGIQUES CHEZ L'IMMUNOCOMPÉTENT : ÉVALUATION DE SEPT RÉACTIFS

DIRECTEUR DE THESE : Dr Judith FILLAUX

LIEU ET DATE DE SOUTENANCE : FACULTÉ DE MÉDECINE RANGUEIL LE 11 DÉCEMBRE 2018

RESUME

Les aspergilloses pulmonaires chroniques et allergiques sont des maladies causées par des champignons appartenant au genre *Aspergillus*. Elles touchent plus de trois millions d'individus dans le monde et la sérologie fait partie des arguments nécessaires au diagnostic. La détection des anticorps spécifiques de type IgG anti-*Aspergillus* repose, selon les préconisations sur une démarche en deux temps, associant une technique de dépistage et, en cas de positivité de cette dernière, une technique de confirmation. Au sein de ces techniques, il existe une diversité de réactifs dont les performances analytiques ont été peu évaluées. L'objectif de cette étude était de comparer les performances diagnostiques de sept réactifs chez 123 sujets immunocompétents. Parmi les tests préconisés pour le dépistage, les réactifs Biorad[®], Bordier[®], Sérion[®] et ImmunoCap[®] montrent des performances analytiques hétérogènes aux seuils spécifiés par les fournisseurs, non adaptées à un dépistage efficace. Afin qu'ils puissent être utilisés en routine de dépistage, leurs performances peuvent être améliorées par modification de leurs seuils de positivité. Pour les tests de confirmation, le WB LDBio[®] et l'IEP ont une spécificité optimale et la sensibilité de l'IEP peut être améliorée par un changement du seuil de positivité. L'ICT LDBio[®] est un réactif en cours d'évaluation qui montre une sensibilité comparable aux tests de dépistage et une spécificité semblable à celles des tests de confirmation.

Titre et résumé en anglais : voir au recto de la dernière page

MOTS-CLES : *Aspergillus* - aspergillose pulmonaire - immunocompétent - IgG - sérodiagnostic - techniques immunoenzymatiques - ELISA - FEIA - Biorad[®] - Bordier[®] - Sérion[®] - Phadia[®] - Western Blot - immunochromatographie - LDBio Diagnostics[®]

DISCIPLINE ADMINISTRATIVE : BIOLOGIE MÉDICALE

INTITULE ET ADRESSE DE L'U.F.R. OU DU LABORATOIRE :

Faculté de Médecine Rangueil – 133 route de Narbonne – 31062 TOULOUSE Cedex 04 – France